



HAL
open science

Effets de la lumière bleue et du champ magnétique sur la synthèse des ROS par le cryptochrome

Louis-David Arthaut

► **To cite this version:**

Louis-David Arthaut. Effets de la lumière bleue et du champ magnétique sur la synthèse des ROS par le cryptochrome. Biologie moléculaire. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS400 . tel-02885958

HAL Id: tel-02885958

<https://theses.hal.science/tel-02885958>

Submitted on 1 Jul 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole Doctorale 515 : Complexité du Vivant
Discipline : Biologie moléculaire, photobiologie

Années 2015-2018

**Effet de la lumière bleue et du champ magnétique sur la
synthèse des ROS par le cryptochrome**

Thèse de Doctorat

Pour obtenir le titre de :

Docteur de Sorbonne Université

Par **Louis-David Arthaut**

Dirigée par :

Dr. Margaret Ahmad : Sorbonne Université

Dr Carlos Martino : Florida Institute of Technology

Rapporteurs :

Dr Laura Baciou : Université Paris Sud

Dr Robert Usselman : Montana State University

Composition du jury :

Pr Codjo Hountondji : Sorbonne Université

Dr Laura Baciou : Université Paris Sud

Dr Baldissera Giovani : Supbiotech

Dr Margaret Ahmad : Sorbonne Université

RESUME EN FRANÇAIS

Introduction :

Les cryptochromes sont des photorécepteurs qui absorbent la lumière bleue. On les trouve chez les animaux et les plantes, ils ont de multiples rôles de signalisation. Ils permettent de réguler la croissance, le développement, les rythmes circadiens ou encore le stress. Leur activation par la lumière bleue se traduit au niveau biochimique par la photoréduction d'un cofacteur qui leur est associé : la flavine, ce qui déclenche ensuite un changement conformationnel du domaine C-terminal qui permettra la liaison des cryptochromes à de multiples partenaires responsables de la signalisation. Aujourd'hui la recherche sur le fonctionnement des cryptochromes s'appuie sur de nouveaux champs d'étude, parmi ceux-ci figurent leur lien avec les ROS ainsi que leur sensibilité aux champs magnétiques. Dans nos travaux nous montrons pour la première fois que les cryptochromes animaux peuvent, à l'instar des cryptochromes de plante, synthétiser directement certains ROS après activation par la lumière bleue, et que cette synthèse a un rôle de signalisation. Enfin nous avons mis en lien leur propriété de magnétoreception avec leur synthèse de ROS chez des modèles cellulaires animaux.

Résultats : (mes différents travaux sont regroupés en une série de 3 articles)

- ✓ Dans le premier article, nous avons étudié la synthèse des ROS induite par le cryptochrome de drosophile DmCRY sous l'effet de la lumière bleue. Pour cela nous avons utilisé un modèle de cellules d'insectes surexprimant DmCRY ainsi que la protéine DmCRY synthétisée et purifiée *in vitro*. Nous avons ainsi pu montrer une synthèse de ROS par DmCRY. Nous avons finalement suivi la photoréduction de cette protéine *in vitro* dans le but de déterminer certains paramètres cinétiques.
- ✓ Le second article reprend les travaux de **Consentino et al, 2015** qui avaient démontré, *in vitro* chez *A. thaliana* une synthèse de ROS par CRY1. Nous avons détecté *in vivo* toujours chez *A. thaliana* une accumulation des ROS dépendante des cryptochromes. Cette accumulation s'accompagne de régulations transcriptionnelles de gènes déjà connus pour être régulés par les ROS. Cette synthèse de ROS est indépendante de la liaison du cryptochrome à ses partenaires, et elle est réalisée par leur région N-terminale.
- ✓ Nos dernières études concernent les effets des champs magnétiques sur la capacité des cryptochromes à synthétiser des ROS. Nous avons pour cela utilisé des modèles cellulaires insectes et mammifères qui nous ont permis de mettre en évidence une augmentation de cette synthèse en présence de champs magnétiques, nous avons de plus corrélé ce phénomène avec une modification du comportement des drosophiles.

Conclusions et perspectives :

Nos résultats montrent que les cryptochromes, grâce à leur signalisation ROS, régulent la transcription en présence de lumière bleue et de champs magnétiques. Nous souhaiterions à présent identifier la région du cryptochrome responsable de la magnétoreception, déterminer si ces ROS ont un impact sur les partenaires protéiques par modification de certains résidus et enfin déterminer s'ils ont un rôle à jouer dans la longévité chez la drosophile.

ABSTRACT IN ENGLISH

Introduction :

Cryptochromes are photoreceptors that absorb blue light, they are found in animals and plants and have multiple signaling roles. In plants they can regulate growth, development, circadian rhythms or stress; in animals they also regulate circadian rhythms and stress responses. Their activation in the presence of blue light is reflected biochemically by the photoreduction of the flavin which is associated with these proteins, this cofactor then triggers a conformational change of the C-terminus domain that will allow the binding of cryptochromes to multiple partners responsible for signaling. Today, research on the functioning of cryptochromes is based on new fields of study, among them are their link with the ROS and their sensitivity to magnetic fields. In our work we show for the first time that animal cryptochromes can also directly synthesize some ROS after activation in blue light, and that this synthesis which is also observed in plants has a signaling role. Finally, we have linked their magnetoreception property with their ROS synthesis in animal cell models.

Results : my different works are grouped into a series of 3 articles :

- ✓ In the first article we studied the synthesis of ROS induced by *Drosophila* cryptochrome DmCRY under blue light conditions. For this we have used an insect cell model overexpressing DmCRY as well as in this work we were able to show a DmCRY dependent ROS accumulation in blue light both in cells and in purified protein. We have studied the synthesis of ROS in an insect cell model, but also in isolated DmCRY protein, and we finally followed the photoreduction of this protein *in vitro*.
- ✓ The second article resume the work of **Consentino et al, 2015**, we have detected a cryptochrome-dependent accumulation of ROS in *A. thaliana*. This accumulation is accompanied by several transcriptional regulations of ROS-regulated genes, and appears in our results as independent of the binding to the partners, but potentially linked to a direct synthesis of ROS in the N-terminal region.
- ✓ Our latest studies concern the effects of magnetic fields on the ability of cryptochromes to synthesize ROS. We have used insect and mammalian cellular models that have allowed us to show an increase in this synthesis in the presence of external magnetic fields, we have further correlated this phenomenon with a change in the behavior of *Drosophila*.

Conclusions and prospects :

Finally, our results show that cryptochromes thanks to their ROS signaling would regulate transcription in the presence of magnetic fields. It remains to be seen which region of the cryptochrome allows this magnetoreception, but also whether these ROS have an impact on the partners by redox modification, or on the longevity in *Drosophila*.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les différents membres du jury ici présents : Codjo Hountondji en tant que président, Baldissera Giovanni en tant qu'examineur, Laura Baciou et Margaret Ahmad. Je remercie tout particulièrement mes deux rapporteurs : Laura Baciou et Robert Usselman pour avoir accepté d'examiner l'ensemble de mon travail.

Je tiens ensuite à remercier très sincèrement le Dr Margaret Ahmad, ma directrice de thèse qui m'a accueilli dans son équipe il y a bientôt quatre ans afin d'y effectuer mon stage de Master 2, puis ma thèse. Elle m'a fait confiance depuis mon arrivée dans l'équipe et a toujours su m'apporter de précieux conseils. Elle a su me transmettre sa passion pour la science et la persévérance pour poursuivre dans ce métier. Je remercie de plus mon co-directeur de thèse Carlos Martino.

Je souhaite également remercier tous mes collègues ou amis présents et passés avec qui j'ai eu la chance de travailler durant ces années : Alain, Jérôme, Nathalie, Maria, Pierre-Etienne, Jacques, Karina, Stéphanie, Mohammed... Merci pour tous ces moments passés ensemble. Je remercie également tous les stagiaires ou doctorants avec qui j'ai eu la chance de travailler durant ma thèse et qui m'ont apporté leur aide à différents moments de mon projet de thèse : Baptiste, Blaise, Alan, Jordan, Manar, Kévin, Marootpong, Mesna, Merfat, Adam, Derek, Carlos, Joseph...

Encore merci également à l'école doctorale pour m'avoir autorisé à entreprendre avec enthousiasme ce travail de recherche, je remercie également Sorbonne Université ainsi que l'IBPS pour leur soutien logistique et administratif.

Je souhaite enfin remercier nos collaborateurs internationaux : Carlos Martino, Thorsten Ritz et Justin Link appartenant respectivement à l'Université Xavier, l'Institut de Technologie de Floride et l'Université de Californie à Irvine.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADN-T	: ADN transféré dans les plantes après infection par des bactéries pathogènes
A-Red	: Amplex Red (marqueur des espèces réactives de l'oxygène)
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
Atcry1	: Gène codant pour la protéine CRY1 d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
Atcry2	: Gène codant pour la protéine CRY2 d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	: Adénosine triphosphate
bHLH	: Basic helix loop helix (motif caractéristique de certains facteurs de transcription)
β-mer	: beta-mercaptoéthanol (agent réducteur)
BRWD3	: "Bromodomain and WD repeat domain containing 3", sous-unité d'un complexe d'ubiquitination chez <i>Drosophila melanogaster</i>
C1C2	: Plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> doubles mutantes nulles pour CRY1 et CRY2
CAB2::LUC	: Système d'expression de la luciférase sous le contrôle des rythmes circadiens
CIB1	: "Cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix 1" (partenaire de CRY2 d' <i>A. thaliana</i>)
CLK/CYC	: Dimère composé des protéines CLOCK et CYCLE chez <i>Drosophila melanogaster</i>
COP1	: "Constitutive photomorphogenic 1" (ubiquitine ligase chez <i>A. thaliana</i>)
CO	: CONSTANS, aussi connue comme "B-box domain protein 1" chez <i>A. thaliana</i>
CPD	: Type de photolyase "Cyclobutane Pyrimidine Dimère" réparant les dimères de pyrimidines
CRY1	: Protéine codée par le gène Atcry1 chez <i>A. thaliana</i>
CRY2	: Protéine codée par le gène Atcry2 chez <i>A. thaliana</i>
Cry b	: Drosophiles mutantes pour DmCRY empêchant la fixation de la FAD
CRY-DASH	: Famille de cryptochromes autre que les types I et II
C-ter	: Domaine Carboxy-terminal d'une protéine
CEMP	: Champ électromagnétique pulsé
CMT	: Champ magnétique terrestre
CRL1	: "Cullin4-RING Finger E3 Ligase" sous-unité des complexes d'ubiquitination
CTT	: "C-terminus tail", queue C-terminale des cryptochromes
DCFH-DA	: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacétate (marqueur des ROS)

dFOXO	: "Forkhead box, sub-group O"
DmCRY/CRY	: Unique cryptochrome de type I codé par <i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	: Diméthylsulfoxyde, un solvant utilisé comme perméabilisant
DTT	: Dithiothréitol, un agent réducteur
E-box	: "Enhancer box", séquence consensus de certains facteurs de transcription
FAD/FADox	: Flavine adénine dinucléotide, cofacteur d'oxydoréduction (forme oxydée)
FAD•-	: Flavine adénine dinucléotide réduite sous forme radicalaire anionique
FADH-	: Flavine sous forme totalement réduite anionique
FADH•	: Flavine sous forme totalement radicalaire neutre
FADH₂	: Flavine sous forme totalement réduite neutre
FT	: "FLOWERING LOCUS T", Facteur de transcription chez <i>A. thaliana</i>
G-box	: Séquence consensus permettant des régulations transcriptionnelles par la lumière
GBF1	: "G-box binding factor 1", facteur de transcription chez <i>A. thaliana</i>
H₂O₂	: Peroxyde d'hydrogène
hCRY1/HsCRY1	: Protéine codée par le gène CRY1 chez <i>Homo sapiens</i>
hCRY2/HsCRY2	: Protéine codée par le gène CRY2 chez <i>Homo sapiens</i>
HEK293	: "Human embryonic kidney", lignée cellulaire humaine
HOECHST	: Marqueur fluorescent de l'ADN
HY4	: Ancien nom du gène <i>Atcry1</i> / locus du chromosome 4 d' <i>A. thaliana</i>
HY5	: "ELONGATED HYPOCOTYL 5", facteur de transcription de type leucine zipper (<i>A. thaliana</i>)
HYH	: "HY5-homolog", homologue de HY5 (<i>A. thaliana</i>)
mCRY1	: Protéine codée par le gène <i>Cry1</i> chez <i>Mus musculus</i>
mCRY2	: Protéine codée par le gène <i>Cry2</i> chez <i>Mus musculus</i>
MTHF / ptérine	: 5,10-méthényltétrahydrofolate, cofacteur enzymatique des cryptochromes
MYC2	: Facteur de transcription de type bHLH chez <i>A. thaliana</i>
NAD⁺ / NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotide sous forme déprotonée/protonée
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, cofacteur d'oxydoréduction
NLS	: "Nuclear localization sequence", signal de localisation nucléaire
NOX	: NADPH oxydase, enzyme génératrice de ROS
NSC	: Noyaux suprachiasmatiques

$^1\text{O}_2$: Oxygène singulet, (ROS) état très réactif du dioxygène O_2
$\text{O}_2^{\bullet-}$: Ion superoxyde (ROS)
PDP1ϵ	: "PAR-domain protein 1 ϵ ", régulateur de CLK/CYC chez <i>Drosophila melanogaster</i>
PER	: Protéine codée par le gène period chez <i>Drosophila melanogaster</i>
PER2	: Protéine codée par le gène "period circadian regulator 2" chez Homo sapiens
PHR	: "Photolyase homology region", région homologue entre cryptochromes et photolyases
PHYA	: Protéine codée par le gène phytochrome A chez A. thaliana
PHYB	: Protéine codée par le gène phytochrome B chez A. thaliana
PIF3 / PIF4	: "Phytochrome interacting factor 3", facteur de transcription chez A. thaliana
qPCR	: Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
RBOH	: "Respiratory burst oxidase protein", enzyme génératrice de ROS
ROS	: "Reactive oxygen species", espèces réactives de l'oxygène
Sf21	: Lignée cellulaire provenant du légionnaire d'automne (<i>Spodoptera frugiperda</i>)
SLIMB	: "Supernumerary limbs", sous unité des complexes d'ubiquitination (<i>D. melanogaster</i>)
SOSG	: "Singlet oxygen sensor green", un marqueur fluorescent de l'oxygène singule
SPA1	: "Suppressor of PHYA-105 1", répresseur de la photomorphogénèse
TIM	: Protéine codée par le gène timeless chez <i>Drosophila Melanogaster</i>
Trp	: Tryptophane
Trp$^{\bullet+}$: Tryptophane sous forme radicalaire chargée positivement
UV	: Ultraviolet
VRI	: "Vrille", régulateur de CLK/CYC chez <i>Drosophila melanogaster</i>
WS	: Ecotype sauvage "Wassilewskija" (Russie) d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
WS01	: Plantules d'A.thaliana d'écotype WS surexprimant la protéine CRY1
WT	: "Wild type", type sauvage non mutant

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique cryptochromes / photolyase.....	p. 14
Figure 2 : Comparaison structurale cryptochromes / photolyases.....	p. 15
Figure 3 : Inhibition de l'élongation de l'hypocotyle par le cryptochrome.....	p. 17
Figure 4 : Expression cyclique de PER et TIM avec ou sans DmCRY.....	p. 18
Figure 5 : Structure générale des cryptochromes et des photolyases.....	p. 19
Figure 6 : Structure détaillée du domaine PHR des cryptochromes.....	p. 20
Figure 7 : Effet du cryptochrome sur les racines et le contenu en chlorophylle.....	p. 24
Figure 8 : Effet du cryptochrome sur les anthocyanes et l'hypocotyle.....	p. 25
Figure 9 : Déclenchement de la floraison par CRY2.....	p. 26
Figure 10 : Régulation des rythmes circadiens par les cryptochromes (<i>A. thaliana</i>).....	p. 27
Figure 11 : Régulation de l'ouverture des stomates par les cryptochromes.....	p. 28
Figure 12 : Signalisation de DmCRY chez la drosophile.....	p. 32
Figure 13 : Rôle de DmCRY dans le vieillissement chez la drosophile.....	p. 35
Figure 14 : Actogramme de souris sauvages ou mutantes pour mCRY1 et mCRY2.....	p. 37
Figure 15 : Signalisation des cryptochromes dans l'horloge circadienne des mammifères.....	p. 38
Figure 16 : Principaux rôles des cryptochromes chez les mammifères.....	p. 39
Figure 17 : Interconversions des formes redox de la flavine.....	p. 42
Figure 18 : Représentation des trois formes redox principales de la flavine.....	p. 42
Figure 19 : Suivi des spectres d'absorption des cryptochromes en lumière bleue.....	p. 43
Figure 20 : Emplacement et mécanismes de photoréduction des tryptophanes.....	p. 44
Figure 21 : Phosphorylation et liaison à l'ATP des cryptochromes chez <i>A. thaliana</i>	p. 48
Figure 22 : Structure et emplacement de la queue C-terminale des cryptochromes.....	p. 52
Figure 23 : Dépliement et liaison des cryptochromes à leurs partenaires (<i>A. thaliana</i>).....	p. 54
Figure 24 : Facteurs déclencheurs de la synthèse des ROS chez les végétaux.....	p. 57
Figure 25 : Circulation des ROS au sein et entre les cellules végétales.....	p. 59
Figure 26 : Modifications redox des groupements thiol par les ROS.....	p. 63
Figure 27 : Réactions théoriques expliquant la formation des ROS par les cryptochromes.....	p. 66
Figure 28 : Photocycle complet des cryptochromes (<i>A. thaliana</i>).....	p. 67

Figure 29 : Synthèse des ROS par les cryptochromes en cellule et en protéines isolées.....p. 68

Figure 30 : Rôle du champ magnétique et de la lumière sur l'orientation des oiseaux.....p. 72

Figure 31 : Mécanisme et effets des paires radicalaires sur l'équilibre réactionnel.....p. 74

Figure 32 : Implication des cryptochromes avec la théorie des paires radicalaires.....p. 76

TABLE DES MATIÈRES

A/ INTRODUCTION	p. 12
1. ASPECTS GENERAUX DES CRYPTOCHROMES	p. 13
1.1 Présentation générale	p. 13
1.1.1 La famille des cryptochromes / photolyases.....	p. 13
1.1.2 Découverte des cryptochromes.....	p. 16
1.1.3 Liaison à des cofacteurs et subdivision N-ter/C-ter.....	p. 19
1.2 Les cryptochromes chez les plantes	p. 22
1.2.1 Rôles des cryptochromes pour la croissance et le développement.....	p. 23
1.2.2 Rôles des cryptochromes au niveau physiologique.....	p. 26
1.2.3 Rôles des cryptochromes chez les végétaux autres qu' <i>Arabidopsis</i>	p. 29
1.3 Les cryptochromes chez les animaux	p. 30
1.3.1 Cryptochromes de type 1.....	p. 31
1.3.2 Cryptochromes de type 2.....	p. 36
2. CRYPTOCHROMES : ACTIVATION ET SIGNALISATION	p. 41
2.1 Activation du photocycle et réduction de la flavine	p. 41
2.1.1 Photoréduction de la flavine.....	p. 41
2.1.2 Rôle de la conformation protéique pour la photoréduction.....	p. 47
2.2 Signalisation et liaison à des partenaires	p. 50
2.2.1 Localisation cellulaire, stabilité et sensibilité.....	p. 50
2.2.2 Liaison à l'ATP et phosphorylation.....	p. 51
2.2.3 Liaison du cryptochrome aux partenaires.....	p. 53
3. NOUVEAUX ROLES DES CRYPTOCHROMES EN LIEN AVEC NOS TRAVAUX	p. 56
3.1 Rôle des cryptochromes dans le stress oxydatif	p. 56
3.1.1 Généralités sur les ROS chez les végétaux et les animaux.....	p. 56
3.1.1.1 Homéostasie et régulation dans la cellule.....	p. 56
3.1.1.2 Quelques effets des ROS au niveau de la cellule ou de l'organisme.....	p. 60
3.1.1.3 Mécanismes oxydatifs des ROS sur les protéines.....	p. 62
3.1.1.4 Méthodes pour la détection des ROS.....	p. 64
3.1.2 Implication des cryptochromes dans la signalisation ROS.....	p. 65
3.1.2.1 Mécanismes pour la synthèse des ROS par les cryptochromes.....	p. 66
3.1.2.2 Détection des ROS synthétisés pendant le photocycle.....	p. 67
3.2 Cryptochromes et champ magnétique	p. 70
3.2.1 Généralités sur les champs magnétiques.....	p. 70
3.2.2 Découverte des effets du champ magnétique sur les organismes vivants.....	p. 71
3.2.3 Mécanismes Théoriques expliquant les effets du champ magnétique.....	p. 73
3.2.4 Implication du cryptochrome dans la sensibilité au champ magnétique.....	p. 75
3.2.4.1 Théories pour la sensibilité magnétique des cryptochromes.....	p. 75
3.2.4.2 Détection des effets du champ magnétique sur les cryptochromes.....	p. 77
3.2.4.3 Lien entre cryptochromes, ROS et champs magnétiques.....	p. 79

4. Objectifs et approche expérimentale.....p. 80

B/ RESULTATS.....p. 83

ARTICLE 1.....p. 84

- 1. Introduction.....p. 84
- 2. Matériel et méthodes.....p. 85
- 3. Résultats.....p. 87
- 4. Discussion.....p. 90
- 5. Ma contribution à l'article.....p. 92
- 6. Version PDF.....p. 93 - 112

ARTICLE 2.....p. 113

- 1. Introduction.....p. 113
- 2. Matériel et méthodes.....p. 114
- 3. Résultats.....p. 116
- 4. Discussion.....p. 120
- 5. Ma contribution à l'article.....p. 124
- 6. Version PDF.....p. 124 - 136

ARTICLE 3.....p. 137

- 1. Introduction.....p. 137
- 2. Matériel et méthodes.....p. 138
- 3. Résultats.....p. 140
- 4. Discussion.....p. 142
- 5. Ma contribution à l'article.....p. 144
- 6. Version PDF.....p. 145 - 176

C/ CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....p. 177

- Conclusion générale**
- Limites rencontrées**
- Travaux complémentaires**

D/ BIBLIOGRAPHIE.....p. 183

INTRODUCTION

1. ASPECTS GENERAUX DES CRYPTOCHROMES

La lumière est la principale source d'énergie pour la photosynthèse, et induit des signaux qui régulent la croissance et le développement des plantes. Les cryptochromes sont des photorécepteurs qui absorbent la lumière bleue, on les retrouve chez les animaux et les plantes, ils ont de multiples rôles de signalisation. Ils ont été identifiés pour la première fois chez *Arabidopsis thaliana*, où ils jouent un rôle clé dans la croissance et le développement. Identifiés par la suite chez les procaryotes, les archées et de nombreux eucaryotes, les cryptochromes sont connus comme étant impliqués dans l'horloge circadienne animale et sont proposés comme magnétorécepteurs chez les oiseaux migrateurs.

Les cryptochromes sont structurellement apparentés aux photolyases, à partir desquelles ils ont évolué et avec lesquelles ils forment une famille de photorécepteurs flavoprotéiques.

1.1 Présentation générale

1.1.1 La famille des cryptochromes/photolyases

La famille des photolyases / cryptochromes est une des très rares familles de flavoprotéines capable d'utiliser l'énergie lumineuse afin de catalyser une réaction biochimique. Cette famille de gènes photoactifs est vaste et diversifiée dans tout le règne du vivant, des archées aux mammifères. Elle regroupe des protéines d'une taille de 50 à 80kD pour 500 à 700 acides aminés de long, elles sont toutes liées à deux chromophores comme cofacteur : une ptérine (MTHF ou méthényltétrahydrofolate) et une flavine (FAD ou flavine adénine dinucléotide). Les photolyases, activées par l'énergie lumineuse, sont des enzymes qui réparent l'ADN endommagé par les UV sans induire de signaux de transduction. La découverte du mécanisme de réparation de l'ADN par les photolyases a d'ailleurs été récompensée par le prix Nobel de chimie en 2015. Les cryptochromes, en revanche, fonctionnent comme des molécules de signalisation qui régulent diverses réponses biologiques telles que l'entraînement des rythmes circadiens chez les plantes et les animaux.

Trois grandes catégories de protéines sont représentées par cette famille :

- Les photolyases de dimères cyclobutane pyrimidine (CPD)
- Les photolyases pour les dimères pyrimidine-pyrimidone (photoproduits 6-4)
- Les cryptochromes (CRY)

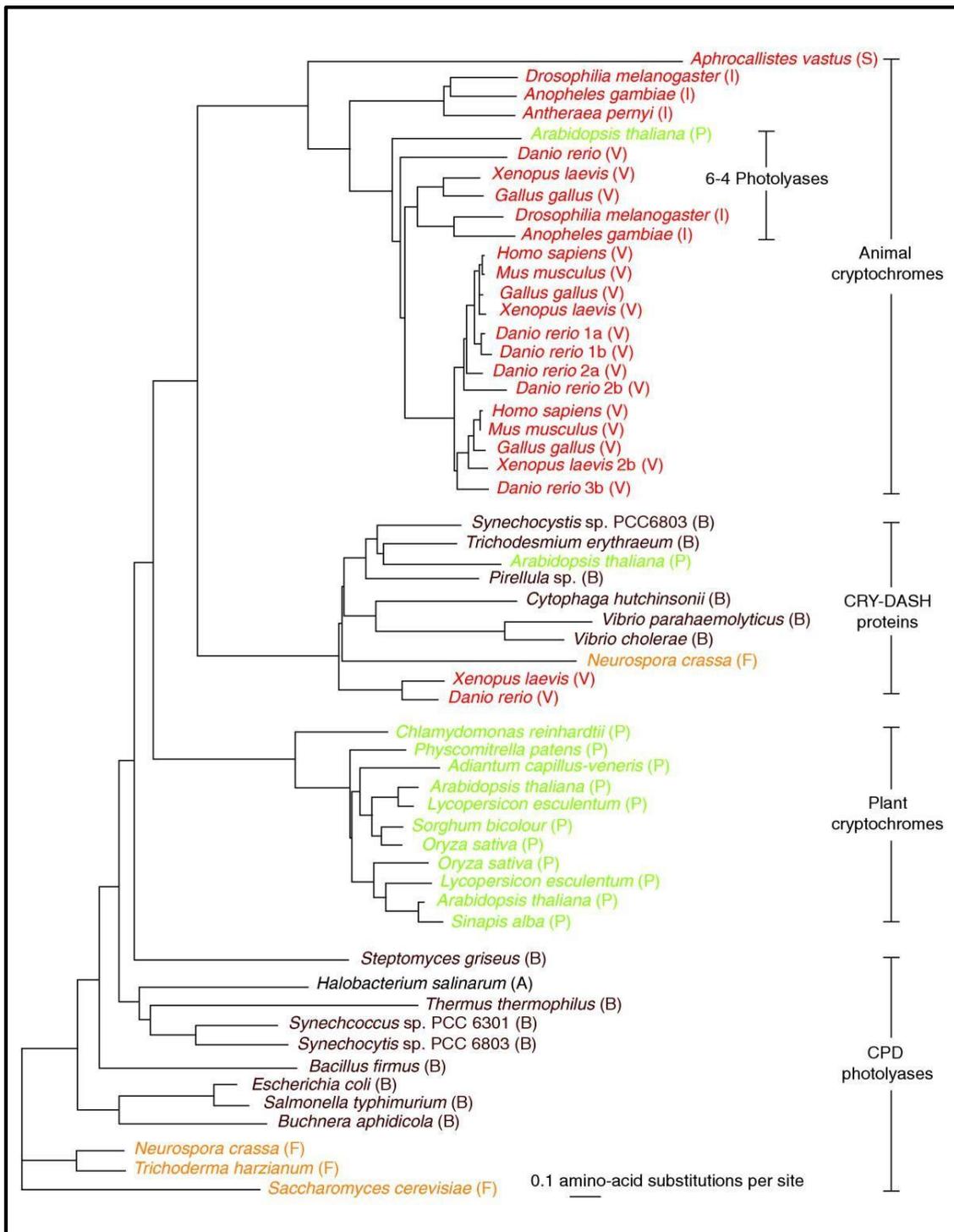


Figure 1 :

Schéma représentant la répartition des différentes familles de cryptochromes et de photolyases dans le règne du vivant (Lin & Todo, 2005).

Au niveau de la distribution dans le règne du vivant, les photolyases sont présentes dans presque toutes les espèces procaryotes et eucaryotes et sont également codées par certains ADN viraux (Biernat *et al*, 2012). Les cryptochromes sont beaucoup moins répandus, étant présents principalement

chez les plantes supérieures et les animaux, mais seulement chez quelques autres espèces eucaryotes (algues, champignons) et procaryotes. Structuellement, les photolyases et les cryptochromes sont très similaires (**Figure 2**), ils partagent des domaines photoactifs similaires et lient des pigments photoactifs similaires (FAD et MTHF). Il est communément admis que les photolyases sont ancestrales aux cryptochromes, et que ceux-ci auraient perdu totalement ou en partie l'activité de réparation de l'ADN, et auraient acquis un nouveau rôle dans la signalisation.

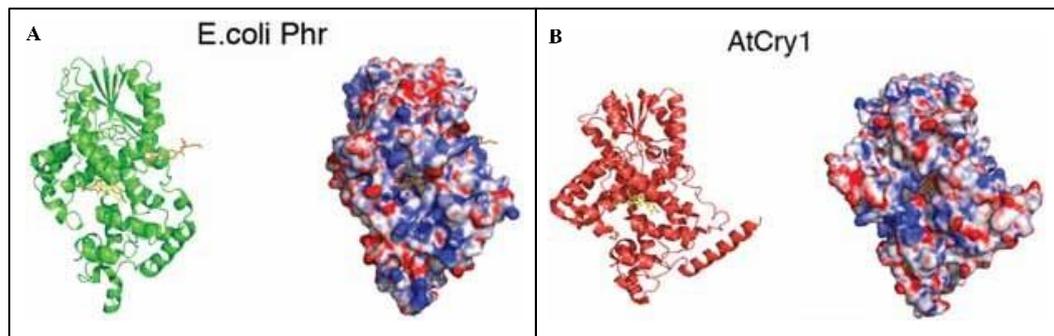


Figure 2 : Différences structurales entre cryptochromes and photolyases, **A** : photolyase chez *E.coli*, **B** : cry1 chez *A. thaliana*. Seul le domaine PHR commun aux deux protéines est représenté, les cofacteurs sont représentés en orange (**Öztürk et al, 2007**).

Par la suite au cours de l'évolution, plusieurs sous-familles majeures de cryptochromes se sont séparées de la photolyase, celles-ci comprennent les cryptochromes classiques des plantes (cry1, cry2 et homologues de ceux-ci), les CRY-DASH (bactériens, animaux ou végétaux) et les cryptochromes du règne animal (type I d'insecte, mammifère de type II et homologues). Certains de de ces groupes présentent une activité résiduelle de réparation de l'ADN comme les CRY-DASH, mais ils présentent tous en revanche des fonctions de signalisation bien définies dans de nombreux systèmes.

Les spécialistes du domaine pensaient initialement que les cryptochromes n'existaient que chez les eucaryotes supérieurs et que les procaryotes étaient dotés de photolyases mais pas de cryptochromes. Des recherches bio-informatiques dans les bases de données génomiques ont révélé la présence d'un gène cryptochrome chez les cyanobactéries (**Hitomi et al, 2000**). Ce nouveau type de cryptochrome a été appelé CRY-DASH, pour souligner sa relation avec les cryptochromes trouvés chez *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* et *Homo* (bien que les CRY-DASH eux-mêmes ne soient pas trouvés chez la drosophile ni chez l'Homme) (**Brudler et al, 2003**). Les protéines de type CRY-DASH ont été trouvées non seulement chez les cyanobactéries photosynthétiques, mais également chez les bactéries non photosynthétiques, les champignons, les plantes et les animaux, y compris *Arabidopsis*, *Neurospora*, le poisson-zèbre et le Xénope (**Figure 1**). Les CRY-DASH sont exprimés

dans plusieurs organites comme les chloroplastes ou la mitochondrie en plus du noyau et du cytoplasme, alors que les autres cryptochromes de plante ne sont localisés que dans ces deux derniers (**Chaves *et al*, 2011**). Des études récentes laisseraient supposer qu'ils auraient un rôle dans la réparation des simples brins d'ADN chez les algues (**Kavakli *et al*, 2017**). A l'instar des autres cryptochromes, les CRY-DASH ont un rôle dans l'expression de certains gènes, du moins chez les cyanobactéries (**Chaves *et al*, 2011**). Néanmoins, la fonction biologique des protéines CRY-DASH reste à ce jour inconnue et pourrait différer selon les espèces.

1.1.2 Découverte des cryptochromes

Depuis la seconde moitié du XIX^e siècle, les biologistes dont Charles Darwin (**Darwin & Darwin, 1880**) ont découvert que la lumière bleue induit des effets importants sur la croissance, le développement et le phototropisme (mouvement des plantes médié par la lumière).

Ces effets, qui comprennent aussi chez les plantes supérieures l'inhibition de l'allongement de l'hypocotyle (**Koornneef *et al*, 1980**) et l'ouverture stomatique entre autres ont pendant longtemps été considérés comme étant médiés par des photorécepteurs liés à une flavine et absorbant la lumière bleue. Alors que les phytochromes, photorécepteurs à la lumière rouge / rouge lointaine avaient pour leur part été déjà relativement bien caractérisés (**Siegelman *et al*, 1960**), aucun photorécepteur à la lumière bleue n'avait encore été identifié ou isolé à ce stade. Tous les efforts effectués pour identifier les photorécepteurs à la lumière bleue initiant ces réponses sont restés vains pendant une longue période, et certains biologistes ont utilisé le terme "cryptochrome" comme nom générique pour ce mystérieux photorécepteur.

Ce n'est qu'au début des années 90 qu'un gène se trouvant dans le locus HY4 chez *Arabidopsis thaliana* a été identifié comme correspondant aux caractéristiques attendues pour un photorécepteur à la lumière bleue (**Ahmad & Cashmore, 1993**). Ce gène, d'abord nommé HY4, a été identifié grâce à l'étude d'un grand nombre de plantes mutantes obtenues par mutagenèse non ciblée. Le phénotype observé chez les plantes mutantes dans ce locus, en présence de lumière bleue, les différencie des plantes sauvages par un caractère déjà bien connu : l'inhibition de l'allongement de l'hypocotyle en réponse à la lumière bleue. Quatre mutants d'*A. thaliana* dans le locus HY4 présentaient une insensibilité à la lumière bleue en comparaison au type sauvage (WT) et présentaient des hypocotyles anormalement longs. Le gène HY4 a été identifié comme étant responsable de ce caractère dans son état sauvage (WT), il permet une sensibilité à la lumière bleue aux alentours de 450nm en induisant une inhibition de la croissance de l'hypocotyle. Les mutations avaient été

effectuées par l'insertion aléatoire d'ADN-T, la région adjacente à cet insert chez les quatre mutants a été identifiée à partir d'une librairie d'ADNc comme contenant une séquence codante de 681 acides aminés, le gène correspondant à cette séquence a été renommé CRY1 peu après (**Lin et al, 1995**).

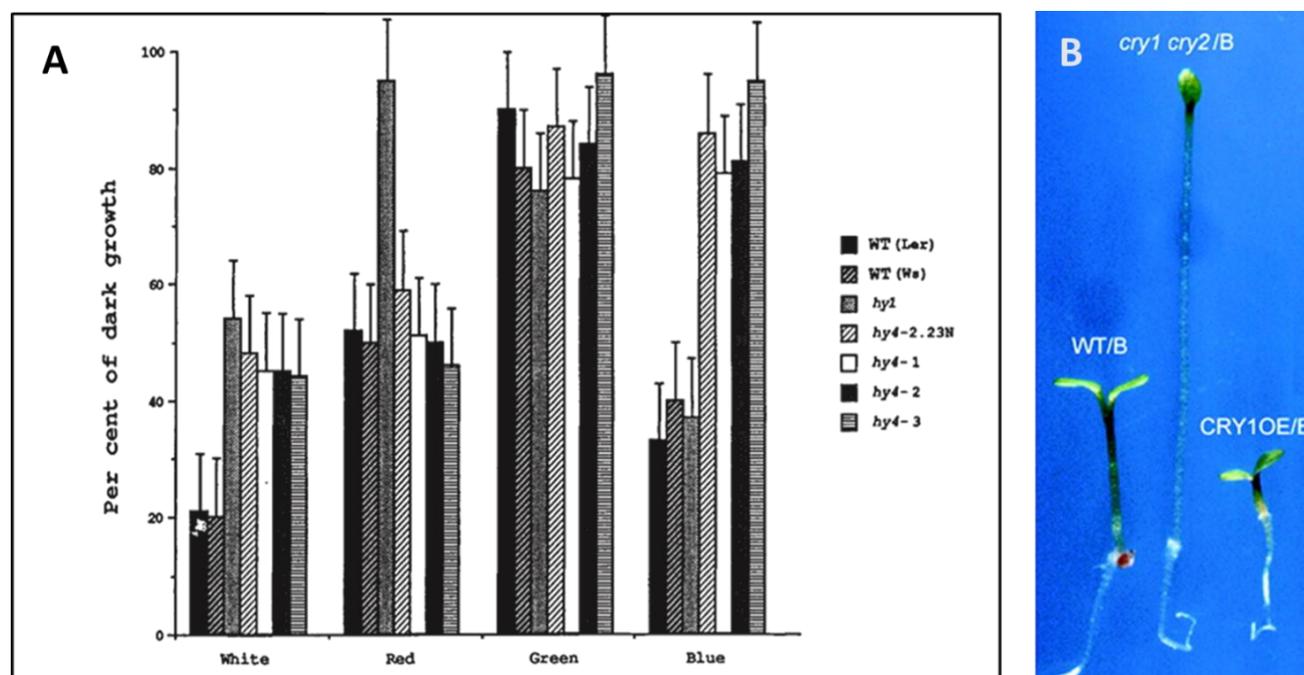


Figure 3 :

A : Inhibition de l'élongation de l'hypocotyle chez *A.thaliana* en fonction de la longueur d'onde de la lumière soumise à des plantules sauvages ou mutantes pour le locus HY4 (mutants hy4). Un mutant pour le phytochrome insensible à la lumière rouge (hy1) est utilisé comme contrôle. (Modifié d'après **Ahmad & Cashmore, 1993**). **B :** phénotype des plantules sauvages, doubles mutantes cry1cry2 ou mutantes de surexpression pour cry1 (CRY1OE) après exposition à la lumière bleue (**Ligeng et al, 2001**).

Par ailleurs, la surexpression du photorécepteur CRY1 (CRY1OE **figure 3B**) entraîne une hypersensibilité à la lumière bleue / UV-A et les plantules transgéniques présentent des hypocotyles exceptionnellement courts. D'autres cryptochromes ont par la suite été identifiés chez *A. thaliana*, CRY2 a lui été identifié par son homologie de séquence avec CRY1 (**Hoffman et al, 1996**). Il code pour un récepteur similaire qui a de nombreuses fonctions redondantes avec CRY1, y compris dans l'inhibition de la croissance de l'hypocotyle.

Chez les animaux plusieurs cryptochromes ont été identifiés, le plus connu d'entre eux est le cryptochrome de drosophile (*Drosophila melanogaster*) DmCRY. Il a été découvert lors d'études sur les rythmes circadiens. Ces rythmes, chez la drosophile, sont maintenus grâce aux cycles lumière / obscurité. Il serait logique de supposer que les yeux et le système visuel jouent un rôle central dans cet

effet, cependant des études sur des mutants sans yeux ont démontré que les mouches aveugles maintenaient une synchronisation de leur rythme comportemental avec les cycles lumière / obscurité (**Helfrich-Förster et al, 2001**). Des explants de thorax ou d'abdomen ont montré des capacités photoréceptrices indépendamment des yeux, suggérant que chaque cellule a individuellement la capacité de se synchroniser avec la lumière. Il apparaît en fait que plusieurs voies indépendantes interviennent dans le maintien des rythmes jour / nuit chez la drosophile (**Plautz et al, 1997**).

C'est ainsi qu'un mutant sélectif a été isolé chez la drosophile par son inaptitude à répondre aux cycles jour/nuit (**Stanewsky et al, 1998**). La mutation empêchait l'expression cyclique des protéines TIM et PER en fonction du jour ou de la nuit (**figure 4**), ces deux protéines étant déjà bien connues dans la synchronisation du cycle jour/nuit chez la mouche.

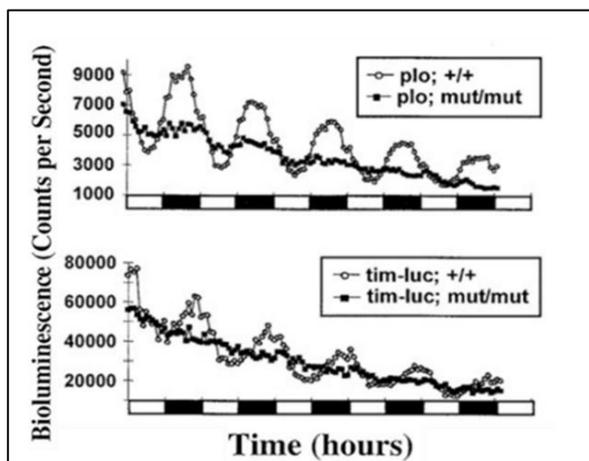


Figure 4 :

Expression des protéines PER (plo) et TIM en fonction du jour ou de la nuit par fusion à la luciférase chez des drosophiles mutantes *cry^b* ou sauvages, chaque bande blanche ou noire représente 12h de jour ou d'obscurité. (**Stanewsky et al, 1998**).

Ce mutant appelé par la suite *cry^b* contenait une mutation faux-sens dans un gène qui s'est avéré être, après séquençage, un homologue des cryptochromes de plantes (**Stanewsky et al, 1998**) et a été renommé Dm*cry*.

Chez l'Homme des recherches ont également été menées et ont permis d'identifier des gènes homologues aux cryptochromes et aux photolyases. Il y a 25 ans une étude (**Li et al, 1993**) concluait que les humains comme tous les mammifères placentaires ne possédaient pas de photolyase contrairement à la majorité des autres espèces animales. Cependant, en 1995 une nouvelle étude de comparaison de séquences ADN a permis de répertorier une protéine humaine homologue à la photolyase (**Adams et al, 1995**). À la lumière de ces travaux et de la découverte d'une nouvelle classe de photolyase chez la drosophile et le crotale (**Todo et al., 1993**) qui répare les lésions mineures induite par les UV (les photoproduit 6-4), le postulat selon lequel il n'y a pas de photolyase chez l'Homme

avait besoin d'être réétudié. C'est ainsi qu'une nouvelle étude a permis à partir de bases de données génomiques humaines de découvrir une deuxième protéine de type photolyase (**Hsu et al, 1996**).

Ces deux protéines affichaient une forte homologie avec la photolyase de drosophile (48%) et entre elles (73%) mais se sont avéré être des cryptochromes, les 2 gènes correspondants ont donc été nommés CRY1 et CRY2 et leurs protéines hCRY1 et hCRY2. De manière similaire aux autres membres de la famille des photolyases / cryptochromes, les deux protéines se sont avérées contenir une FAD et un MTHF mais ne possédaient aucune activité de réparation de l'ADN, ce qui les excluait de la classe des photolyases. Leurs fonctions n'ont pu être découvertes qu'en étudiant des souris doubles KO pour les homologues murins mCRY1 et mCRY2. Ces études ont révélé l'implication des cryptochromes dans l'horloge circadienne mammifère (**Chaves et al, 2011**).

1.1.3 Liaison à des cofacteurs et subdivision N-ter/C-ter

La structure du domaine de la photolyase d'*Escherichia coli* a été comparée à celle de CRY1 d'*A. thaliana*. Pour ces deux protéines, le domaine chromophore N-terminal liant deux chromophores est responsable de l'absorption de la lumière, les deux chromophores étant le MTHF et la FAD. La **Figure 5** ci-dessous montre les différences de structure entre les cryptochromes et les photolyases.

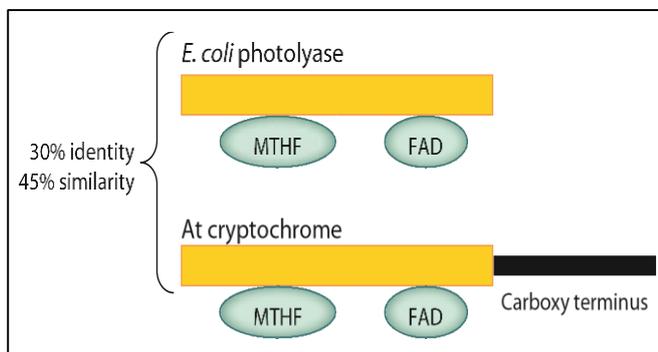


Figure 5 : Structure générale et différences entre les familles des cryptochromes et des photolyases comprenant la partie N-terminale (en jaune) et C-terminale (en noir) (**Chaves et al, 2011**).

La région N-terminale aussi appelé domaine PHR (Photolyase Homology Region), correspond aux acides aminés 30 à 350. Sa séquence est hautement conservée dans toutes les classes de cryptochromes et de photolyases. Ce domaine est lui-même subdivisé en trois sous-domaines : l' α/β domain correspond au début de la région N-terminale, l'helical domain qui comprend la poche contenant la FAD sous une forme inhabituelle en U, et l'interdomain loop qui réalise une jonction entre les deux autres domaines (**Figure 6**). La région C-terminale (acides aminés 350-700) est très peu conservée entre espèces et sa longueur varie également beaucoup. Le rôle qui est connu à ce jour pour ce domaine est de permettre l'interaction du cryptochrome à des partenaires protéines, à l'origine d'une

signalisation permettant de réguler des fonctions biologiques variées sous le contrôle de la lumière bleue.

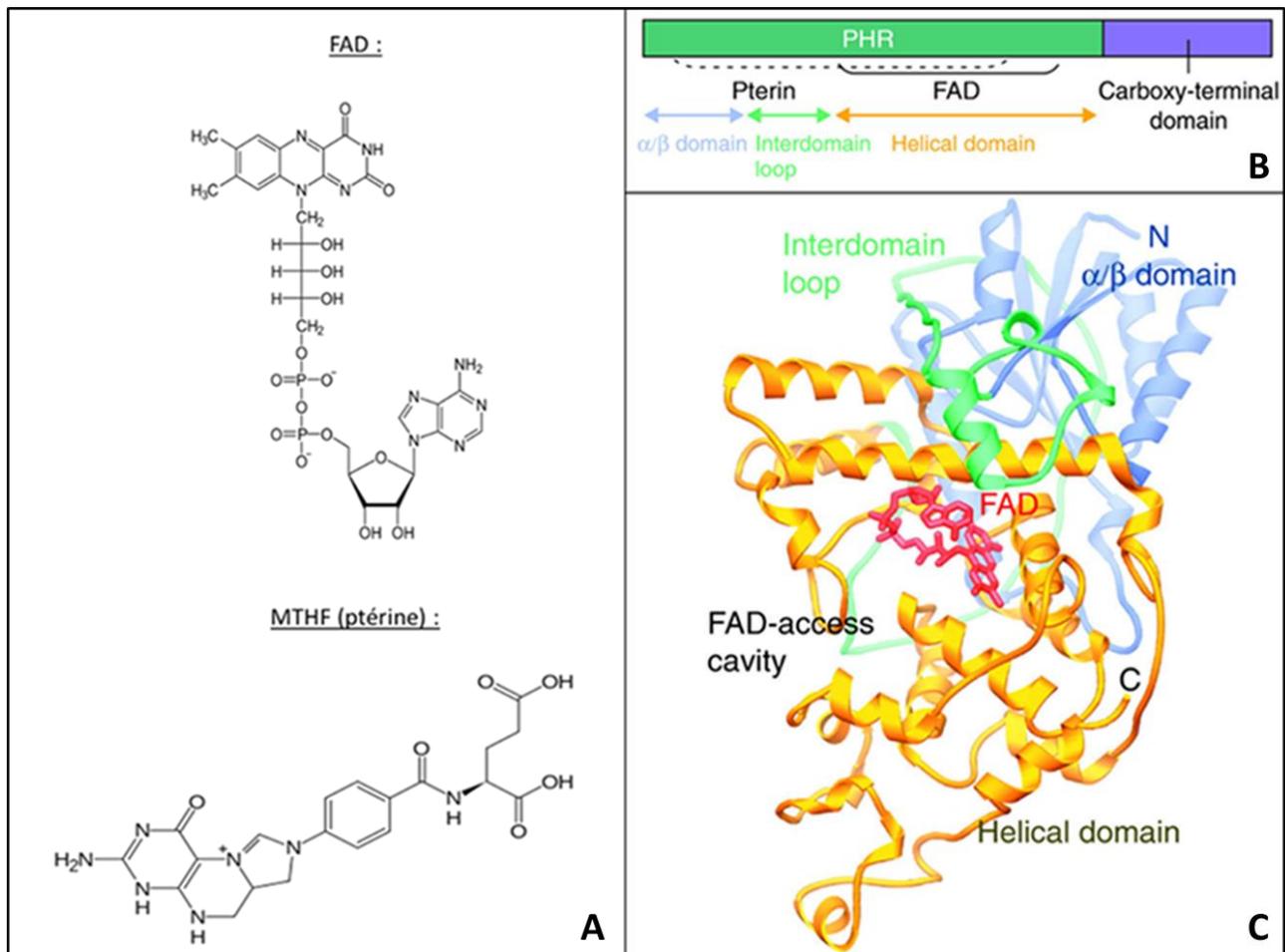


Figure 6 :

A : Structure des 2 cofacteurs (FAD et ptérine). **B :** Représentation schématique d'une protéine typique de la famille cryptochrome / photolyase. **C :** Représentation schématique typique de la conformation du domaine PHR (ici cry-DASH chez *Synechosystis*) (Lin & Todo, 2005).

Contrairement aux cryptochromes, les photolyases tout comme les CRY-DASH n'ont pas d'extension C-terminale. La découverte de la liaison des cryptochromes à des cofacteurs (flavine et ptérine) s'est faite au milieu des années 1990 (Malhotra *et al*, 1995). Les cofacteurs FAD et MTHF ont été identifiés peu après la découverte des cryptochromes (Park *et al*, 1995). Ceux-ci sont logés dans deux cavités complémentaires de leur forme et accessibles depuis l'extérieur au sein du domaine PHR de la protéine. Ces deux cofacteurs et plus particulièrement la FAD ont un rôle crucial pour l'activité biologique des cryptochromes :

La Flavine adénine dinucléotide (FAD) est un cofacteur d'oxydo-réduction dérivant de la riboflavine aussi appelée vitamine B2. Dans les systèmes biologiques, la forme totalement oxydée

FAD agit comme accepteur de protons H^+ et d'électron e^- . La forme FADH agit à la fois comme accepteur et donneur de protons et d'électron et la forme FADH₂ comme donneur d'électron. La FADH₂ est notamment connue comme étant utilisée par les flavoprotéines du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale, permettant la synthèse de 2 ATP supplémentaires. En tant que groupement prosthétique (ou cofacteur) elle intervient pleinement dans l'activité biologique des cryptochromes notamment pour son rôle d'accepteur d'électron. C'est également elle qui donne au cryptochrome ses propriétés photoréceptrices puisqu'elle absorbe la lumière bleue vers 450nm.

Le 5,10-méthényltétrahydrofolate (ou MTHF) est un dérivé de l'acide folique, ou vitamine B9. Sa forme biologiquement active est la forme ionique de l'acide 5,10-méthényltétrahydrofolique, il est couramment abrégé en 5,10-CH=THF. C'est un coenzyme qui donne et reçoit des groupes méthényle ($-CH=$). L'acide folique dont il est dérivé est connu pour être un précurseur métabolique impliqué notamment dans la synthèse des bases nucléiques, purines et pyrimidines (ADN et ARN) mais également dans la synthèse d'acides aminés tels que la méthionine, l'histidine et la sérine.

D'un point de vue général les cryptochromes subissent un changement conformationnel suite à la photoréduction de la flavine par un transfert d'électrons, ce transfert étant initié par l'absorption de la lumière bleue par la flavine FAD. Cette photoréduction avait déjà été largement étudiée chez la photolyase d'*E. coli*. (**Li et al, 1991**) avant d'être découverte chez les plantes. Chez la photolyase, la réparation de l'ADN ne peut avoir lieu que lorsque la flavine est sous forme réduite FADH⁻. Li et al ont démontré en 1991 que le radical FADH• neutre photoexcité est réduit en FADH⁻ par un résidu tryptophane intrinsèque, celui-ci est situé à environ 15 Å à la surface de la protéine où il peut être réduit par un réducteur extrinsèque. Par la suite des calculs théoriques modélisant les voies de transfert des électrons ont suggéré que deux autres résidus de tryptophane étaient impliqués dans la photoréduction de la flavine (**Cheung et al, 1999**). Chez les cryptochromes, il a été démontré, dans plusieurs protéines isolées, que la photoréduction de la flavine se faisait également via une triade de résidus tryptophane (**Giovanni et al, 2003**).

La fonction du MTHF n'est pas encore clairement définie, néanmoins il occupe une région distincte de la flavine chez les cryptochromes et les photolyases au sein du PHR. Son site de fixation n'est pas bien conservé, seul deux glutamates sont identiques, le reste des 12 acides aminés varie selon les espèces. Il a été démontré qu'il subit lui aussi une photoréduction chez les photolyases, et ce par un transfert d'électrons à la flavine en utilisant des voies alternatives, le même processus a été démontré pour les CRY-DASH (**Moldt et al, 2009 ; Okafuji et al, 2010**). Etant donné que son pic d'absorption se situe aux alentours de 380nm, la ptérine pourrait servir à étendre le spectre d'action

des cryptochromes à des longueurs d'onde plus courtes (**Hoang et al, 2008**). Cependant malgré l'absence de la ptérine, la photoréduction de la flavine chez *A. thaliana* est très peu affectée en lumière bleue et en lumière UV. D'autres études ont confirmé que la photoréduction de la ptérine n'est pas corrélée à des changements conformationnels significatifs au sein du domaine N-terminal (**Moldt et al, 2009**). En conclusion il n'a pas été prouvé à ce jour que la ptérine soit pertinente pour la fonction biologique des cryptochromes et des photolyases *in vivo* (**Chaves et al, 2011**).

1.2 Les cryptochromes chez les plantes

Les cryptochromes ont d'abord été identifiés pour leur rôle dans l'inhibition de la croissance de l'hypocotyle chez des plantules d'*A. thaliana* exposées à la lumière bleue (**Ahmad et al, 1998**). Par la suite, d'autres fonctions diverses et variées affectant de nombreux aspects de la croissance et du développement des plantes ont été identifiées chez *A. thaliana* pour le gène *Atcry1* et son homologue *Atcry2*. Par ailleurs les cryptochromes ont de nombreuses fonctions similaires chez d'autres espèces végétales.

Il est intéressant de noter que presque toutes ces réponses diverses et variées peuvent s'expliquer par les effets d'activations et de répressions transcriptionnelles ou encore de régulation par le protéasome. Les deux protéines CRY1 et CRY2 d'*Arabidopsis* sont des protéines nucléaires et ont un effet indirect significatif sur les régulations transcriptionnelles. Selon les conditions mises en place, entre 5 et 25% des gènes sont régulés par la lumière bleue dont la plupart via les protéines CRY1 et CRY2 chez *Arabidopsis* (**Ma et al, 2001**). L'analyse de cette expression a révélé que plus de 130 facteurs de transcription étaient régulés par CRY1 et CRY2 chez des plantules d'*Arabidopsis* (**Jiao et al, 2003**), faisant des cryptochromes les principaux responsables de l'expression génétique lumière bleue dépendante. CRY1 a un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes par la lumière bleue sous des illuminations à court et à long terme (**Kleine et al, 2007**). En revanche, CRY2 a un effet mineur sur la transcription (**Ohgishi et al, 2004**). Parmi les gènes régulés par les cryptochromes, on retrouve des facteurs de transcription sous le contrôle du stress induit par une forte luminosité, ou intervenant dans la voie de synthèse des phénylpropanoïdes, eux-mêmes impliqués dans les réponses à d'autres types de stress comme les attaques microbiennes ou d'herbivores (**Kleine et al, 2007**).

Un nouveau champ d'étude des cryptochromes a débuté chez les plantes il y a quelques années, il s'agit du lien entre le photocycle des cryptochromes et les espèces réactives de l'oxygène (ROS). C'est dans le but d'élucider les mécanismes du photocycle, que des études se basant sur des modèles théoriques ont montré en 2011 que l'activation du cryptochrome par la lumière bleue *in vitro* induit la

formation de ROS dont le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Müller & Ahmad, 2011 ; Consentino *et al*, 2015). Les ROS étant eux-mêmes des molécules signalétiques majeures, leur rôle au sein du photocycle pourrait s'étendre à la régulation de nombreuses fonctions reliées au stress. Certains effets attribuables aux cryptochromes peuvent directement être mis en relation avec la synthèse de ces ROS comme la mort cellulaire programmée. Une étude a ainsi montré que chez *Arabidopsis* la mort cellulaire programmée induite par la lumière bleue n'est pas nécessairement attribuée aux changements redox dans les chloroplastes, mais potentiellement aux cryptochromes (Danon *et al*, 2006).

Nos études (partie résultats) sont très largement focalisées sur ce sujet, nous reviendrons également en détail sur les découvertes préliminaires réalisées dans ce domaine dans la dernière partie de l'introduction. Cependant nous nous sommes également concentrés sur une autre fonction encore débattue et attribuée aux cryptochromes : leur sensibilité aux champs magnétiques ou magnétoreception. Nous verrons finalement qu'un lien existe potentiellement entre ces deux fonctions que sont la synthèse des ROS et la magnétoreception.

1.2.1 Rôles des cryptochromes pour la croissance et le développement

Les effets attribués aux cryptochromes chez *A. thaliana* en plus des deux principaux (synthèse des ROS et magnétoreception) que nous avons étudié sont nombreux : l'élongation des racines, l'inhibition de l'élongation de l'hypocotyle, la synthèse de la chlorophylle, l'accumulation des anthocyanes, le déclenchement de la floraison, le contrôle des rythmes circadiens, l'ouverture des stomates...

Chez *Arabidopsis*, alors qu'elles sont sous terre et normalement privées de lumière, les racines expriment également CRY1 et CRY2 (Lin *et al*, 1996 ; Canamero *et al*, 2006). De plus, la lumière affecte de nombreux aspects du développement racinaire, comme l'extension des racines, la croissance directionnelle induite par la gravité ou la formation des racines latérales (Feldman *et al*, 1984). Il a été montré que les cryptochromes jouent un rôle essentiel dans l'élongation de la racine primaire exposée à la lumière bleue chez *Arabidopsis* (Canamero *et al*, 2006) (Figure 7). La racine primaire des mutants non fonctionnels pour CRY1 est significativement plus courte que celle du type sauvage, de plus la longueur de la racine des lignées surexprimant CRY1 est considérablement plus importante que celle du type sauvage.

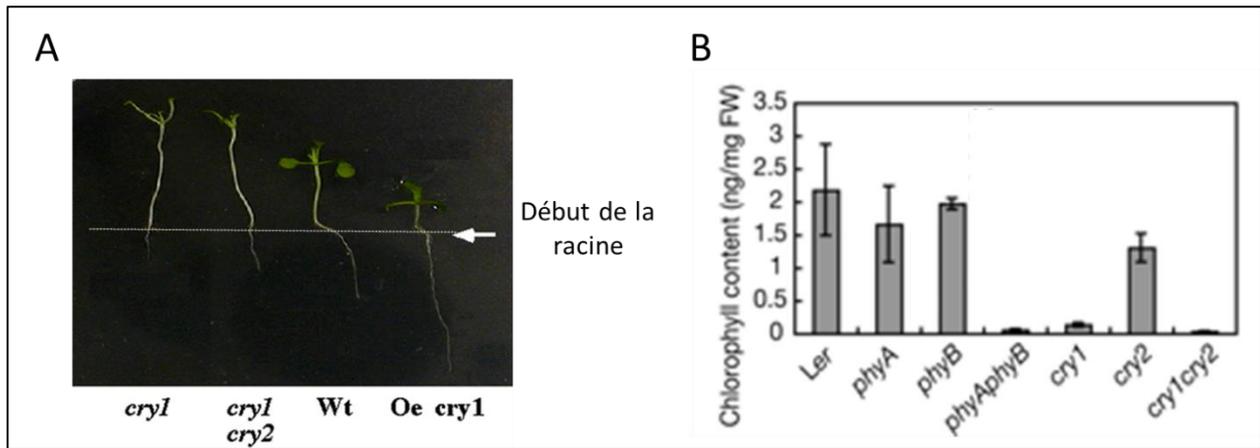


Figure 7 :

A : Croissance racinaire chez des plantules d'*A. thaliana* sauvages ou mutantes soumises à une lumière bleue (Canamero *et al*, 2006). **B :** Quantité de chlorophylle contenue dans les racines de plantules sauvages (Ler) ou mutantes non fonctionnelles pour les cryptochromes (*cry*) ou les phytochromes (*phy*) après 10 jours d'illumination à la lumière bleue (Usami *et al*, 2004).

En revanche, le double mutant non fonctionnel *cry1cry2* développe une plus longue racine que le mutant *CRY1* seul, indiquant que *CRY2* inhiberait son élongation. *CRY1* et *CRY2* agiraient donc de manière antagoniste dans l'élongation de la racine principale.

Il apparaît également que la lumière bleue est beaucoup plus efficace que la lumière rouge pour induire le développement des chloroplastes dans les racines d'*Arabidopsis*. *CRY1* semble prédominant dans ce processus, mais pourrait nécessiter la présence des phytochromes. *CRY1* régule négativement la synthèse de la chlorophylle dans les racines, en effet le double mutant nul *cry1cry2* ou le mutant nul *cry1* seul montrent une inhibition de la synthèse de chlorophylle en lumière bleue. A l'inverse le mutant nul *cry2* seul montre une accumulation de chlorophylle comme le sauvage. Il se pourrait que *CRY1* agisse conjointement avec les phytochromes A et B dans cette régulation car les doubles mutants non fonctionnels *phyAphyB* montrent également une absence de chlorophylle dans les racines. Les cryptochromes et les phytochromes étant déjà connus pour réguler d'autres fonctions de façon conjointe (Devlin *et al*, 2000).

L'inhibition de l'allongement de l'hypocotyle est le premier rôle attribué aux cryptochromes, mais des études ultérieures ont décrit de manière plus précise leur implication dans ce processus. Chez le mutant homozygote non fonctionnel pour *CRY1* un allongement de l'hypocotyle a été observé en réponse à la lumière bleue par rapport aux plantes de type sauvage. Une certaine redondance fonctionnelle a été mise en évidence entre *CRY1* et *CRY2* pour cette fonction (Figure 8B) car l'hypocotyle du double mutant non fonctionnel *cry1cry2* est légèrement plus long que celui du simple mutant *CRY1*. Cependant il apparaît que *CRY1* est plus déterminant que *CRY2* pour ce caractère.

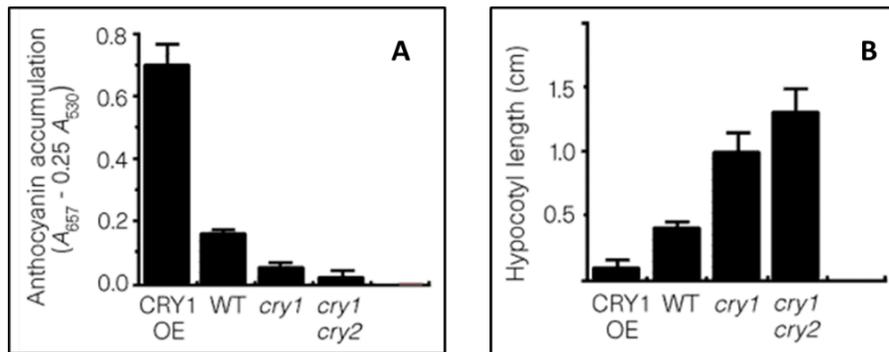


Figure 8 :

A : Accumulation des anthocyanines après exposition à la lumière bleue chez *A. thaliana* surexprimant CRY1 (CRY1OE), WT, mutant pour CRY1 (*cry1*) ou mutant CRY1 et CRY2 (*cry1cry2*). **B :** Longueur de l'hypocotyle après exposition à la lumière bleue. (Ahmad *et al*, 1998).

Après exposition à la lumière bleue l'accumulation d'anthocyanes est également corrélée avec le niveau d'expression de la protéine CRY1 (Ahmad *et al*, 1998). Les anthocyanes sont des pigments naturels des feuilles, des pétales et des fruits, situés dans les vacuoles des cellules, solubles dans l'eau, allant du rouge orangé au bleu pourpre. Bien que l'effet de CRY1 soit plus important, on retrouve encore une fois une redondance fonctionnelle avec CRY2 car le double mutant *cry1cry2* voit sa quantité d'anthocyanes diminuer par rapport au mutant *cry1* simple.

Les gènes *Atcry2* et *Atcry1* codent pour des récepteurs présentant des similarités : un domaine N-terminal de 400 acides aminés hautement conservé et un domaine C-terminal plus court (120 acides aminés) mal conservé (similarité de séquence <15% entre *Atcry1* and *Atcry2*).

Le gène *Atcry2* a de nombreuses fonctions redondantes avec *Atcry1* (Ahmad *et al*, 1998 ; Lin *et al*, 1998), malgré les domaines C-terminaux divergents. Néanmoins des rôles distincts lui ont été attribués, et la protéine CRY2 pour laquelle il code subit une dégradation suite de son activation par la lumière bleue, en raison de son ubiquitination et de son adressage subséquent au protéasome (Lin *et al*, 1998 ; Yu *et al*, 2007). Par conséquent, les réponses de CRY2 sont observées préférentiellement aux faibles irradiations de lumière bleue et peuvent servir à augmenter la détection de la lumière bleue dans des conditions où la lumière est limitante.

Il est maintenant bien connu que le passage des plantes de la croissance végétative au développement floral est régulé par les récepteurs à lumière rouge (les phytochromes) mais aussi les récepteurs à la lumière bleu-ultraviolet (les cryptochromes). Un des rôles notables de CRY2 est de raccourcir le temps nécessaire à la floraison lorsque la durée du jour se rallonge (El-assal *et al*, 2003 ; Guo *et al*, 1998), en conditions normales celle-ci se déclenche lorsque la durée d'ensoleillement augmente.

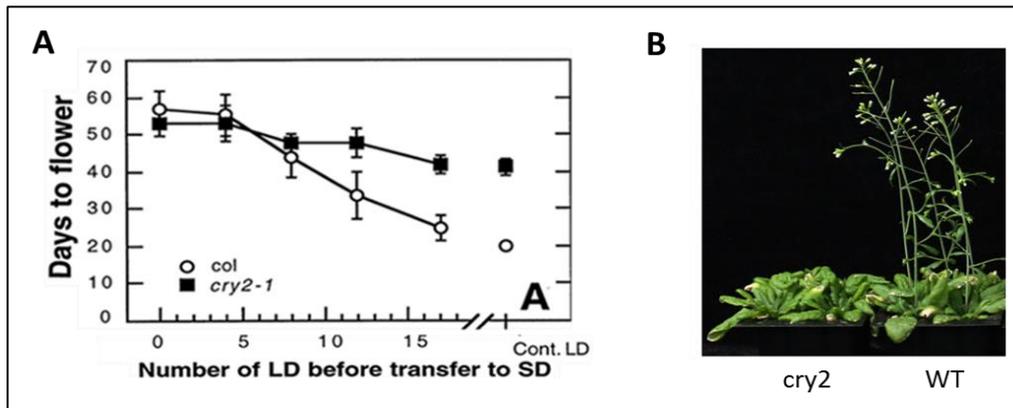


Figure 9 :

A : Effet de la durée d'exposition à des jours longs (LD) sur le temps nécessaire à la floraison des plantules d'*A. thaliana* avant transfert en jours courts (SD) pour les types sauvages (col) ou mutants cry2 homozygote (cry2-1). **B :** plantes sauvages (WT) et mutantes homozygote cry2 après 30 jours d'illumination continue en lumière blanche. (Guo *et al*, 1998 ; Liu *et al*, 2017).

Plus tard, il a été découvert qu'en présence de CRY2 la quantité de protéine CO était significativement plus élevée à la fin des longues journées chez les plantes sauvages que par rapport aux mutants déficients en cryptochrome. De plus, l'accumulation de CO va permettre l'accumulation de la protéine FT qui va déclencher la formation des organes floraux. CRY2 et CO se lient toutes les deux à l'ubiquitine ligase COP1 (constitutive photomorphogenic 1), ce qui pourrait expliquer que la fixation de CRY2 à COP1 empêche celle de CO à COP1 en lumière bleue par rapport aux conditions d'obscurité (Liu *et al*, 2008), le mécanisme serait ainsi le même que pour l'ouverture des stomates. Encore plus récemment il a été découvert que l'interaction CRY2/COP1 pourrait être liée à une autre interaction : CRY2/SPA1. SPA1 est une protéine de type kinase qui se fixe de façon lumière bleue dépendante à CRY2, et se fixe également à COP1 en activant la dégradation de CO (Zuo *et al*, 2011). Ces résultats indiqueraient que CRY2 (et dans une moindre mesure CRY1) augmente la stabilité de la protéine CO par un mécanisme de protection de la dégradation par le protéasome (Turck *et al*, 2008)

1.2.2 Rôles des cryptochromes au niveau physiologique

Les rythmes circadiens sont des rythmes d'une durée d'environ 24h au niveau physiologique et comportemental et sont un composant ubiquitaire de la vie eucaryote. Ils ont été mis en évidence pour la première fois par Jean-Jacques de Marain (1678-1771) qui a remarqué que l'ouverture des fleurs de mimosa en fonction du jour ou de la nuit persistait en obscurité. La fonction d'horloge interne chez *Arabidopsis* et de manière générale chez les plantes semble elle aussi régulée à la fois par CRY1

et CRY2, qui agissent de manière redondante en raccourcissant la durée du jour perçue lors d'une exposition à la lumière.

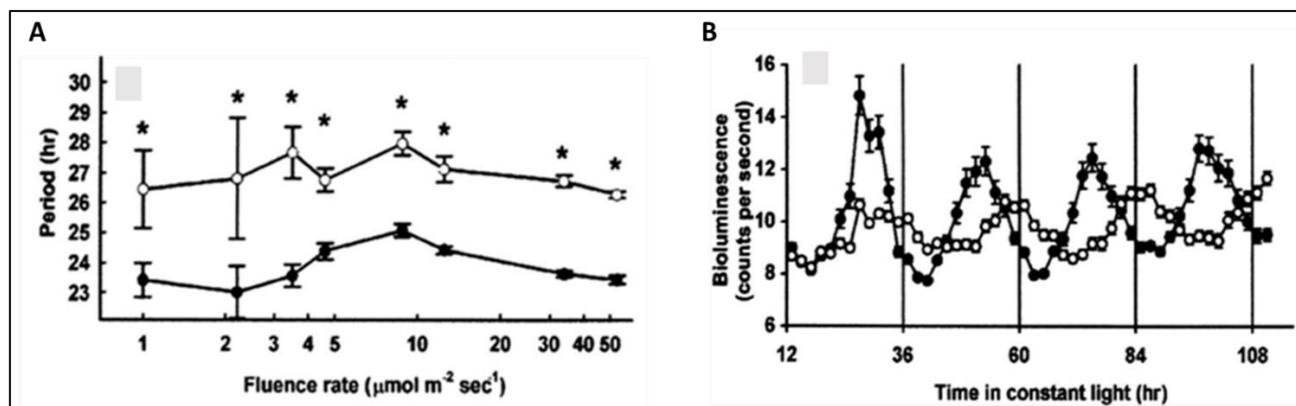


Figure 10 :

AA

A : Effet de la lumière bleue et de son intensité sur la longueur du cycle journalier chez des plantules d'*A. thaliana* sauvages (noir) ou mutantes *cry1cry2* (blanc). Les résultats ont été obtenus par construction CAB2::LUC (CAB2 étant un promoteur induit par l'horloge circadienne) **B :** Bioluminescence en fonction du temps chez des plantules d'*A. thaliana* sauvages (noir) ou mutantes (blanc). (Devlin & Kay, 2000).

Ainsi des études ont montré que des semis d'*A. thaliana* maintenus dans une obscurité constante ont une période circadienne d'environ 36 heures, alors qu'en lumière cette période est progressivement raccourcie à 24 heures (Millar *et al*, 1995 ; Devlin & Kay, 2000). Chez les doubles mutants non fonctionnels *cry1cry2* la longueur du jour perçue est plus longue de 3h après exposition à la lumière bleue (figure 10A). Les mutants non fonctionnels *cry1* ou *cry2* seuls présentent une période normale de 24h en lumière bleue indiquant une redondance fonctionnelle entre les deux photorécepteurs.

Un fait important dans ces observations est qu'un rythme robuste d'expression de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur circadien CAB2, est toujours observé en l'absence de CRY1 et de CRY2 (figure 10B). Les cryptochromes participent donc à l'établissement du rythme circadien mais sans en être un composant clef. D'autres études ont, elles aussi, mis en évidence que les doubles mutants *Atcry1/Atcry2* sont entièrement rythmiques dans des conditions appropriées (Yanovsky *et al*, 2000). Chez les mammifères en revanche, la perte des deux cryptochromes entraîne une arythmie (van der Horst *et al*, 1999). Ce résultat indique donc une nette divergence dans l'organisation de la machinerie circadienne entre les mammifères et les plantes.

Un des autres rôles attribués aux cryptochromes est de réguler l'ouverture des stomates. Ces orifices de petite taille sont présents dans l'épiderme des organes aériens des végétaux, le plus souvent

sur la face inférieure des feuilles. Chez les plantes supérieures leur rôle est de permettre les échanges gazeux avec l'air ambiant (O₂, CO₂, vapeur d'eau...), ils sont les principaux responsables des pertes hydriques par évapotranspiration et régulent ainsi la pression osmotique. L'ouverture de l'orifice ou ostiole, permise grâce à deux cellules de garde est contrôlée par un certain nombre de signaux environnementaux ou internes, incluant la lumière, l'humidité, la disponibilité en O₂ ou en CO₂, les phytohormones, le calcium, les espèces réactives de l'oxygène... (Blatt *et al*, 2000 ; Assmann *et al*, 2001 ; Schroeder *et al*, 2002). Les stomates sont fermés à l'obscurité mais s'ouvrent en réponse à la lumière bleue, il apparaît que plusieurs photorécepteurs sont responsables de cette ouverture (Kinoshita *et al*, 2001) dont les cryptochromes chez *A. thaliana* (Mao *et al*, 2005).

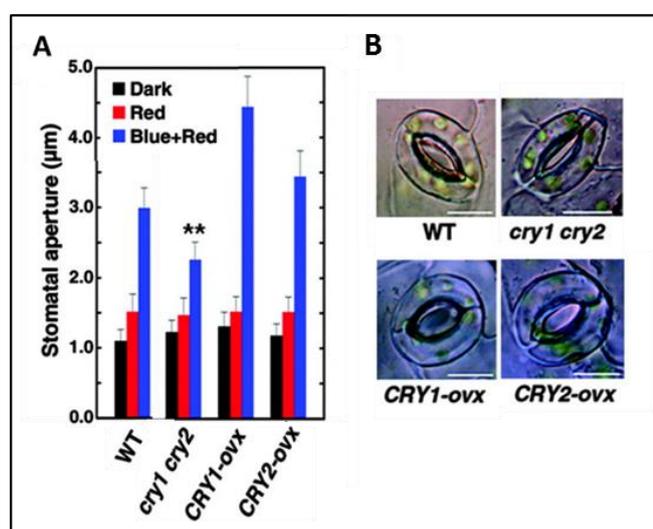


Figure 11 :

A : Ouverture des stomates sous différentes conditions lumineuses chez *A. thaliana* sauvage, double mutante *cry1cry2* ou mutante de surexpression *cry1* ou *cry2*. **B :** Observation de l'ouverture des stomates chez les différents mutants après exposition à la lumière bleue. (Mao *et al*, 2005)

Chez les plantules doubles mutantes non fonctionnelles *cry1cry2* il y a une meilleure résistance à la sécheresse qui est probablement liée à l'ouverture des stomates. L'ouverture est maximale lorsque *CRY1* est surexprimé, plus encore que lorsque *CRY2* est surexprimé. Il n'y a aucune ouverture en revanche chez le double mutant (Figures 11A, et B).

Aucune différence pour l'ouverture à l'obscurité ou en lumière rouge n'a été observée, indiquant que l'ouverture des stomates médiée par *CRY1* et *CRY2* est lumière bleue dépendante. Ces mêmes études ont également suggéré que la signalisation par le système *CRY-COP1* pourrait être le responsable de cette régulation car les mutants non fonctionnels *COP1* laissent leurs stomates ouverts à l'obscurité. *COP1*, une ubiquitine ligase qui avait déjà été identifiée comme se liant à *CRY1* et *CRY2* pour les diriger vers le protéasome (Wang *et al*, 2001 ; Yang *et al*, 2001) agirait comme répresseur de l'ouverture des stomates, alors que *CRY1* et *CRY2* pourraient agir comme répresseurs de *COP1*. *CRY1* serait également impliqué dans la résistance à certaines bactéries en conditions de lumière

continue, avec une réduction de la production d'acide salicylique (composé aux propriétés antiseptiques) mais de façon assez modeste chez les mutants où CRY1 est inactif (**Wu & Yang, 2010**).

Le phototropisme est une des fonctions régulées par CRY1 et CRY2 mais de façon assez mineure. Les cryptochromes sont nécessaires pour l'inclinaison des jeunes plantules à faible luminosité, mais en revanche, lorsque l'intensité d'éclairage augmente, on retrouve une courbure chez les mutants *cry1cry2* (**Ahmad et al, 1998**), indiquant l'action d'autres photorécepteurs à la lumière bleue (les phototropines). CRY2 pourrait en plus de son rôle dans la floraison réguler la taille des fruits, le nombre d'ovules par fruits ou encore le pourcentage d'ovules fécondés. En effet la région chromosomique de CRY2 a été identifiée comme responsable de la régulation de ces caractères (**El-Assal et al, 2004**).

Enfin des études ont montré que CRY1 et CRY2 avaient la capacité d'induire des régulations transcriptionnelles ou post transcriptionnelles et ce en lumière rouge (**Yang et al, 2008**). Ces effets pourraient être dus aux interactions directes qui existent entre phytochromes et cryptochromes, ou à leur interaction avec des partenaires communs comme COP1. A noter toutefois que les différences entre WT et double ko *cry1cry2* sont bien plus prononcées en lumière bleue qu'en lumière rouge, indiquant un rôle mineur de la lumière rouge sur les cryptochromes.

1.2.3 Rôles des cryptochromes chez les végétaux autres qu'*Arabidopsis*

Chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*), quatre gènes codant pour des cryptochromes ont été découverts, et des analyses chez les mutants pour ces différents cryptochromes ont indiqué qu'ils ont un rôle dans la photomorphogenèse, le raccourcissement des hypocotyles, l'accumulation d'anthocyanines et de chlorophylle dans les feuilles ainsi que dans l'accumulation de flavonoïdes et de lycopènes dans les fruits (**Weller et al, 2001**). Des coactions entre cryptochromes et phytochromes ont également été indiquées.

Chez le pois (*Pisum sativum*), trois cryptochromes ont été identifiés. Ils seraient responsables de l'expansion de folioles, l'élongation des entrenœuds, le déclenchement de la floraison, et ils présenteraient également une redondance fonctionnelle avec les phytochromes (**Platten et al, 2005**).

Chez le colza (*Brassica napus*), assez proche d'*Arabidopsis*, un seul cryptochrome a été identifié. Des études suggèrent que son rôle serait similaire à celui d'Atcry1 d'*A. thaliana* concernant l'inhibition de l'élongation de l'hypocotyle ou l'accumulation d'anthocyanines (**Chatterjee et al, 2006**).

Chez les Monocotylédones, des études concernant le rôle des cryptochromes ont également été menées. A la différence des dicotylédones, qui ont deux cotylédons et un hypocotyle, les monocotylédones n'ont qu'un seul cotylédon appelé coléoptile, et un mésocotyle à la place de l'hypocotyle faisant office de tige. Différentes études ont montré que l'élongation du coléoptile est inhibée en lumière bleue pour l'avoine (**Thornton & Thimann, 1967**), le maïs (**Wang & Lino, 1997**) et le riz (**Biswas et al, 2003**). Par la suite plusieurs cryptochromes ont été identifiés pour l'orge (**Perrotta et al, 2001**), le riz (**Matsumoto et al, 2003**) ou encore le blé (**Xu et al, 2010**).

Les cryptochromes sont également exprimés chez les plantes inférieures, comme la mousse *Physcomitrella patens* pour laquelle deux d'entre eux ont été identifiés (**Imaizumi et al, 2002**). Les auteurs de cette étude ont également démontré que les signaux régulés par les cryptochromes régulent de multiples processus développementaux chez les mousses, incluant l'induction des branches latérales, l'induction et le développement du gamétophyte ainsi que la répression des réponses à l'auxine. Une action conjointe entre cryptochromes et phytochromes semble également être à l'œuvre chez cette espèce (**Uenaka et al, 2005**).

Chez les fougères, la lumière bleue régule aussi une grande variété de réponses physiologiques, dont l'inhibition de la germination des spores (**Sugai & Furuya, 1985**), le phototropisme (**Hayami et al, 1986**), la croissance des frondes (équivalent des feuilles) et du méristème apical (**Miyata et al, 1979**) ou encore l'orientation des chloroplastes (**Kagawa & Wada, 1994**). Cinq cryptochromes ont ensuite été identifiés chez *Adiantum capillus-veneris* (**Kanegae & Wada, 1998**) indiquant que les fougères possèdent la plus large famille de cryptochromes connue à ce jour.

1.3 Les cryptochromes chez les animaux

Chez les animaux, les cryptochromes peuvent être divisés en deux groupes : les cryptochromes de type I et II, en fonction de leur rôle dans l'horloge circadienne. Ce mécanisme régulateur endogène permet de générer un rythme journalier au niveau du comportement, de la physiologie ou du métabolisme avec une périodicité d'environ 24 heures. Ce rythme doit être réajusté chaque jour par la lumière pour éviter les décalages possibles. Il est régulé par un certain nombre de régulateurs au niveau de la transcription ou de la traduction par des boucles de rétrocontrôle. Au sein de ce système, les cryptochromes qui agissent comme des photorécepteurs circadiens peuvent être de deux types : soit de type I lorsque leur rôle est dépendant de la lumière, c'est le cas chez la drosophile et les autres insectes. Les autres cryptochromes qui agissent indépendamment de la lumière et ayant pour rôle de réprimer la transcription d'autres gènes sont de type II, ils sont présents chez la souris, l'Homme et les autres

vertébrés. Les chiffres romains sont utilisés pour éviter la confusion avec la numérotation spécifique des cryptochromes. Il est à noter que certains animaux possèdent les deux types. Enfin les deux types de cryptochromes (I et II) sont distincts des cry-DASH que l'on retrouve également chez certains animaux avec une fonction encore inconnue. Les fonctions ou mécanismes régulés par les cryptochromes de type I et II sont décrits dans les chapitres suivants.

1.3.1 Cryptochromes de type I

Le représentant le plus étudié au sein de cette famille est le cryptochrome de drosophile DmCRY. Le génome de drosophile ne contient qu'un seul cryptochrome contrairement à la plupart des insectes qui possèdent également un cryptochrome de type II (**Zhu *et al*, 2008**). La fonction de DmCRY a été identifiée par l'étude de mutants cry^b. Ces mutants présentent toujours un comportement rythmique journalier mais leur cycle jour / nuit est fortement affecté. Cette particularité a permis d'identifier DmCRY comme étant un photorécepteur impliqué dans le maintien de l'horloge circadienne par la lumière (**Emery *et al*, 1998 ; Stanewsky *et al*, 1998**). Les mécanismes moléculaires de l'horloge circadienne, basés sur des boucles de rétrocontrôle régulant la transcription et la traduction sont assez bien conservés entre les insectes et les mammifères (**Stanewsky, 2003 ; Yu & Hardin, 2006**). Chez la drosophile, ces mécanismes de synchronisation de l'horloge circadienne par la lumière ont depuis longtemps été étudiés. Notons également que les trois scientifiques : Jeff Hall, Michael Rosbash et Michael Young ont reçu le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 2017 pour leurs travaux sur l'horloge circadienne de la drosophile. Ceci montre, une fois de plus, la valeur de la drosophile comme excellent modèle pour les études biomédicales.

Cependant, DmCRY n'est pas un composant essentiel de cette horloge, car les oscillations circadiennes persistent chez les mutants cry^b en obscurité constante pour certains paramètres comme le comportement (**voir figure 4**) (**Stanewsky *et al*, 1998**). Tous ces mécanismes rythmiques ont lieu dans le cerveau des drosophiles qui contient environ 150 neurones appelés "neurones d'horloge" qui expriment de façon rythmique les gènes de l'horloge circadienne (**Yoshii *et al*, 2015**) et contrôlent ainsi le rythme journalier du comportement. Les gènes exprimés par ces neurones codent notamment pour les protéines TIM, PER, CLK, CYC mais aussi CRY (ou DmCRY), codé par DmCRY (**Yoshii *et al*, 2008 ; Bénito *et al*, 2008**). En plus de cette horloge centrale au cœur du cerveau, la drosophile possède une horloge périphérique qui réside dans de nombreux organes ou tissus comme les antennes, les pattes, les ailes, l'abdomen ou les yeux. Des fonctions tissu spécifique sont régulées au sein de ces

différentes zones par les gènes de l'horloge qui y sont exprimés (plautz *et al*, 1997 ; Ito & Tomioka, 2016). Ces oscillateurs périphériques sont cependant largement contrôlés par l'horloge centrale.

Les gènes clock (CLK) et cycle (CYC) codent pour des facteurs de transcription qui vont former le complexe CLK/CYC qui va activer la transcription de plusieurs autres gènes. En effet CLK/CYC se fixe sur des séquences promotrices consensus appelées E-box (CACGTG) présentes notamment dans le promoteur des gènes tim et per. Durant la nuit, l'hétérodimère CLK/CYC se lie aux E-box de per et tim, entre autres, et active leur transcription, ce qui a pour effet d'accumuler ces deux protéines. Les protéines forment ensuite l'hétérodimère stable PER/TIM qui va être phosphorylé par des kinases puis adressé au noyau. Dans le noyau, PER/TIM se fixe sur l'hétérodimère CLK/CYC et l'inactive. Ce qui conduit à l'inhibition de la transcription de PER, TIM et d'autres gènes contrôlés par l'horloge circadienne. PER et TIM sont donc des régulateurs négatifs de l'horloge (Ozturk *et al*, 2013).

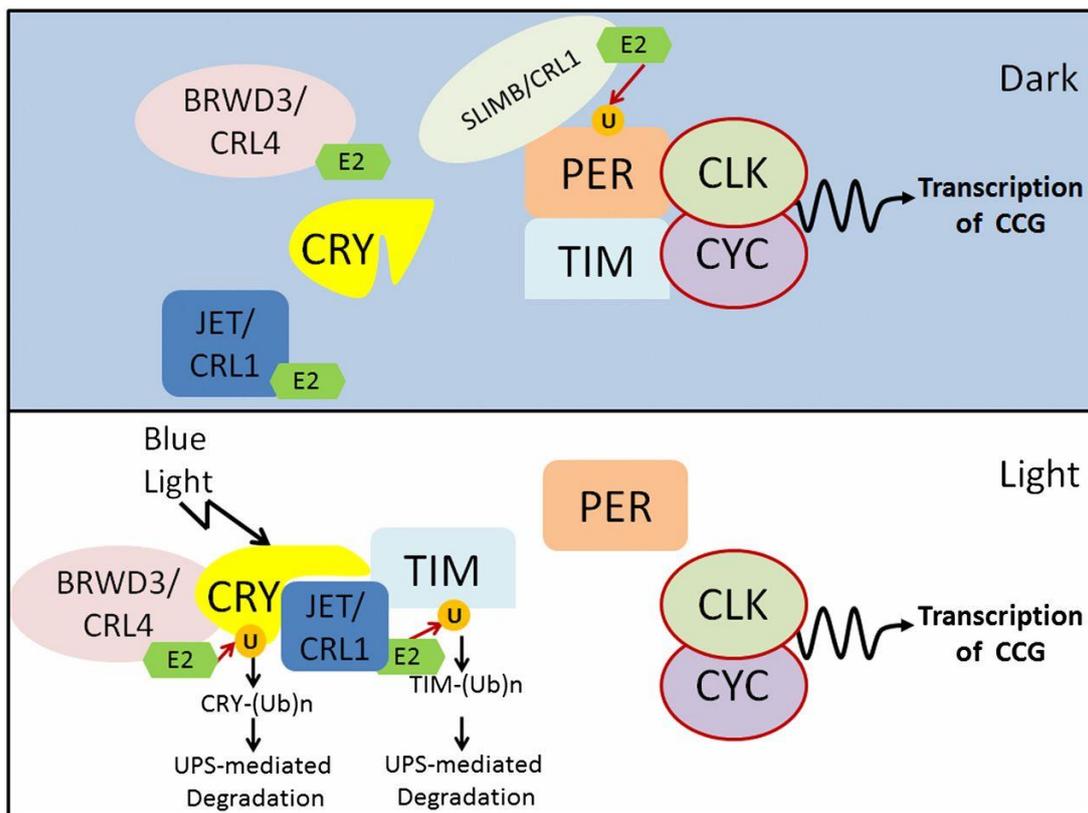


Figure 12 :
Schéma illustrant La place du cryptochrome au sein de l'horloge circadienne chez la drosophile. (Ozturk *et al*, 2013).

A l'obscurité, le complexe d'ubiquitination SLIMB/CRL1 est responsable de la dégradation de PER, ce qui déstabilise le dimère PER/TIM. En début de journée, la lumière permet l'activation du

cryptochrome, ce qui induit sa fixation sur TIM et déclenche son ubiquitination par la protéine jetlag, une ubiquitine ligase, qui finalement entraîne sa dégradation (**Koh et al, 2006 ; Peschel et al, 2009**). PER qui est stabilisée par TIM se dégrade également, ce qui permet l'arrêt de la répression des gènes contrôlés par l'horloge circadienne et le redémarrage la phase d'activation de l'horloge. CRY peut aussi être dégradé de façon lumière dépendante par sa liaison avec un autre complexe d'ubiquitination : BRWD3/CRL4 (**figure 12**).

Une autre voie permettant la régulation de CLK et CYC fait intervenir la protéine vrille (VRI) et la PAR domain protein 1ε (PDP1ε) qui s'accumulent en fin de journée et en début de nuit. Une troisième boucle fait intervenir CWO (clockwork-orange) qui réprime également l'activité CYC et CLK, la synthèse de PER et TIM, et sa propre synthèse par rétrocontrôle. Le rôle de cette protéine serait de maintenir l'amplitude journalière d'expression des composants de l'horloge (**Lim et al, 2007**). En dépit de leur apparente indépendance ces boucles se régulent entre elles car, chez les drosophiles mutantes cry^b, le niveau d'expression des gènes Pdp1ε et vri est affecté au niveau des yeux et du cerveau (**Collins et al, 2006**).

Les interactions entre CRY, TIM et PER expliquent, de manière simple, comment les mécanismes de l'horloge sont réinitialisés par la lumière. Cependant, ces mécanismes sont plus complexes car PER et TIM sont également dégradés par un mécanisme différent, lorsque l'obscurité est maintenue (**Grima et al, 2002**). D'autres études ont montré que certaines kinases régulaient aussi les niveaux de transcription de PER et TIM (**Kloss et al, 1998**). De plus, tous les neurones d'horloge n'expriment pas CRY (**Yoshii et al, 2008**) et le cryptochrome est lui-même très instable en présence de lumière, ce qui indique que l'intensité de la lumière régule négativement le niveau de protéine (**Emery et al, 1998**). Enfin, contrairement au rôle de régulateur positif des gènes contrôlés par CLK et CYC qu'on pourrait attribuer à DmCRY, des études ont mis en évidence que cette protéine agit comme répresseur transcriptionnel des gènes activés par CLK / CYC (**Collins et al, 2006**).

Bien que DmCRY soit le seul cryptochrome codé par le génome de la drosophile, la simplicité apparente de son mécanisme s'estompe si l'on tient compte de la diversité des fonctions biologiques affichées par cette seule protéine. Il apparaît que DmCRY aurait un rôle indépendant de la lumière toujours dans le maintien des rythmes circadiens de manière similaire aux cryptochromes de type II, et ce grâce à la température (**Krishnan et al, 2001**). Cette découverte a entraîné de nouvelles investigations qui ont révélé que DmCRY intervient dans certaines régulations transcriptionnelles en absence complète de lumière chez les pupes de drosophile (**Vieira et al, 2012**). Plus d'une centaine de gènes sont régulés par DmCRY à l'obscurité dont presque la moitié est impliquée dans les réponses

aux stress et aux ROS. Cette activité à l'obscurité indiquerait qu'une petite portion du stock de cryptochrome est lié à une flavine déjà réduite qui n'a pas à être photoréduite pour activer la protéine. Il apparaît également que les cryptochromes de type I, dont le modèle de référence est DmCRY, montrent des réponses lumière-dépendantes très robustes aussi bien chez les mouches vivantes que sur des cultures cellulaires de cellules d'insecte (**Chaves et al, 2011**).

Comme chez *Arabidopsis*, les réponses de DmCRY sont observées avec la lumière bleue et UV en dessous de 500nm avec un maximum aux alentours de 450nm. Le spectre d'activation de DmCRY se superpose partiellement au spectre d'absorption de la flavine dans la lumière visible (**VanVickle-Chavez & Van Gelder, 2007**). Des expériences sur des protéines purifiées et isolées ont montré qu'à l'obscurité, la protéine est liée à une flavine oxydée qui peut être réduite sous forme anionique par la lumière bleue (**Berndt et al, 2007**), ce qui active les fonctions biologiques du cryptochrome (**Hoang et al, 2008**). Ce même mécanisme d'oxydation/réduction a été également mis en évidence par fluorescence en utilisant des cultures de cellules d'insecte Sf21 (la lignée Sf21 a été obtenue à partir d'ovaires du stade larvaire de *Spodoptera frugiperda*, elle est principalement utilisée pour sa capacité à produire des protéines codées par un baculovirus recombinant) (**Hoang et al, 2008**). Ces observations suggèrent que le même processus de photoréduction de la flavine a lieu chez les plantes et les insectes, car on retrouve dans les deux cas un cycle de photoréduction / réoxydation de la flavine (**Berndt et al, 2007 ; Bouly et al, 2007 ; Lin et al, 2018**).

Un lien entre cryptochrome, rythmes circadiens et longévité a récemment été mis en évidence (**Rakshit & Giebultowicz, 2013**). Chez la drosophile, des régulations mutuelles entre rythmes circadiens et vieillissement avaient déjà été établies avec certains composants de l'horloge comme le gène *period* dans des modèles de maladies neurodégénératives (**Krishnan et al, 2012**). Chez les jeunes mouches, une forte amplitude des oscillations d'expression des gènes de l'horloge comme *tim*, *per*, *vri* ou *pdp1ε* est observée quotidiennement. Une diminution de ces oscillations chez des mouches âgées entraînent une activité et / ou un sommeil fragmenté (**Rakshit et al, 2012 ; Rakshit & Giebultowicz, 2013**). Une nouvelle étude a été menée pour tenter de restaurer l'expression des gènes de l'horloge et le comportement des mouches en fonction du jour ou de la nuit. Elle a permis d'attribuer un nouveau rôle à DmCRY, celui de contrer les effets du vieillissement en surabondance d'oxygène (hyperoxie) en restaurant l'expression journalière des gènes de l'horloge (**Figure 13**).

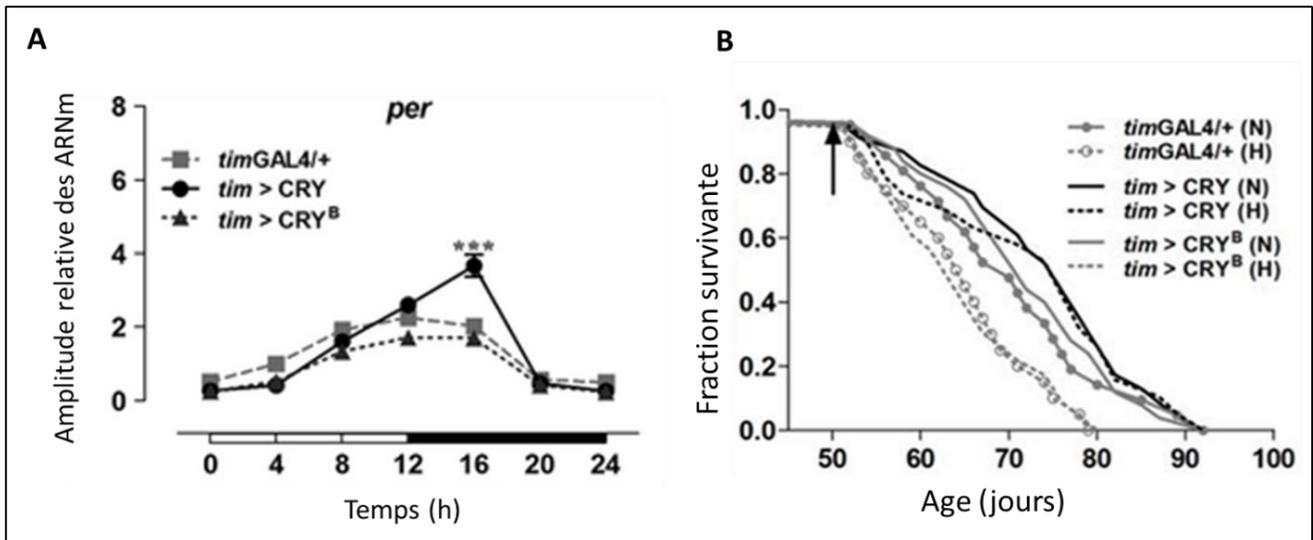


Figure 13 :

A : Abondance relative des ARNm *per* en fonction du jour ou de la nuit chez des mouches âgées (50j) surexprimant CRY (*tim > CRY*), mutantes non fonctionnelles pour CRY (*tim > CRY^B*), ou sauvages (*timGAL4/+*). **B :** courbes de survie des mêmes drosophiles sauvages ou mutantes en conditions normales d'oxygène (normoxie : N) ou de forte abondance en oxygène (hyperoxie : H) (Rakshit & Gebultowicz, 2013).

Les mouches âgées qui surexpriment CRY présentent une augmentation de l'amplitude d'expression des gènes de l'horloge dont PER et TIM en fonction du cycle jour/nuit. Elles montrent aussi un meilleur taux de survie avec l'âge en conditions d'hyperoxie (H). Des expériences complémentaires ont également montré que la quantité de protéines carbonylées dans les têtes de drosophiles âgées était réduite et que l'activité locomotrice était plus importante chez ces mêmes mouches surexprimant CRY. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux qui ont montré que DmCRY régule des gènes impliqués dans les réponses aux ROS et aux stress (Vieira *et al*, 2012)

D'autres cryptochromes de type I comme celui du papillon monarque, sont impliqués dans l'orientation durant la période migratoire. Chaque automne, des millions de papillons monarques voyagent de l'est des Etats-Unis et du nord du Canada jusque dans une petite zone au centre du Mexique où ils passent l'hiver, ils parcourent ainsi 4000km. Pour cela, ils ont besoin d'une carte et d'une boussole dont le soleil est la principale composante. Plusieurs études suggèrent un rôle des photorécepteurs, notamment ceux de l'horloge circadienne, pour l'orientation des papillons par le soleil et la lumière ultraviolette polarisée (Reppert S-M, 2007). La modification du timing des cycles jour/nuit, tout comme la suppression des gènes de l'horloge, perturbent l'orientation du vol. Deux des gènes de l'horloge étant CRY1, un cryptochrome de type I et CRY2 de type II (Kyriacou *et al*, 2009). Comme chez la drosophile CRY1 régule négativement les régulateurs centraux de l'horloge qui sont les homologues de CLOCK et CYCLE par sa liaison à TIM et PER en coopération avec CRY2

(Chaves *et al*, 2011). CRY1 est exprimé dans les neurones d'horloge du cerveau mais aussi dans d'autres tissus avec les autres gènes de l'horloge. Ils sont tous probablement impliqués dans certains aspects de la migration, principalement par la détection de la durée du jour qui varie en fonction de la latitude. De la même manière que CRY2 chez *A. thaliana* qui déclenche la floraison lorsque les jours se rallongent, les cryptochromes du monarque, en association avec d'autres gènes de l'horloge pourraient déclencher la migration lorsque les jours raccourcissent. Ce mécanisme permettrait également aux papillons de repérer leur latitude au fur et à mesure de la migration (Reppert *et al*, 2010). Une hypothèse a été émise quant à la sensibilité magnétique de CRY1 et CRY2 pour l'orientation des monarques par le champ magnétique terrestre (Kyriacou C, 2009 ; Reppert *et al*, 2010).

1.3.2 Cryptochromes de type II

De manière analogue à la découverte des cryptochromes de type I chez la drosophile, c'est en recherchant des gènes analogues à la photolyase qu'ont été découverts les cryptochromes de type II chez les mammifères (Hsu *et al*, 1996). Ces protéines nommées hCRY1 et hCRY2 chez l'Homme ont également des homologues qui ont été identifiés chez la souris : mCRY1 et mCRY2 (Kobayashi *et al*, 1998) qui sont fortement exprimés au niveau de la rétine et des noyaux suprachiasmatiques et semblent comme chez la mouche, avoir un rôle majeur dans la régulation des rythmes circadiens (Miyamoto & Sancar, 1998). Chez les mammifères et notamment chez les souris, la rétine contient des molécules photoréactives aussi bien pour la vision que pour les réponses lumière dépendantes aux rythmes circadiens. Les opsines, localisées au sein des cônes et les bâtonnets sont utilisées pour la vision, mais leur rôle dans les régulations circadiennes n'est pas encore connu. Un petit groupe de cellules rétinienne ganglionnaires émettent des projections jusqu'aux noyaux suprachiasmatiques (NSC) dans l'hypothalamus, connus comme étant le centre régulateur des rythmes circadiens. Ces cellules ganglionnaires qui n'expriment pas d'opsines expriment, en revanche, les cryptochromes 1 et 2. De plus, les noyaux suprachiasmatiques expriment eux-mêmes mCRY1 et mCRY2 de façon circadienne (Miyamoto & Sancar, 1998). Ces données ont amené les spécialistes à suggérer leur rôle de régulateur circadien chez les mammifères. Afin de vérifier cette hypothèse, des mutants knock-out pour CRY1 et CRY2 ont été générés (Van Der Horst *et al*, 1999), il apparaît que le rythme jour/nuit est totalement aboli au niveau du comportement lorsque les souris sont maintenues à l'obscurité totale (Figure 14). L'arrhythmicité est immédiate pour les souris doubles mutantes à l'obscurité, alors que chez d'autres souris simples mutantes mCRY1 ou mCRY2, on observe seulement un décalage temporel de l'activité locomotrice avec le temps tout en maintenant les rythmes.

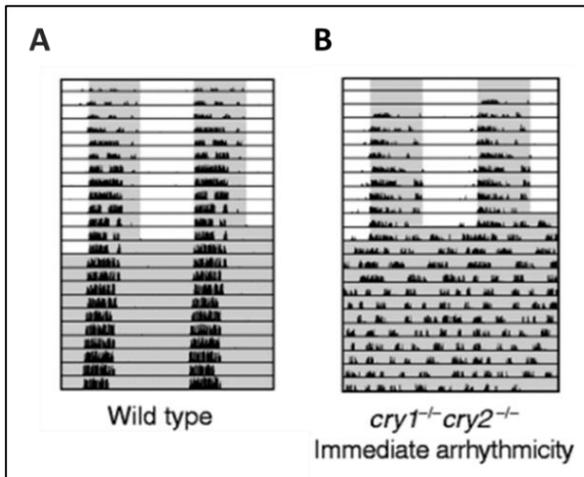


Figure 14 : Actogramme (ou phénotype d'activité locomotrice circadienne) de souris sauvages (A) ou double mutantes pour mCRY1 et mCRY2 (B). Les zones grisées représentent les périodes d'obscurité, une ligne représente 2 journées complètes, les illuminations sont stoppées au bout de 20 jours. Les petits traits noirs correspondent à des périodes d'activité sur une roue circulaire (Van Der Horst *et al*, 1999).

Ces expériences montrent qu'en plus d'être essentiels pour le maintien du rythme à l'obscurité (Figure 14A), ils sont impliqués individuellement sur la longueur de la période circadienne. En revanche en conditions d'alternance jour / nuit (figure 14B), mCRY1 et mCRY2 ne sont pas impliqués dans l'horloge circadienne. Ce rôle pourrait être rempli par la mélanopsine, un photorécepteur circadien chez les mammifères (Semo *et al*, 2003).

A l'instar de celle des insectes, l'horloge circadienne mammifère fonctionne par des boucles de rétrocontrôle au niveau de la transcription et de la traduction (Figure 15). Le complexe CLOCK:BMAL1 joue ici le rôle de régulateur central, il se fixe sur les E-box des gènes contrôlés par l'horloge, ces séquences sont conservées entre la mouche et la souris. Ce complexe active donc la transcription d'un grand nombre de gènes, sachant qu'approximativement 40% du génome de souris est exprimé de façon rythmique en fonction du jour ou de la nuit (Zhang *et al*, 2014). Parmi ces gènes régulés un groupe de répresseurs a été identifié : cry1, cry2, per1 et per2 qui agissent par une boucle de rétrocontrôle. Les protéines PER et CRY s'associent en hétéromultimères puis entrent dans le noyau et répriment le complexe CLOCK:BMAL1 (Brown *et al*, 2005). Des données récentes supposent même que CRY peut réprimer seul CLOCK:BMAL1 (Stratmann *et al*, 2010). Une autre boucle faisant intervenir ROR et REV-ERB permet au contraire de favoriser l'expression des gènes régulés par l'horloge dont BMAL1 (Gustafson *et al*, 2015). La dégradation journalière de PER et CRY permet de réduire la répression de CLOCK:BMAL1. Les régulations transcriptionnelles de CRY1 sont primordiales pour le maintien d'un cycle de 24h, tout comme les régulations post traductionnelles de CRY1 et CRY2 (Busino *et al*, 2007). Leur stabilité serait régulée par FBXL3, une ubiquitine ligase nucléaire qui induit leur dégradation par le protéasome et par d'autres ubiquitine ligase dans le cytoplasme (Yoo *et al*, 2013).

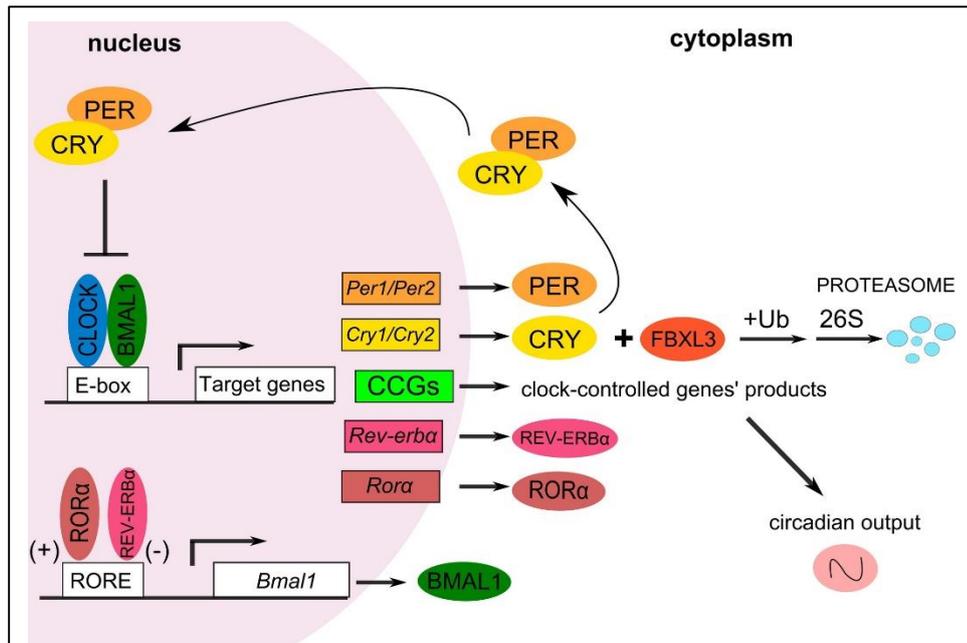


Figure 15 :

Schéma général des connaissances actuelles sur mécanismes moléculaires de l'horloge circadienne des mammifères. Les CCG sont tous les gènes régulés positivement ou négativement par les régulateurs centraux CLOCK et BMAL1 (Kavakli *et al*, 2017).

La molécule KL001 a été caractérisé par sa liaison aux deux cryptochromes, au niveau de la poche dans laquelle se trouve la FAD, et ce de façon compétitive avec FBXL3. Cette compétition permet la stabilisation de ces deux protéines en empêchant leur dégradation et le rallongement de la période circadienne ; cet exemple montre la capacité du cryptochrome à être une cible thérapeutique pour les troubles liés à l'horloge circadienne (Nangle *et al*, 2013). Plusieurs investigations ont démontré que CRY1 et CRY2 ont des fonctions distinctes, seul CRY1 est capable de générer de façon autonome un rythme circadien dans des tissus autres que les NSC, contrairement à CRY2, bien que les bases moléculaires de ces différences soient inconnues (Evans *et al*, 2012). D'autres publications récentes montrent que les régulations transcriptionnelles de CRY1 et CRY2 ne s'arrêtent pas à leur interaction avec CLOCK:BMAL1, en effet ils semblent se lier indirectement à plus de 16 000 loci à travers le génome de la souris (Koike *et al*, 2012).

Depuis peu, d'autres rôles en dehors des régulations circadiennes ont été attribués aux cryptochromes de type II chez les mammifères comme le montre la **Figure 16**. Ces rôles concernent la régulation du métabolisme et la maintenance de l'intégrité cellulaire et génomique par la détection de l'état de la cellule.

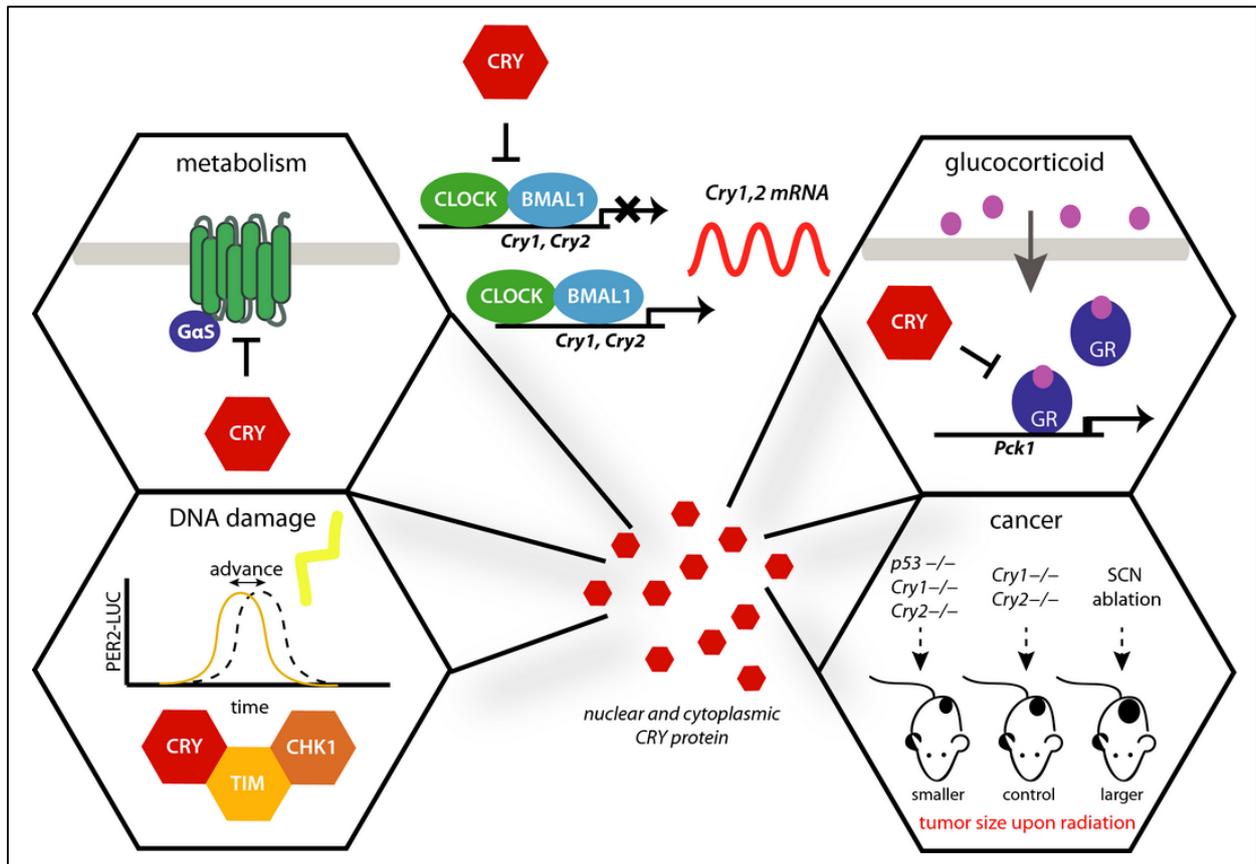


Figure 16 :
Schéma représentatif de l'état des connaissances sur l'ensemble des rôles attribués aux cryptochromes chez les mammifères (Michael *et al*, 2017).

Chez les rongeurs, l'interruption de l'horloge circadienne modifie la voie de l'insuline et conduit à l'obésité (Shi *et al*, 2013). CRY1 et CRY2 participent à l'homéostasie du glucose en interagissant avec le récepteur aux glucocorticoïdes, inhibant la transcription des gènes qui sont responsables de cette homéostasie (Lamia *et al*, 2011), ce faisant, ils limitent l'hyperglycémie induite par les glucocorticoïdes. D'autres équipes ont identifié une interaction entre les cryptochromes et la sous-unité Gas d'un récepteur couplé aux protéines G permettant ainsi de moduler la voie AMPc/Creb pour limiter la glycogénèse hépatique lors du jeûne (Zhang *et al*, 2010). L'homéostasie du glucose en général est sévèrement perturbée chez les souris déficientes en cryptochrome.

Les cryptochromes ont des similarités structurales avec les photolyases, enzymes réparant l'ADN. Bien que ne réparant pas directement l'ADN, les cryptochromes interagissent avec des voies cellulaires en réponse aux dommages à l'ADN (Kang *et al*, 2010). Chez les mammifères, il existe une protéine TIM comme chez la drosophile, mais celle-ci a des rôles distincts de la régulation de l'horloge circadienne. En effet elle module, entre autre, la réparation de l'ADN par la voie ATR-Chk1 qui

contrôle les checkpoints lors du cycle cellulaire (**Chou & Elledge, 2006**). Une étude a montré que CRY1 est capable de se lier à TIM. Cette liaison entre en compétition avec l'interaction TIM/ATR-Chk1, ce qui permet de moduler cette voie de réparation de l'ADN (**Kang & Leem, 2014**). De même, la liaison PER2/CRY1 entre également en compétition avec la liaison TIM/CRY1. En plus de réguler la stabilité de CRY1 ces interactions pourraient expliquer le décalage du rythme circadien en réponse aux stress génotoxiques (**Engelen *et al*, 2013**).

De nombreuses études épidémiologiques ainsi que des expériences chez la souris montrent qu'une perturbation des rythmes circadiens comme la lumière de nuit ou le travail en rotation peut conduire à une augmentation de l'incidence des cancers (**Papagiannakopoulos *et al*, 2016 ; Mteyrek *et al*, 2017**). De plus, chez des souris dont on a réalisé une ablation des NSC, on observe une accélération du développement des tumeurs (**Fillipski *et al*, 2002**). Du fait de leur implication indirecte dans la réparation des lésions de l'ADN par la voie ATR-Chk1 on pourrait penser que l'absence de CRY1 et CRY2 contribue à augmenter l'incidence des cancers. Cependant, des études *in vivo* sur des souris doubles knockout pour CRY1 et CRY2 n'ont révélé aucune différence avec les souris sauvages (**Gauger & Sancar, 2005**). En revanche, chez des modèles de souris sensibles au développement des cancers (mutantes pour le gène suppresseur de tumeur p53), la délétion des deux cryptochromes a un effet protecteur, et allonge la durée de vie des souris. Ces mêmes études ont montré que les fibroblastes de souris triples knockout p53/CRY1/CRY2 induisent plus facilement l'apoptose en réponse aux UV en comparaison au simple knockout p53, impliquant par-là les cryptochromes dans la transmission des signaux apoptotique indépendamment de p53 (**Ozturk *et al*, 2009**). Ces résultats pourraient attribuer aux cryptochromes un rôle clé dans les approches de chimiothérapie concernant les tumeurs ou p53 est inactif.

Chez l'Homme, les cryptochromes sont exprimés dans presque tous les tissus dont la rétine et les NSC (**Spek *et al*, 1996**). Bien qu'ils soient insensibles à la lumière, certaines études montrent une augmentation de l'expression de hCRY1 en réponse à la lumière bleue, ce qui pourrait venir d'un effet indirect (**Chen *et al*, 2005**). Des modèles d'expression des protéines hCRY1 ont été utilisés chez la drosophile pour déterminer si il pouvait y avoir une conservation (en terme de fonction) dans la cellule entre les cryptochromes de type I et II (**Vieira *et al*, 2012**). Celles-ci ont montré que hCRY1 possède une activité biologique chez la drosophile à l'obscurité et contre toute attente également à la lumière. Elles ont également révélé qu'à l'obscurité les cryptochromes de type II dont fait partie hCRY1 sont liés à une flavine déjà réduite, alors que chez la drosophile et les plantes la lumière bleue sert à la réduction de la flavine. Cette différence fondamentale du point de vue biochimique pourrait expliquer les divergences fonctionnelles entre les cryptochromes de type I et II. Toutefois, chez des cellules Sf21

surexprimant hCRY1, une photoréduction de la flavine par la lumière bleue a été observée, contredisant toutes les observations réalisées jusqu'alors sur l'activité indépendante de la lumière des cryptochromes de mammifères (**Hoang et al, 2008**).

Bien que l'on connaisse partiellement les voies signalétiques et les partenaires des cryptochromes végétaux, de type I ou de type II et leurs différents rôles au sein de l'horloge circadienne animale ou végétale, les mécanismes de conversion du signal lumineux en réponse biologique appropriée sont toujours activement en cours d'étude. Ceux-ci suscitent toujours de nombreux débats notamment concernant le photocycle de la flavine, le rôle de chaque acide aminés dans ce processus ou encore le changement conformationnel permettant la liaison aux partenaires permettant l'activité biologique. Il serait donc nécessaire de comprendre la genèse de ces signaux lorsque les effets obtenus sont indépendants de la lumière comme c'est le cas pour les cryptochromes de type II.

2. ACTIVATION ET SIGNALISATION DES CRYPTOCHROMES

Les mécanismes d'activation et de signalisation des cryptochromes ont de grandes similarités mais également de nombreuses spécificités entre espèces comme nous allons le voir.

2.1 Activation du photocycle et réduction de la flavine

2.1.1 Photoréduction de la flavine

Le chromophore principal des cryptochromes pour l'activation et la signalisation, la flavine adénine dinucléotide, est un transporteur de deux électrons au maximum que l'on peut retrouver dans trois états redox différents : état oxydé (FAD), état semi réduit (sous forme anionique $FAD^{\bullet-}$ ou neutre $FADH^{\bullet}$) ou état totalement réduit (anionique $FADH^-$ ou neutre $FADH_2$) (**Figure 17**). Parmi ces différentes formes, seules les flavines oxydées et semi-réduites sous forme anionique absorbent une quantité significative de lumière (400–500nm). De plus, le spectre d'action du cryptochrome concernant l'inhibition de l'élongation de l'hypocotyle correspond au spectre d'absorption de la flavine sous forme oxydée (**Ahmad et al, 2002**). Ces résultats sont cohérents avec le fait que la FAD oxydée soit le photopigment actif *in vivo* pour les cryptochromes. Il a également été proposé que la flavine oxydée puisse correspondre à l'état fondamental chez les cryptochromes d'*Arabidopsis* du fait de leur capacité d'absorption. Lorsque CRY1 du gène *Atcry1* est exprimé en cellules d'insecte pour ensuite être purifié, la flavine est retrouvée sous forme oxydée (**Lin et al, 1995**). Sous illumination en lumière bleue, la flavine de CRY1 purifié peut être converti sous forme neutre semi réduite $FADH^{\bullet}$.

Cette nouvelle forme a la caractéristique de pouvoir absorber la lumière verte. Puis, si l'on prolonge l'illumination on obtient la forme totalement réduite FADH⁻ ou FADH₂ qui reste capable d'absorber quelques longueurs d'onde du domaine visible.

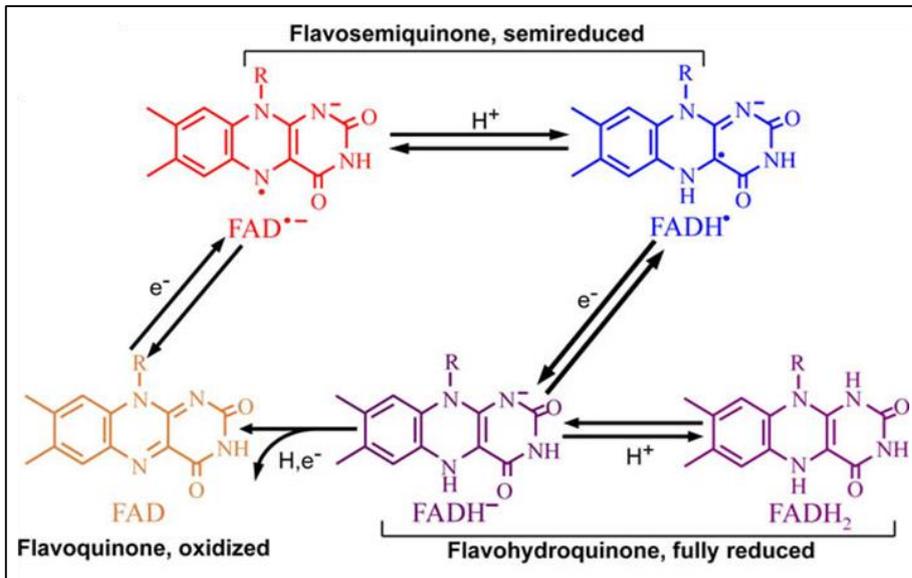


Figure 17 : Schéma représentatif des cinq formes redox possibles pour la flavine ainsi que leur possible interconversion (d'après Liu *et al*, 2011).

De façon similaire à CRY1, CRY2 contient également une flavine sous forme oxydée qui peut être réduite par l'absorption de lumière bleue comme l'ont montré des expériences utilisant la résonance paramagnétique électronique sur des protéines *in vitro* (Banerjee *et al*, 2007). L'addition de lumière verte, en plus de la lumière bleue, supprime certains effets induits par le cryptochrome comme l'inhibition de l'élongation de l'hypocotyle ou l'accumulation d'anthocyanines pour CRY1 mais aussi le déclenchement de la floraison pendant les jours courts pour CRY2 ainsi que sa dégradation dépendante de la lumière bleue (Bouly *et al*, 2007, Banerjee *et al*, 2007). L'effet antagoniste entre lumière bleue et lumière verte a donné lieu à l'établissement d'un nouveau modèle (Figure 18) permettant d'expliquer le cycle de photoréduction de la flavine.

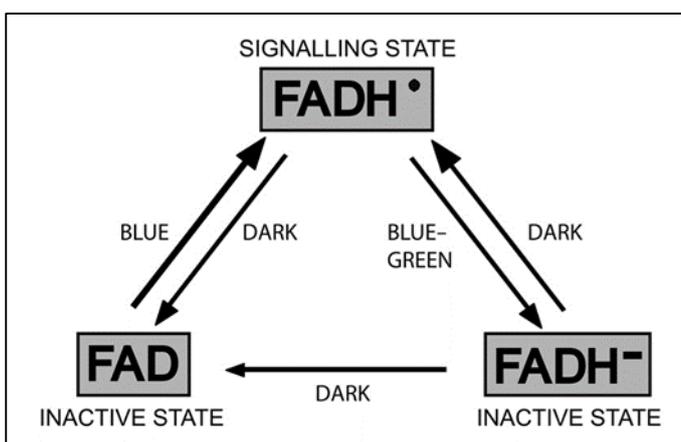


Figure 18 : Schéma représentant le modèle actuel à trois états du photocycle des cryptochromes chez Arabidopsis. Les 3 formes redox possibles sont représentées ainsi que leur état d'activité pour la signalisation des cryptochromes (Bouly *et al*, 2007).

Selon ce modèle, la flavine est à l'état oxydé (FAD) à l'obscurité, sous forme semi réduite FADH• en lumière bleue, ou totalement réduite (FADH-) par l'addition de lumière bleue ou verte. La forme FADH₂ n'est pas observable lors du photocycle des cryptochromes. Grâce à la présence de lumière bleue, la flavine oxydée passe à un état excité noté FAD* qui permet la récupération d'un électron d'un tryptophane dans son environnement proche. La photoréduction de la flavine oxydée vers son état excité en flavine semi réduite déclenche un changement conformationnel permettant la transduction d'un signal par la liaison à des partenaires protéiques. Selon ce modèle, la forme totalement réduite ne confère aucune activité biologique au cryptochrome mais peut, en revanche, s'oxyder à nouveau à l'obscurité pour terminer le photocycle et revenir à la forme FAD. Après purification du cryptochrome, il est possible de suivre, *in vitro*, l'interconversion entre forme oxydée et semi réduite grâce aux spectres d'absorption, car ceux-ci diffèrent selon l'état redox de la flavine. Lorsqu'elle est oxydée, l'absorbance est maximale aux alentours de 450nm et diminue lorsqu'elle se réduit. A l'inverse l'absorbance est maximale pour les UV vers 350nm avec la forme semi réduite et diminue lors de l'oxydation (Liu *et al*, 2010).

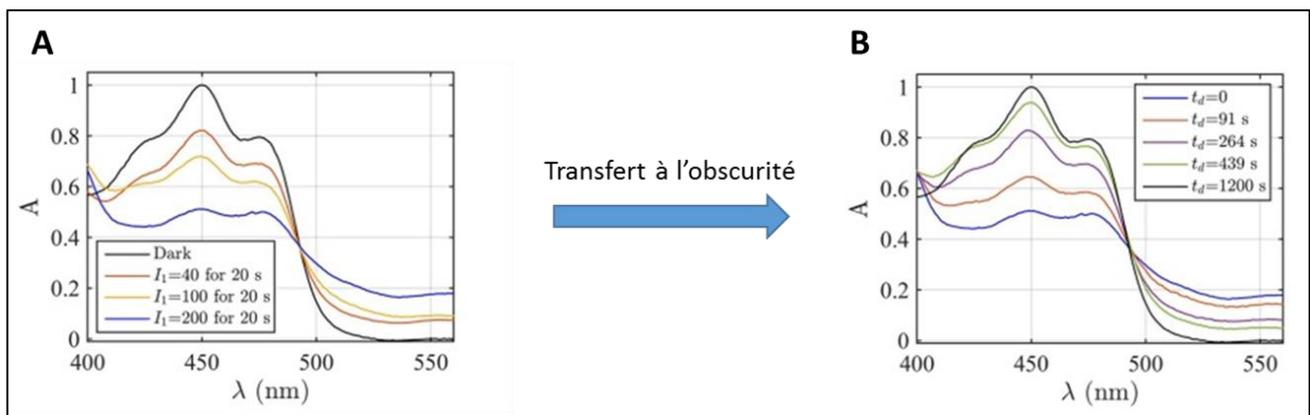


Figure 19 :

A : Spectres d'absorption pour la protéine CRY2 d'*Arabidopsis* purifiée en fonction de l'intensité de lumière bleue utilisée ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). **B :** Spectres d'absorption de CRY2 obtenus après illumination en lumière bleue à $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pendant 20 secondes et remis en obscurité, les spectres sont analysés à différents temps après le retour à l'obscurité (Procopio *et al*, 2016).

Ces spectres d'absorption permettent également de calculer certains paramètres cinétiques des cryptochromes comme la demi-vie de réoxydation de la flavine ou le rendement quantique (l'efficacité de la photoréduction par rapport à la quantité de photons). Le temps nécessaire pour revenir à la forme oxydée est de quelques minutes chez *Arabidopsis*, les demi-vies de la forme FADH• pour CRY1 et CRY2 avant sa réoxydation étant respectivement d'une et deux minutes (Procopio *et al*, 2016). Bien que la forme totalement réduite anionique existe *in vivo*, elle n'est présente qu'en très faible proportion

comparé aux formes oxydées et semi-réduites. L'étape de conversion entre forme semi réduite et totalement réduite est très inefficace, on peut donc simplifier davantage le modèle en un modèle à deux états (FAD / FADH•). Chez des photolyases purifiées, l'état de la flavine est semi réduit à l'obscurité, ce qui inactive la protéine, mais elle est totalement réduite à la lumière, ce qui permet une activité catalytique pour la réparation de l'ADN (Aubert *et al*, 2000).

Pour CRY1, Les mécanismes permettant la réduction de la flavine impliquent trois tryptophanes (Zeugner *et al*, 2005). Ces trois tryptophanes, qui se situent au niveau du domaine PHR, sont selon de nombreuses études, les donneurs d'électron permettant la réduction de la FAD. Ils sont hautement conservés, car ils correspondent aux acides aminés W324, W377 et W400 chez CRY1, et aux résidus W321, W374 et W397 chez CRY2. Chez les photolyases, trois tryptophanes : W306, W359 et W382 permettent également un transfert d'électron vers la flavine (Aubert *et al*, 2000). Leur localisation dans la protéine est très proche de la poche contenant la FAD et au sein de laquelle la réduction a lieu (Liu *et al*, 2016). La conservation de ces tryptophanes témoigne de leur importance, car lorsque l'un de ces trois résidus est remplacé par une alanine ou une phénylalanine, causant un minimum de perturbations conformationelles, mais étant inertes du point de vue redox, la flavine ne peut pas être réduite. En effet, plusieurs études *in vitro* utilisant les protéines CRY1 et CRY2 montrent que la présence de ces trois tryptophanes est nécessaire à la photoréduction (Liu *et al*, 2010 ; Li *et al*, 2011) aussi bien pour CRY1 que pour CRY2 chez *Arabidopsis*.

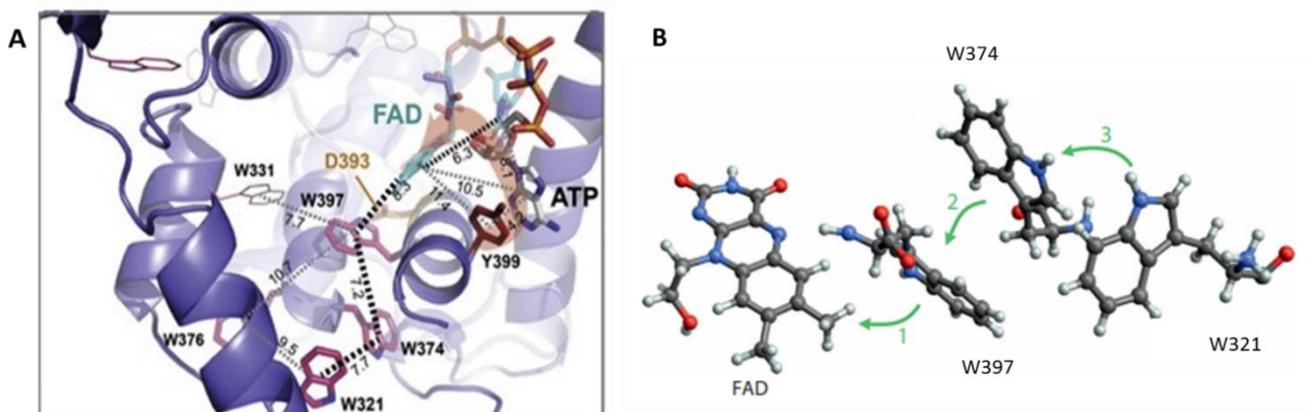


Figure 20 :

A : Structure protéique partielle du domaine PHR de CRY2 chez *Arabidopsis* montrant partiellement la poche dans laquelle vient se fixer la flavine (en turquoise). Les trois tryptophanes permettant le transfert des électrons sont représentés en violet, les distances en Å sont précisées et le trajet des électrons correspond à la ligne noire en pointillés. **B :** modèle simplifié du transfert des électrons entre la flavine et les tryptophanes (Ahmad M, 2016 ; modifié d'après Hore & Mouritsen, 2016).

D'autres observations *in vivo* utilisant les mêmes mutants des trois tryptophanes montrent que l'activité photoréductrice est réduite par rapport aux protéines sauvages (**Ahmad M, 2016 ; El-Esawi et al, 2015 ; Hoang et al, 2008**). L'activité photoréductrice résiduelle observée chez ces simples mutants pourrait être due à des voies alternatives pour le transfert des électrons qui n'apparaissent pas *in vitro* car elles nécessiteraient la présence de certains métabolites (ATP, ADP, NADH). Ces métabolites ont été décrits comme amplifiant des voies alternatives au photocycle classique, impliquant d'autres tryptophanes comme W376 et W331 chez CRY2 et même une tyrosine à proximité de la flavine (**Engelhard et al, 2014**). Une autre étude a révélé l'importance d'un aspartate au niveau de la poche contenant la flavine pour l'établissement du photocycle. Lorsque celui-ci est remplacé par une asparagine (mutation D396N) une réduction complète de la flavine en lumière bleue est observée. Cette réduction complète confère chez ce mutant pour CRY1 une habilité à réparer l'ADN simple brin (**Burney et al, 2012**). Cet aspartate est donc indispensable au maintien de la forme active semi réduite de CRY1. Il été envisagé que la déprotonation de cet aspartate suite à la réduction de la FAD pourrait déclencher le changement conformationnel à l'origine de l'activité de CRY1 (**Thöing et al, 2015**).

Ce processus à l'origine de la réduction de la flavine est extrêmement rapide, les ordres de grandeur sont plus ou moins les mêmes entre les cryptochromes et les photolyases. Le premier transfert d'électron entre le premier tryptophane (W397 chez CRY1) et la flavine excitée par la lumière bleue a lieu en moins d'une picoseconde. Une paire de radicaux se crée de façon transitoire ($FAD^{\bullet-}/Trp1H^{\bullet+}$). Cette réaction peut être réversible. Si ce n'est pas le cas, la réaction se stabilise par un second transfert d'électron entre premier et le second tryptophane, puis entre le deuxième et le troisième, en un temps relativement plus long ($\approx 100ps$). A la fin de la réaction en chaîne, le dernier tryptophane $Trp3H^{\bullet+}$ exposé au solvant se déprotone en quelques centaines de nanosecondes. Par le processus inverse, la flavine est capable de réduire les tryptophanes. Or des réducteurs externes rentrent en compétition avec la $FADH^{\bullet}$, et réduisent le radical neutre $Trp3^{\bullet}$. Cette compétition permet à la forme $FADH^{\bullet}$ de se stabiliser (**Muller et al, 2015 ; Brazard et al, 2011 ; Aubert et al, 2000**).

Ces tryptophanes sont de plus probablement essentiels au maintien de la structure secondaire et/ou tertiaire des cryptochromes, car lorsque CRY2 subit une substitution d'un seul tryptophane par une alanine induit un changement conformationnel à la surface de la protéine qui rend CRY2 constitutivement actif et ce indépendamment de la lumière (**Li et al, 2011**).

A la différence de ce qui se produit chez les plantes, les cryptochromes animaux de type I réduisent la FAD en radical anionique semi réduit : $FAD^{\bullet-}$ qui se ré-oxyde à nouveau à l'obscurité en

conditions aérobies (**Zoltowski et al, 2011**). Une triade de tryptophanes (W420, W397 et W342) est responsable de la photoréduction de la flavine, avec des voies alternatives de transfert des électrons à partir d'autres tryptophanes que ceux de la triade et également présents autour de la flavine. Des expériences comprenant des cellules insectes recombinantes exprimant DmCRY ont montré que cette triade est essentielle pour la photoréduction de la FAD en FAD^{•-} (**Ozturk et al, 2008**). L'état semi-réduit FAD^{•-} a initialement été proposé comme étant à l'origine de l'état actif de la protéine (**Hoang et al, 2008 ; Vaidya et al, 2013**). Selon ce modèle l'état fondamental de la flavine serait l'état oxydé FAD qui se réduirait en FAD^{•-} en présence de lumière bleue. Plusieurs évidences en faveur de ce modèle ont été obtenues par différentes expérimentations. Le fait que le spectre d'absorption de la lumière responsable de la dégradation de DmCRY se superpose au spectre d'absorption de la flavine oxydée, ou bien que DmCRY surexprimé en cellules d'insecte contiennent une flavine sous forme oxydée qui est réduite sous forme FAD^{•-} en lumière bleue corrobore ce modèle (**Hoang et al, 2008**). De nouvelles études concernant la structure et le mode d'activation de DmCRY renforcent l'exactitude de ce modèle (**Vaidya et al, 2013 ; Lin et al, 2018**). D'autres études centrées sur le changement conformationnel (**Ganguly et al, 2016**), ainsi que celles de notre équipe (**Arthaut et al, 2017**) qui incluent l'étude des ROS ou du champ magnétique confirment, elles aussi, ce modèle de photoréduction.

Une triade de trois tryptophanes est également présente au niveau du PHR des cryptochromes de mammifères dont ceux de l'Homme (**Liu et al, 2010**). La protéine hCRY1 purifiée ou en cellule d'insecte Sf21 est capable de subir une photoréduction à la lumière (**Hoang et al, 2008**) bien que les formes précises d'oxydoréduction de la flavine qui en seraient responsable n'aient pas été identifiées. Cependant aucune étude n'a encore corrélé cette photoréduction à une activité de régulation génétique chez les mammifères. Les mécanismes à l'origine de la réduction et n'impliquant pas la lumière restent pour l'instant inconnus. Sachant que les mammifères sont plus volumineux et denses que les feuilles et les insectes, et souvent nocturnes, il paraîtrait logique que les cryptochrome qui font partie de l'horloge circadienne soient régulés autrement que par une absorption directe de lumière. A l'exception de quelques études sur hCRY1 exprimé chez la drosophile (**Vieira et al, 2012 ; Gelder et al, 2003**), aucune étude n'a pu montrer que cette protéine était capable de réguler la transcription sous l'effet de la lumière. Sachant que hCRY1 est exprimé dans presque tous les tissus humains, il pourrait subir une photoréduction dans certains tissus comme la rétine ou la peau. Toutefois pour expliquer les effets lumière-indépendants des cryptochromes de mammifères il faudrait envisager d'autres mécanismes. Un nombre croissant de preuves attestent que des interactions ont lieu entre l'horloge circadienne et de multiples voies redox intracellulaires notamment métaboliques, dont la voie de biosynthèse du

cofacteur redox NAD⁺ (Pritchett & Reddy, 2017). Il est donc possible que la réduction de la flavine soit cycliquement contrôlée par des agents réducteurs cellulaires dont la proportion serait elle-même contrôlée par l'horloge circadienne, entretenant ainsi le cycle. Néanmoins ces hypothèses restent à confirmer.

2.1.2 Rôle du changement conformationnel pour la liaison aux partenaires

Chez *Arabidopsis*, les domaines C-terminaux soumis à un changement conformationnel ont une longueur de 180 et 110 acides aminés respectivement chez CRY1 et CRY2. En l'absence du domaine PHR, qui permet la photoréception, la partie C-terminale est constitutivement active, elle est capable d'interagir avec les partenaires protéiques et permet de remplir en permanence les fonctions des cryptochromes en l'absence de lumière (Yang *et al*, 2000 ; Yu *et al*, 2007). Un motif de 80 acides aminés appelé NC80, faisant partie du domaine C-terminal, est dé-réprimé après un changement conformationnel induit par la lumière bleue (Yang *et al*, 2016). Des études utilisant un laser pulsé sur la protéine CRY1 ont confirmé qu'un changement conformationnel avait bien lieu mais que celui-ci disparaissait avec une protéine CRY1 tronquée de son domaine C-terminal (Kondoh *et al*, 2011). Selon certains modèles, la libération de ce motif, qui reste emprisonné à l'obscurité pourrait être due à la phosphorylation ayant lieu dans la partie C-terminale. Celle-ci est directement corrélée à l'intensité et à la durée d'exposition à la lumière (Shalitin *et al*, 2003) et pourrait être l'élément déclencheur du changement conformationnel. La surface protéique de CRY1 au niveau du domaine PHR est principalement négative (Brautigam *et al*, 2004), il pourrait donc se produire une répulsion électrostatique avec les charges négatives des groupements phosphate. Cependant, le changement conformationnel détecté pour CRY1 d'*A. thaliana* survient en quelques millisecondes (Kondoh *et al*, 2011), ce qui est probablement beaucoup trop rapide pour que la phosphorylation ait lieu avant. De plus, la zone masquée avant le changement de conformation pourrait être nécessaire à la fixation des kinases. Ce changement conformationnel serait à l'origine de la libération du motif NC80 qui correspond à une région terminale permettant la signalisation par la liaison aux partenaires. Ce mécanisme d'activation a également été identifié chez CRY2 et pourrait expliquer en partie la régulation de la floraison par CRY2 (Yu *et al*, 2007).

Malheureusement aucune information n'a été obtenue sur la structure 3D du domaine C-terminal car celui-ci semble très difficile à analyser par cristallographie ou toute autre méthode du fait que sa structure semble très irrégulière. De plus sa structure est très difficile à prédire *in silico*. Ceci implique que les modèles de repliement de la partie C-terminale ne sont que théoriques et donc à

prendre avec beaucoup de précaution (**Figure 22**). Récemment des études par dichroïsme circulaire ont suggéré qu'une portion de 50 acides aminés, adjacents à la cavité de la flavine, étaient d'une grande importance pour le déploiement de la partie C-terminale en réponse à la lumière. Ce résultat indiquerait un lien potentiel de cause à effet entre réduction de la FAD, restructuration des acides aminés environnants dont l'aspartate 396 et la libération de la partie C-terminale (**El-Esawi et al, 2015**).

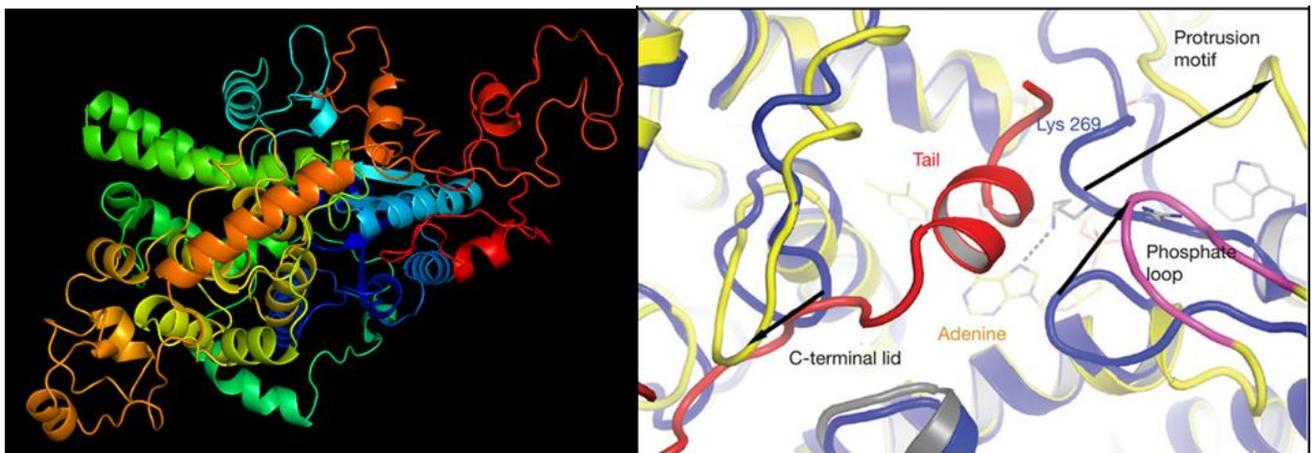


Figure 21 :

A gauche : Modélisation de la structure secondaire et tertiaire de la protéine CRY1 d'*A. thaliana* grâce au programme Phyre2. Les résidus allant du bleu à l'hélice orange centrale correspondent au PHR, et le domaine C-terminal commence après celle-ci et se termine à la partie rouge. **A droite :** Représentation schématisée de la conformation protéique de DmCRY aux environs de la queue C-terminale (rouge), on observe plusieurs structures comme la boucle phosphate (rose) ou le couvercle C-terminal (jaune) (**Zoltowski et al, 2011**).

Bien qu'il subsiste une incohérence quant au site exact de l'interaction des cryptochromes avec leurs partenaires, il existe un consensus selon lequel la majorité d'entre eux se fixent au niveau du N-terminal et que la lumière bleue soit le déclencheur de ce mécanisme par l'induction de la photoréduction et du changement conformationnel en C-terminal (**Kondoh et al, 2011 ; Partch et al, 2005**).

Chez la drosophile, DmCRY contient lui aussi une queue C-terminale (CTT) en forme d'hélice qui se situe à la surface de la protéine près de la cavité contenant la flavine. Elle est tout aussi essentielle pour la signalisation que chez les plantes (**Vaidya et al, 2013**). *In vivo*, DmCRY est moins stable à la lumière qu'à l'obscurité et l'est encore moins si on lui retire la CTT (**Busza et al, 2004 ; Rosato et al, 2001**), celle-ci permettrait donc une bonne stabilité dans cette région. La structure tridimensionnelle de la protéine DmCRY est aujourd'hui entièrement connue (**Figure 21**), et on peut remarquer que la CTT est séquestrée par plusieurs structures autour d'elle regroupant différents résidus comme le "C-

terminal lid", le "protrusion motif" ou la "phosphate binding loop". Les différences structurelles entre DmCRY et les photolyases montrent que la reconnaissance de la CTT se fait à la place de l'ADN. Mécaniquement, lors de sa photoréduction, la flavine subit une distorsion, ce qui influe directement sur les résidus voisins dont certains sont directement en contact avec l'hélice de la CTT (**Zoltowski et al, 2011**). Dans une étude plus récente, la photoréduction a été directement reliée à la protonation d'une histidine dans l'environnement de la CTT. Cette protonation déclenche une altération des liaisons hydrogène environnantes qui induisent l'éjection de la CTT de sa cavité et ce de façon très rapide, de l'ordre de 25ns (**Ganguly et al, 2016**). Le temps pendant lequel la protéine sera active est quant à lui beaucoup plus long, de l'ordre de quelques minutes. Ces études permettent d'expliquer le lien qui existe entre la photoréduction, le changement conformationnel et la signalisation avec les partenaires comme TIM. En effet, lorsque la CTT est relâchée de sa cavité en présence de lumière bleue elle se retrouve davantage exposée à la protéolyse, cela concorde avec le fait que DmCRY interagit avec jetlag, une ubiquitine ligase qui induit l'ubiquitination de TIM et DmCRY (**Koh et al, 2006 ; Peschel et al, 2009**). Toutefois, certaines études affirment que DmCRY est polyubiquitiné par un complexe d'ubiquitination, et cela notamment grâce à la protéine BRWD3, car lorsque celle-ci est inactive, la dégradation de DmCRY est fortement réduite (**Ozturk et al, 2013**). Cette CTT pourrait donc être fortement impliquée dans la liaison aux partenaires. Une étude récente montre que les modifications globales dans la structure de DmCRY sont parfaitement modélisables par le repositionnement de la CTT en dehors de sa cavité et que la région de DmCRY qui se fixe à la protéine TIM ressemble à la CTT (**Vaidya et al, 2013**). Chez d'autres animaux comme le poulet, des changements structurels notamment du cryptochrome 4 ont également été identifiés, et cela en réponse à la lumière (**Watari et al, 2012**), ce qui laisse penser que ce mécanisme est hautement conservé dans l'évolution.

Chez les mammifères, des mécanismes similaires ont lieu, cependant la lumière n'est pas indispensable à ce phénomène. Chez la souris on retrouve également une queue C-terminale d'une centaine d'acides aminés pour mCRY1 et mCRY2. Elle est nécessaire pour la répression de BMAL1/CLOCK car la délétion complète de la partie C-terminale inhibe l'activité du cryptochrome et rend impossible l'inactivation de BMAL1/CLOCK par CRY/PER2 (**Chaves et al, 2006 ; Tamanini et al, 2007**). La CTT est associée à une hélice alpha à la fin du PHR pour former une structure qui permet la liaison directe avec la protéine de l'horloge BMAL1 (**Czarna et al, 2011**). Il apparaît que l'interaction entre les cryptochromes et BMAL1 a lieu à la fois au niveau de la queue C-terminale et au niveau d'une poche secondaire du domaine PHR (**Rosenweig et al, 2018**). Ces études pourraient potentiellement être intéressantes pour concevoir de nouvelles molécules thérapeutiques capables de réguler l'horloge circadienne.

2.2 Signalisation et liaison aux partenaires

2.2.1 Localisation cellulaire et stabilité

L'immense majorité des études qui ont été réalisées chez les plantes et les animaux suggèrent déjà que l'action du cryptochrome avait lieu dans le noyau. Les principaux arguments en faveur de cette théorie venaient de leur proximité structurelle avec les photolyases qui se doivent d'être liées à l'ADN pour sa réparation. Mais ce sont des analyses par fluorescence qui vont d'abord confirmer cette théorie chez *Arabidopsis*. Elles ont confirmé que CRY1 et CRY2 étaient tous les deux localisés à la fois dans le cytoplasme et le noyau et que CRY2 est une protéine presque exclusivement nucléaire qui de plus possède une séquence NLS dans sa partie C-terminale (**Guo *et al*, 1999**). La partie C-terminale de CRY2 seule est même suffisante pour cette localisation, et la présence ou non de lumière ne semble pas affecter l'activité de localisation de la séquence NLS. Aucune NLS n'a été retrouvée chez CRY1, ce qui n'empêche pas la protéine d'être également localisée dans le noyau. L'homologue de CRY1 est également retrouvé dans le cytoplasme et le noyau des cellules chez d'autres plantes comme le riz ou la fougère (**Matsumoto *et al*, 2003 ; Imaizumi *et al*, 2003**). Cette présence de CRY1 dans le cytoplasme pourrait permettre certaines fonctions distinctes des protéines CRY1 localisées dans le noyau (**Wu & Spalding, 2007**).

Concernant les cryptochromes de type I, nos études, réalisées chez des cellules d'insecte Sf21 surexprimant la protéine DmCRY, ont mis en évidence une localisation de la protéine DmCRY dans le noyau en réponse à la lumière bleue (**Arthaut *et al*, 2017**). Des résultats similaires avaient déjà mis en évidence un phénomène de relocalisation de CRY2 d'*A. thaliana* en cellules Sf21 en réponse à la lumière bleue (**Jourdan *et al*, 2015**). Une des explications à ces phénomènes pourrait être que le changement conformationnel induit par la lumière faciliterait l'accessibilité de la séquence NLS aux transporteurs nucléaires.

En ce qui concerne les cryptochromes animaux de type II, il est maintenant clairement démontré qu'ils s'accumulent dans le cytoplasme et se fixent aux protéines PER chez les mammifères. Ces complexes sont ensuite transloqués dans le noyau. Au cours de plusieurs analyses moléculaires, une séquence NLS a été mise en évidence aussi bien chez les protéines PER que chez les cryptochromes (**Zhu *et al*, 2003 ; Hirayama *et al*, 2003**). De plus le domaine PHR de mCRY1 possède deux séquences NLS. Cependant la relocalisation nucléaire tout comme l'activité biologique de la protéine mCRY1 par liaison aux partenaires ne nécessite pas la présence de ces séquences NLS, la

liaison seule avec PER2 est en effet suffisante (**Tamanini et al, 2007**). Récemment l'importine nucléaire KPNB1 a été identifiée comme essentielle à la relocalisation nucléaire de PER et CRY. La perte de cette protéine abolit la rythmicité des gènes de l'horloge et le comportement cyclique jour/nuit (**Lee et al, 2015**). Les premières études sur les souris ont montré que mCRY1 était adressé à la mitochondrie mais peu présent ailleurs, alors que mCRY2 était principalement présent dans le noyau (**Kobayashi et al, 1998**).

La plupart des cryptochromes deviennent instables à la lumière, leur demi-vie d'activation oscille entre 1 à deux minutes chez les plantes à 5 minutes chez la drosophile (**Arthaut et al, 2017**). Chez *Arabidopsis*, CRY2 subit une dégradation par le protéasome 26S alors que CRY1 est stable (**Lin et al, 1998 ; Yu et al, 2009**). Chez les cryptochromes de mammifères, une dégradation dépendante de la lumière a été détectée pour hCRY1 exprimé chez la drosophile (**Hoang et al, 2008**), de manière similaire à ce qui a été observé pour les complexes COP1 / CRY2 et jetlag / CRY.

2.2.2 Liaison à l'ATP et phosphorylation

Bien qu'aucune interaction directe entre les cryptochromes et l'ADN n'ait été détectée jusqu'à ce jour, il apparaît que la molécule d'ATP est capable de se fixer au niveau de la poche contenant la flavine et d'induire une autophosphorylation dépendante de la lumière bleue. Cette observation a été faite *in vivo* et *in vitro* chez des plantules d'*Arabidopsis* aussi bien pour CRY1 que pour CRY2 (**Shalitin et al, 2002 ; Shalitin et al, 2003**) (**Figure 22A**). Aucun autre substrat que le domaine N-terminal n'a été identifié pour l'activité kinase du cryptochrome. De plus aucun rôle physiologique n'a clairement été attribué à cette autophosphorylation. Néanmoins, il semblerait qu'elle permette une stabilisation de la flavine sous sa forme semi réduite FADH• (**Burney et al, 2009**). La forme semi réduite de la flavine permettant au cryptochrome d'avoir une activité biologique, cette autophosphorylation pourrait jouer un rôle significatif dans la stabilisation de la conformation active du cryptochrome. La disponibilité en ATP dans la cellule pourrait donc moduler l'activité des cryptochromes. En accord avec cette hypothèse, notre équipe a mis en évidence que l'ATP permettait une voie alternative de transfert d'électrons pour la photoréduction (**El-Esawi et al, 2015**). La liaison à la poche de la flavine pourrait augmenter la flexibilité de certains résidus et/ou permettre un meilleur alignement des résidus, créant des opportunités pour le transfert des électrons (**Engelhard et al, 2014**).

La phosphorylation de CRY1 pourrait être réalisée par deux mécanismes, une autophosphorylation qui a été observée *in vitro* au niveau N-terminal, et une phosphorylation réalisée par des kinases végétales dans la région C-terminale et observable uniquement *in vivo* (Chaves *et al*, 2011). Seules quelques unes de ces kinases ont été identifiées comme PPK123 et PPK124 (Liu *et al*, 2017). En revanche l'autophosphorylation n'est pas détectable pour CRY2 (Ozgun & Sancar, 2006) qui ne présente qu'un seul type de phosphorylation réalisée en C-terminal par d'autres kinases végétales comme CK1.3 et CK1.4 (Tan *et al*, 2013).

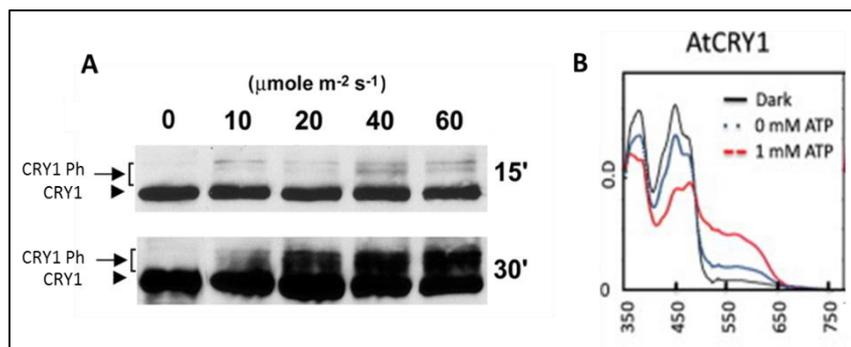


Figure 22 :

A : Analyse par Western blot de la phosphorylation de CRY1 chez des plantules d'*A. thaliana* après 15 ou 30min d'illumination en lumière bleue à une intensité variable. **B :** Spectre d'absorption de CRY1 purifiée à l'obscurité ou à la lumière bleue avec ou sans ATP (Shalitin *et al*, 2003 ; Burney *et al*, 2009)

Les spectres d'absorption montrent que l'ajout d'ATP permet d'augmenter la proportion de flavine réduite (Figure 21). Cette phosphorylation, que l'on observe à la lumière disparaît peu à peu à l'obscurité et est absente chez les mutants inactifs pour CRY1 ou CRY2, suggérant que l'activité biologique du photorécepteur est directement corrélée à son état de phosphorylation, car en effet seul la forme active des cryptochromes est phosphorylable. On peut faire l'hypothèse que la phosphorylation des cryptochromes stabilise leur forme active semi-réduite. Toutefois, la phosphorylation lumière bleue dépendante de CRY2 déclenche également son ubiquitination et sa dégradation (Liu *et al*, 2017). Cependant la phosphorylation des cryptochromes chez les végétaux est plus complexe à appréhender car l'ATP est capable de se fixer à la protéine en obscurité tout en induisant un changement conformationnel. Il semblerait également que plusieurs résidus soient phosphorylables parmi les sérines, thréonines et tyrosines du domaine N-terminal (Shalitin *et al*, 2003). Bien que la phosphorylation soit maintenant identifiée comme influant sur l'activité de CRY1 et de CRY2 (Liu *et al*, 2017), il est impossible de dire si elle est réellement nécessaire à l'activité biologique *in vivo* et si oui jusqu'à quel point. En effet, en substituant les 13 sérines phosphorylables

en C-terminal pour CRY2, seuls des effets mineurs ont été observés au niveau biologique (**Wang et al, 2015**). Il reste néanmoins à déterminer l'implication de l'autophosphorylation en N-terminal dans l'activité biologique de CRY1.

Concernant les cryptochromes de type I, les mécanismes de phosphorylation sont peu connus. La phosphorylation d'une thréonine pour DmCRY a été néanmoins détectée par spectrométrie de masse et cristallographie. Celle-ci pourrait jouer un rôle dans le maintien de la conformation du domaine C-terminal (**Zoltowski et al, 2011**).

Chez les mammifères et plus particulièrement chez la souris, la phosphorylation du cryptochrome a été largement étudiée, et semble mieux comprise que chez les plantes. Au moins cinq kinases différentes se sont révélées être impliquées dans la phosphorylation du cryptochrome et ce de façon lumière indépendante (**Sanada et al, 2004 ; Kurabayashi et al, 2010; Hirano et al, 2014 ; Liu & Zhang, 2016**). Ces kinases incluent "l'adénosine monophosphate-activated protein kinase" (AMPK), la "glycogen synthase kinase 3 β " (GSK3 β), la "DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)" ou encore la "mitogen-activated protein kinase" (MAPK). Ces études ont montré que la phosphorylation du cryptochrome le déstabilise mais augmente son activité. Lorsque la phosphorylation est inhibée des distorsions apparaissent concernant la période circadienne.

2.2.3 Liaison à des partenaires et transduction du signal

Chez les cryptochromes de type I, l'activation par la lumière permet la liaison à différents partenaires qui sont tous des composantes de l'horloge circadienne ou bien des ubiquitines ligases qui vont entraîner la dégradation du cryptochrome ou de ses partenaires protéiques. Chez *A. thaliana* les partenaires se liant au cryptochrome ainsi que la transduction du signal qui s'en suit sont aujourd'hui étudiés de manière intensive. Il a été mis en évidence au niveau mécanistique que CRY1 et CRY2 interagissaient tous les deux avec CIB1 et SPA1 (**Liu et al, 2011**) en réponse à une exposition à la lumière bleue. CRY1 et CRY2 sont de plus tous les deux capables de s'homodimériser; cette fonction se révélant être essentielle pour leurs différentes activités (**Sang et al, 2005 ; Yang et al, 2016**). Le domaine PHR serait responsable de la formation de ces dimères (**Figure 23**).

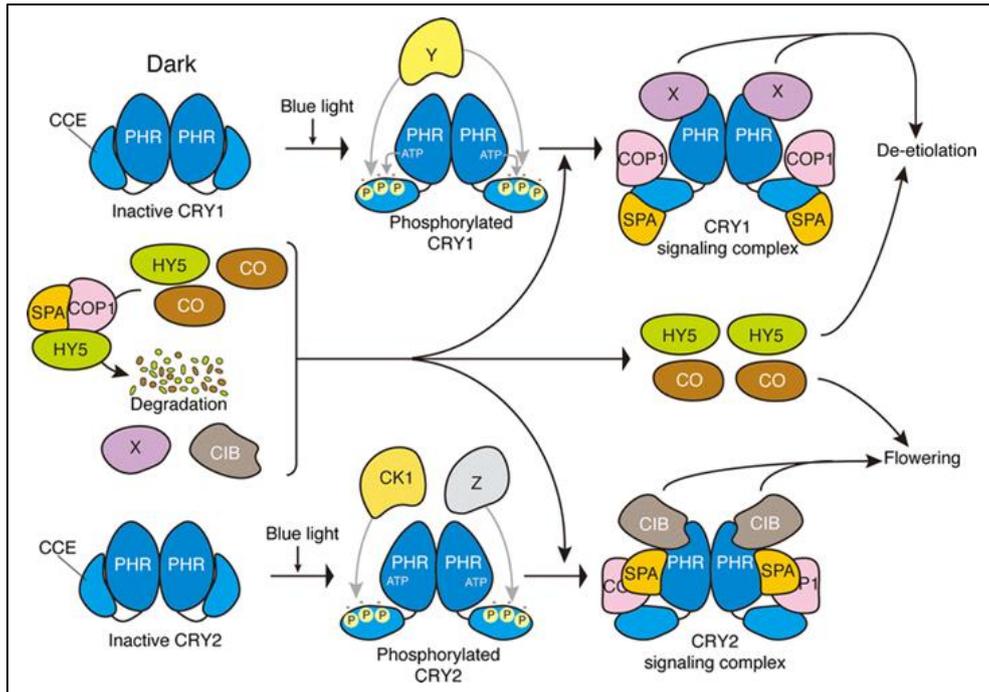


Figure 23 :

Schéma théorique expliquant le dépliement de CRY1 et CRY2 par la lumière bleue après dimérisation des domaines PHR et la phosphorylation des domaines C-terminaux (CCE) par des kinases encore peu connues. La liaison aux partenaires peut ensuite avoir lieu dans le but d'accumuler les protéines HY5 et CO pour l'établissement de leurs fonctions (**Liu et al, 2016**).

SPA1 (suppressor of PHYA-105 1) et ses protéines associées SPA2 et SPA4 forment avec COP1 un complexe d'ubiquitine ligase qui réprime la photomorphogenèse en inhibant notamment l'expression du gène HY5, un facteur de transcription de type leucine zipper qui se fixe sur le promoteur de nombreux gènes régulés par la lumière (**Osterlund et al. 2000; Lau & Deng 2012**). A l'obscurité, le complexe COP1/SPA1 ubiquitine HY5, provoquant sa dégradation. A la lumière, ce complexe est inactivé par l'intervention de CRY1 et CRY2 qui se fixent sur SPA1, ce qui permet l'accumulation de HY5 dans le noyau (**Liu et al, 2011 ; Zuo et al, 2011**) ou de la protéine CO pour CRY2, qui induit l'expression du gène FT (**Turck et al, 2008**). Le mécanisme exact de ces interactions reste cependant à élucider. Les différences d'affinité entre CRY1 et CRY2 pour SPA1 pourraient expliquer leurs différences en matière d'activité (**Liu et al, 2015**). Les phytochromes en plus de se lier aux cryptochromes (**Ahmad et al, 1998**) se lient aussi à SPA1 en présence de lumière rouge et permettent la dissociation de COP1 et SPA1 (**Sheerin et al, 2015**). Ces études peuvent expliquer les convergences fonctionnelles entre cryptochromes et phytochromes sous des conditions lumineuses variées.

CIB1 (cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix 1) est la première protéine chez les plantes qui a été identifiée comme se fixant sur CRY2 de façon lumière dépendante (**Liu et al, 2008**). Par son interaction avec CRY2, CIB1 régule positivement le déclenchement de la floraison en se fixant également sur la G-box (CACGTG) du promoteur du gène FT qui code pour un régulateur transcriptionnel qui va permettre, au niveau du méristème, la transcription des gènes de l'identité florale (**Corbesier et al, 2006**). Néanmoins, il est possible que CIB1 se fixe à plusieurs autres protéines bHLH (CIB3, CIB4, CIB5) *in vivo* car elle est capable de se fixer à plusieurs *box* différentes. A l'opposé aucun lien n'a pu être établi entre CRY1 et CIB1.

Selon le modèle principal d'activation du cryptochrome, la région N-terminale subit une photoréduction qui est convertie en changement conformationnel dans la partie C-terminale, permettant la signalisation. En accord avec ce modèle, la partie C-terminale de CRY1 se fixe sur COP1 (**Yang et al, 2001**), de plus CRY1 interagit avec SPA1 par son domaine C-terminal (**Lian et al, 2011**). En revanche, le site de liaison de CRY2 à SPA1 ou CIB1 ne se situe pas dans la partie C-terminale de CRY2 mais dans son domaine PHR (**Liu et al, 2008 ; Zuo et al, 2011**). Le domaine PHR est donc d'une grande importance pour la signalisation. En appui à ces observations, une étude a récemment montré que le PHR de CRY1 fusionné à une séquence NLS est capable d'induire seul, une inhibition de l'élongation de l'hypocotyle. Cette inhibition se produit donc indépendamment de toute fixation sur COP1; indiquant par là un rôle indépendant de la signalisation COP1. De plus 34% des gènes régulés par CRY1 sont même régulés par PHR_{CRY1}-NLS (**He et al, 2015 ; Liu et al, 2016**). La régulation des gènes par le PHR de CRY1 fonctionne de façon antagoniste aux phytohormones comme l'auxine ou les gibbérellines, signifiant peut-être un rôle du PHR dans les voies de signalisation régulées par ces hormones.

Récemment, PIF3 et PIF4, deux facteurs de transcription de type bHLH (comme CIB1), ont été reconnus comme se fixant à CRY1 et CRY2 dans le noyau. Les cryptochromes régulent directement l'activité de ces deux facteurs de transcription, déjà connus comme interagissant avec les phytochromes. PIF3 et PIF4 régulent la croissance induite par la lumière bleue, la lumière rouge et la température par leur fixation sur les séquences promotrices *E-box* (**Pedmale et al, 2016**). Il est probable que d'autres facteurs de transcription se fixent sur CRY1 et CRY2, ceux-ci restent à identifier.

3. NOUVEAUX ROLES DES CRYPTOCHROMES EN LIEN AVEC NOS TRAVAUX

Nos différents travaux se sont focalisés sur deux nouveaux champs d'étude des cryptochromes :

- Leur lien avec les ROS, car il est maintenant de plus en plus accepté que les cryptochromes, par leur photocycle, sont capables d'induire la synthèse de certains ROS ; et par conséquent de permettre potentiellement une régulation d'un certain nombre de paramètres physiologiques, morphologiques ou comportementaux modulés par la présence de ces espèces réactives de l'oxygène (**Consentino *et al*, 2015**).
- Leur rôle dans la magnétoreception. En effet il a été depuis longtemps suggéré que les cryptochromes pouvaient jouer le rôle de magnétorécepteur sur la base des observations d'oiseaux migrateurs qui utilisent une boussole magnétique nécessitant de courtes longueurs d'onde lumineuses pour pouvoir s'orienter (**Ritz *et al*, 2000**).

Les mécanismes moléculaires sous-jacents, les fonctions cellulaires régulées par ces deux composantes ainsi que leur lien étroit avec les cryptochromes sont décrits, ci-dessous, de façon détaillée.

3.1 Rôle des cryptochromes dans le stress oxydatif

3.1.1 Généralités sur les ROS chez les végétaux et les animaux

Chez les plantes, les ROS ont de multiples fonctions dans l'acclimatation, la germination, le développement et la signalisation de manière générale. Les ROS en tant qu'oxydants des protéines altèrent leur fonctionnement, et en tant qu'oxydant des lipides ils permettent le relargage de composés actifs dans la signalisation (**Dietz *et al*, 2016**). Cependant les mécanismes sous-jacents à leur homéostasie sont encore mal connus du fait de leur haute réactivité, des difficultés à les détecter spécifiquement ou de leur implication dans un très grand nombre de processus biologiques.

3.1.1.1 Homéostasie et régulation dans la cellule

De manière générale, les conditions environnementales comme la lumière, la température, la limitation des ressources en eau et en minéraux ou bien les attaques d'insectes ou de pathogènes sont les principales causes de stress environnementaux qui conduisent à une activation de certaines voies

par les ROS. Ils sont situés dans de nombreux compartiments cellulaires, et même dans l'environnement extracellulaire. Leur localisation spatiale et temporelle associée à leur spécificité de réaction leur confère des signalisations spécifiques dans la cellule.

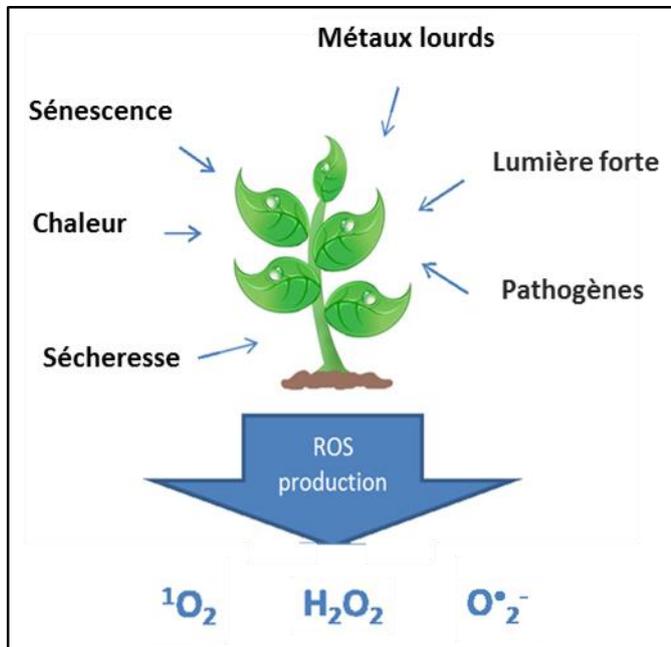


Figure 24 :

Schéma récapitulant les différentes causes environnementales responsables de la synthèse des différents ROS chez les végétaux (modifié d'après **Jajic et al, 2015**).

Certains de leurs rôles prennent place dans les chloroplastes, la mitochondrie, les peroxysomes qui sont de puissants générateurs de ROS et autres signaux redox lors de processus tels que la photosynthèse, la photorespiration ou la respiration. Les peroxysomes sont considérés comme une importante source de molécules signaux et ont la capacité de produire ou piéger de grandes quantités de ROS. Certains de ces organites, qui produisent de l'ATP, par un système de transfert d'électron et dans un environnement riche en oxygène, vont conduire à la formation des principaux ROS : $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ ou H_2O_2 . L'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ est un état excité très réactif du dioxygène O_2 qui peut être formé lors de la réaction entre l' O_2 et la chlorophylle dans son état triplet (**Krieger-Liszkay A, 2005**). Une autre source de sa production peut venir des mécanismes de défense contre les pathogènes. Durant ce processus, la plante produit des phytoalexines qui vont à leur tour générer du $^1\text{O}_2$ (**Flors & Nonell, 2006**). Contrairement à $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 , la formation d'oxygène singulet ne résulte pas d'un transfert d'électron à l'oxygène, en revanche un des électrons est délocalisé dans une orbitale de plus haute énergie. Sa demi-vie très courte dans la cellule est d'environ 200ns (**Gorman & Rogers, 1992**). Le superoxyde est généré dans différents compartiments ainsi que dans l'apoplasme ou la membrane plasmique, sa source principale de production résulte de la réduction du dioxygène par un électron issu de la photosynthèse. Il est également produit par certaines oxydases comme les NADPH oxydase (NOX) ou les Respiratory Burst Oxidase Homologs (RBOH) (**Jajic et al, 2015**),

sa demi-vie dans la cellule est de quelques microsecondes (**Dat et al, 2000**). Le peroxyde d'hydrogène est produit de deux manières : soit à partir du superoxyde soit à partir d'oxydases comme l'oxalate oxydase (**Hu et al, 2003**), sa demi-vie *in vivo* est plus longue, environ 1ms (**Quan et al, 2008**).

Ces ROS ont une incidence au niveau de l'expression génétique des génomes mitochondriaux, chloroplastiques et nucléaire (**Kleine & Leister, 2016**). Il reste toutefois à comprendre comment ces signaux passent d'un organite à un autre. Les membranes notamment, jouent le rôle de barrières ou de ponts pour réguler le transport des protéines ou métabolites mais également les échanges redox. Les antioxydants aussi peuvent être échangés entre compartiments et ils régulent l'accumulation des ROS, permettant le maintien de certaines fonctions métabolique comme l'assimilation de l'azote ou du carbone. Les organelles eux-mêmes ont une plasticité morphologique et peuvent développer des extensions comme les stromules, les peroxules ou les matrixules par lesquels des molécules signal comme les ROS peuvent circuler et jouent un rôle crucial dans la communication entre organelles (**Noctor & Foyer, 2016**). L'apoplasme permettrait également le stockage des ROS et leur transport entre des cellules potentiellement éloignées (**Parsons & Fry, 2012**). Des avancées significatives ont eu lieu ces dernières années à propos de l'interconnexion entre les organelles qui régulent l'état redox de la cellule (**Dietz et al, 2016**).

Certaines enzymes permettent aussi la détoxification des ROS comme les ascorbate peroxydases (APX) ou les 2-Cys peroxyredoxines qui sont en première ligne pour éliminer le H₂O₂ des chloroplastes, certaines peroxyredoxines se trouvent également dans les mitochondries ou les peroxysomes (**Awad et al, 2015**). Les catalases se situent principalement dans les peroxysomes (**Mhamdi et al, 2012**) et permettent la conversion de H₂O₂ en H₂O. Les superoxydes dismutases sont spécialisées dans la détoxification de l'ion superoxyde en catalysant la réduction ou l'oxydation d'O₂^{•-} en H₂O₂ ou O₂. Ce sont elles qui déterminent la demi-vie du superoxyde. Le superoxyde peut aussi réagir avec l'oxyde nitrique •NO pour former le peroxynitrite ONOO⁻, une espèce réactive de l'azote qui comme les ROS peut endommager l'ADN et les protéines. Les substrats nécessaires à ces peroxydases pour cette détoxification dans les chloroplastes sont les ferrédoxines, thiorédoxines, le NADPH, le glutathion ou l'ascorbate (**Foyer & Noctor, 2016**). Ces agents antioxydants permettent le contrôle de l'état redox dans les cellules et lorsque leur capacité antioxydante est dépassée par la quantité de ROS présente, des dommages aux lipides, aux protéines et à l'ADN commencent à apparaître.

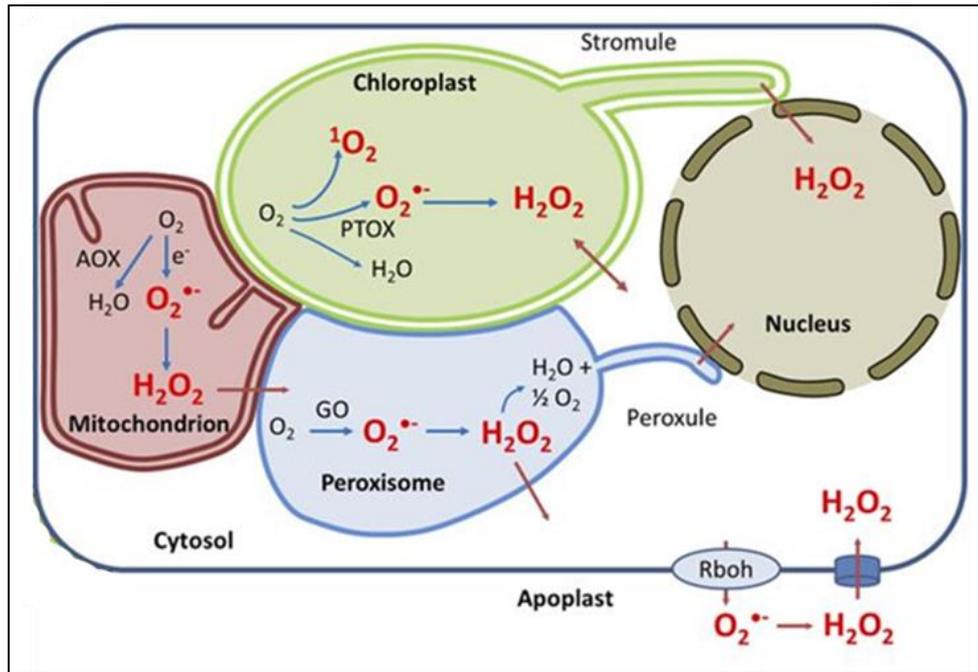


Figure 25 :

Schéma récapitulatif de la synthèse ainsi que la circulation de ROS dans la cellule végétale. L'abréviation AOX correspond à une oxydase alternative, GO à glycolate oxydase et PTOX à oxydase terminale du plaste (**Dietz *et al*, 2016**).

Ils pourraient même jouer un rôle d'intermédiaire dans la signalisation par les ROS (**Han *et al*, 2013**), mais la redondance fonctionnelle de certaines enzymes est peut être une des raisons pour lesquelles il est si difficile d'étudier séparément les voies régulées par les ROS. Notre connaissance des mouvements intracellulaire de ces molécules signal reste très incomplète. Certains transporteurs membranaires ont été identifiés pour l'ascorbate (**Miyaji *et al*, 2015**) mais la plupart sont inconnus pour les autres molécules signal. Certains systèmes chez les mitochondries et les chloroplastes utilisent des navettes à travers la double membrane pour réaliser un transport indirect à partir du NAD(P) vers le malate et l'oxaloacétate (**Kinoshita *et al*, 2011**). Certains transporteurs d'eau comme les aquaporines sont également capable de faire transiter, d'un organelle à l'autre, des molécules signal dont le H₂O₂ (**Bienert & Chaumont, 2014**). Certains ROS comme le superoxyde ou l'oxygène singulet ont des durées de vie très courtes, ce qui laisse supposer qu'ils seraient incapables de diffuser des chloroplastes ou des mitochondries jusque dans le noyau, et ne pourraient donc pas moduler l'activité des protéines nucléaires. H₂O₂ est bien plus stable et sa quantification donne des résultats bien plus élevés. Les études réalisées sur le H₂O₂ le désignent aujourd'hui comme un messenger

cellulaire omniprésent et indispensable au même titre qu'une poignée d'autres petites molécules signal comme Ca^{2+} , l'AMPc ou l'IP3.

3.1.1.2 Quelques effets des ROS au niveau de la cellule ou de l'organisme

Il est important de garder à l'esprit que les ROS n'ont pas qu'un rôle de destruction de certains composants cellulaires, à forte concentration ils occasionnent en effet des dommages aux cellules, mais à des concentrations plus modérées ils jouent des rôles importants pour la signalisation. D'où la difficulté à établir des thérapies à base d'antioxydants (**Stanner *et al*, 2004**). Les principaux ROS chez les plantes que sont $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou encore des groupements hydroxyle OH^{\cdot} permettent en plus le déclenchement de réponses qui permettent à leur tour de protéger la cellule contre le stress oxydatif et de rétablir l'homéostasie redox. Ces dernières années, un nombre croissant d'études a mis en évidence une régulation par les ROS de certains processus biologiques chez les plantes dont voici quelques exemples :

- La régulation de la disponibilité en fer est en partie due aux ROS : ZAT12, un facteur de transcription dont l'expression est stimulée par la présence des ROS interagit avec le régulateur central de la déficience en fer FIT en inhibant sa fonction, ce qui inhibe l'absorption du fer et la formation de radicaux hydroxyles très toxiques. A l'inverse, certaines protéines, notamment impliquées dans la photoréception, influent sur la quantité de ROS présent dans la cellule. La lumière qui permet la photosynthèse est un des principaux facteurs déclencheurs de la formation des ROS dans les chloroplastes. Cette formation pourrait être modulée par les gènes *fhy3* et *far1* déjà connus comme interagissant avec le phytochrome A en lumière rouge. Ces deux gènes contrôleraient l'expression des gènes photosynthétiques en fonction de la quantité de lumière disponible car en faible lumière il n'y a plus d'accumulation de ROS. De plus, ces gènes activent l'expression d'enzymes connues pour réguler l'homéostasie des ROS comme la RBOH (**Le *et al*, 2016**).
- Il est également connu que les ROS influent sur certaines voies en coopération avec les phytohormones comme l'auxine, les brassinostéroïdes, les gibbérellines, l'acide abscissique ou l'éthylène dans le but de réguler la croissance des plantes et leur tolérance aux stress. Beaucoup d'hormones déclenchent elles-mêmes une accumulation de ROS de manière souvent indirecte, en faisant intervenir d'autres enzymes comme les NOX ou les RBOH qui vont permettre la synthèse du H_2O_2 . Mais dans la plupart des cas les mécanismes moléculaires qui régulent ces

enzymes restent inconnus, d'autres molécules signal pourraient être impliquées comme le calcium Ca^{2+} ou l'oxyde nitrique NO, tous deux impliqués dans la signalisation par les ROS et les hormones (**Xia et al, 2015**). Les ROS agissent aussi conjointement aux phytohormones lors de la germination après l'intégration de multiples facteurs environnementaux. Selon sa concentration, H_2O_2 réprime ou active la germination (**Lariguet et al, 2013**).

- Certains messagers secondaires des voies activées par les ROS sont des produits directement oxydés par ces ROS. L'oxygène singulet qui est responsable de l'oxydation des caroténoïdes dans les chloroplastes produit un de ses dérivés oxydés : le β -cyclocitral qui est probablement un messager secondaire qui induit l'activation des gènes sous le contrôle de $^1\text{O}_2$, qui à leur tour augmentent la tolérance au stress photooxydatif (**Ramel et al, 2012**). $^1\text{O}_2$ est aussi capable d'induire une peroxydation des lipides de façon non enzymatique, conduisant à la mort cellulaire (**Triantaphylidès et al, 2008**).
- Il a été mis en évidence par beaucoup d'études que H_2O_2 a un rôle double d'activation ou de protection contre différent stress ou fonctions cellulaires comme la sénescence. La sénescence peut être déclenchée ou non en fonction de la concentration en H_2O_2 . Lorsque celle-ci augmente certains facteurs de transcription comme ORS1 sont exprimés et vont activer d'autres gènes associés à la sénescence pour accélérer le processus (**Balazadeh et al, 2011**). Mais d'autres gènes comme JUB1 sont surexprimés par H_2O_2 en fonction de sa concentration et vont retarder la sénescence et diminuer l'accumulation de peroxyde (**Wu et al, 2012**). D'autres effets bénéfiques ont été attribués au peroxyde d'hydrogène lorsqu'il est appliqué préventivement à l'exposition à certains stress abiotiques comme : le stress dû à la chaleur (**Gao et al, 2010**), aux faibles intensités lumineuses (**Jajic et al, 2015**), à la sécheresse (**Ishibashi et al, 2011**).
- $\text{O}_2^{\cdot-}$ ne peut pas traverser la membrane des chloroplastes contrairement au H_2O_2 , ce qui en fait à première vue un candidat peu probable pour la médiation de certains processus biologiques comme la sénescence ou les stress abiotiques (**Jajic et al, 2015**). Il est présent cependant dans d'autres organites y compris le cytosol (**Zarepour et al, 2010**). Diverses études ont montré que sa concentration augmentait lors de la sénescence, mais il est difficile de lui attribuer un rôle car sa présence est accompagnée de celle d' H_2O_2 . Des rôles dans la signalisation lui ont néanmoins été attribués. En effet, lorsque le paraquat, un puissant herbicide générateur d'ions superoxyde en lumière, est ajouté chez des plantules, la régulation d'un grand nombre de gènes nucléaires chez *A. thaliana* est observée (**Scarpeci et al, 2008**). Les gènes les plus fortement

régulés interviennent dans les réponses aux stress abiotiques. Le superoxyde serait aussi impliqué dans la réponse aux blessures (Soares *et al*, 2011), ou encore la réponse au stress causé par les métaux lourds comme le cadmium (Rodriguez-Serrano *et al*, 2006).

Chez les animaux, les ROS sont également des messagers cellulaires essentiels ainsi que des régulateurs redox. Lorsqu'ils sont en excès, ils ont une profonde implication dans des pathologies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, le diabète, l'athérosclérose... (Dröge *et al*, 2002). Ils sont, selon la théorie du stress oxydatif par les radicaux libres, des régulateurs centraux de l'horloge biologique du vieillissement (Harman D, 2006).

3.1.1.3 Mécanismes oxydatifs des ROS sur les protéines

Chez les eucaryotes, la modification des équilibres redox ou la modification de molécules signal comme le β -cyclocitral ne sont pas les seuls mécanismes par lesquels les ROS peuvent réguler les diverses fonctions existant dans la cellule ou l'organisme.

Pendant de nombreuses années les modifications oxydatives des groupements thiols des cystéines étaient considérées comme des artefacts résultants des conditions *in vitro*, mais depuis les années 2000, de nouveaux développements ont livré une toute autre vérité (Yu *et al*, 2005). Il s'avère que les modifications redox des groupements thiols sont des outils moléculaires qui permettent à de nombreuses protéines de réguler leur activité (Brandes *et al*, 2009). Ces réactions s'apparentent à un nouveau type de modification post-traductionnelle comme la phosphorylation, la méthylation ou l'ubiquitination. Ces modifications redox ont lieu en présence d'un stress oxydatif conduisant à l'élévation de la concentration en ROS. Certaines modifications redox des thiols sont réversibles. Celles-ci ont été identifiées sur des protéines impliquées dans diverses fonctions parmi lesquelles figurent la transcription, la traduction, le métabolisme, la transduction de nombreux signaux ou la mort cellulaire. D'un point de vue logique on pourrait penser que l'état d'oxydation des cystéines par les ROS permettrait de réguler la formation des ponts disulfure et donc la structure tridimensionnelle des protéines affectées, ce qui finalement pourrait réguler leur activité enzymatique ou encore leur aptitude à se lier à l'ADN ou à des partenaires pour la signalisation. En effet, plusieurs modifications apportées aux groupements thiol des protéines par l'action du H_2O_2 ont été démontrées (Brandes *et al*, 2009) (Figure 26).

Les cystéines, dont le groupement thiol est réduit, peuvent être oxydées par le H_2O_2 pour former l'acide sulfénique R-SOH ou sulfénate sous forme déprotonée, ces produits d'oxydation sont très

fréquents mais également très réactifs (**Salmeen et al, 2003**). Cette forte réactivité fait d'eux de simples intermédiaires capables de subir d'autres modifications plus stables, comme la formation de disulfides R-S-S-R avec une cystéine sous forme réduite. Il est important de noter que toutes ces réactions sont entièrement réversibles grâce aux thiorédoxines et aux glutarédoxines qui tirent leur pouvoir réducteur du NADPH. C'est souvent la réactivité de ces enzymes qui déterminent la demi-vie des produits d'oxydation au sein des protéines.

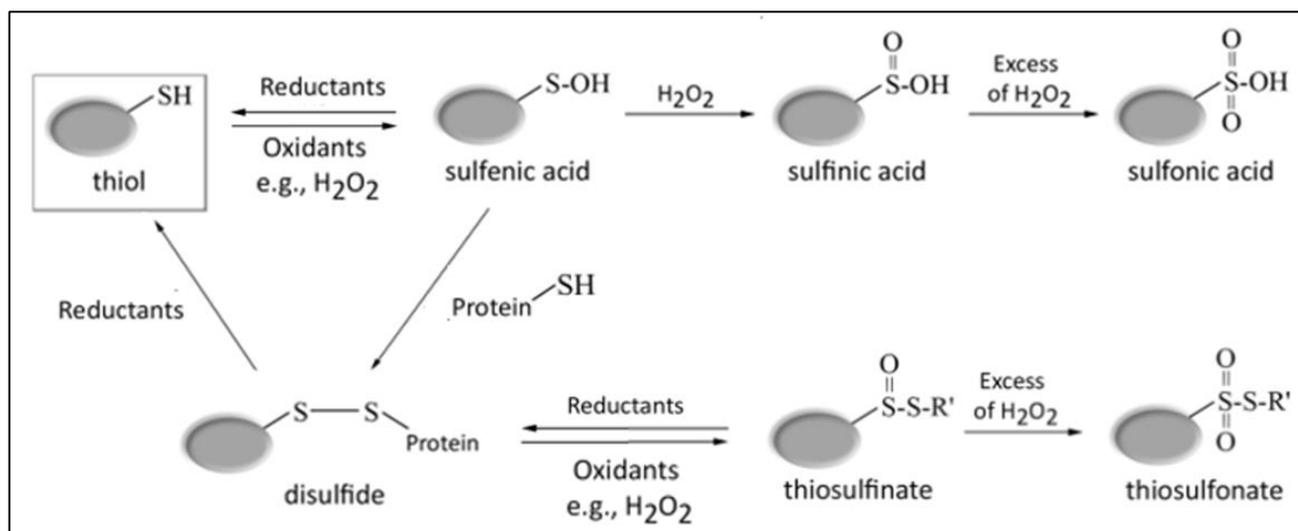


Figure 26 :

Schéma représentant les modifications redox que peuvent subir les groupements thiols dans la cellule, notamment sous l'effet du peroxyde d'hydrogène (modifié d'après **Brandes et al, 2009**).

En temps normal, lorsque les ROS sont abondants, l'équilibre originel de l'état d'oxydation des groupements thiols est restauré grâce à certaines enzymes comme les thiorédoxines et les glutarédoxines (**Holmgren et al, 2005**). Une exposition prolongée et/ou intense aux ROS comme H₂O₂ peut conduire à une suroxydation des cystéines et former l'acide sulfinique R-SO₂H ou sulfinate puis enfin l'acide sulfonique R-SO₃H ou sulfonate. Ces modifications sont largement considérées comme irréversibles *in vivo*, bien que certaines acide sulfinique réductases aient été découvertes (**Woo et al, 2003**). Toutes ces modifications conduisent le plus souvent à un changement dans la structure de la protéine, pouvant causer leur inactivation (comme PTEN et GapDH : **Yu et al, 2005** ; **Shenton & Grant, 2003**) mais aussi leur activation (OxyR ou Hsp33 : **Ilbert et al, 2007** ; **Paget & Buttner, 2003**). Le nombre de protéines découvertes comme étant régulées par les ROS augmente d'année en année.

Un fort stress oxydatif peut également conduire à un excès de groupements disulfides, une mauvaise conformation protéique et éventuellement la mort cellulaire (**Cumming et al, 2004 ; Sitia et al, 2004**). La suroxydation des disulfides peut de même occasionner la formation de thiosulfinate R-SO-S-R' dont la réaction est réversible, ou bien de thiosulfonate R-SO₂-S-R' dont l'accumulation est irréversible. Le type d'oxydation, ainsi que son ampleur, dépendent de la nature de l'oxydant, de sa quantité, de sa localisation cellulaire et de sa distance avec la protéine cible. De faibles changements du niveau de base des ROS peuvent causer des modifications oxydatives à des protéines spécifiquement sensibles à ces oxydants.

3.1.1.4 Méthodes pour la détection des ROS

L'imagerie *in vivo* des ROS a grandement contribué aux avancées récentes sur leur signalisation. Le principal problème qui a été rencontré a été de mettre au point des marqueurs spécifiques, car certains stress génèrent à la fois H₂O₂, ¹O₂ et O₂^{•-}. Dans des conditions normales, le flux de ROS généré dans les cellules est maintenu à un faible niveau par l'action d'enzymes antioxydantes. Dans certains cas, un déséquilibre entre la production de ROS et leur dégradation doit être créé pour qu'ils soient observés. La production de ROS est donc souvent observée en conditions stressantes pour l'organisme ou la cellule. Historiquement les marqueurs utilisés pour leur détection étaient le 3,3'-diaminobenzidine pour le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et le nitrobleu tétrazolium pour l'ion superoxyde O₂^{•-}. Leur sensibilité, leur fiabilité ainsi que leur caractère invasif étaient loin d'être optimum. Aujourd'hui des marqueurs à base de fluorescéine sont utilisés comme le Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) pour l'oxygène singulet ¹O₂ (**Koh et al, 2016**), le dihydroéthidium (DHE) pour O₂^{•-} ou bien le 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacétate ou DCFH-DA pour le H₂O₂ (**Evans et al, 2016**). Ces réactifs permettent de déterminer la localisation *in situ* des ROS mais restent difficiles à utiliser pour certains tissus, leurs mesures sont peu fiables pour établir une quantification précise, et leur spécificité à l'encontre de certains ROS est toujours contestée (**Winterbourn C, 2014**). D'autres réactifs sont utilisés pour une meilleure quantification des ROS dans les tissus comme l'Amplex Red pour le H₂O₂ par fluorimétrie (**Zhou et al, 1997**), ou encore le XTT pour O₂^{•-} par colorimétrie (**Frahry & Schopfer, 2001**). L'Amplex Red est quelque peu instable, il peut s'autooxyder pour produire H₂O₂ et O₂^{•-}, et peut aussi réagir avec d'autres composants redox actifs (**Jajic et al, 2015**). Ces marqueurs des ROS, de faible poids moléculaire, sont plus faciles à utiliser que certains bio senseurs protéiques comme la roGFP ou le HyPer, mais sont moins sensibles et sélectifs que ces derniers. Les marqueurs

protéiques nécessitent toutefois un contrôle rigoureux du pH et de l'activité antioxydante. La détection des ROS peut aussi se faire par résonance paramagnétique électronique (RPE) grâce à la capacité de certains électrons à absorber et réémettre de l'énergie. Les limites de cette dernière méthode sont l'incompatibilité avec des tissus vivants, la sous-estimation de la quantité de ROS et le coût excessif (**Jajic et al, 2015**). Une des pistes possibles pour améliorer l'étude des ROS chez les plantes serait de standardiser les procédures pour pouvoir comparer un grand nombre d'études.

3.1.2 Implication des cryptochromes dans la signalisation ROS

Dans nos études, en cours de réalisation, nous étudions la possibilité qu'une régulation de certains facteurs de transcription, dont MYC2 et GBF1 chez *Arabidopsis* ainsi que dFOXO chez la drosophile, par les cryptochromes, impliquent une intervention des ROS synthétisés par leur domaine N-terminal. MYC2 et GBF1 appartiennent à la classe des bHLH et bZIP et se fixent sur les éléments de promoteur G-box en agissant de façon antagoniste pour réguler certains processus comme la croissance de l'hypocotyle. Il a été de plus montré que ces facteurs de transcription agissent en aval du signal de transduction induit par l'activité de CRY1 et CRY2 (**Maurya et al, 2015**) et ceci en se fixant sur le complexe protéique formé par COP1, SPA1, HY5 et HYH (**Mallapa et al, 2008 ; Singh et al, 2012**). Il a été mis en évidence que les changements redox autour de l'ADN pouvaient moduler la fixation du facteur GBF1 à l'ADN. L'ajout de DTT renforce sa fixation alors que les agents oxydants comme les ROS seraient susceptibles d'inhiber cette interaction (**Shaikhali et al, 2012**). Les cryptochromes, étant capables d'une synthèse directe des ROS (**Müller & Ahmad, 2011**), GBF1 est donc un bon candidat pour une régulation directe dépendante des ROS synthétisés par les cryptochromes dans le noyau pendant leur interaction au sein du complexe protéique.

dFOXO est un facteur de transcription appartenant à la "forkhead box, classe O" régulé notamment par la voie insuline/IGF, elle-même connue pour influencer la longévité. L'activité de dFOXO est inhibée par cette voie, mais lorsque son activité augmente, la longévité des drosophiles augmente également (**Hwangbo et al, 2004**). Les facteurs de transcription FOXO sont très répandus chez les animaux, aussi bien chez la drosophile que chez les mammifères. De récentes études ont mis en évidence leur régulation par les équilibres redox (**Klotz et al, 2015**). Sous certaines conditions pathologiques qui entraînent une augmentation du stress oxydant, l'activité de FOXO est bien plus forte qu'en conditions normales. Ceci laisse supposer une activation des protéines FOXO par les ROS. Les protéines FOXO, lorsqu'elles sont activées, induisent l'expression de certains gènes antioxydants,

ce qui peut en partie expliquer leur lien avec la longévité. D'autres études ayant souligné un rôle de DmCRY sur l'augmentation de la longévité sur les drosophiles (**Rakshit & Giebultowicz, 2013**). Il serait donc possible que les gènes FOXO soient activés par les cryptochromes. Du fait qu'ils sont impliqués dans des mêmes fonctions, un lien étroit est par conséquent envisageable entre les cryptochromes et le facteur dFOXO par interaction directe ou indirecte. De même, il est possible que les ROS synthétisés par les cryptochromes soient responsables de la régulation redox de GBF1. En accord avec cette hypothèse, la synthèse des ROS par DmCRY a lieu dans le noyau comme nous l'avons montré dans nos résultats (**Arthaut et al, 2017**), où les facteurs de transcription GBF1 et dFOXO sont observables.

3.1.2.1 Mécanismes moléculaires de la synthèse des ROS par les cryptochromes

C'est en 2011 que les premières hypothèses reliant les cryptochromes aux ROS ont été formulées. Celles-ci expliquaient que lors du photocycle, le mécanisme de réoxydation de la FAD à l'obscurité chez *A. thaliana* par l'oxygène O₂ impliquait la formation d'ions superoxyde (**Müller & Ahmad, 2011**). Jusqu'alors, aucune attention n'avait été accordée à l'étape de réoxydation. Les recherches étaient davantage focalisées sur l'étape de réduction et le mécanisme d'activation du cryptochrome. Or, cette réoxydation relance le système de photoréduction et implique aussi bien FADH[•] que FADH⁻. L'équilibre homéostatique des ROS, produits lors de cette réaction, dépend de l'amplitude de leur accumulation et de leur durée de vie à l'obscurité. De ces paramètres dépend aussi l'amplitude des réponses biologiques en réponse à la synthèse de ces ROS.

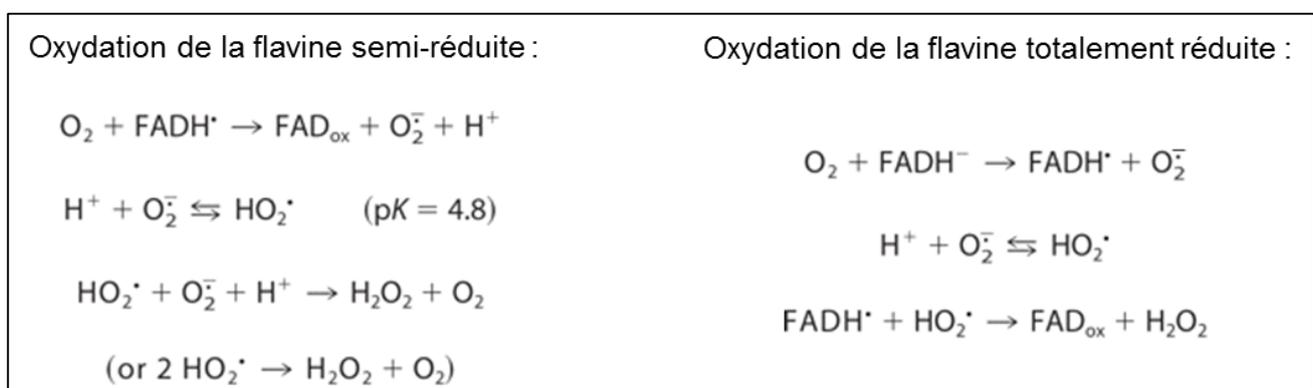


Figure 27 :

Réactions chimiques théoriques entre la flavine réduite et le dioxygène lors de l'étape de réoxydation pour la protéine CRY1 chez *A. thaliana* (**Müller & Ahmad, 2011**).

Ce processus de réoxydation prendrait quelques minutes et impliquerait la formation d' $O_2^{\bullet -}$ mais aussi peut-être d'hydroperoxyde (HO_2^{\bullet}) ou de peroxyde d'hydrogène (Müller & Ahmad, 2011). Dans le cadre de la réoxydation de la $FADH^{\bullet -}$, il est nécessaire selon ce modèle que les réactions soient rapides pour que les réactifs diffusent le moins possible dans la cellule avant d'avoir oxydé la $FADH^{\bullet -}$. Il semble néanmoins possible que la cavité contenant la flavine soit capable de piéger le superoxyde et l'hydroperoxyde pour permettre la seconde réaction impliquant $FADH^{\bullet -}$. Cependant, la réoxydation de la $FADH^{\bullet -}$ est plus pertinente *in vivo*. Le fait qu' HO_2^{\bullet} soit un bien meilleur agent oxydant que O_2 rend la réoxydation de $FADH^{\bullet -}$ est bien plus rapide que celle de la $FADH^-$.

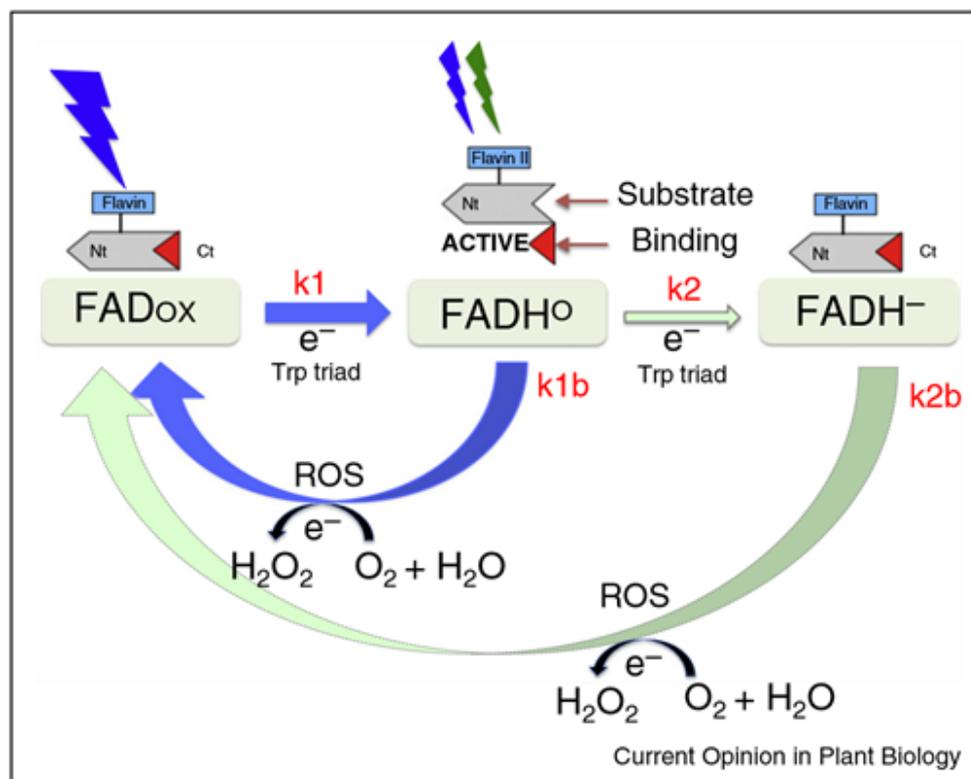


Figure 28 :

Schéma du photocycle de CRY1 et CRY2 chez *A. thaliana*. Les Deux étapes du photocycle sont visibles : L'étape de photoréduction permettant l'activation du cryptochrome et l'étape de réoxydation à l'obscurité, libérant ainsi le H_2O_2 (Ahmad M, 2016).

Enfin, comme évoqué précédemment, la proportion de forme totalement réduite est négligeable. Selon ce modèle, pour chaque photon absorbé, une molécule de peroxyde se forme. Il pourrait donc y avoir une relation proportionnelle entre quantité de lumière reçue et quantité de ROS synthétisée. Ceci permettrait, en théorie, une signalisation par les ROS pour CRY1 et CRY2 chez *A. thaliana* en réponse à la lumière bleue. Cette hypothèse est d'autant plus crédible que les cryptochromes sont connus pour réguler de nombreux gènes impliqués dans les réponses à différents

stress aussi bien chez les plantes que chez les animaux (Kleine *et al*, 2007, Vieira *et al*, 2012). Leur régulation pourrait donc dépendre plus ou moins directement de la synthèse de ces ROS et non pas de la liaison stricte à des partenaires protéiques. Cette signalisation par les ROS constituerait un nouveau paradigme concernant la signalisation des cryptochromes qui n'était étudiée jusqu'alors que par le changement conformationnel et la liaison aux partenaires (Ahmad M, 2016).

1.1.2.2 Détection des ROS synthétisés pendant le photocycle des cryptochromes

Déjà en 2011, lorsque l'hypothèse du lien entre ROS et cryptochromes avait été formulée, une production d'oxygène avait été détectée au cours d'expériences sur la protéine CRY1 purifiée à laquelle avait été ajouté du DTT et une catalase. L'ajout de DTT sert d'agent réducteur afin de donner un électron aux tryptophanes, et la catalase réagit avec le H_2O_2 (formé après excitation du cryptochrome par la lumière) pour donner O_2 et H_2O . Ces études ont mis en évidence une consommation de d'oxygène par CRY1 qui n'est observée qu'en présence de lumière bleue, puis lorsque la catalase était ajoutée au mélange une production d'oxygène apparaissait subitement (Müller & Ahmad, 2011). Ces résultats étaient en accord avec le modèle décrit plus haut et ont été confirmés par d'autres études par la suite. Il restait à déterminer si les cryptochromes étaient capables *in vivo* de moduler la concentration en ROS dans les cellules, et si cette accumulation avait une signification biologique.

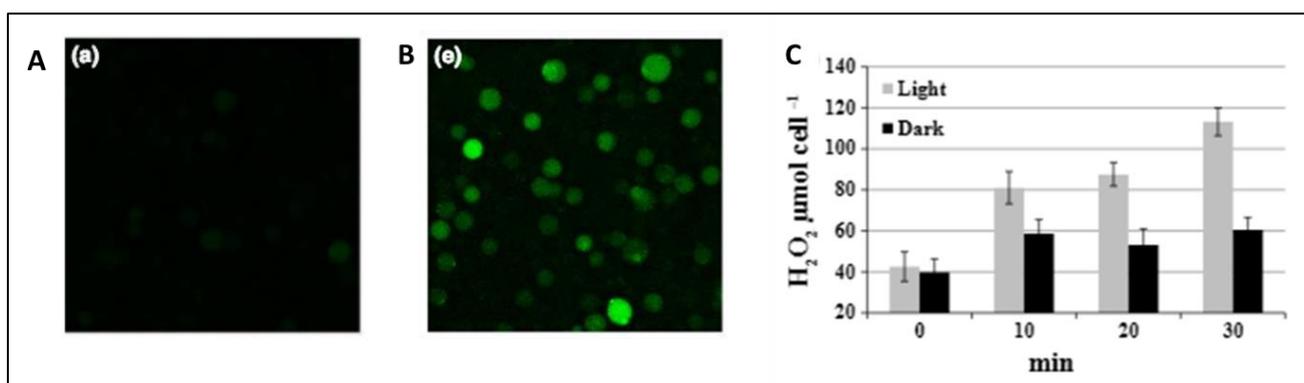


Figure 29 :

A et B : observation par microscopie confocale des ROS produits après illumination à la lumière bleue à $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ par des cellules sf21 contrôles (A) ou surexprimant CRY1 (B) grâce à l'utilisation de DCFH-DA. **C :** Détection des ROS produits *in vitro* par la protéine CRY1 purifiée en fonction du temps d'illumination à la lumière blanche à $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ grâce à l'utilisation d'Amplex UltraRED (Consentino *et al*, 2015).

C'est dans cette perspective qu'ont été conduites de nouvelles recherches toujours pour CRY1 chez *A. thaliana* grâce à un modèle de cellules d'insecte (**Consentino et al, 2015**). Ces recherches ont prouvé qu'en présence de lumière bleue, une accumulation de ROS a lieu chez des cellules d'insectes Sf21 dans lesquelles la protéine CRY1 est surexprimée (**Figure 26 AB**). Les auteurs ont estimé que les ROS produits lors de ces tests résultaient plus ou moins directement du photocycle et non de la signalisation C-terminale classique en raison de l'éloignement phylogénique entre les plantes et les insectes. L'accumulation de ces ROS, à la fois cryptochrome et lumière bleue dépendante, a lieu dans les structures vésiculaires du cytoplasme de la cellule comme le réticulum endoplasmique autour du noyau. Cette localisation correspond à celle de la protéine CRY1 détectée par immunofluorescence principalement dans le cytoplasme et autour du noyau.

D'autres analyses du même article ont montré que la protéine CRY1 purifiée est suffisante pour permettre la synthèse des ROS par son photocycle et ce sans nécessiter la présence d'agent réducteur comme le DTT ou le β ME (**Figure 26 C**). L'ajout d'agent réducteur est d'ailleurs une source de perturbation pour les mesures de fluorescence au spectrofluorimètre. Les auteurs ont également corrélé cette augmentation de la concentration en ROS, aussi bien *in vitro* que dans les cellules Sf21 surexprimant CRY1, avec une augmentation de la mortalité de ces cellules à la lumière bleue et en fonction du temps. Les effets sur la mortalité ne sont observés ni à l'obscurité, ni chez les cellules contrôles. Enfin chez des protoplastes d'*A. thaliana* (cellules végétales dont la paroi est digérée et sur lesquels les tests de mort cellulaires et de détection des ROS sont possibles) mutants nuls pour CRY1 et CRY2, l'accumulation des ROS est la même à la lumière bleue et à l'obscurité. Les protoplastes sauvages exprimant les gènes CRY1 et CRY2 endogènes accumulent, en revanche, plus de ROS à la lumière bleue qu'à l'obscurité. De plus, la mortalité des protoplastes est davantage réduite en présence de lumière bleue chez les mutants *cry1cry2* par rapport aux protoplastes sauvages. Ces études soulignent ainsi le lien étroit qui existe entre le photocycle déclenché par la lumière bleue, la synthèse des ROS et les réponses cellulaires qui en découlent, à savoir ici la mort cellulaire, édifiant les bases d'une nouvelle approche de l'étude des cryptochromes sur divers organismes. Ces études sont évidemment à mettre en parallèle avec celles réalisées auparavant sur la mort cellulaire programmée en lumière bleue et dépendante des cryptochromes (**Danon et al, 2006**). D'autres études ont plus tard montré des résultats allant dans le même sens pour CRY2 d'*A. thaliana* (**Jourdan et al, 2015**). En outre il a été identifié une accumulation de ROS dans le noyau de cellules Sf21 surexprimant CRY2. Parallèlement à cela, la protéine CRY2, marquée par des anticorps, se trouve localisée dans le cytoplasme de ces cellules à l'obscurité et migre massivement dans le noyau après une exposition à la lumière bleue. Il y a donc une colocalisation entre la protéine CRY2 active et les ROS.

Aucune étude n'avait jusqu'à il y a peu tenté de déterminer si les cryptochromes animaux étaient eux aussi capables de synthétiser des ROS au niveau de la cellule ou de la protéine. C'est sur ces interrogations que nous avons basé une partie de nos recherches. Celles-ci se sont focalisées sur le cryptochrome de drosophile DmCRY et nous ont conduits à diverses expérimentations. Une deuxième interrogation qui demeure après les quelques études préliminaires réalisées chez CRY1 et CRY2 est le rôle biologique potentiel, chez la plante, des ROS synthétisés par ces deux protéines. C'est à cette question que nous avons tenté de répondre lors d'une autre série d'études chez *A. thaliana* dont nous exposerons également les résultats et les conclusions.

3.2 Cryptochrome et champ magnétique

Une large variété d'organismes ont la faculté de pouvoir ressentir les champs magnétiques de façon plus ou moins directe, notamment le champ magnétique terrestre, et de pouvoir utiliser ce "sixième sens" comme une source d'information directionnelle. Les mécanismes biochimiques et/ou biophysiques qui en sont à l'origine sont et restent à ce jour un mystère. Il apparaît aujourd'hui qu'en plus de leur sensibilité à la lumière, les cryptochromes jouent un rôle primordial pour détecter la présence des champs magnétiques et de convertir cette détection en signal biologique via le mécanisme des paires radicalaires (**Ritz *et al*, 2000 ; Rodgers & Hore, 2009**).

3.2.1 Généralités sur les champs magnétiques

Un champ magnétique est une grandeur caractérisée par trois composantes : une norme, une direction et un sens en tout point de l'espace qui permettent de modéliser les effets magnétiques du courant électrique ou de certains matériaux comme les aimants permanents. Les deux principales sources de champs magnétiques sont donc les courants électriques et les aimants permanents.

Le champ magnétique terrestre (CMT) appelé bouclier terrestre est présent dans un vaste espace autour de la terre dont l'origine provient du noyau externe. Les mouvements de convection du noyau externe constitué de métal liquide (fer et nickel) fonctionnent comme une dynamo auto entretenue, qui est à l'origine de courants électriques qui vont eux-mêmes engendrer ce CMT, puis le CMT va à son tour induire ces mouvements de convection. C'est pour cette raison que le CMT fonctionne de manière constante et autonome depuis plus de trois milliard d'années. Il fonctionne comme un dipôle magnétique, assimilable à une bobine parcourue par un courant électrique. L'ensemble des lignes de

champ partent du pôle sud terrestre qui correspond au pôle nord magnétique pour rejoindre le pôle nord terrestre ou pôle sud magnétique. En un point donné le vecteur champ magnétique peut être décomposé en une composante verticale et une autre horizontale. Aux pôles nord et sud magnétiques la composante horizontale a une valeur nulle, alors qu'à l'équateur c'est la composante verticale qui est nulle. La valeur de l'induction magnétique exprimée en teslas du CMT est d'environ $50\mu\text{T}$ bien qu'elle oscille entre l'équateur et les pôles.

Certains matériaux sont dits ferromagnétiques, c'est-à-dire capable de former des aimants permanents par la structure cristalline que prennent les atomes de fer, nickel ou cobalt. Les forces mises en jeu dans ce type de magnétisme sont beaucoup plus fortes que pour les autres types de magnétisme (paramagnétisme, diamagnétisme). Ces autres types de magnétisme caractérisent des matériaux qui ne possèdent pas d'aimantation spontanée mais qui sous l'effet d'un champ magnétique extérieur acquièrent une aimantation orientée dans le même sens que le champ magnétique appliqué. Ils possèdent également une structure cristalline complexe qui permet l'alignement de leur moments magnétiques dans la direction des champs magnétiques externes, mais cette alimentation n'est que temporaire. Dans le cas des champs magnétiques induits par des courants électriques, l'intensité du courant est proportionnelle à l'intensité du champ, c'est le cas des électroaimants ou du CMT. Il est par conséquent possible dans certaines applications de générer un champ électromagnétique pulsé (CEMP) induit par une interruption à une fréquence plus ou moins élevée du courant électrique. Nos études se sont concentrées sur les effets des CEMP sur le photocycle des cryptochromes et de leurs conséquences pour la cellule ou l'organisme.

3.2.2 Découverte des effets du champ magnétique sur les organismes vivants

L'hypothèse d'une sensibilité au champ magnétique dans le monde animal n'est pas nouvelle, dès le milieu du XIX^{ème} siècle elle fut proposée par le zoologiste allemand Alexander von Middendorff pour expliquer la migration directionnelle des oiseaux (**von Middendorff A, 1859**). L'utilisation d'une boussole magnétique par les oiseaux migrateurs a été formellement démontrée pour la première fois en 1966 chez le rouge-gorge (**Wiltschko & Merkel, 1966**), et depuis même phénomène a été observé pour une vingtaine d'autres espèces d'oiseaux (**Wiltschko & Wiltschko, 1996**). Lors de ces expériences les oiseaux sont maintenus captifs dans une cage sans repère visuel pour l'oiseau, le champ magnétique terrestre reste leur dernier repère connu. Etonnement la pression pour la migration est si forte que les oiseaux s'orientent en s'agitant ou en sautant dans une direction particulière, qui correspond à la direction qu'ils emprunteraient en vol libre lors de leur migration.

Leur orientation dans la cage change même selon la période de l'année. Ainsi ils s'orientent vers le nord pendant la période migratoire du printemps qui correspond à une remontée de l'Afrique du nord jusqu'en Europe, à l'inverse ils s'orientent préférentiellement vers le sud dans leur cage à l'automne, concordant avec une migration de l'Europe vers l'Afrique. La responsabilité du champ magnétique terrestre dans l'orientation du rouge gorge est démontrée lorsque l'on modifie artificiellement l'orientation de ce champ, dans ces conditions les oiseaux modifient leur orientation selon le même angle (Wiltchko *et al*, 2001). Les autres espèces non migratrices comme le pigeon semblent également utiliser le champ magnétique terrestre mais l'effet de celui-ci est très difficilement visible. Etant donné que ceux-ci s'orientent vers leur nid il est difficile d'obtenir une orientation directionnelle identique pour tous les spécimens étudiés.

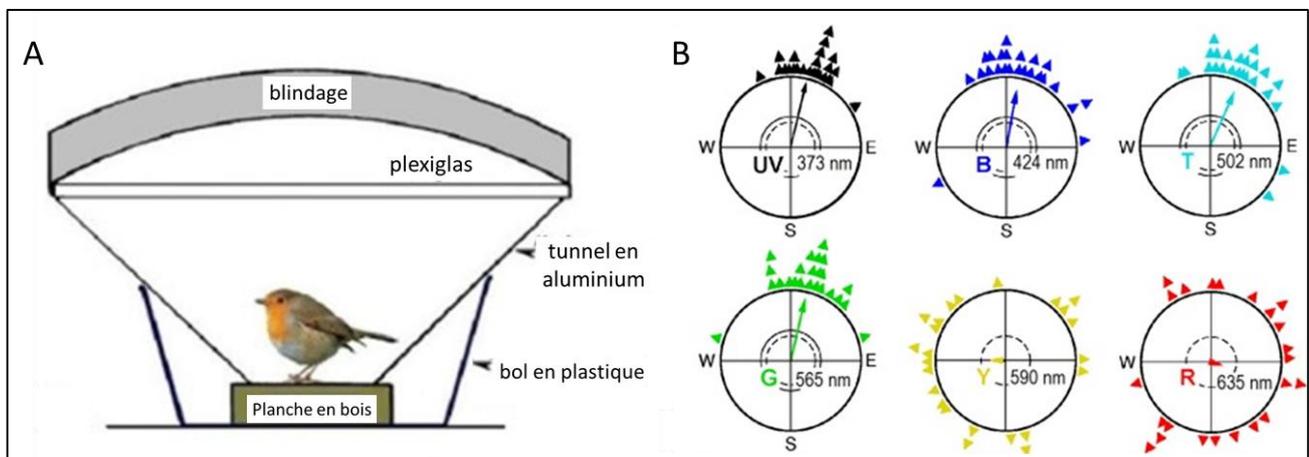


Figure 30 :

A : Schéma représentatif du protocole expérimental pour l'étude de l'orientation du rouge gorge en fonction du champ magnétique terrestre. **B :** Orientation des oiseaux par rapport au nord magnétique dans les conditions du protocole et en fonction de la longueur d'onde soumise aux oiseaux (modifié d'après Wiltchko & Wiltchko, 2014).

Le fait le plus intéressant est que ces orientations préférentielles ne sont possibles qu'à la lumière et seulement pour certaines longueurs d'onde, à savoir les UV, le bleu, le turquoise et le vert mais pas pour le reste du spectre visible (Wiltchko & Wiltchko, 2014). L'absence de lumière empêche également l'orientation directionnelle. Cette dépendance de la lumière indique que le mécanisme responsable de la magnétoreception est assez inhabituel et semblerait ne pas impliquer directement des matériaux magnétiques de façon permanente. Les mécanismes en question impliqueraient une composante photoréceptrice sensible à certaines longueurs d'onde. Le consensus selon lequel les cryptochromes étaient les candidats les plus probables pour expliquer un tel phénomène s'est ensuite rapidement imposé.

Parallèlement à ces études, il est maintenant admis, par la communauté médicale, que certaines stimulations magnétiques ont des applications thérapeutiques. C'est notamment le cas de la stimulation magnétique transcrânienne ou TMS (**Montagne-Larmurier et al, 2009 ; Van Belkum et al, 2016**). Cependant, ces thérapies utilisent de puissants champs magnétiques dans l'unique but d'induire un champ électrique capable de stimuler les neurones. Mais d'autres thérapies utilisant des champs électromagnétiques pulsés beaucoup plus faibles pourraient de même avoir des effets thérapeutiques. Plusieurs de leurs effets bénéfiques ont été démontrés sur des cellules humaines pour des pathologies comme la maladie de Parkinson (**Vadalà et al, 2015**). De plus, le potentiel thérapeutique des champs électromagnétiques pulsés a été démontré pour des pathologies impliquant d'autres organes que le cerveau. Les CEMP pourraient avoir un potentiel thérapeutique pour la régénération osseuse ou encore le traitement des cancers (**Cook et al, 2015 ; Vadalà et al, 2016**). Il n'est cependant pas à exclure que les cryptochromes puissent contribuer à ces effets bénéfiques observés. Cependant, ces études ne se sont contentées que d'étudier les effets sans en comprendre les mécanismes qui y conduisent ; aucun lien avec les cryptochromes ou une autre protéine n'a pu être établi à l'heure actuelle.

3.2.3 Mécanismes théoriques expliquant les effets du champ magnétique

Les mécanismes moléculaires induits par les champs magnétiques sur les systèmes vivants ne sont toujours pas connus. Cependant trois hypothèses majeures ont vu le jour pour expliquer leur mécanisme d'action :

La première d'entre elles met en avant l'implication des rhodopsines, des pigments protéiques photosensibles présents dans la rétine et responsables de la sensibilité de l'œil à la lumière (**Hong F, 1977 ; Hong F, 1995**). Cette étude a montré que les rhodopsines sont capables de s'orienter magnétiquement à la façon d'un aimant, Cependant cette propriété n'a pu être observée qu'à des intensités de champ magnétique mille fois supérieures à celle du CMT. Ce constat rend peu probable un effet significatif *in vivo* de ce mécanisme sur l'orientation des oiseaux.

Une deuxième possibilité d'action du champ magnétique, qui a reçu et reçoit encore beaucoup d'intérêt, stipule que des particules de magnétite pourraient avoir un effet direct sur la magnétoreception (**Kirschvink & Gould, 1981**). La magnétite est un minéral composée principalement d'oxydes de fer avec des traces d'autres métaux, ce qui la rend capable d'être attirée par les aimants.

Enfin une troisième hypothèse impliquerait les spins d'électrons non appariés de molécules biologiques qui formeraient alors une paire radicalaire pouvant être modulée par l'action des champs magnétiques. C'est sur ce prémice que nous avons basé nos recherches pour tenter d'expliquer la sensibilité du cryptochrome aux champs magnétiques. La première observation qui a conduit à cette hypothèse date des années 1970. A cette époque il a été observé qu'un champ magnétique d'une intensité 20 fois supérieure à celle du CMT pouvait influencer les réactions entre des paires radicalaires *in vitro* et *in vivo* chez certaines bactéries (**Schulten *et al*, 1976 ; Werner *et al*, 1978**). Une paire radicalaire est composée de deux molécules ou radicaux contenant chacun un nombre impair d'électrons et dont les spins des deux électrons non appariés peuvent influencer la réaction entre les deux composés. Le spin est souvent assimilé à un moment cinétique ou la rotation d'un objet sur lui-même. Les spins des deux électrons non appariés leur donne un moment magnétique, ce qui les soumet à des altérations ou modifications en présence d'un champ magnétique. Une paire radicalaire peut se trouver dans deux états possibles appelés états singulet ou triplet qui résultent du couplage des spins des deux électrons non appariés. Lorsque les spins sont opposés ils sont dans l'état singulet, inversement si les spins sont identiques ils sont dans l'état triplet. Dans un schéma réactionnel classique des paires radicalaires (**Figure 31**), deux réactifs vont mener à la formation de cette paire radicalaire grâce à l'apport d'une importante source d'énergie. Les deux électrons initiaux peuvent soit venir des deux réactifs séparément, soit d'un seul des deux réactifs et l'un d'eux sera transféré à l'autre réactif grâce à cet apport d'énergie, ce qui aboutit à la formation de la paire radicalaire. La différence entre les états singulet et triplet est que seul l'état singulet peut conduire à la réaction réverse conduisant à la reformation des réactifs, alors que l'état triplet ne peut que conduire à la formation des produits. Le rôle essentiel du champ magnétique dans cette réaction est qu'il permet une interconversion entre les états singulets et triplets, et ceci en fonction de son orientation. Toutefois, dans ce modèle les états triplets et singulets conduisent à la formation des mêmes produits, mais la proportion de paires radicalaires se trouvant dans l'état singulet ou triplet, modulable par les champs magnétiques peut modifier l'équilibre de cette réaction et donc sa vitesse.

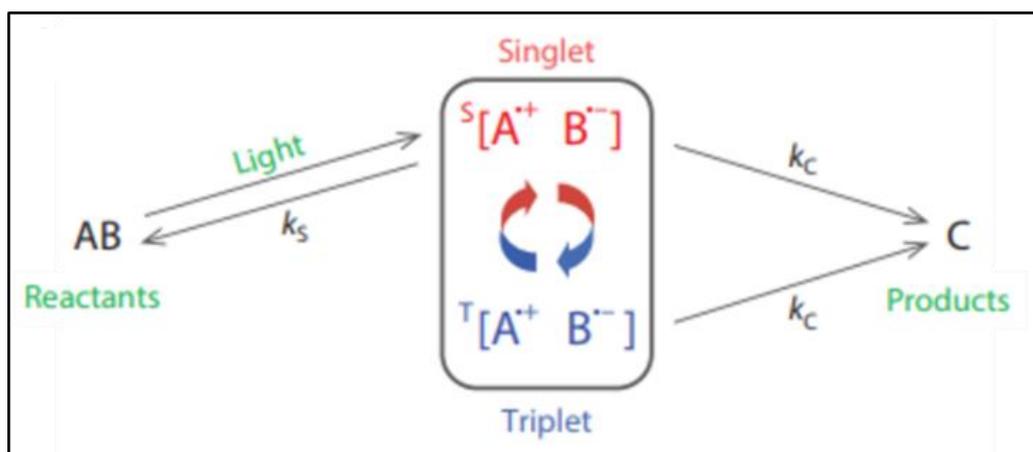


Figure 31 :

Mécanismes réactionnels théoriques expliquant l'effet d'un champ magnétique externe sur l'équilibre réactionnel d'une paire radicalaire (**Hore & Mouritsen, 2016**).

Une des limitations de ce modèle est qu'il serait nécessaire que les paires radicalaires soient orientées dans le sens du champ magnétique en application pour que son impact soit clairement visible. En effet **Maeda *et al*, 2008** ont montré que la direction du champ magnétique pouvait influencer sur le rendement de produits formés par une paire radicalaire. Si l'application et l'orientation d'un champ magnétique peut potentiellement modifier l'équilibre de certaines réactions biochimiques cellulaires impliquant des paires radicalaires cela pourrait mener alors, à un nombre conséquent de régulations dans la signalisation, la transcription ou la traduction au sein de la cellule, de l'organe ou de l'organisme. Il est en revanche erroné de penser que le champ magnétique favoriserait la formation de l'état triplet ou singulet, il n'y a rien qui puisse le prouver en l'état (**Hore & Mouritsen, 2016**).

3.2.4 Implication du cryptochrome dans la sensibilité au champ magnétique

Plusieurs études montrent que les cryptochromes sont impliqués dans la faculté de certains animaux à détecter les champs magnétiques, mais il n'y a toujours aucune preuve qu'il s'agisse précisément du magnétorécepteur. Il est possible que le cryptochrome joue un rôle indirect dans la détection du champ magnétique et ait besoin de molécules ou de partenaires protéiques spécifiques (**pour revue voir Hore & Mouritsen, 2016**). Il n'en reste pas moins qu'à ce jour, les cryptochromes restent les uniques candidats pour expliquer les mécanismes de magnétoreception selon le modèle des paires radicalaires (**Dodson *et al*, 2013 ; Ahmad M, 2016**). Les opsines, qui utilisent aussi la lumière, n'impliquent pas la formation de paires radicalaires. Les chlorophylles, qui sont les seules autres biomolécules connues pour générer des paires radicalaires induites par la lumière, n'existent pas chez

les oiseaux. De plus il n'existe pas moins de quatre cryptochromes exprimés au niveau de la rétine des oiseaux migrateurs qui pourraient expliquer les effets migratoires en fonction de la longueur d'onde (Bolte *et al*, 2016). Cependant, aucun effet des champs magnétiques sur les cryptochromes aviaires n'a pu être observé. La raison principale étant est qu'il est difficile d'exprimer ces cryptochromes liés à leur flavine *in vitro*.

3.2.4.1 Théories pour la sensibilité magnétique des cryptochromes

Chez les cryptochromes, lors de la photoréduction, a lieu un échange d'électron entre un tryptophane et la flavine. Cet échange d'électron permet la formation transitoire de deux radicaux distants de 2nm : $FAD^{\bullet-}$ et $TrpH^{\bullet+}$, puis très rapidement la flavine est protonée pour former le $FADH^{\bullet}$. Ces deux radicaux sont formés initialement dans leur état singulet, dû au transfert d'un des deux électrons du tryptophane à la flavine dans son état photoexcité (Weber *et al*, 2010 ; Maeda *et al*, 2012). L'autre cofacteur du cryptochrome (le MTHF) n'apparaît pas aujourd'hui comme pouvant être impliqué dans la magnétoreception par le mécanisme des paires radicalaires.

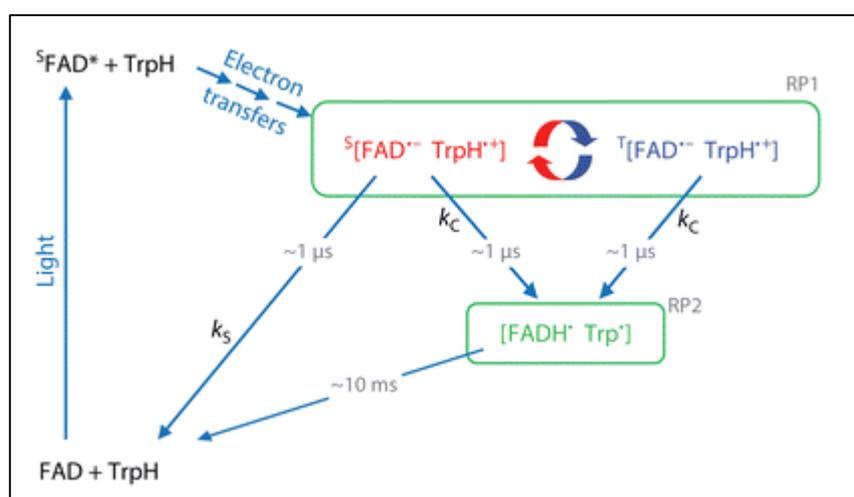


Figure 32 : Mécanismes réactionnels théoriques des paires radicalaires pour CRY1. Deux paires radicalaires sont théoriquement possibles : $[FAD^{\bullet-}/Trp^{\bullet+}]$ et $[FADH^{\bullet}/Trp^{\bullet}]$ après excitation par la lumière, principalement bleue et verte (Hore & Mouritsen, 2016).

Dans ce modèle la première paire radicalaire formée $[FAD^{\bullet-}/Trp^{\bullet+}]$ peut conduire à une seconde paire radicalaire $[FADH^{\bullet}/Trp^{\bullet}]$ après protonation/déprotonation des deux radicaux. Cependant, la durée de vie de cette seconde paire, de l'ordre de 10ms, est trop longue pour qu'elle soit affectée par les champs magnétiques. En effet, le temps de relaxation des spins de leurs électrons étant beaucoup plus court que 10ms ($1\mu s$), et une fois ce temps écoulé ils sont stables et ne peuvent plus être affectés par les champs magnétiques. La recombinaison des radicaux dans l'état singulet permet théoriquement de revenir aux réactifs initiaux $FADox/TrpH$, ce qui est impossible pour l'état triplet.

Ce modèle théorique bien qu'utile dans mes études ne prend bablement pas en compte toute la complexité du mécanisme de magnétoréception par les cryptochromes. En effet on peut douter du fait que la réponse du cryptochrome au champ magnétique soit identique selon qu'il soit lié ou non à des partenaires ou des métabolites. Les cryptochromes doivent-ils être immobilisés voir alignés avec ce champ magnétique ? Existe-il d'autres paires radicalaires que la paire $FAD^{\bullet-}/Trp^{\bullet+}$ chez les cryptochromes? Jusqu'à quelle valeur d'induction magnétique les cryptochromes sont-ils magnéto-sensibles ? Ce mécanisme théorique est-il similaire entre conditions *in vivo* et *in vitro* ? Ce mécanisme est-il applicable aux cryptochromes animaux ? La réponse à ces questions permettrait de mieux définir ce modèle, par ailleurs d'autres modèles ont été proposés (Lee *et al*, 2014 ; Qin *et al*, 2015)

Des éléments de réponse aux questions citées plus haut peuvent toutefois être apportés. Il est possible que des voies alternatives pour le transfert des électrons *in vivo* puissent modifier la sensibilité magnétique des cryptochromes, elles pourraient également générer d'autres paires radicalaires. Un champ magnétique de l'ordre de 50 μ T pourrait être suffisant pour permettre la sensibilité magnétique des cryptochromes, en se basant sur l'importance du champ magnétique interne à la protéine. Ces champs magnétiques intrinsèques doivent également être pris en compte pour estimer la sensibilité magnétique d'un système, qui peut théoriquement varier d'un facteur 100 (Lee *et al*, 2014). Il n'est toujours pas certain qu'une orientation des protéines soit nécessaire pour être sensible aux champs magnétiques. Dans le cas où les cryptochromes ne sont pas orientés dans la cellule, aucun effet directionnel ne peut exister. En revanche, s'ils sont immobilisés et alignés grâce à des éléments structurels tel que le cytosquelette ou plus probablement les membranes cellulaires, ces effets directionnels pourraient être significatifs (Solov'yov *et al*, 2010 ; Hill & Ritz, 2010). Les cryptochromes sont, cependant, solubles dans l'eau et ne se lient pas directement aux membranes. Néanmoins, chez les oiseaux, des expériences de fractionnement cellulaire ont identifié une importante proportion de cryptochromes dans la fraction membranaire (Nießner *et al*, 2011). Ces résultats suggèrent que les cryptochromes pourraient se lier à des partenaires, qui pourraient eux-mêmes être des composants membranaires permettant l'alignement des cryptochromes pour finalement activer leur sensibilité directionnelle au champ magnétique externe.

3.2.4.2 Détection des effets du champ magnétique sur les cryptochromes

Chez *Arabidopsis thaliana*, des preuves concrètes d'une implication des champs magnétiques dans le processus de floraison ont été démontrées et cela en présence de lumière (Xu *et al*, 2015). Des études ont démontré, par spectroscopie, que la protéine CRY1 d'*Arabidopsis thaliana* est sensible à

un champ magnétique de 30mT (500 fois le CMT) pendant une période transitoire de moins d'1 microseconde durant laquelle se forme la paire radicalaire [FAD•-/Trp•+] elle-même capable de se convertir après protonation/déprotonation en une seconde paire radicalaire [FADH•/Trp•] (**Maeda et al, 2012**). Cependant, cette deuxième forme a une durée de vie bien plus longue (quelques millisecondes) ce qui empêcherait, selon les modèles établis, que le champ magnétique influe sur son équilibre réactionnel. Par conséquent seul la première forme serait magnéto-sensible. Ces expériences n'expliquent pas comment le cryptochrome se comporte dans la cellule, et si la présence de partenaires potentiels ou de quelconques structures permettent de l'immobiliser et/ou de l'aligner avec les champs magnétiques environnants. D'autres études ont tenté de démontrer les effets du champ magnétique sur la croissance de l'hypocotyle, l'accumulation d'anthocyanes ou la dégradation de CRY2 (**Ahmad et al, 2007**). Celles-ci ont démontré que lorsque l'intensité du champ magnétique ambiant est dix fois supérieure à celle du CMT, l'accumulation d'anthocyanes est plus importante, et la croissance de l'hypocotyle est davantage réduite en lumière bleue qu'en conditions normales avec le CMT seul. Ces études ont toutefois eu des difficultés à être reproduites (**Harris S-R et al, 2009**).

Chez la drosophile plusieurs effets du champ magnétique dépendants du cryptochrome et de la lumière bleue ont été détectés :

- Les réponses binaires dans un labyrinthe en T : dans ce type d'expérience les drosophiles sont exposées à la lumière dans un tube en verre débouchant sur deux extrémités dans lesquelles elles peuvent se déplacer, un champ magnétique n'est appliqué qu'à l'une des deux extrémités. Il apparaît dans ces études que le choix de ces mouches pour l'une ou l'autre des extrémités est influencé lorsque celles-ci sont préalablement entraînées à associer la présence d'un champ magnétique avec la présence de sucrose. En effet ces drosophiles entraînées choisissent majoritairement l'extrémité exposée à un champ magnétique lors du test final malgré l'absence de sucrose, ce qui confirme leur capacité à détecter la présence des champs magnétiques. (**Gegear et al, 2008**). L'implication du cryptochrome dans la sensibilité au champ magnétique est démontré par l'incapacité des drosophiles mutantes n'exprimant plus DmCRY à associer la présence de sucrose avec la présence du champ magnétique.
- Les rythmes circadiens : la longueur de la période circadienne des drosophiles est modifiée (raccourcie ou rallongée en fonction des études) en présence de champs magnétiques. De plus, la surexpression de DmCRY au sein des neurones d'horloge amplifie les réponses circadiennes et ces effets ont également été observés chez des drosophiles exprimant hCRY2 (**Yoshii et al, 2009 ; Fedele et al, 2014**). Ces mêmes études ont mis en évidence une augmentation de

l'activité locomotrice chez les drosophiles sauvages exposées à un champ magnétique, alors que chez les mutantes nulles l'effet inverse est observé.

Cependant, l'ensemble de ces études ne permettent pas d'expliquer par quel mécanisme direct ou indirect les cryptochromes permettent la détection des champs magnétiques. Il a été montré que DmCRY interagissait avec une protéine codée par le gène MagR pour former un complexe protéique qui présente des réponses dépendantes de la lumière en présence d'un champ magnétique induit *in vitro* chez des cellules HEK ainsi que des neurones (Qin *et al*, 2016 ; Pang *et al*, 2017). Les atomes de fer, contenus dans le complexe MagR/DmCRY, ne sont cependant pas suffisants pour expliquer les effets obtenus. Bien que la paire radicalaire formée entre le tryptophane et la flavine du cryptochrome puisse être impliquée, le mécanisme sous-jacent reste encore inconnu. Des études génétiques substituant DmCRY aux cryptochromes de vertébrés ont montré que la sensibilité aux champs magnétiques et à la lumière est probablement très conservée chez les animaux (Nießner *et al*, 2016).

Les cryptochromes de mammifères et notamment humains montrent une activité lumière dépendante en présence d'un champ magnétique (Foley *et al*, 2011). Ces études ne se sont toutefois contentées que d'exprimer la protéine hCRY2 chez la drosophile en étudiant leur comportement lors d'expériences utilisant des labyrinthes en T.

3.2.4.3 Lien entre cryptochromes, ROS et champs magnétiques

Les nombreuses études qui ont mis en relation les cryptochromes avec les champs magnétiques n'ont pas d'explication concrète aux faits observés, mais les caractéristiques du photocycle des cryptochromes permettent d'esquisser quelques hypothèses. Il a été plusieurs fois suggéré qu'il pourrait exister une autre paire radicalaire que le couple FADH• / Trp•, il s'agit de la paire FADH• / O₂⁻ (Ritz *et al*, 2009 ; Hogben *et al*, 2009 ; Nießner *et al*, 2014). Il est même envisagé que l'oxygène triplet ³O₂ puisse, lui aussi, former un couple avec la flavine semi-réduite (Müller & Ahmad, 2011). Le produit final obtenu serait toujours le H₂O₂, et les mécanismes théoriques resteraient inchangés, à savoir qu'il est supposé y avoir une interconversion entre les formes triplet et singulet de ce couple et que seul l'état singulet permettrait de former les produits. L'existence de ces paires radicalaires pourrait, de plus, expliquer le fait que la triade de tryptophane ne soit pas nécessaire à la magnétoreception chez la drosophile (Gegear *et al*, 2010). Cependant, il est nécessaire que la flavine se réduise totalement pour aboutir à la paire radicalaire FADH• / O₂⁻ (voir figure 27), et cette forme étant très minoritaire, aucune expérience *in vitro* n'a donc pu mettre en évidence cette nouvelle paire.

La photoréduction est plus efficace *in vivo* (**Consentino et al, 2015 ; Arthaut et al, 2017**) et pourrait faire intervenir des agents réducteurs inconnus, rendant plausible la formation de cette paire radicalaire au sein de l'organisme.

Il est également possible que les ROS contribuent aux effets des champs magnétiques sur certains organismes, y compris l'Homme, d'une autre manière que par le mécanisme des paires radicalaires. La régulation de leur synthèse dans les cellules peut conduire à des effets bénéfiques ou néfastes pour l'organisme (**Sies et al, 2015**), selon qu'ils permettent ou non d'activer les mécanismes de défense contre le stress. Or, les cryptochromes ont la capacité de synthétiser des ROS au cours de leur cycle de photoréduction. Le mécanisme des paires radicalaires permettrait en théorie de moduler la vitesse de synthèse des produits, dont les ROS font partie, en réponse aux champs magnétiques. Il est donc tout à fait concevable que la concentration en ROS dans les cellules puisse être contrôlée par les champs magnétiques, par l'intermédiaire des cryptochromes. Ceci pourrait entre autre expliquer les bénéfices observés lors de l'utilisation de CEMP sur des cellules humaines. En effet des travaux sur des modèles cellulaires humains ont démontré que les champs magnétiques ont la capacité d'augmenter les niveaux de ROS (**Calabro et al, 2013 ; Poniedzialek et al, 2013 ; Zhao et al, 2011**). Il est à noter que ces études utilisent des champs magnétiques d'induction modérée à forte, de quelques dizaines de mT à quelques teslas, bien plus importante que celle du CMT (45µT). De plus, les recherches qui étudient le lien entre les champs magnétiques et les ROS concernent une large variété de champs magnétiques (**Wang & Zhang, 2017**). Ces travaux n'ont étudié que l'effet des champs magnétiques sur la production des ROS sans étudier l'impact des cryptochromes sur cette production. Des études complémentaires utilisant des champs magnétiques de plus faible induction et se focalisant sur le lien entre les cryptochromes et les effets déjà observés semblent indispensables.

Objectifs et approche expérimentale

Mes différentes études sont regroupées en une série de 3 articles, publiés ou acceptés et sont focalisées autour de deux nouveaux champs d'études autour des cryptochromes : leur lien avec les ROS et leur rôle dans la magnétoreception

Dans le premier article nous avons étudié la synthèse des ROS induite par le cryptochrome de drosophile DmCRY. Nous avons repris le mode opératoire de l'article de (**Consentino *et al*, 2015**) qui constitue en grande partie la base de mon travail de thèse. Plusieurs études ont été menées :

- La synthèse des ROS en cellules Sf21 surexprimant DmCRY
- Le suivi de la synthèse des ROS par la protéine purifiée
- Le suivi de la photoréduction *in vitro*

Finalement nous avons montré une accumulation de ROS dépendante de DmCRY en lumière bleue à la fois en cellules et en protéines isolées.

Le second article reprend le travail de (**Consentino *et al*, 2015**) sur la synthèse des ROS par CRY1 chez *A. thaliana* tout en l'approfondissant et en lui donnant du sens. Nous nous sommes ici demandé si la synthèse de ces ROS pouvait être également suivie chez des plantules d'*Arabidopsis* et avoir un rôle fonctionnel chez ces plantes. Selon le modèle théorique les ROS sont produits par le domaine N-terminal alors que la signalisation cellulaire est contrôlée par la partie C-terminale. Nous avons décidé d'étudier spécifiquement l'activité ROS N-terminale en utilisant des mutants de la partie C-terminale. Pour cela une série d'observations a été réalisée :

- Détection des ROS en lumière bleue chez des plantules d'*A. thaliana* mutantes nulles ou surexprimant CRY1
- Analyse qPCR de la régulation transcriptionnelle des mutants CRY1 nuls mais aussi des mutants CRY1 C-terminaux C en lumière bleue.
- Analyse de la photoréduction et de la synthèse des ROS des protéines mutantes C-ter CRY1 purifiées
- Vérification de l'inactivité biologique des cryptochromes mutants C-ter (accumulation d'anthocyanes et longueur d'hypocotyle)

Nous avons finalement démontré un rôle potentiel du domaine N-ter seul pour certaines fonctions cellulaires et ce grâce à une signalisation par les ROS.

Dans le dernier article qui n'est pas encore publié nous avons tenté de répondre à la question qui était de savoir si les champs magnétiques pulsés pouvaient avoir un impact sur l'activité des cryptochromes. Nous avons pour cela utilisé plusieurs modèles d'étude :

- Des pupes de drosophiles mutantes ou sauvages pour DmCRY. Nous voulions savoir si en présence d'un champ magnétique pulsé les drosophiles pouvaient modifier leur comportement.
- Des cellules insectes sauvages ou surexprimant DmCRY. Celles-ci nous ont permis de savoir si en présence d'un champ magnétique et de la lumière bleue l'activité N-terminale pouvait être inhibée ou stimulée en synthétisant plus ou moins de ROS.
- Le même type d'observation a été réalisé en cellules de mammifères (Homme et souris) avec les cryptochromes humains ou de souris.

Ces dernière série d'études nous a permis de mettre en évidence une synthèse de ROS de façon CRY dépendante en présence de lumière bleue et d'un champ magnétique. Ces résultats combinés à ceux du deuxième article laisseraient supposer une régulation des fonctions cellulaires directement contrôlée par le champ magnétique pulsé.

Additionnellement à ces résultats plusieurs études sont toujours en cours :

- J'ai personnellement construit un grand nombre de plasmides afin de pouvoir exprimer des protéines CRY1 mutantes en cellules d'insecte Sf21 afin de pouvoir les purifier, et ceci dans le but de savoir quelle région de la protéine est responsable de la sensibilité au champ magnétique.
- Nous étudions les effets d'un autre type de champ magnétique : le champ magnétique statique, dont les effets attendus sur les cryptochromes pourraient être différents de ceux observés avec le champ pulsé.
- Nous sommes en ce moment en train d'étudier les effets de DmCRY sur le vieillissement des drosophiles sous différentes conditions lumineuses, avec pour objectif complémentaire d'étudier les niveaux d'expression des gènes connus comme étant impliqués dans le vieillissement. Ces études n'impliquent que la lumière bleue sans champ magnétique.
- Un autre projet que nous avons débuté consiste en l'étude de l'interaction entre DmCRY de la drosophile et CRY1 d'*Arabidopsis thaliana* et deux facteurs de transcription : dFOXO et GBF1. Ces facteurs de transcription sont connus pour réguler de nombreux gènes respectivement en lien avec le vieillissement, soit en réponse à une forte lumière, il a également été montré qu'ils sont inactivés en présence de H₂O₂, ce sont ces deux caractéristiques qui nous ont amené à étudier leur lien potentiel avec les cryptochromes.

RESULTATS ET ANALYSE

ARTICLE 1

Blue-light induced accumulation of reactive oxygen species is a consequence of the *Drosophila* cryptochrome photocycle

Arthaut L-D, Jourdan N, Mteyrek A, Procopio M, El-Esawi M, d' Harlingue A, Bouchet P-E, Witczak J, Ritz T, Klarsfeld A, Birman S, Usselman R, Hoecker U, Martino C & Ahmad M

Plos One 12, e0171836.

1. Introduction

Dans cet article nous sommes sortis du paradigme selon lequel les cryptochromes animaux et dans le cas présent DmCRY aurait principalement un rôle dans la régulation des gènes suite au changement conformationnel induit par la lumière bleue. Le principal objectif dans ce domaine était de déterminer la nature des réactions biochimiques permettant l'activité de cette protéine. De récentes études menées par notre propre équipe ont révélé une nouvelle fonction aux cryptochromes dans la synthèse des ROS aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Müller & Ahmad, 2011 ; Consentino *et al*, 2015). L'axe principal de recherche était d'identifier l'enchaînement des réactions photochimiques conduisant au changement conformationnel. Chez CRY1 comme pour DmCRY, la flavine est sous forme oxydée en obscurité et se réduit en présence de lumière pour permettre un changement conformationnel. Une récente controverse concernant photoréduction de DmCRY a été discutée, celle-ci s'appuie sur des études ayant montré que la forme semi-réduite FAD•- n'est pas nécessaire à la photoréduction *in vivo*, des protéines mutantes dont un tryptophane a été substitué sont incapables de subir la photoréduction *in vitro*, mais ces protéines mutantes continuaient pourtant à conférer une activité biologique *in vivo* (Oztuürk *et al*, 2008 ; Oztuürk *et al*, 2011). Il apparaît cependant que la photoréduction a bien lieu *in vivo* mais par des voies alternatives aux trois tryptophanes (Engelhard *et al*, 2014 ; El-Esawi *et al*, 2015). Les nouvelles études sur la relation entre ROS et cryptochromes ont commencé chez les plantes avec la protéine CRY1 purifiée, mettant en évidence une synthèse de H₂O₂, tout en sachant que CRY1 et CRY2 subissent tous les deux un cycle de photoréduction / réoxydation en lumière bleue. L'étape de réoxydation est théoriquement responsable de la synthèse du

H₂O₂. L'accumulation de ces ROS dépendante des cryptochromes est visible au sein du noyau ou CRY1 et CRY2 sont eux même localisés (**Consentino *et al*, 2015**). Alors que dans les mitochondries et les chloroplastes, principaux producteurs de ROS dans la cellule, ce sont les enzymes métaboliques qui sont responsables de cette synthèse.

Afin de résoudre certaines controverses ainsi que proposer de nouveaux champs d'études de la signalisation de DmCRY nous avons étudié son photocycle avec une nouvelle approche. Nous avons calculé certains paramètres enzymatiques de cette protéine comme son rendement quantique ainsi que sa demi-vie de réoxydation en obscurité, qui concorde avec des résultats déjà obtenus chez les plantes avec CRY1 et CRY2 (**Ozturk *et al*, 2011 ; Ozturk *et al*, 2014**). Nous avons enfin donné une nouvelle dimension à la signalisation de DmCRY en démontrant qu'une accumulation de ROS se produit à la suite d'une illumination en lumière bleue de cette protéine, dans la cellule tout et avec la protéine isolée. Ces résultats suggèrent la possibilité qu'une synthèse enzymatique directe par les cryptochromes pourrait représenter un mécanisme alternatif de stress oxydant fortement conservé dans le règne du vivant.

2. Matériels et méthodes

Echantillons protéiques et expériences de photoréduction :

Ce matériel a été utilisé pour les figures 1 ,2 et 3. Le cDNA complet du gène DmCRY a été cloné dans un vecteur de transfert baculovirus : pAcHLT-A en phase avec un tag de 6 histidines en N-terminal. La protéine DmCRY a été exprimée dans des cellules d'insecte Sf21 par des méthodes préalablement établies, et a été purifiée par une colonne d'affinité en nickel NTA dont le protocole d'extraction a déjà été décrit (**Bouly *et al*, 2007**). Les expériences de photoréduction ont été réalisés à 21°C dans un tampon phosphate à 50mM, pH 7.5 et 10mM de β-mercaptoéthanol. Des constructions contrôles (Spa1), permettant une expression de la totalité du cDNA de la protéine SPA1 ont été effectuées en clonant ce gène dans le vecteur baculovirus pDEST10 (Thermo Fisher Scientifique, Waltham, Ma.) puis le vecteur a été introduit en cellules Sf21. La protéine SPA1 a été choisie car ayant un rôle dans la signalisation par la lumière, mais elle n'a pas de pigments photoactifs en lumière.

Analyses cinétiques :

Des analyses cinétiques par méthode numérique ont été effectuées pour le calcul du rendement quantique par photon ainsi que la demi-vie de réoxydation, en utilisant notamment les spectres

d'absorption obtenus (figure 2), le protocole ayant déjà été décrit (**Procopio et al, 2016**). Les détails de ces analyses se trouvent dans les résultats supplémentaires de l'article (S1).

Détection des ROS dans les échantillons de protéines purifiées :

Pour détecter les ROS, la protéine DmCRY a été éclairée en lumière bleue à $3000\mu\text{E}$ ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$) pendant 30 minutes à 0°C . La concentration en protéine était de $30\mu\text{M}$ (PBS pH 7.4) et sans agent réducteur. Des aliquotes ont été prélevés intervalles réguliers et congelés dans l'azote liquide avant de détecter les ROS. Pour cela $3\mu\text{L}$ d'échantillon protéique décongelé ont été dilués 100 fois dans du tampon phosphate à 50mM pH 7.4. On ajoute l'Amplex UltraRED à la concentration finale de $10\mu\text{M}$ et la horseradish peroxydase à une concentration finale de 0.2 U. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité la fluorescence a été détectée avec un volume de $100\mu\text{L}$ par puits à l'aide d'un spectrofluorimètre Cary Eclipse en utilisant les maximums d'excitation / émission : $560\text{nm} / 590\text{nm}$. Pour l'Amplex Red la fluorescence détectée a été convertie en concentration d' H_2O_2 en utilisant une gamme étalon de concentration en peroxyde d'hydrogène. La valeur de cette concentration sur le graphique correspond à celle de l'échantillon non dilué avant l'analyse. Un autre marqueur a été utilisé pour la détection des ROS : le DCFH-DA, 1mM de ce marqueur a été rajouté aux échantillons protéiques dans leur tampon d'élution avant illumination. La fluorescence a été lue en triplicatas sans dilution en prélevant directement $100\mu\text{L}$ pour chaque puits à analyser au spectrofluorimètre. Les longueurs d'ondes d'excitation / émission étaient respectivement de $490\text{nm} / 530\text{nm}$.

Détection des ROS dans les cultures de cellules d'insectes Sf21 :

Les cellules d'insecte exprimant DmCRY ou SPA1 ont été collectées 72h après leur infection par les baculovirus exprimant les différentes constructions, et ont été resuspendues dans du PBS (50mM sodium phosphate, 150mM NaCl à pH 7.4) avec pour concentration finale 2×10^5 cellules/mL. Le DCFH-DA a ensuite été ajouté à une concentration finale de 1mM avant illumination à 22°C . L'illumination a été effectuée sur des plaques 24 puits avec 1mL de culture cellulaire directement placée sous la source lumineuse pendant 10 minutes à différentes intensités lumineuses (figure 4). Après illumination les cellules sont collectées, lavées au PBS puis lysées dans un volume final de $500\mu\text{L}$ de PBS dans lequel on a ajouté du Triton X-100 à 0.1%. $80\mu\text{L}$ de lysat cellulaires sont prélevés à trois reprises pour chaque condition et la fluorescence est mesurée avec 490nm ex / 530nm em.

Détection de DmCRY par immunofluorescence :

Les cellules Sf21 sont incubées pendant 2h sur lamelles de verre puis placées en obscurité ou en lumière bleue pendant 15 minutes et fixées avec du paraformaldéhyde à 2% pendant 10 minutes à température ambiante. Elles sont perméabilisées avec du Triton X-100 à 0.1% et incubées avec anticorps polyclonal de lapin anti-DmCRY et un anticorps secondaire anti-lapin Alexa 488. Un liquide de montage comprenant du DAPI a été ajouté à la lamelle et recouvert d'une lame, les cellules ont été observées à l'objectif 63X au microscope confocal Leica SP5. Le DAPI et l'Alexa-488 ont été respectivement excités aux longueurs d'onde 405 et 488nm et l'émission de fluorescence a été détectée à 498 et 561nm.

Localisation intracellulaire des ROS :

Les cellules Sf21 contrôles ou surexprimant DmCRY ont été lavées 2 fois avec du PBS (pH 7.4) puis incubées dans du PBS contenant 58µM de DCFH-DA pendant 10 minutes en obscurité puis placées en lumière bleue pendant 5 minutes. Elles sont observées entre lame et lamelles à l'aide de l'apotome Zeiss AxioImager Z1 ou du microscope confocal Leica TCS SP5.

3. Résultats :

Nous avons démontré que les préparations purifiées de la protéine DmCRY subissent une réaction de photoréduction *in vitro*. Ceci implique la transition du cofacteur FAD de l'état oxydé FAD à l'état semi réduit anionique FAD^{•-}. Au retour à l'obscurité la flavine se réoxyde spontanément en présence d'oxygène moléculaire pour revenir à l'état oxydé FAD_{ox}, ce qui provoque un photocycle continu lorsque l'illumination est constante. De ce fait la vitesse de réoxydation de la flavine dépend des constantes de vitesse k et k_b selon le modèle cinétique à 2 états (**figure 1**). Cette photoréduction dépendante de la lumière a été liée à l'activité biologique dans de nombreuses études (**Vaidya et al, 2013 ; Hoang et al, 2008**). Cependant deux paramètres cinétiques, à savoir le rendement quantique et la demi-vie de réoxydation de la FAD^{•-} n'avaient jamais été calculés. Nous avons utilisé le modèle à deux états du DmCRY et des expériences de photoréduction ont été réalisées *in vitro* sur des échantillons protéiques purifiés. Ils ont été illuminés en lumière bleue avec une intensité de lumière croissante pendant 30 secondes en présence de β-mercaptoéthanol à 10mM (**figure 2**). L'apparition de la forme redox a ensuite été visualisée par la diminution de l'absorbance à 450nm, puis une fois l'échantillon laissé à obscurité l'absorbance a de nouveau augmentée pour revenir au spectre d'absorption d'origine de la flavine oxydée. C'est à partir de ces courbes que nous avons pu estimer la demi-vie de réoxydation et le rendement quantique (**formule SI**) d'après des formules déjà utilisées

(Procopio *et al*, 2016). La courbe en figure 2B rapporte la concentration de FADox normalisée à partir des courbes en **figure 2A** en fonction du temps d'obscurité (td) et ce grâce aux équations décrivant le modèle à deux états (**équation S7**). On obtient finalement une valeur de kb de 0.0021s⁻¹ soit une demie vie de réoxydation de 5.5 minutes. Le calcul du rendement quantique a été possible grâce aux spectres d'absorption obtenus pour les **figures 2A et 2B** en utilisant le même modèle cinétique à 2 états déjà utilisé les cryptochromes d'*Arabidopsis* (**formule S1**). La **figure 2D** montre la constante de vitesse k en fonction de l'intensité de lumière bleue, cette relation a pu être établie à partir des spectres d'absorption obtenus en **figure 2C** et de la relation $k = \sigma I$. C'est à partir de cet ajustement linéaire que nous avons pu déterminer la valeur de σ , puis grâce à la relation connue entre ϕ le rendement quantique et σ nous avons pu déterminer que la valeur de ce rendement était de 0.35 (voir figures supplémentaires). Cela signifie concrètement que 35% de la lumière absorbée par le cryptochrome est utilisée pour la photoréduction. Cette valeur de rendement obtenue pour DmCRY est comparable à celle déjà obtenue pour CRY1 et CRY2 d'*Arabidopsis* tout comme la valeur obtenue pour la demi-vie de réoxydation (Procopio *et al*, 2016). Ces données suggèrent qu'il y a un environnement intra protéique stabilisant autour de la flavine pour le DmCRY.

La principale caractéristique de cette photoréduction est de produire de ROS (dont le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène), comme cela a été montré chez *Arabidopsis* (Consentino *et al*, 2015 ; Müller & Ahmad, 2011). Pour déterminer si le même mécanisme a lieu pour DmCRY nous avons illuminé des échantillons protéiques purifiés de DmCRY et nous avons utilisé un test fluorimétrique avec l'Amplex Red qui se convertit en résorufine par réaction avec une molécule d'H₂O₂, la résorufine étant sélective du H₂O₂. Pour analyser la synthèse d'autre ROS plus réactifs comme le superoxyde un deuxième marqueur des ROS a été utilisé : le DCFH-DA qui contrairement à l'Amplex Red a été ajouté aux protéines avant l'illumination. Des aliquotes ont été analysés à différents temps et des expériences utilisant une protéine contrôle : la BSA ont été réalisées dans les mêmes conditions qu'avec le DmCRY (résultats non publiés) et n'ont montré aucune augmentation de la synthèse des ROS après illumination en lumière bleue. En revanche la lumière bleue induit nettement la synthèse des ROS par la protéine DmCRY purifiée (**figure 3A et 3B**).

Pour compléter ces observations nous avons analysé la synthèse des ROS par le DmCRY avec des cellules Sf21 pour vérifier si cette synthèse est biologiquement significative, avec l'aide du DCFH-DA par dosage spectrofluorimétrique. Des cellules contrôles (spa) sont également utilisées (voir méthode). Ces contrôles permettent d'éliminer les autres effets impliquant la synthèse des ROS de façon indépendante de DmCRY comme l'infection virale. Les résultats obtenus montrent que seule l'illumination des cellules surexprimant DmCRY induit une augmentation de la production des ROS

par rapport aux cellules contrôles (**figure 4A**). Cet effet est visible dès 40 μ E et s'amplifie si on augmente l'intensité de la lumière bleue. On peut remarquer qu'à des intensités lumineuses élevées comme 160 μ E la formation des ROS augmente également de façon modeste chez les cellules contrôles, ce qui indique qu'il y a des effets non spécifiques de DmCRY sur le stress cellulaire. Enfin on peut affirmer que ces effets sont lumière bleue dépendants, car ni l'obscurité ni la lumière rouge ne permettent une induction de la synthèse des ROS (**figure 4B**), ce qui est parfaitement compatible avec les mécanismes du photocycle des cryptochromes.

Pour terminer cette série d'études nous avons démontré que l'illumination du DmCRY induisait la formation des ROS au sein du noyau. Ces résultats ont été obtenus en utilisant les mêmes cellules Sf21 et le marqueur DCFH-DA (voir méthode), et montrent une nette production de ROS par les cellules surexprimant DmCRY et uniquement avec la lumière bleue (**figure 5A**). La quantité de ROS détectable à l'apoptome est inférieure et sensiblement identique pour les trois autres conditions, en obscurité pour les cellules CRY et SPA et en lumière pour les cellules SPA. Ces observations confirment donc les résultats préalablement obtenus par dosage, qui impliquent une production de ROS suite à un éclairage en lumière bleue. Pour obtenir des détails plus précis sur la localisation intracellulaire de ces ROS nous avons observé ces mêmes cellules avec DCFH-DA au microscope confocal. Un marquage fluorescent diffus peut être observé dans l'ensemble des cellules y compris dans leurs noyaux. Des structures vésiculaires comme le réticulum endoplasmique montrent un marquage fluorescent intense qui peut être expliqué par le fait que les cellules aient besoin de stocker l'excès de ROS produit avant de le sécréter dans le milieu extracellulaire (**figure 5B**). La localisation de DmCRY dans ces cellules avec ou sans lumière bleue a été rendue possible par immunofluorescence. Et on peut déduire de ces observations que le DmCRY est principalement présent au niveau du cytoplasme en obscurité et qu'il est localisé dans l'ensemble de la cellule après 15 minutes en lumière bleue, et plus particulièrement dans le noyau (**figure 5C**). Ceci indique qu'il y a un transport du DmCRY dans la cellule du cytoplasme vers le noyau suite à une exposition en lumière bleue. Un mécanisme similaire a déjà été mis en évidence pour CRY2 (**Jourdan *et al*, 2015**). En résumé l'ensemble de ces données montrent qu'il y a une colocalisation entre la biosynthèse des ROS et l'expression du DmCRY dans ces cellules, ce qui est compatible avec le fait que le DmCRY synthétise lui-même des ROS.

4. Discussion :

Une des principales questions concernant l'activation de DmCRY concerne la nature des réactions photochimiques impliquées dans certaines fonctions biologiques. L'interconversion redox de DmCRY a été reliée à ses mécanismes de signalisation dans de nombreuses études (**Van Vickle-Chavez et al, 2007 ; Hoang et al, 2008**). Il a été également démontré que la photoréduction de la flavine induite par la lumière permet l'activation du cryptochrome (**Berndt et al, 2007 ; Paulus et al, 2015**) et que ce même changement redox permet l'interaction avec des partenaires protéiques même en l'absence de lumière (**Vaidya et al, 2013**), bien que certaines controverses concernant ces mécanismes soient apparues (**Ozturk et al, 2008 ; Ozturk et al, 2011 ; Ozturk et al, 2014**). Celles-ci contestant que l'état semi-réduit de la flavine soit nécessaire à l'activité du DmCRY. En effet des cryptochromes mutés pour un des trois tryptophanes sont incapables de transférer les électrons jusqu'à la flavine et gardent toujours une activité *in vivo*. Or il apparaît que des voies alternatives aux tryptophanes pour le transfert des électrons soient utilisables au sein du DmCRY (**Engelhard et al, 2014 ; El-Esawi et al, 2015**), ce qui explique les résultats contradictoires obtenus. De plus l'intensité de lumière bleue utilisée au cours de ces expériences était bien au-dessus du seuil de saturation pour l'activation de DmCRY, de sorte que la réponse différentielle n'a pas été prise en compte. Malgré cela la corrélation entre l'interconversion redox de la flavine et l'activation de DmCRY par changement conformationnel permettant la signalisation a été récemment rigoureusement démontrée (**Lin et al, 2018**). C'est notamment pour cette raison que nos études tentent d'établir un nouveau lien entre la photoréduction de la flavine et la signalisation du DmCRY notamment par la synthèse des ROS. Il faut cependant rappeler dans ce contexte que les phénotypes observés qui sont induits par DmCRY dépendent de l'intensité de lumière utilisée, bien que la sensibilité de DmCRY à la lumière soit toujours identique. Par exemple l'induction de la protéolyse de DmCRY dans les neurones où il s'exprime nécessite une intensité lumineuse beaucoup plus élevée que la simple régulation circadienne au niveau des cellules de l'horloge. Une telle variabilité est caractéristique des réactions de signalisation biologique grâce entre autre à des partenaires situés bien en aval par rapport au récepteur. Le rendement quantique de 0.35 que nous avons obtenu se situe bien dans la gamme des molécules de signalisation et est comparable à celui de CRY2 ou des phototropines (**Procopio et al, 2016 ; Kasahara et al, 2002**). Le fait que la réduction de la flavine est efficace à faible intensité lumineuse (**figure 2**), ainsi que sa demi-vie d'activation est relativement longue (5.5 minutes) est compatible avec un rôle de signalisation *in vivo*. Des expériences de protéolyse ont montré qu'un éclairage d'une durée inférieure à une milliseconde est suffisant pour induire l'activation du cryptochrome, qui n'est cependant mesurable que pendant les minutes suivantes (**Ozturk et al, 2008**). La signalisation par le domaine C-terminal de

DmCRY s'exerce donc pendant plusieurs minutes pour chacune des protéines au à partir du début de la période d'obscurité. Nos résultats ne concernant que la protéine pure, d'autres études suggèrent que la demi-vie *in vivo* de DmCRY pourrait atteindre 15 minutes (**Ozturk et al, 2011**).

Une autre découverte majeure que nous apportons dans nos études est que les ROS se forment durant la photoactivation de DmCRY, grâce au transfert d'un électron de la FAD•- à une molécule de dioxygène pour finalement former une molécule d' H₂O₂ (**voir schéma réactionnel S1**). La dismutation du superoxyde étant facilitée à pH 7.4 par les groupements hydroperoxyde HO₂- conduit aux produits finaux : O₂ et H₂O₂. A chaque fois que la flavine est réduite à la lumière il y a une molécule de H₂O₂ formée pendant l'étape de réoxydation. La vitesse de cette réoxydation (kb de la figure 1) reste la même, que l'on soit en conditions d'éclairage ou en obscurité. Ainsi l'illumination de DmCRY devrait aboutir à une relation proportionnelle entre la concentration en protéine, le temps d'éclairage, la quantité de ROS produite et l'intensité de l'éclairage avant qu'elle ne devienne saturante. En accord avec cette hypothèse, la synthèse d'H₂O₂ augmente de façon linéaire pendant une durée de 30 minutes (**figure 3A**) et reste proportionnelle à l'intensité de l'éclairage jusqu'à 160μE *in vivo* (**figure 4A**). Le DCFH-DA qui détecte également O₂•- a montré une augmentation linéaire en fonction du temps de la quantité de ROS synthétisée par DmCRY (**figure 3B**). Parallèlement à cela la formation des ROS observée dans les cellules Sf21 après illumination devrait avoir lieu y compris avec une concentration en DmCRY biologique, soit bien inférieure à celle observée dans ce modèle de surexpression protéique. L'ensemble de ces résultats combinés avec ceux déjà obtenus par spectroscopie RPE (**Procopio et al, 2016**) indiquent que les cycles de photoréduction / réoxydation de la flavine se produisent *in vivo* en réponse à une illumination continue de DmCRY en conditions physiologiques. Pour que ce mécanisme ait lieu, la flavine doit passer de l'état semi-réduit à l'état oxydé en obscurité, ce qui infirme certaines controverses concernant l'état redox de la flavine lorsque le cryptochrome est actif (**Ozturk et al, 2008 ; Ozturk et al, 2014**).

Finalement nos résultats démontrent la possibilité que cette synthèse enzymatique des ROS puisse contribuer au rôle de signalisation de DmCRY. Le changement conformationnel subit par DmCRY se produit bien avant la réaction qui conduit à la formation des ROS. Il est donc difficile de séparer les effets sur la cellule uniquement dus au changement conformationnel en C-terminal et ceux qui découlent seulement de la formation des ROS par la partie N-terminale. Néanmoins les ROS sont en soi des régulateurs essentiels du stress cellulaire et du vieillissement à travers les lignées phylogénétiques (**Fanjul-Moles ML, 2013**). Une récente étude chez la drosophile indique que la restauration de l'amplitude d'expression journalière de certains composants de l'horloge circadienne due à la surexpression de DmCRY diminue la sensibilité au stress oxydant et augmente la longévité

(**Rakshit & Giebultowicz, 2013**). En accord avec ces études, de nouvelles réponses récemment découvertes et induites par DmCRY impliquent des gènes participant à la réponse aux stress et à la signalisation ROS (**Vieira *et al*, 2012**). Il n'est par ailleurs pas exclu que certains de ces effets soient dus à des régulations redox de certains facteurs de transcription qui pourraient être également sensibles aux ROS synthétisés directement par DmCRY. Une étude a révélé que certains canaux potassiques dont l'ouverture est modulée par les équilibres redox sont également régulés par les cryptochromes chez la drosophile (**Fogle *et al*, 2015**). Ces études suggèrent finalement que la signalisation ROS des cryptochromes puisse impliquer l'activation ou l'inhibition de nombreux substrats cytosoliques ou nucléaires sensibles à l'état redox de la cellule.

Ma contribution à cet article :

- Expériences *in vitro* concernant les protéines purifiées.
- Expériences utilisant les cellules Sf21 pour les dosages spectrofluorimétriques.
- Observations à l'apoptome.
- Spectres d'absorption obtenus à partir des protéines purifiées.
- Observations au microscope confocal pour la détection des ROS mais,

RESEARCH ARTICLE

Blue-light induced accumulation of reactive oxygen species is a consequence of the *Drosophila* cryptochrome photocycle

Louis-David Arthaut^{1,2}, Nathalie Jourdan¹, Ali Mteyrek³, Maria Procopio^{1,4}, Mohamed El-Esawi^{1,5}, Alain d'Harlingue¹, Pierre-Etienne Bouchet¹, Jacques Witczak¹, Thorsten Ritz⁴, André Klarsfeld³, Serge Birman³, Robert J. Usselman⁶, Ute Hoecker⁷, Carlos F. Martino², Margaret Ahmad^{1,8*}

1 UMR CNRS 8256 (B2A), IBPS, Université Paris VI, Paris, France, **2** Department of Biomedical Engineering, Florida Institute of Technology, Melbourne, Florida, United States of America, **3** GCRN team, Brain Plasticity Unit, UMR 8249 CNRS/ESPCI Paris, PSL Research University, Paris, France, **4** Department of Physics and Astronomy, University of California, Irvine, California, United States of America, **5** Botany Department, Faculty of Science, Tanta University, Tanta, Egypt, **6** Department of Chemistry and Biochemistry, Montana State University, Bozeman, Montana, United States of America, **7** Botanical Institute and Cluster of Excellence on Plant Sciences (CEPLAS), BioCenter, University of Cologne, Cologne, Germany, **8** Department of Biology, Xavier University, Cincinnati, Ohio, United States of America

* margaret.ahmad@upmc.fr



OPEN ACCESS

Citation: Arthaut L-D, Jourdan N, Mteyrek A, Procopio M, El-Esawi M, d'Harlingue A, et al. (2017) Blue-light induced accumulation of reactive oxygen species is a consequence of the *Drosophila* cryptochrome photocycle. PLoS ONE 12(3): e0171836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171836>

Editor: Ilija Solov'yov, Syddansk Universitet, DENMARK

Received: September 2, 2016

Accepted: January 26, 2017

Published: March 15, 2017

Copyright: © 2017 Arthaut et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Data are contained in main paper and supporting information.

Funding: This work was supported by Air Force Office of Sponsored Research, FA9550-14-0-0409 (to MA, TR, CFM).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Cryptochromes are evolutionarily conserved blue-light absorbing flavoproteins which participate in many important cellular processes including in entrainment of the circadian clock in plants, *Drosophila* and humans. *Drosophila melanogaster* cryptochrome (DmCry) absorbs light through a flavin (FAD) cofactor that undergoes photoreduction to the anionic radical (FAD^{•-}) redox state both *in vitro* and *in vivo*. However, recent efforts to link this photoconversion to the initiation of a biological response have remained controversial. Here, we show by kinetic modeling of the DmCry photocycle that the fluence dependence, quantum yield, and half-life of flavin redox state interconversion are consistent with the anionic radical (FAD^{•-}) as the signaling state *in vivo*. We show by fluorescence detection techniques that illumination of purified DmCry results in enzymatic conversion of molecular oxygen (O₂) to reactive oxygen species (ROS). We extend these observations in living cells to demonstrate transient formation of superoxide (O₂^{•-}), and accumulation of hydrogen peroxide (H₂O₂) in the nucleus of insect cell cultures upon DmCry illumination. These results define the kinetic parameters of the *Drosophila* cryptochrome photocycle and support light-driven electron transfer to the flavin in DmCry signaling. They furthermore raise the intriguing possibility that light-dependent formation of ROS as a byproduct of the cryptochrome photocycle may contribute to its signaling role.

Introduction

Cryptochromes are a family of blue-UV/A light absorbing flavoprotein receptors found throughout the biological kingdom [1–3]. They are implicated in the regulation of growth and development in plants, and in the entrainment of the circadian clock in animals [4, 5]. A well-established biological function of *Drosophila* cryptochrome (DmCry) is to contribute towards setting the circadian clock in response to light [6]. It does so by binding to the *Drosophila* core clock protein Timeless (Tim) and the E3 ubiquitin ligase Jetlag in the presence of blue light. As a result, Tim is degraded and can no longer participate in its natural feedback loop involving interaction with the transcriptional activator complex Clock:Cycle (Clk:Cyc) [7]. In this way, the 24-hour internal oscillation is disturbed, and may even be completely stopped in constant light. DmCry has more recently been shown to have other functions independent of its role in the circadian clock, including direct light sensing in neurons [8] and response to stress [9].

The current paradigm for DmCry signaling is that DmCry undergoes a light-dependent conformational change which exposes binding sites for partner proteins such as Tim and Jetlag to initiate the signaling reaction. Crystal structure of full-length DmCry shows that a small (30aa) C-terminal extension is folded against an N-terminal light sensing domain, in the pocket close to the flavin cofactor [10, 11]. When this C-terminal extension is deleted, the partner proteins bind constitutively to the N-terminal domain of DmCry and therefore the response becomes constitutive. These observations indicate that the C-terminal domain of DmCry is released from the protein surface upon illumination, allowing partner proteins access to the N-terminal domain in a light-dependent manner [6, 7]. A similar paradigm involving light-initiated conformational change appears to hold for cryptochrome responses in other systems [1–5].

The current challenge in the field is to define the nature of the photochemical reaction which gives rise to the conformational change initiating the signaling response. Like all cryptochromes, DmCry binds a light-sensing FAD cofactor within a hydrophobic pocket adjacent to the C-terminal domain of the protein [10,11]. The flavin redox state is in the oxidized form in the purified protein when maintained in the dark. Illumination results in photoreduction to the anionic FAD⁻ redox state [12–14]. These redox state transitions have been shown to accompany a light-induced conformational change and initiate biological signaling both *in vitro* [15] and *in vivo* [16]. Therefore, the anionic flavin semiquinone redox state was proposed as the active signaling conformation [15, 16].

Controversy involving this mechanism revolved around the observation that mutants involved in electron transfer to the flavin in DmCry which fail to photoreduce *in vitro* nonetheless retained biological activity *in vivo* [13, 17]. This was taken as evidence that formation of the anionic radical (FAD⁻) redox state is not required for biological signaling. However, this apparent contradiction is resolved by the demonstration that mutants which fail to undergo photoreduction *in vitro* are nonetheless photoreduced *in vivo* [16, 18, 19], indicating that formation of the anionic radical redox state occurs by alternate electron transfer routes and therefore can initiate signaling. Further controversy has arisen on apparent methodological grounds [compare e.g. 15, 20], and on whether redox changes could explain the light sensitivity of DmCry responses and half-life of the signaling states *in vitro* [13, 17]. This has prompted the suggestion of a mechanism of DmCry activation where the anionic radical (FAD⁻) instead of oxidized FAD, may be the light-absorbing species, which undergoes some unspecified photoreaction [17, 20].

Recently, it has been shown that plant cryptochromes produce reactive oxygen species (ROS) as a result of illumination [21,22]. This follows from observations *in vitro* that a consequence of the *Arabidopsis* cryptochrome flavin redox cycle is the formation of ROS and

hydrogen peroxide (H_2O_2) in isolated proteins [23,24]. Specifically, *Arabidopsis cry1* and *cry2* both undergo flavin reduction from FAD_{ox} to a mixture of radical ($FADH^\bullet$) and reduced ($FADH^-$) redox states as a consequence of illumination. Upon return to darkness, these proteins are reoxidized to the FAD_{ox} redox state by a process that releases superoxide and hydrogen peroxide both *in vitro* [23] and *in vivo* [21,22]. ROS accumulation occurs in the nucleus where cryptochromes are localized, in contrast to mitochondrial and cytoplasmic compartments which produce ROS via metabolic enzymes.

To help resolve existing controversies concerning DmCry activation and also to provide novel insights into the oxidative signaling mechanism of DmCry, we have here re-examined the DmCry photocycle of flavin reduction/reoxidation in detail by a kinetic modeling approach. This allowed us to calculate the quantum efficiency of photon absorption and show that this reaction has the light sensitivity to serve a signaling role. We further determined the half-life of the presumed signaling state (FAD^\bullet) *in vitro* and show that it is consistent with published estimates of the lifetime of the signaling state of DmCry *in vivo* [17, 20]. Finally, we have added a new dimension to the DmCry signaling paradigm by demonstrating the formation and accumulation of intracellular ROS as a result of illumination. These results suggest the possibility that direct enzymatic production of ROS by cryptochrome may represent an alternate oxidative signaling mechanism that may be conserved across phylogenetic lines.

Materials and methods

Protein samples and photoreduction experiments

These methods were used for results presented in Figs 1, 2 and 3. The full-length *Drosophila* cryptochrome cDNA sequence was cloned into the pAChLT-A baculovirus transfer vector (BD Biosciences, San Jose, Ca.) in-frame with the N-terminal 6-His tag. The DmCry protein was expressed in Sf21 insect cell cultures by established methods and purified over an NTA nickel affinity column as previously described [25]. Photoreduction experiments were performed at 21°C in a buffer of 50mM phosphate, pH 7.5 and 10mM β -mercaptoethanol. A control expression construct (Spa1) consisted of the full-length SPA1 cDNA [26] cloned into the pDEST10 baculovirus transfer vector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma.) and introduced for expression in Sf21 insect cells. Spa1 was chosen as it is involved in light signaling in plants but has no photoactive pigment and is not directly responsive to light [27].

Kinetic analysis

Kinetic analysis and numerical methods for determination of quantum efficiency and half-life were performed as described previously [28] using optical spectra from isolated DmCry. Details of the present analysis are included in the Supplementary Material (S1 Text).

Detection of ROS in purified protein samples

For determination of ROS, DmCry protein at a concentration of 30 μM in PBS at pH 7.4 and in the absence of added reducing agent was illuminated with blue light (3000 $\mu mol m^{-2} sec^{-1}$) for 30 minutes at 0°C. Aliquots were taken at the indicated times and frozen into liquid nitrogen prior to ROS determination. *H₂O₂ detection*: 3 μl of protein sample was diluted into 0.3 ml of 50 mM of sodium phosphate buffer at pH 7.4 and adjusted to a final concentration of 10 μM Amplex UltraRED (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma.) and 0.2 U of horse radish peroxidase (Sigma Aldrich, St Louis, Mo. USA). After 30 minutes of incubation time in the dark, fluorescence was read in triplicate from each sample (100 μl volume for each reading) in 96 well plates with a Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Varian) at absorption

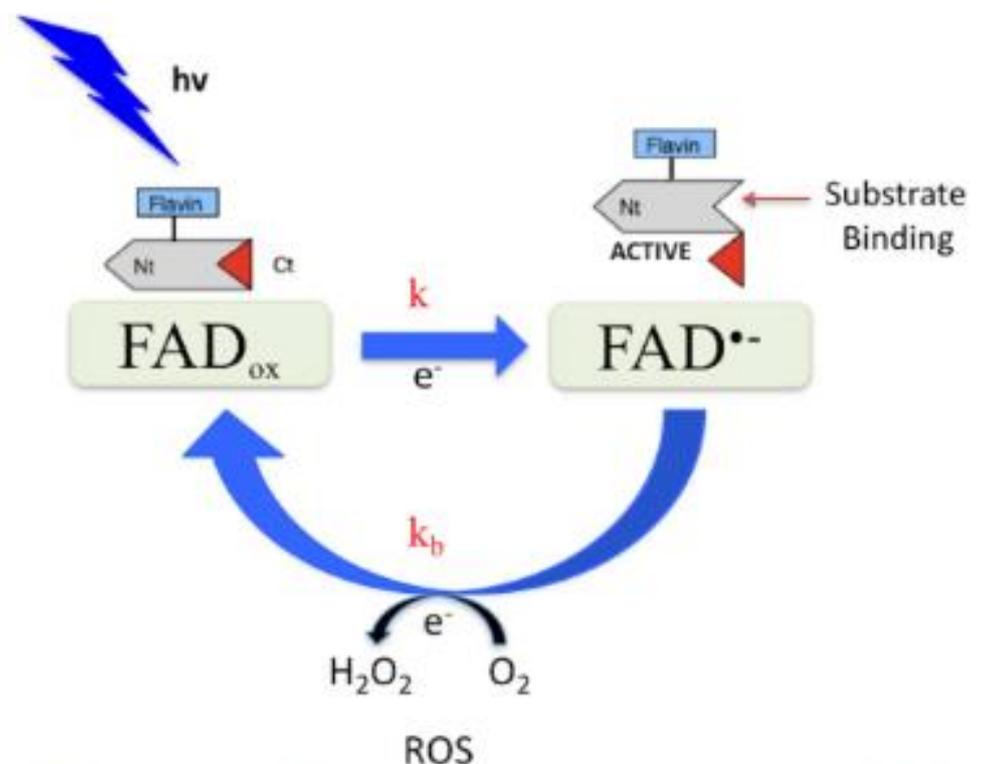


Fig 1. Possible *Drosophila* cryptochrome photocycle. In the dark, the protein-bound cofactor (FAD_{ox}) is shown in the oxidized redox state. Light absorption triggers flavin photoreduction [12–14] at a rate constant k . Reoxidation to the FAD_{ox} state occurs spontaneously in the dark at a rate constant k_b . Possible changes in C-terminal conformation linked to redox state interconversion are diagrammed [15].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171836.g001>

560 nm, emission 590 nm. Fluorescence units were converted to concentration of H₂O₂ by a standard curve of concentration vs. fluorescence units as described previously [21]. The H₂O₂ concentration displayed on the Y-axis of the graphical representation refers to the total concentration of H₂O₂ in the undiluted protein sample. *ROS detection using dichlorofluorescein fluorescent substrate:* Transient formation of ROS was monitored by addition of 1 mM CM-H₂DCFDA (5,6-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Molecular Probes, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) to the protein samples immediately prior to illumination. In the text, we have abbreviated the name of this reagent to DCFH-DA. The fluorescence was read in triplicate from each sample (100 μ l undiluted sample volume for each reading) in 96 well plates with a Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Varian) at excitation/emission of 490/530nm.

Detection of ROS in Sf21 insect cell culture

Insect cells expressing either DmCry or Spa1 expression constructs were harvested 72 hours post-infection and resuspended in PBS buffer (50 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl buffer pH 7.4) at a final concentration of 2×10^5 cells/ml. DCFH-DA was then added to a final concentration of 1 mM prior to illumination at 22°C for the indicated times and light qualities (Fig 4). Illumination was in 24-well microtitre plates placed directly under the light source for 10 minutes, with 1 ml cell cultures per well. Subsequent to illumination, cells were harvested, washed twice in PBS, then lysed in a final volume of 0.5 ml PBS with the addition of 0.1%

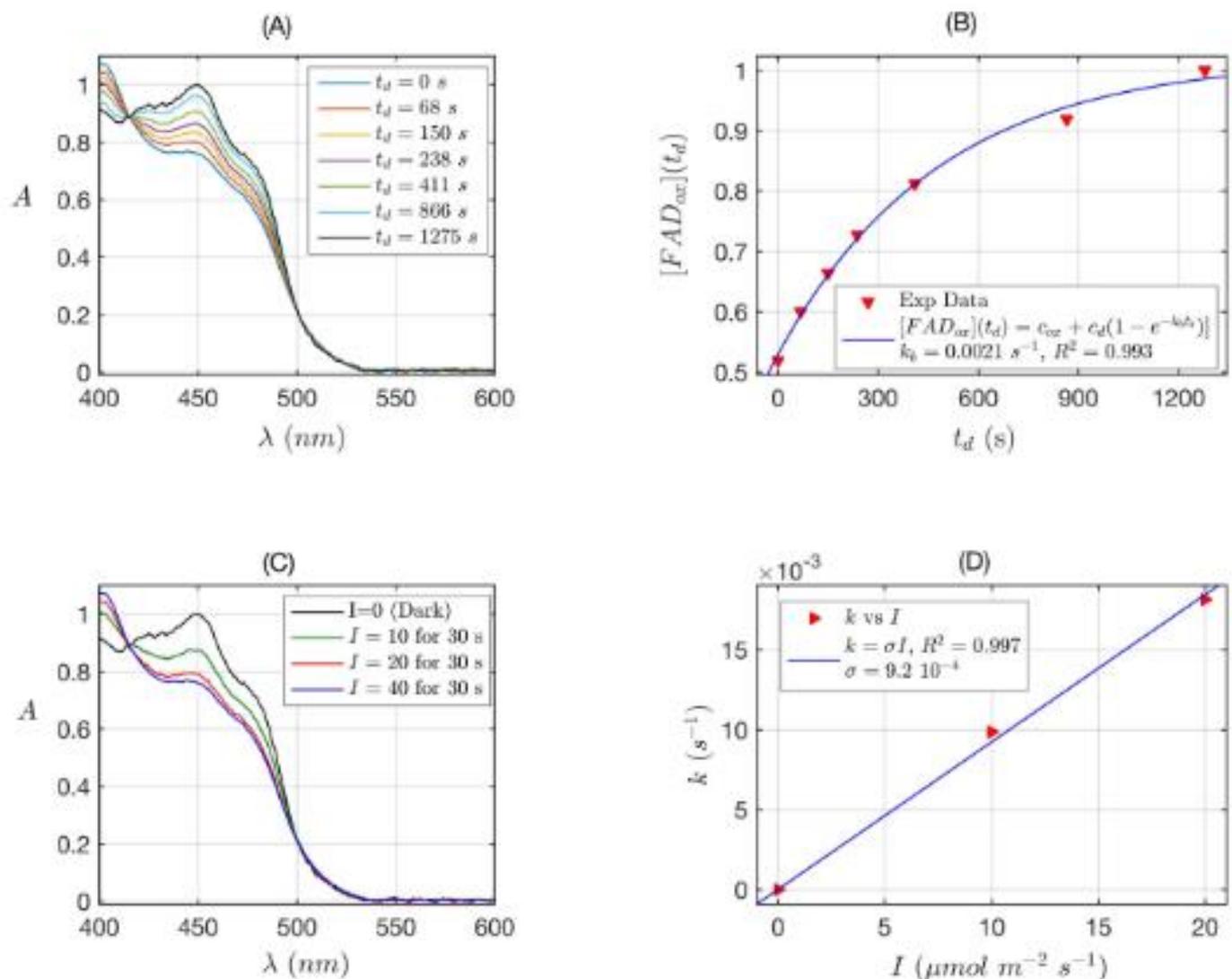


Fig 2. Rate constants and quantum yield for two-state reduction and reoxidation of DmCry. (A) Isolated purified DmCry protein was illuminated for 30 s at $I = 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ blue light and placed in darkness ($t_d = 0 \text{ s}$). Normalized absorption spectra are reported at increasing dark reoxidation times t_d . (B) Normalized concentration of FAD_{ox} as a function of the dark reoxidation time t_d . The FAD_{ox} concentration was obtained from the absorbance at 450 nm from panel A according to Eq. S7 (see S1 Text). The red triangles represent the experimental data, and the blue curve is the fit of the experimental data with the two-states reoxidation model (Eq. S8). From the fit the reoxidation rate resulted $k_0 = 0.0021 \text{ s}^{-1}$, (half-life of $\tau_{1/2} = 5.5 \text{ min}$). The goodness of the fit was excellent ($R^2 \approx 1$). (C) Isolated purified DmCry protein was illuminated for 30 s at the indicated blue light fluence rates I . Normalized absorption spectra are presented. (D) Calculated forward rate constant k versus photon fluence rate I (red triangles). For each I , the rate constant k was calculated by numerically solving the two-states kinetic equations (see S1 Text, Eq. S1), with the concentration of FAD_{ox} , obtained from panel C and reoxidation k_0 obtained from panel B. We fit k as function of I by using the linear equation $k = \sigma I$. The fit is reported as blue curve in Fig 2. From the fit the photo-conversion cross section was $\sigma = 9.2 \times 10^{-4} \mu\text{mol}^{-1} \text{ m}^2$. From σ the quantum yield ϕ was calculated according to $\sigma = 2.3 \epsilon_{ox}(450) \phi$, by using the experimentally calculated extinction coefficient $\epsilon_{ox}(450) = 1130 \text{ mol}^{-1} \text{ m}^2$ ($11300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The quantum yield resulted $\phi = 0.35$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171836.g002>

Triton X-100. 80 μl aliquots of the whole cell lysate were transferred to individual wells of a 96 well microtitre plates and measured at excitation/emission of 490/530 nm.

Immunofluorescence labelling of DmCry

Sf21 cells incubated during 2 hours on glass coverslips were exposed to dark or blue light for 15 min and fixed with 2% paraformaldehyde for 10 min at room temperature (RT),

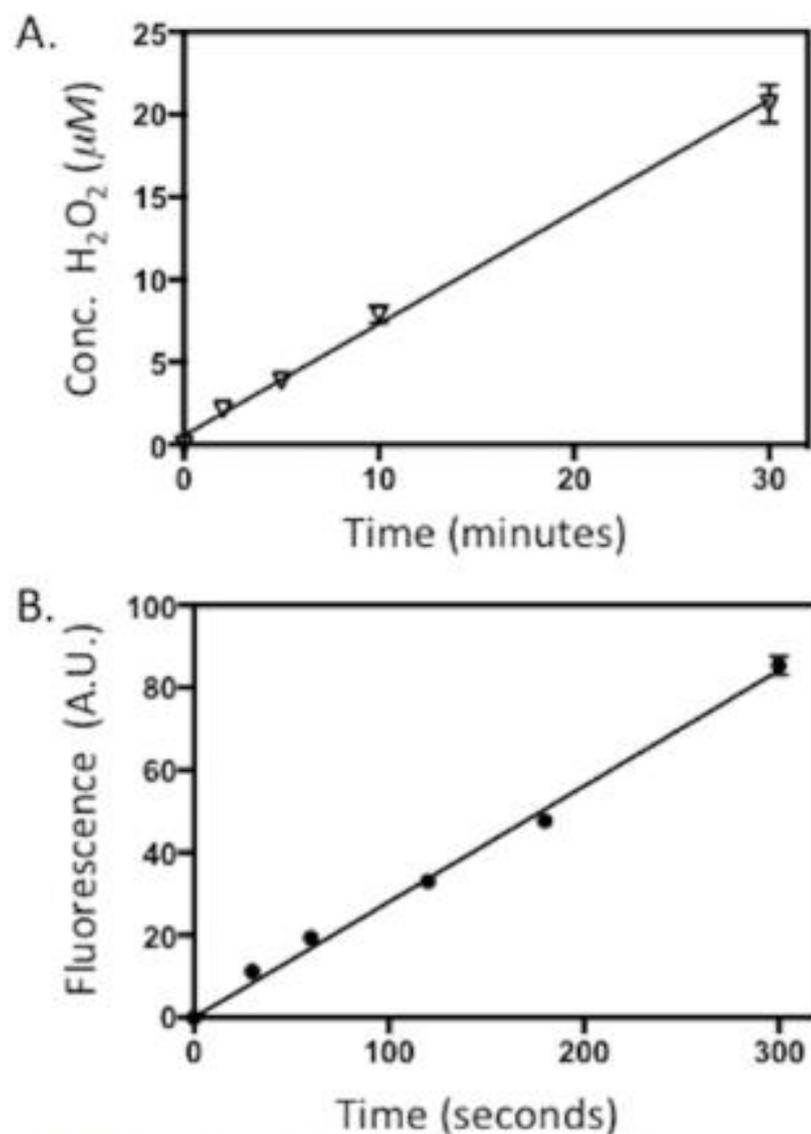


Fig 3. Formation of ROS by purified *Drosophila* Cryptochrome (DmCry). 30 μM DmCry protein was illuminated at saturating blue light intensity for the indicated times on ice. A. The concentration of H_2O_2 released in the sample after illumination was determined by the Amplex Red fluorescence detection (see Methods). B. ROS formation in the course of illumination assayed by DCFH-DA fluorescence (ex: 490/em: 530) (see Methods). Error is SD of three measurements.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171836.g003>

permeabilized with 0.1% Triton X-100 and then incubated with an anti-DmCry rabbit polyclonal antibody [28] [16] and an Alexa 488-conjugated anti-rabbit secondary antibody. Coverslips were mounted in Fluoroshield with DAPI (4', 6'-diamino-2-phenylindole) and viewed by a Leica upright SP5 confocal microscope with a 63X objective. DAPI and Alexa 488 were, respectively, excited at a 405 and 488 nm wavelengths, and the Emission fluorescence intensities and DIC were detected by using a photomultiplier between 498 and 561 nm, and a transmission photomultiplier, respectively. Two channels were recorded sequentially at each z-step. Z series projections and merge images were performed using ImageJ software

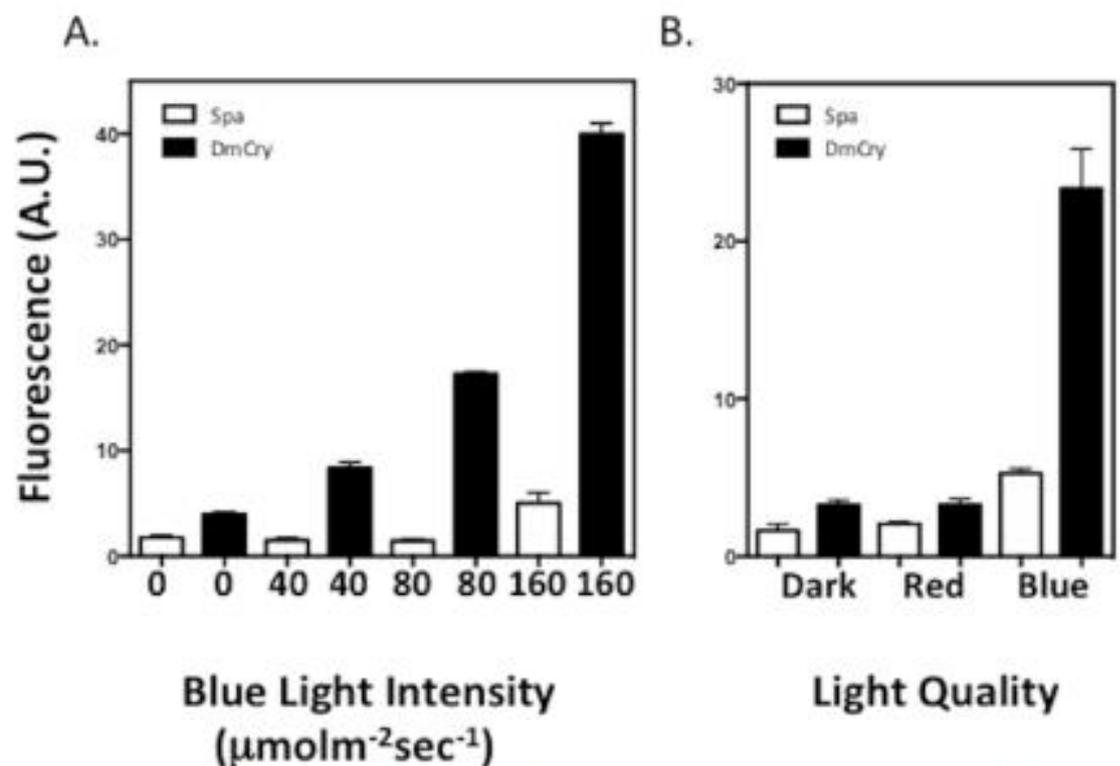


Fig 4. Induction of ROS in insect cell culture expressing DmCry. A. Living insect cell cultures expressing either DmCry or a SPA1 control construct were treated with the fluorescent substrate DCFH-DA and then exposed to the indicated blue light intensity for 10 min. Subsequently to illumination, DmCry expressing and control cell cultures were harvested, lysed, and evaluated by fluorescence spectroscopy for the formation of ROS (see Methods). B. Cells exposed to dark, red, or blue light. Error bars represent SD of three measurements.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171836.g004>

(W. S. Rasband, ImageJ [U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij>, 1997–2009]).

Intracellular localization of ROS

Sf21 living cells expressing DmCry or the control SPA1 construct were washed 2 times in PBS (pH 7.4) and incubated in PBS containing 58 μM DCFH-DA (Molecular Probes, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) for 10 min in the dark, then exposed to blue light during 5 min and observed immediately either between glass and coverslips with a Zeiss AxioImager.Z1/ApoTome microscope or in an observation chamber with an inverted Leica TCS SP5 microscope. Green fluorescence from DCFH-DA was excited at 488 nm. Zeiss AxioImager.Z1/ApoTome observations were done by using a 10X objective. Emission fluorescence intensities were detected by using the Zeiss filter set 38 Endow GFP shift free; EX BP 470/40, BS FT 495, EM BP 525/50 and differential interference contrast (DIC) with an Analy DIC TransLight. The images were digitally captured with a CCD-camera (AxioCam MRm) using the software Axiovision (version 4.7.2, Carl Zeiss).

Inverted Leica TCS SP5 microscope observations were done by using a 40x objective. Emission fluorescence intensities were detected by using a photomultiplier between 498 and 561 nm and DIC by using a transmission photomultiplier. Z series projections were performed using ImageJ software (W. S. Rasband, ImageJ).

Results

Kinetic modeling of the *Drosophila* cryptochrome photocycle

Purified preparations of DmCry protein have been shown to undergo a photoreduction reaction *in vitro* [12–14]. This involves transition from the FAD cofactor bound in the oxidized redox state (FAD_{ox}) to the anionic radical ($\text{FAD}^{\cdot-}$). Upon return to darkness, the flavin spontaneously re-oxidizes in the presence of molecular oxygen to restore the resting (FAD_{ox}) state, giving rise to a continuous photocycle under constant illumination (Fig 1). Therefore, the concentration of the $\text{FAD}^{\cdot-}$ flavin radical redox state depends on the rate constants k and k_b , according to the two-states kinetic model (see S1 Text in Supplementary Material). This light-dependent redox reaction has been linked to biological activity in a number of studies [15, 16]. However, the kinetic parameters of the reaction (light sensitivity, lifetime of redox state intermediates, and quantum yield) have yet to be rigorously established.

We therefore first derived a two-states kinetic model of the DmCry photocycle. Photoreduction experiments were performed by illuminating purified DmCry protein samples at increasing intensities (photon fluences I) of blue light for 30 seconds in the presence of a mild reductant (10 mM β -mercaptoethanol) (Fig 2). Flavine reduction to the anionic radical ($\text{FAD}^{\cdot-}$) redox form could then be observed by spectral decrease at 450 nm.

We have estimated the dark reoxidation rate k_b (dark reversion time) for reoxidation of flavin from the $\text{FAD}^{\cdot-}$ back to FAD_{ox} . For this experiment, DmCry protein samples were illuminated at maximum light intensity and then returned to darkness. Spectra were taken at defined dark intervals t_d (Fig 2A). From these data it was possible to estimate the reoxidation half-life (see [28] and S1 Text). Fig 2B reports (red triangles) the normalized FAD_{ox} concentration calculated from panel (A) as a function of the dark time t_d , and (blue curve) the fit of the data with the two-states dark reoxidation model equation reported in the legend (Eq. S7). The dark reoxidation rate resulted $k_b = 0.0021 \text{ s}^{-1}$, which gives a half-life of $\tau_{1/2} = 5.5$ minutes.

Calculation of the quantum yield for flavin reduction was performed using the data obtained from spectra reported in Fig 2A and 2B. A two-state kinetic model was used as described previously for *Arabidopsis cry* [28]—see also detailed description of the methods in S1 Text. Fig 2D shows (red triangles) the forward rate constant k as a function of the blue light intensity (fluence rate) I used in panel (C), and (blue curve) the linear fit $k = \sigma I$ of the data. From the linear fit we estimated a photoconversion cross section of $\sigma = 9.2 \cdot 10^{-4}$ (in $\mu\text{mol}^{-1} \text{ m}^2$ units), which allowed us to calculate a quantum yield of $\phi = 0.35$ by using an estimated molar extinction coefficient of $\epsilon_{\text{ox}}(450) = 11300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [29] (for details of calculations see [28] and S1 Text).

The quantum yield for flavin reduction of 0.35 is well within the range for biological signaling molecules and comparable with that reported for *Arabidopsis cry2* of 0.19 [28]. The half-life of the $\text{FAD}^{\cdot-}$ redox state is also comparable to that of *Arabidopsis cry1* and *cry2*, where photoreduction leads to formation of the neutral radical (FADH^{\cdot}) redox state [28]. DmCry by contrast forms the charged anionic radical ($\text{FAD}^{\cdot-}$) both *in vitro* or *in vivo* [14, 16]. These data suggest a significant stabilizing effect of the intraprotein environment on the flavin radical in DmCry.

DmCry illumination induces the formation of ROS

One of the characteristics of flavin reoxidation from the radical (FADH^{\cdot}) or reduced (FADH^2) to the oxidized (FAD_{ox}) redox state in plant cryptochromes is the transient formation of ROS, producing superoxide and hydrogen peroxide (H_2O_2) [21–23]. To determine whether DmCry activation likewise induces the formation of ROS, we have illuminated isolated

samples of DmCry and tested for the production of H_2O_2 using a resorufin fluorometric assay. (see *Methods*). The resorufin fluorescence detection is a selective measurement of H_2O_2 , which is a secondary byproduct of possible superoxide ($O_2^{\cdot -}$) or other radical formation [23]. Aliquots of DmCry were removed at the indicated times and the concentration of H_2O_2 determined (Fig 3A). The concentration of H_2O_2 increased in a linear fashion over a time period of 30 min (Fig 3A).

To directly assay for short-lived ROS such as $O_2^{\cdot -}$ or other intermediate ROS, we further analysed the protein samples with a general indicator of ROS formation, the fluorescent probe DCFH-DA [30]. In this assay, the fluorescence substrate DCFH-DA was added to the protein immediately prior to illumination (Fig 3B). Aliquots were analysed at the given time points for fluorescence resulting from the formation of ROS. Illumination indeed caused a linear increase over time in signal for DmCry (Fig 3B), whereas control protein samples at the same concentration such as BSA showed no increase (not shown). We conclude the signal is due largely to the production of ROS as a result of DmCry flavin reoxidation.

DmCry illumination induces the formation of ROS in living cells

To determine that DmCry illumination also leads to the induction of ROS in living cells we analysed Sf21 insect cell cultures expressing recombinant DmCry from baculovirus expression constructs. For this assay, the fluorescent substrate DCFH-DA was added to the cell incubation medium prior to illumination (see *Methods*). As a negative control, we used Sf21 insect cells expressing a different construct lacking photoactive pigments, namely SPA1 (Suppressor of Phy A), a plant protein that is implicated in light responsiveness in plants but is not photochemically active [26, 27]. This control was used to correct for possible non-specific effects on ROS induction, since viral infection and recombinant protein expression could of themselves initiate stress response that is unrelated to DmCry activation.

The results showed that illumination of DmCry expressing cell cultures induced a clear increase in ROS production compared to control cell cultures (Fig 4A). This effect was observable already as low as $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ blue light, and increased with increasing illumination (Fig 4A). At very high light intensities ($160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) ROS formation also increased modestly in the negative control cell (SPA1 expressing) cultures, indicating non-specific effects of blue light illumination on cellular stress. Induction of ROS was not observed in darkness or red light (Fig 4b), consistent with a requirement for activation of cryptochrome.

DmCry illumination induces formation of ROS in the nucleus

Information on the localization of ROS was obtained through staining of DmCry expressing cell cultures with DCFH-DA during illumination (see *Methods*). After 10 minutes blue light illumination, DmCry expressing cells showed a significant increase in fluorescence as compared to control cells (expressing the SPA1 construct) in blue light, but not in darkness (Fig 5A). This validates our biochemical data (Fig 4) and confirms that rapid ROS induction is a consequence of DmCry illumination *in vivo*. To obtain details of intracellular localization, confocal microscopy was used after blue light exposure (Fig 5B). Diffuse fluorescence could be seen throughout the cell but was also localized within the nuclear compartment. Particularly pronounced vesicular structures are likely endoplasmic reticulum surrounding the nucleus, and may arise as a consequence of the cell's attempts to remove excess ROS by secretion into the extracellular medium.

To obtain information concerning the localization of DmCry, we performed immunostaining with anti-DmCry antibody. In dark-adapted cells, staining can be seen primarily in the cytosol and is largely absent in the nucleus (Fig 5C), consistent with DmCry localization in the

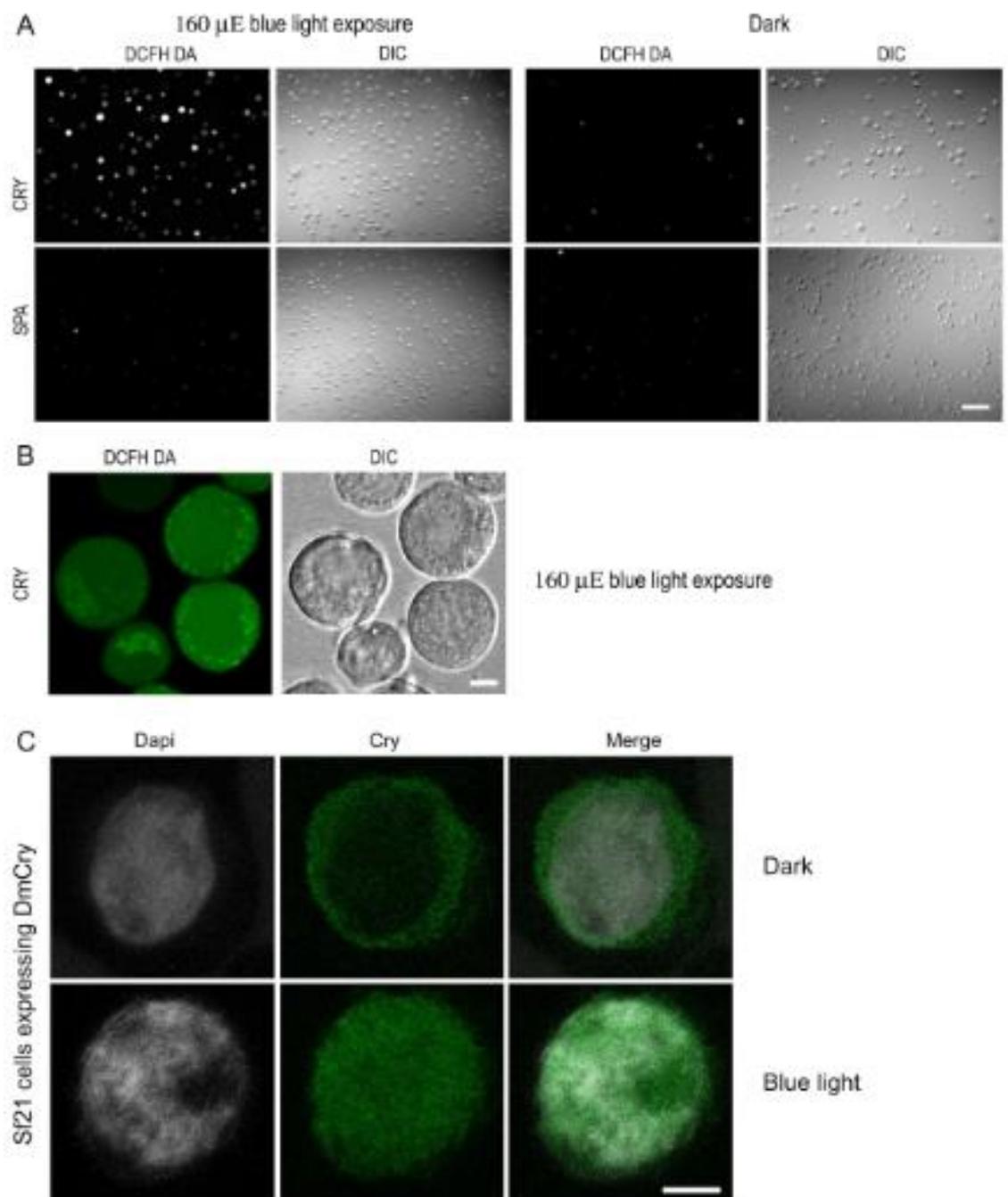


Fig 5. Subcellular localization of ROS and DmCRY in Sf21 insect cells exposed to blue light. Living Sf21 cells stably expressing DmCRY were treated with DCFH-DA, exposed to dark or blue light and viewed by **(A)** a Zeiss AxioImager.Z1/ ApoTome using a 10x objective (bar 100 μ m) **(B)** an inverted Leica TCS SP5 microscope. Images show single confocal z section that cross the nucleus. Diffused fluorescent ROS staining can be seen in nucleus and cytoplasm. Punctuate and intense fluorescent ROS staining also colocalizes perfectly with ER (endoplasmic reticulum) surrounding the nucleus. Scale bar: 10 μ m. **(C)** Sf21 stably expressing DmCry were fixed with paraformaldehyde, permeabilized with Triton X100, incubated with an anti-DmCry1 rabbit polyclonal antibody and an Alexa 488-conjugated anti-rabbit secondary antibody. DNA were stained with 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI). Cells were observed with a Leica TCS SP5 confocal microscope. Images show projections of optical sections that cross the nucleus. Scale bar, 10 μ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171836.g005>

cytosol. After 15min illumination with $80 \mu\text{moles m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ blue light, immunostaining of these same cell cultures showed significant increase in cryptochrome localization in the nucleus. These data indicate that DmCry is localized primarily in the cytoplasmic compartment in the dark, but moves into the nuclear compartment upon activation. Similar results were previously obtained in the case of the *Arabidopsis cry2* [22].

In sum, these data show colocalization of ROS biosynthesis with DmCry protein expression, and are thereby consistent with primary synthesis of ROS by cryptochromes in living cells.

Discussion

One of the key questions in DmCry activation concerns the nature of the photoreactions that are implicated in biological activity. Numerous studies have linked a redox state interconversion to signaling in DmCry, including by action spectroscopy that shows oxidized flavin as the photosensor in the dark-adapted state [16,31], that flavin photoreduction accompanies light activation [12,14], and that redox change of the flavin *in vitro* can induce conformational change and productive interaction with substrate proteins even in the absence of light [15].

However, there has also been a great deal of controversy concerning this mechanism. Much of the confusion has resulted from the observation that mutants of DmCry that do not undergo flavin reduction *in vitro* [13, 17, 20] have been reported to retain biological activity *in vivo*, thereby disputing that formation of the flavin radical is required for biological function. This observation can be explained by the fact that cryptochrome mutants defective in electron transfer *in vitro* are nevertheless photoreduced *in vivo* by alternate routes [16,18,19]. Therefore they indeed form the flavin radical redox state in response to light *in vivo* and their observed biological activity is expected. Confusion concerning the role of flavin reduction in has been further exacerbated by studies that incorrectly analysed cryptochrome mutant phenotypes, either by scoring constitutive dark phenotypes as 'light activated' or performing experiments far above saturating light intensities such that differential responsivity was missed (for full discussion of recent literature, see [15]). Nonetheless, a signaling mechanism based on activation by redox state interconversion has not been conclusively demonstrated and one of the weaknesses has been that the DmCry photocycle has not been rigorously characterized and correlated to DmCry signaling events.

For this reason, one of the main goals of the present study was to ascertain whether a photocycle based on flavin reduction (Fig 1) is indeed compatible with known characteristics of *in vivo* signaling by DmCry. It should be cautioned in this context that there can be considerable variation in reported light sensitivity of DmCry dependent phenotypes *in vivo*, which is not necessarily linked to the actual light sensitivity of the receptor. For instance, light-induced proteolysis of DmCry and signaling in neuronal firing [8, 17] require much higher apparent irradiance than phase shifting of the circadian clock [32]. Such variability is a classic feature of biological signaling reactions, which result from signal amplification events that are far downstream of the receptor [33]. Nonetheless, the quantum yield obtained for flavin reduction of 0.35 is well within the range for biological signaling molecules and is comparable with the quantum efficiency of both *Arabidopsis cry2* [28] and phot1 [34], which are both sensitive plant flavoprotein receptors operating in a low fluence range. The fact that flavin reduction is efficient and occurs in response to relatively low light intensity (Fig 2) is consistent with a signaling role *in vivo*.

Another kinetic feature of the DmCry photocycle consistent with a biological signaling role is the relatively long half-life (5.5 min) of the anionic radical ($\text{FAD}^{\bullet-}$) redox state. This indicates that, if the anionic radical redox state is indeed the activated signaling state of DmCry, then

biological activity is predicted to persist for several minutes after the end of illumination. Indeed, proteolytic experiments have shown that even a single flash of light of less than 1 msec is sufficient to induce biological activation of DmCry, which however is only apparent after a delay of several minutes in the ensuing dark interval [13]. Other studies suggest a half-life of up to 15 minutes for the signaling state of DmCry *in vivo*, as estimated by the lifetime of the activated conformational state [17], consistent with the extended lifetime of the anionic radical ($FAD^{\cdot-}$) redox state shown in this study.

The second finding presented here is the demonstration that ROS are formed upon photoactivation of DmCry. A possible mechanism for the one electron reduction of O_2 by $FAD^{\cdot-}$ and subsequent production of H_2O_2 is shown in the reaction scheme (S1 Fig) included in the Supporting Information. The dismutation of superoxide would be facilitated at pH7.4 by the presence of small amounts of hydroperoxy radical, leading to H_2O_2 and O_2 as final products.

In this reaction scheme (S1 Fig), every time the flavin in DmCry becomes reduced by light, there is a molecule of H_2O_2 formed during the subsequent reoxidation step. The rate of this reoxidation (k_b —Fig 1 of main text) is not dependent on light and so occurs at a constant rate during illumination. Thus, illumination of DmCry should result in synthesis of ROS in proportion to the concentration of the protein, the extent of flavin reduction (dependent on the light intensity), and the overall illumination time. In keeping with this expectation, the concentration of H_2O_2 formed by DmCry *in vitro* increased linearly over time and was indeed proportional to the protein concentration (see Fig 3a, which reports the concentration of H_2O_2 formed over a 30 minute time period by a protein sample at 30 μ molar concentration). Furthermore, the DCFH-DA fluorescent substrate, which detects $O_2^{\cdot-}$ in addition to other ROS products, likewise showed a linear increase in ROS subsequent to illumination of the isolated protein (Fig 3B).

Significantly, light-induced formation of ROS could also be detected in living cells, and co-localized with DmCry in both cellular and nuclear compartments of Sf21 insect cells (Fig 5). Since ROS production is a direct enzymatic property of DmCry illumination irrespective of cellular partner proteins and cofactors (see Fig 3), it should occur even at the lower DmCry protein concentration in the natural cellular environment. These results, taken together with prior *in-cell* EPR spectroscopy [16], show that cycles of flavin reduction/reoxidation must occur *in vivo* in response to continuous DmCry illumination under physiological conditions. DmCry flavin must furthermore be in the oxidized (FAD_{ox}) redox state in the dark for this to occur, which contradicts an alternate suggestion that the anionic radical redox state may represent the resting, dark-adapted state of DmCry [13, 20] and undergoes some unspecified photoreaction.

Finally, our results present the intriguing possibility that enzymatic biosynthesis of ROS by DmCry may contribute to its signaling role. It should be emphasized that the conformational change in DmCry triggered by flavin reduction occurs well before the reverse (reoxidation) reaction that generates ROS, and therefore it may be difficult to determine which signaling effects are due solely to ROS formation. Nonetheless, ROS in and of itself is an important regulator of cellular stress and ageing across phylogenetic lines [35]. A recent report in *Drosophila* indicates that restoring normal levels of CRY in ageing flies restores normal rhythmicity and improves longevity [36], whereas novel DmCry responses have been linked to regulation of genes implicated in stress response and ROS signaling [37]. It is not excluded that some of these effects may be due to activation of redox sensitive transcription factors by ROS synthesized by DmCry. Alternatively, a recent intriguing report has shown modulation of redox activated potassium channels of the plasma membrane by *drosophila* cryptochromes. This suggests a possible ROS signaling role of DmCry that may involve ROS-dependent activation of a cytosolic redox sensitive substrate [38].

Supporting information

S1 Text. Supplement to methods for kinetic modelling of DmCry photocycle.
(DOCX)

S1 Fig. A possible mechanism for the one electron reduction of O₂ by FAD^{•-} and subsequent production of H₂O₂.
(TIFF)

Acknowledgments

We are grateful to Adam Purvis and Derek Burdick for help with protein sample preparation. Funding was from AFOSR (FA9550-14-0-0409).

Author Contributions

Conceptualization: MA LA AM MP ME TR AK SB UH CFM.

Data curation: MA.

Formal analysis: LA NJ AM MP ME AH PB JW TR AK SB CFM MA RJU.

Funding acquisition: TR AK SB CFM UH MA.

Investigation: LA NJ AM MP ME AH PB JW CFM MA RJU.

Methodology: MA LA NJ AM MP AH PB JW TR RJU.

Project administration: MA.

Resources: TR AK SB CFM UH MA.

Software: MP TR.

Supervision: TR AK SB CFM MA RJU.

Validation: MA LA NJ AM MP ME AH PB JW TR AK UH SB CFM.

Visualization: LA MP TR AK SB CFM MA.

Writing – original draft: LA MP TR AK SB CFM MA.

Writing – review & editing: LA TR AK SB CFM MA RJU.

References

1. Chaves I, Pokorny R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, et al. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual Review in Plant Biology*. 2011; 62: 335–364.
2. Öztürk N, Song BH, Özgür S, Selby CP, Morrison L, Parth C et al. Structure and function of animal cryptochromes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2007; 72: 119–131. <https://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.015> PMID: 18419289
3. Sancar A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue light photoreceptors. *Chemical Reviews*. 2003; 103(6): 2203–2237. <https://doi.org/10.1021/cr0204348> PMID: 12797829
4. Ahmad M. Photocycle and signaling mechanisms of plant cryptochromes. In *SI: 33: Cell signalling and gene regulation*. *Current Opinion in Plant Biology*. 2016; 33: 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.013> PMID: 27423124
5. Peschel N, Helfrich-Förster C. Setting the clock—by nature: Circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*. 2011; 585(10): 1435–1442. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.02.028> PMID: 21354415

6. Yoshii T, Hermann-Luibl C, Helfrich-Förster C. Circadian light-input pathways in *Drosophila*. *Communicative and Integrative Biology*. 2015; 4: 9(1): e1102805. <https://doi.org/10.1080/19420889.2015.1102805> PMID: 27066180
7. Peschel N, Chen KF, Szabo G, Stanewsky R. Light-dependent interactions between the *Drosophila* circadian clock factors cryptochrome, jetlag, and timeless. *Current Biology*. 2009; 19(3): 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.042> PMID: 19185492
8. Fogle KJ, Parson KG, Dahm NA, Holmes TC. CRYPTOCHROME is a blue-light sensor that regulates neuronal firing rate. *Science*. 2011; 331(6023): 1409–1413. <https://doi.org/10.1126/science.1199702> PMID: 21380718
9. Alex A, Li A, Zeng X, Tate RE, McKee ML, Capen DE, Zhang Z et al. A Circadian Clock Gene, Cry, Affects Heart Morphogenesis and Function in *Drosophila* as Revealed by Optical Coherence Microscopy. *PLoS One*. 2015; 10(9): e0137236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137236> PMID: 26348211
10. Zoltowski BD, Valdivya AT, Top D, Widom J, Young MW, Crane BR. Structure of full-length *Drosophila* cryptochrome. *Nature*. 2011; 480(7377): 396–399. <https://doi.org/10.1038/nature10618> PMID: 22080955
11. Czama A, Berndt A, Singh HR, Grudziecki A, Ladumer AG, Timinsky G et al. Structures of *Drosophila* cryptochrome and mouse cryptochrome1 provide insight into circadian function. *Cell*. 2013; 153(6): 1394–1405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.011> PMID: 23746849
12. Berndt A, Kotke T, Breitkreuz H, Dvorsky R, Hennig S, Alexander M et al. A novel photoreaction mechanism for the circadian blue light photoreceptor *Drosophila* cryptochrome. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(17): 13011–13021. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608872200> PMID: 17298948
13. Oztürk N, Song SH, Selby CP, Sancar A. Animal type 1 cryptochromes. Analysis of the redox state of the flavin cofactor by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(6): 3256–3263. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708612200> PMID: 18056988
14. Paulus B, Bajzath C, Melin F, Heidinger L, Kromm V, Herkersdorf C, Benz U, Mann L, Stehle P, Hellwig P, Weber S, Schleichner E. Spectroscopic characterization of radicals and radical pairs in fruit fly cryptochrome — protonated and nonprotonated flavin radical-states. *FEBS Journal*. 2015; 282(16): 3175–89. <https://doi.org/10.1111/febs.13299> PMID: 25879256
15. Valdivya AT, Top D, Manahan CC, Tokuda JM, Zhang S, Pollack L et al. Flavin reduction activates *Drosophila* cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013; 110: 20455–20460. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313336110> PMID: 24297896
16. Hoang N, Schleichner E, Kacprzak S, Bouly JP, Ploot M, Wu W et al. Human and *Drosophila* cryptochromes are light activated by flavin photoreduction in living cells. *PLoS Biology*. 2008; 6: e160. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060160> PMID: 18597555
17. Ozturk N, Selby CP, Annayev Y, Zhong D, Sancar A. Reaction mechanism of *Drosophila* cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108(2): 516–521. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017093108> PMID: 21187431
18. Engelhard C, Wang X, Robles D, Moidt J, Essen LO, Batschauer A et al. Cellular metabolites enhance the light sensitivity of *Arabidopsis* cryptochrome through alternate electron transfer pathways. *Plant Cell*. 2014; 26: 4519–4531. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.129609> PMID: 25428980
19. El-Esawi M, Glascoe A, Engle D, Ritz T, Link J, Ahmad M. Cellular metabolites modulate in vivo signaling of *Arabidopsis* cryptochrome-1. *Plant Signaling & Behavior*. 2015; 10: e1063758.
20. Ozturk N, Selby CP, Zhong D, Sancar A. Mechanism of photoreduction of *Drosophila* cryptochrome: role of the redox status of the flavin chromophore. *Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289(8): 4634–4642. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.542498> PMID: 24379403
21. Consentino L, Lambert S, Martino C, Jourdan N, Bouchet PE, Witczak J, et al. Blue-light dependent reactive oxygen species formation by *Arabidopsis* cryptochrome may define a novel evolutionarily conserved signaling mechanism. *New Phytologist*. 2015; 206(4): 1450–1462. <https://doi.org/10.1111/nph.13341> PMID: 25728686
22. Jourdan N, Martino C, El-Esawi M, Witczak J, Bouchet PE, d'Harlingue A et al. Blue-light dependent ROS formation by *Arabidopsis* Cryptochrome-2 may contribute towards its signaling role. *Plant Signaling & Behavior*. 2015; 10(8): e1042647.
23. Muller P, Ahmad M. Light activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286: 21033–21040. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.228940> PMID: 21467031
24. Van Wilderen LJ, Silksstone G, Mason M, Van Thor JJ, Wilson MT. Kinetic studies on the oxidation of semiquinone and hydroquinone forms of *Arabidopsis* cryptochrome by molecular oxygen. *FEBS Open Biology*. 2015; 5: 885–892.

25. Bouly JP, Schleicher E., Dionisio-Sese M, Vandenbussche F, Van Der Straeten D, Bakrim N et al. Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282: 9383–9391. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609842200> PMID: 17237227
26. Hoecker U, Tepperman JM, Quail PH. SPA1, a WD-repeat protein specific to phytochrome A signal transduction. *Science*. 1999; 16; 284(5413): 496–499. PMID: 10200059
27. Nixdorf M, Hoecker U. SPA1 and DET1 act together to control photomorphogenesis throughout plant development. *Planta*. 2010; 231(4): 825–833. Epub 2009 Dec 30. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1088-y> PMID: 20041285
28. Procopio M, Link J, Engle D, Witczak J, Ritz T, Ahmad M. Kinetic Modeling of the Arabidopsis Cryptochrome Photocycle: FADH(o) Accumulation Correlates with Biological Activity. *Frontiers in Plant Science*. 2010; 28; 7: 888. <https://doi.org/10.3389/fpls.2010.00888> PMID: 27446119
29. Joms MS, Wang B, Jordan SB, Chandekar LP. Chromophore function and interaction in *Escherichia coli* DNA photolyase: reconstitution of the apoenzyme with pterin and/or flavin derivatives. *Biochemistry*. 1990; 29 (2): 532–561. PMID: 2400908
30. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension*. 2007; 49: 717–727. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000258594.87211.6b> PMID: 17296874
31. VanVickle-Chavez SJ, Van Gelder RN. Action spectrum of *Drosophila* cryptochrome. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 6; 282(14): 10561–10566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609314200> PMID: 17284451
32. Vinayak P, Coupar J, Hughes SE, Fozdar P, Kilby J, Garren E, Yoshii T, Hirsh J. Exquisite light sensitivity of *Drosophila melanogaster* cryptochrome. *PLoS Genetics*. 2013; 9(7): e1003615. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003615> PMID: 23874218
33. Galston AW. Plant Photobiology in the Last Half-Century. *Plant Photobiology*. 1974; 54(4): 427–436.
34. Kasahara M, Swartz TE, Olney MA, Onodera A, Mochizuki N, Fukuzawa H et al. Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from *Arabidopsis*, rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 2002; 129(2):762–773. <https://doi.org/10.1104/pp.002410> PMID: 12068117
35. Fanjul-Moles ML. ROS signaling pathways and biological rhythms: perspectives in crustaceans. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)*. 2013; 18: 665–675.
36. Rakshit K, Giebultowicz JM. Cryptochrome restores dampened circadian rhythms and promotes health-span in aging *Drosophila*. *Aging Cell*. 2013; 12(5): 752–762. <https://doi.org/10.1111/acef.12100> PMID: 23692507
37. Vieira J, Jones AR, Danon A, Sakuma M, Hoang N, Robles D, Tail S et al. Human cryptochrome-1 confers light independent biological activity in transgenic *Drosophila* correlated with flavin radical stability. *PLoS1*. 2012; 7(3): e318671.
38. Fogle KJ, Baik LS, Houli JH, Tran TT, Roberts L, Dahm NA et al. CRYPTOCHROME-mediated phototransduction by modulation of the potassium ion channel beta-subunit redox sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112. 2015: 2245–2250. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416586112> PMID: 25646452

Supplementary Material

Blue-light induced accumulation of Reactive Oxygen Species is a consequence of the *Drosophila* cryptochrome photocycle.

Louis-David Arthaut^{1,2}, Nathalie Jourdan¹, Ali Mteyrek³, Maria Procopio^{1,4}, Mohamed El-Esawi^{1,5}, Alain d'Harlingue¹, Pierre-Etienne Bouchet¹, Thorsten Ritz⁴, André Klarsfeld³, Serge Birman³, Robert J. Usselman⁶, Ute Hoecker⁷, Carlos F. Martino² and Margaret Ahmad^{1,8}.

Short title: Cryptochrome synthesis of ROS.

¹ UMR CNRS 8256 (B2A), IBPS, Université Paris VI, Paris, 75005 France

² Department of Biomedical Engineering, Florida Institute of Technology, Melbourne, FL 32901 U.S.A.

³ GCRN team, Brain Plasticity Unit, UMR 8249 CNRS/ESPCI Paris, PSL Research University, 75005 Paris, France..

⁴ Department of Physics and Astronomy, University of California, Irvine, CA, 92697-4575 U.S.A.

⁵ Botany Department, Faculty of Science, Tanta University, 31527 Tanta, Egypt.

⁴ Department of Physics and Astronomy, University of California, Irvine, CA, 92697-4575 U.S.A.

⁵ Botany Department, Faculty of Science, Tanta University, 31527 Tanta, Egypt.

⁶ Department of Chemistry and Biochemistry, Montana State University, Bozeman MT 59717 U.S.A.

⁷ Botanical Institute and Cluster of Excellence on Plant Sciences (CEPLAS), Biocenter, University of Cologne, 50674, Cologne, Germany.

⁸ Department of Biology, Xavier University, Cincinnati, Ohio, 45207, U.S.A.

* Corresponding author

E-mail: margaret.ahmad@upmc.fr (MA)

1. Kinetic model of DmCry

Drosophila cryptochromes (DmCrys) undergo light-induced flavin reduction from oxidized (FAD_{ox}) to radical ($FAD^{\bullet-}$) redox states, with subsequent re-oxidation upon return to darkness. Figure 1 reports the DmCry photocycle. The time evolution of the two intermediate state concentrations is described by a set of coupled first-order kinetic equations (Espensen 1981):

$$\begin{cases} \frac{d[FAD_{ox}]}{dt} = -k[FAD_{ox}] + k_b[FAD^{\bullet-}] \\ \frac{d[FAD^{\bullet-}]}{dt} = k[FAD_{ox}] - k_b[FAD^{\bullet-}] \end{cases} \quad (S1)$$

where k is the forward rate constant, and k_b the dark re-oxidation rate constant. In Eq. S1 square brackets denote the normalized concentrations of the transient states FAD_{ox} and $FAD^{\bullet-}$. At any given time t , $[FAD_{ox}](t) + [FAD^{\bullet-}](t) = 1$, and the initial condition at $t=0$ is $[FAD_{ox}](0) = 1$.

The analytical solution of the two-state kinetic model, reported in Eq. S1, is straightforward and results:

$$[FAD_{ox}](t) = \frac{k_b}{k + k_b} + \frac{k}{k + k_b} e^{-(k+k_b)t} \quad (S2)$$

$$[FAD^{\bullet-}](t) = \frac{k}{k + k_b} (1 - e^{-(k+k_b)t}) \quad (S3)$$

We follow the method used in (Procopio, et al. 2016) to fit the two-state kinetic model to absorption spectra of the isolated proteins. This will allow to find the re-oxidation rate constants and quantum yields and thus predict the concentrations of the two states at a given illumination condition.

We record absorption spectra from 400 to 600 nm, by illuminating DmCry samples with blue light (450 +/-10nm). We apply the Beer-Lambert law, which relates the concentration of the transient states to the absorbance A (Schmidt, 2005). According to the Beer-Lambert law, the absorbance A at a given wavelength λ and at time t is linearly dependent on the concentration of the absorbing species (Schmidt 2005). In the frequency range considered here, both FAD_{ox} and $FAD^{\bullet-}$ absorb blue light (450nm) (Bouly, et al.

2007, Banerjee, et al. 2007, Liu, Zhong and Lin 2010).

Thus there are two absorbing species at 450nm, and the Beer-Lambert results:

$$A(450, t) = \varepsilon_{ox}(450)[FAD_{ox}](t) + \varepsilon_d(450)[FAD^{\bullet-}](t) \quad (S4)$$

where $\varepsilon_{ox}(450)$ and $\varepsilon_d(450)$ are the extinction coefficients of respectively FAD_{ox} and $FAD^{\bullet-}$. The extinction coefficient of the anionic radical $FAD^{\bullet-}$ is about half the extinction coefficient of FAD_{ox} (Liu, Zhong and Lin 2010):

$$\varepsilon_d(450) = \frac{\varepsilon_{ox}(450)}{2} \quad (S5)$$

We substitute Eq. S5 in Eq. S4, and then normalize the new expression to the dark, i.e. $A(450,0) = \varepsilon_{ox}(450)[FAD_{ox}](0)$. We re-define $A(450,t)$ as the normalized absorbance and, $[FAD_{ox}](t)$ and $[FAD^{\bullet-}](t)$ as the normalized concentration. Thus we obtain a simplified relationship between absorbance and concentration of the two species:

$$A(450, t) = [FAD_{ox}](t) + \frac{[FAD^{\bullet-}](t)}{2} \quad (S6)$$

Considering that at a given time t $[FAD_{ox}](t) + [FAD^{\bullet-}](t) = 1$ we obtain from Eq. S6 the concentration of $[FAD_{ox}](t)$ and $[FAD^{\bullet-}](t)$ as a function of the absorption at 450 nm at a given time t as:

$$[FAD_{ox}](t) = 2A(450, t) - 1 \quad (S7)$$

$$[FAD^{\bullet-}](t) = 2 - 2A(450, t) \quad (S8)$$

We use Expressions S7 and S8 to fit absorption spectra with the kinetic model, and find re-oxidation rate k_b and quantum yield ϕ (Procopio, et al. 2016).

1.1. Dark re-oxidation rate k_b

Since flavin re-oxidation from $FAD^{\bullet-}$ to FAD_{ox} can be monitored spectroscopically by following the absorbance at 450nm, we first obtain experimental values for the dark re-oxidation kinetics from the anionic radical ($FAD^{\bullet-}$) to the oxidized (FAD_{ox}) flavin states of the DmCry.

We define the re-oxidation time as t_d , and $t_d = 0$ is the time in which DmCry is placed in darkness, after being illuminated for a certain time t at fluence rate I . We record the absorption spectrum after increasing times in darkness t_d , until complete re-oxidation to FAD_{ox} (see Fig. 2A). When only dark re-oxidation occurs ($k=0$), the analytical solutions of Eq. S1 for $[FAD_{ox}](t)$ is:

$$[FAD_{ox}](t_d) = c_{ox} + c_d(1 - e^{-k_b t_d}) \quad (S8)$$

$$[FAD^{\bullet-}](t_d) = c_d e^{-k_b t_d} \quad (S9)$$

where c_{ox} and c_d are the initial concentrations of, respectively, FAD_{ox} and $FAD^{\bullet-}$ at the dark time $t_d=0$. We plot the concentrations of FAD_{ox} , obtained from the spectra at 450nm by using Eq. S7, as a function of the dark recovery time t_d , and fit the data with Eq. 3S (see Fig. 2B). We calculate the half-life $\tau_{1/2}$ according to $\tau_{1/2}=\ln(2) k_b^{-1}$.

1.2. Quantum yield ϕ

We calculate the quantum yield by exploiting the linear correlation between forward rate constant and fluence rate, i.e. $k=\sigma I$, where σ is the photo-conversion cross section. The photo-conversion cross section σ is related to the quantum yield ϕ according to $\sigma=2.3\epsilon_{ox}(450)\phi$ (Kendrick and Kronenberg 1994). To obtain the photo-conversion cross section we illuminate DmCry sample with increasing blue light fluence rates I and record absorption spectra (see Fig. 2C). For each fluence rate I we calculate the concentration of FAD_{ox} from the spectra (Eq. S7), which we use to find the corresponding forward rate k by numerically solving Eq. 2 (see two-state model algorithm in (Procopio, et al. 2016)). We estimate σ by fitting I vs. k with a linear function, $k=\sigma I$ (see Fig. 2D). From σ we calculate ϕ by using the extinction coefficient $\epsilon_{ox}(450)$ of DmCry (see main text).

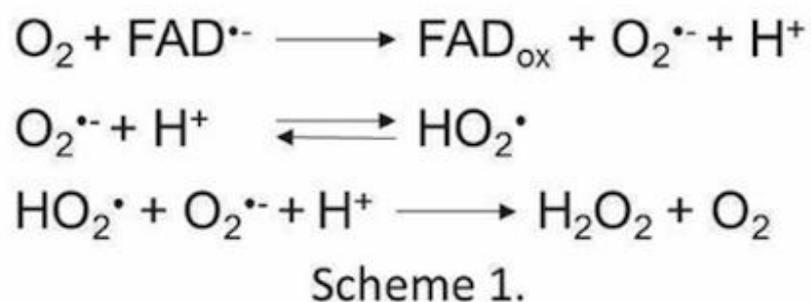
2. Bibliography

- Banerjee, R., E. Schleicher, S. Meier, R.M. Viana, R. Pokorny, M. Ahmad, R. Bittl, and A. Batschauer. 2007. "The signaling state of Arabidopsis cryptochrome 2 contains flavin semiquinone." *J. Biol. Chem.* 282: 14916–14922.
- Bouly, J.P., E. Schleicher, M. Dionisio-Sese, F. Vandenbussche, D. Van Der Straeten, N. Bakrim, S. Meier, et al. 2007. "Cryptochrome blue-light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states." *J. Biol. Chem.* 282: 9383–9391.
- Espensen, J. H. 1981. *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*. New York: McGraw-Hill.
- Kendrick, R.E., and G.H.M. Kronenberg. 1994. *Photomorphogenesis in Plants*. Springer Science & Business Media.
- Liu, Hongtao, Dongping Zhong, and Chentao Lin. 2010. "Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors." *Curr Opin Plant Biol* 13 (5): 578–586.
- Müller, P., and M. Ahmad. 2011. "Light-activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (24): 21033-21040.
- Procopio, M, J Link, D Engle, J Witczak, T Ritz, and M Ahmad. 2016. "Kinetic modeling of the Arabidopsis cryptochrome photocycle: FADHo accumulation correlates with biological activity." *Front. Plant Sci* 7: 888.

Schmidt, W. 2005. *Optical Spectroscopy in Chemistry and Life Sciences: An Introduction*. New York: Wiley-VCH.

S1 Figure Captions

SI Fig 1 Reaction scheme for flavin reoxidation. A possible mechanism for the one electron reduction of O₂ by FAD^{•-} and subsequent production of H₂O₂.



ARTICLE 2

Blue-light induced biosynthesis of ROS contributes to the signaling mechanism of *Arabidopsis* cryptochrome

El-Esawi M, Arthaut L-D, Jourdan N, d' Harlingue A, Link J, Martino C & Ahmad M

Sci Reports 7, 13875

1. Introduction

Les cryptochromes sont connus comme étant des récepteurs à la lumière bleue hautement conservés avec de multiples rôles de signalisation : la croissance et le développement des plantes, la photomorphogénèse, l'initiation de la floraison ou encore la réponse aux stress. Ce sont des protéines nucléaires qui régulent de manière plus ou moins directe plus de 20% du total des transcrits cellulaires (**Jiao *et al*, 2007 ; Phee *et al*, 2007**). Leur domaine C-terminal, de longueur variable, est important pour leur localisation nucléaire. Les partenaires protéique connus des cryptochromes chez *Arabidopsis* sont nombreux, comme COP1/SPA1, régulant d'autres facteurs de transcription tels que HFR1 ou HY5/HYH, qui permettent finalement de contrôler la floraison ou encore la photomorphogénèse. Le changement conformationnel qui résulte de leur activation permet la liaison avec des partenaires, bien que les mécanismes qui en sont responsables soient encore très mal connus (**Kondoh *et al*, 2011**). Il a récemment été montré que les cryptochromes végétaux comme CRY1 d'*Arabidopsis thaliana* sont capable de synthétiser des ROS (H_2O_2 et $O_2^{\bullet-}$) après illumination (**Consentino *et al*, 2015**). Cette synthèse est possible grâce à l'étape de réoxydation de la flavine qui passe de l'état semi-réduit ou totalement réduit ($FADH^{\bullet}$ ou $FADH^-$) à l'état oxydé (**Müller & Ahmad, 2011**). Les ROS sont des sous-produits du métabolisme au niveau des chloroplastes, des mitochondries ou des peroxysomes. Ils peuvent aussi être induits par certains stress environnementaux et régulent les mécanismes cellulaires de la tolérance au stress : croissance des racines, sénescence, réponses hormonales, défense contre les pathogène mais également les mécanismes de défenses contre les ROS (**Bhattacharjee S, 2012 ; Dietz**

et al, 2016 ; Xia et al, 2015). Il a été montré que les cryptochromes sont impliqués de manière indirecte dans diverses voies de signalisation ROS, incluant les réponses défensives induites par l'oxygène singulet, le stress induit par les fortes intensités de lumière et l'apoptose (**Danon et al, 2006 ; Kleine et al, 2007**). Des analyses par puces à ADN ont montré qu'il y a un important chevauchement entre les gènes régulés par les ROS et les gènes régulés par les cryptochromes (**Roberts et al, 2006 ; Chen et al, 2013 ; Jiao et al, 2005**). Certains de ces effets sont indirects, comme la régulation des niveaux de production d'oxygène singulet en réponse à la lumière au sein des chloroplastes (**Danon et al, 2006**), ou encore la régulation d'intermédiaires impliqués dans la photomorphogénèse (**Chen et al, 2013**). Les mécanismes expliquant ces relations étroites restent peu connus. L'illumination des cryptochromes *in vitro* permet la production stœchiométrique des ROS (**Consentino et al, 2015 ; Arthaut et al, 2017**) il est possible que cette biosynthèse puisse directement jouer un rôle de signalisation chez les plantes en réponse à la lumière bleue. C'est à cette question que nous avons voulu répondre dans cette série d'études, avec pour modèle le gène CRY1 chez *Arabidopsis thaliana*. Nous montrons par microscopie à fluorescence que les ROS comme le peroxyde d'hydrogène s'accumulent dans le noyau des cellules végétales après activation du cryptochrome. Ils induisent l'expression de gènes régulés par les ROS, impliqués dans diverses fonctions liées au stress biotique ou abiotique. Les cryptochromes mutants en C-terminal, non fonctionnels pour les processus de photomorphogénèse gardent leur capacité à induire des phénotypes liés aux ROS. Nous concluons que la biosynthèse nucléaire des ROS par les cryptochromes représente un nouveau champ d'étude qui complète les autres études en cours. Ces mécanismes pourraient conduire à de nouvelles applications utilisant la lumière bleue pour activer les défenses des plantes en culture contre les toxines ou le stress environnemental de manière générale.

2. Matériels et méthodes

Conditions de croissance des plantes et plantules :

Les semis d'*Arabidopsis* sont d'écotype WS. Les plantules mutantes Cry1 et Cry2 n'ont pas de protéines CRY1 ou CRY2 détectables (**Ahmad et al, 2002**), d'autres mutants pour CRY1 ont été identifiés selon un protocole déjà établi (**Ahmad et al, 1995**). La croissance des plantules se fait sur milieu agar en boîte de pétri (1/2xMS, 2% sucrose, pH 6.0, 0.8% agar). Les graines ont été systématiquement stérilisées selon un protocole de référence (**Ahmad et al, 2002**), puis étalées sur boîte de pétri, maintenues à 4°C pendant 48h, puis finalement été placées 24h en lumière rouge pour induire leur germination avant d'être maintenues en obscurité ou placées dans les conditions

lumineuses choisies pour nos expériences. La croissance de l'hypocotyle et l'accumulation d'anthocyanines ont été mesurés selon un protocole déjà utilisé (**Ahmad et al, 1995**).

Observations à l'apoptome :

10 plantules étiolées (maintenues en obscurité pendant tout leur développement) âgées de 8 à 10 jours ont été utilisées pour chaque condition. Elles sont incubées dans 2mL de tampon phosphate (200mM pH 7.4) contenant 2µL HOECHST, 2µL de DMSO et 4µL de SOSG pendant 30 minutes en obscurité et à température ambiante. Elles ont ensuite été rincées 4 fois dans le même tampon phosphate seul puis placées à l'obscurité ou en lumière bleue saturante pendant 10 minutes. Les observations sont faites au microscope Zeiss AxioImager.Z1/ApoTome à l'objectif 20X et des longueurs d'onde d'excitation / émission de 350 / 460-490nm pour le HOECHST et 372 / 395-416nm pour le réactif SOSG. Une superposition d'images a été obtenue avec une caméra CCD. Une seule section Z a été observée à l'aide du logiciel imageJ. Une map de colocalisation avec des pixels colorés a été établie. Le marquage HOECHST en rouge a été utilisé pour segmenter les images et définir les zones d'intérêt, puis en utilisant l'outil ROI manager la densité de signal cyan et rouge a été quantifiée dans la zone des noyaux et représentée sous forme d'histogrammes dans les conditions étudiées.

Analyses par RT-PCR quantitative :

Les plantules d'*Arabidopsis thaliana* sauvages (WS), mutantes nulles pour CRY1, CRY2, double mutantes nulles CRY1-CRY2 et les mutants C-terminaux (K611R, D623K et D652K) ont été cultivées et ont germé comme décrit ci-dessus. Des plantules de 4 jours dont la croissance a eu lieu en obscurité ont été transférées en lumière bleue à 60µE pendant 3h ou conservées en obscurité. Ces plantules ont été ensuite collectées et broyées dans l'azote liquide. L'ARN total a été isolé en utilisant le kit RNeasy Plant (Qiagen) et la synthèse de l'ADN complémentaire a été réalisée à l'aide du kit Reverse Transcription (Qiagen). Les qRT-PCR ont été réalisées en utilisant le SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Les réactions de qRT-PCR ont été amplifiées dans les conditions suivantes : 95°C pendant 15min, suivi de 40 cycles à 95°C pendant 15s, 57°C pendant 30 s et 72°C pendant 30s. Les niveaux d'expression ont été calculés et normalisés à l'expression d'un gène contrôle UBI1. 12 couples d'amorces correspondant à 12 gènes impliqués dans la réponse aux ROS ont été utilisés pour les analyses et sont listés le tableau 1 des données supplémentaires.

Expression, extraction protéique et détection des ROS :

Toutes ces méthodes ont déjà été décrites (**Consentino et al, 2015**). Brièvement, l'allèle mutant E531K pour CRY1 a été cloné dans le vecteur d'expression baculovirus pBakPak9 en incluant un tag

composé de 6 histidines en N-terminal. Ce vecteur a été transfecté en cellules Sf21 et l'expression protéique induite selon les recommandations du fabricant. Les protéines ont ensuite été isolées sur une colonne d'affinité de nickel (**Bouly et al, 2007**), la concentration qui a ensuite été utilisée pour nos expériences se situait entre 30 et 50 μ M. Les expériences de photoréduction ont été effectuées à 18°C dans un tampon phosphate (NaPO₄ 50mM pH 7.5) auquel a été ajouté 5mM de DTT. Après illumination en lumière bleue les spectres d'absorption ont été analysés par un spectrophotomètre Cary Scan 300 UV/Vis. Pour détecter les ROS, les échantillons de protéine sauvage CRY1 ou mutante E531K à la même concentration ont été éclairés dans le tampon NaPO₄ et maintenus sur de la glace. L'intensité de l'éclairage était de 1000 μ E et aucun agent réducteur n'a été ajouté. Des aliquotes ont été prélevés aux temps indiqués et congelés dans l'azote liquide jusqu'à la fin de l'expérience. Ces aliquotes ont été décongelés et la fluorescence correspondant aux ROS a été mesurée grâce à l'Amplex Red selon le protocole décrit par (**Consentino et al, 2015**).

3. Résultats

Des études ont montré une augmentation des niveaux de ROS chez des cellules Sf21 exprimant des cryptochromes d'*Arabidopsis* recombinants, cependant aucun rôle n'y avait été attribué (**Consentino et al, 2015**). Nous avons donc tenté de déterminer si une illumination pouvait déclencher une augmentation de la synthèse des ROS par les cryptochromes au niveau des noyaux chez *Arabidopsis*. Deux types de plantules d'*A. thaliana* ont été utilisées : les doubles mutants C1C2, mutants nuls pour CRY1 et CRY2 et des plantules WS01 qui surexpriment la protéine CRY1. Le réactif SOSG permet de détecter l'oxygène singulet, un des sous-produits de la réoxydation de la flavine (**figure 1b**) (**Müller & Ahmad, 2011**). Nous avons observé la production de ROS au niveau des apex racinaires car ceux-ci expriment les cryptochromes et la détection des ROS n'est pas perturbée par l'activité des chloroplastes. Après illumination les plantules C1C2 et WS01 avaient toutes les deux des niveaux de ROS similaires, bien qu'ils soient quelque peu réduits chez les mutants C1C2 (**figure 2, panneaux SOSG**). Cependant si on regarde la superposition des deux marquages noyaux et ROS (**figure 2, panneau Colocalized pixels Map**) on peut voir une nette différence entre les deux types de plantules. La proportion de marquage ROS qui colocalise avec les noyaux est près de 4 fois supérieure chez les plantules WS01 par rapport aux doubles mutants (**figure 2b**). Nous en avons conclu que cette forte augmentation de la quantité de marquage ROS chez les plantules WS01 ne pouvait résulter que de l'activation du cryptochrome par la lumière, et pourrait être compatible avec un possible rôle de signalisation dans le noyau.

De nombreuses analyses transcriptomiques concernant l'expression des gènes régulés par les cryptochromes après exposition en lumière ont été réalisées (**Kleine *et al*, 2007 ; Roberts & Paul 2006 ; Chen *et al*, 2013**). Elles ont indiqué un chevauchement entre les gènes régulés par la lumière et ceux régulés par les ROS. Pour vérifier l'ampleur de ce chevauchement nous avons choisi d'étudier au hasard une douzaine de gènes qui avaient déjà été décrits comme étant induits par les ROS, à travers plusieurs catégories fonctionnelles différentes incluant la défense contre les pathogènes ou la détoxification des ROS. Parmi ces 12 gènes on retrouve :

- ERF4 et ERF5, facteurs de transcription sensibles à l'éthylène, une hormone végétale (**Laloi *et al*, 2007**).
- WRKY33 également sensible à l'éthylène (**Jiao *et al*, 2005**).
- Un facteur de transcription à doigt de zinc ZAT10 (**Miller *et al*, 2008**)
- La protéine SIB1 (Sigma Factor Binding Protein 1) (**Laloi *et al*, 2007**)
- HSPRO2, une Heat Shock Protein (**Jiao *et al*, 2005**)
- APX2, une enzyme de détoxification des ROS (**Miller *et al*, 2008**)
- ANACO47, une protéine dont l'expression est régulée par le stress oxydatif (**Mehterov *et al*, 2012**).
- FMO1, qui permet la résistance aux pathogènes (**Griebel & Zeier, 2008**)

L'expression de ces gènes a été analysée chez 4 types de plantules mutantes ou sauvages d'*Arabidopsis* après illumination pendant 3h en lumière bleue saturante pour que les réponses induites par les cryptochromes soient significatives (**figure 3**). L'ensemble de ces gènes ont montré une diminution de leur expression chez les plantules mutantes nulles pour CRY1 ou CRY2. En revanche aucune différence d'expression n'a été détectée en obscurité (**figure 1 supplémentaire**) entre les plantules sauvages ou mutantes. On peut remarquer que les simples mutants nuls pour CRY1 ou CRY2 montrent tous les deux une diminution de moitié de l'expression des 12 gènes, et que les doubles mutants nuls montrent une expression encore plus faible. Ceci indique que CRY1 et CRY2 contribuent de manière équivalente à l'induction de l'expression de ces gènes.

Toutefois les cryptochromes le changement conformationnel subit par les cryptochromes en lumière bleue et qui leur permet d'interagir avec des partenaires protéiques semble contribuer au rôle des cryptochromes dans la signalisation ROS (**Danon *et al*, 2006 ; Kleine *et al*, 2007 ; Roberts & Paul, 2006 ; Chen *et al*, 2013**). Nous nous devons de résoudre le problème qui était de déterminer si

la biosynthèse directe des ROS par les cryptochromes pouvait jouer un rôle dans la signalisation ROS de manière indépendante au changement de conformation en C-terminal. Après avoir étudié l'activité biologique de plusieurs allèles mutants pour la partie C-terminale du gène CRY1 nous avons sélectionné quelques-uns qui ne présentaient aucune des activités biologiques connues des cryptochromes. Certains des mutants que nous avons identifiés ont déjà été décrits comme inactifs pour des fonctions comme l'inhibition de croissance de l'hypocotyle ou l'accumulation d'anthocyanines en lumière bleue (Ahmad *et al*, 1995 ; Shalitin *et al*, 2003 ; Procopio *et al*, 2016) car incapables de subir le changement de conformation nécessaire pour interagir avec d'autres protéines. Nous avons ainsi analysé l'allèle mutant E531K pour CRY1 dont la mutation ponctuelle se situe en C-terminal et en dehors de la séquence de localisation nucléaire, ce qui confère à cette protéine une inactivité qui n'est pas reliée à une incapacité à se relocaliser dans le noyau. Nous l'avons comparée à la protéine sauvage CRY1 pour sa capacité à subir une photoréduction en lumière bleue ainsi que pour sa capacité à se réoxyder en obscurité et à synthétiser des ROS comme H₂O₂ (figures 4a, 4b et 4c). La capacité de cette protéine mutante à induire la photoréduction de la flavine reste inchangée par rapport à la protéine sauvage CRY1 (figure 4a). La capacité de ces mêmes protéines mutantes à réoxyder la flavine et à synthétiser du peroxyde d'hydrogène est également comparable à la protéine sauvage (figure 4b et 4c). Ces résultats confirment que la mutation en C-terminal n'affecte pas la capacité de cette protéine à synthétiser des ROS lors de la réoxydation. La perte de fonction de ce mutant pour la photomorphogénèse était donc reliée à son incapacité de subir le changement conformationnel, et n'est pas due à une incapacité à synthétiser des ROS. Mais l'information essentielle est que l'on peut dorénavant étudier l'activité de biosynthèse des ROS par CRY1 de manière indépendante à son activité C-terminale.

L'objectif a ensuite été de vérifier si ces mutants de substitution en C-terminal étaient capables de réguler certaines fonctions cellulaires, et par la même occasion certains des 12 gènes régulés par les ROS sur lesquels nous nous sommes focalisés. Nous avons pour cela étudié 3 mutants de substitution en C-terminal que nous avons nouvellement identifiés : R611K, E623K et E652K. Ces mutations ne concernent aucun des résidus connus comme étant phosphorylés et se situent en dehors de toute région connue comme essentielle à la localisation nucléaire. Ces allèles mutants ont chacun montré un niveau d'expression comparable au type sauvage en obscurité pour l'ensemble des 12 gènes (figure 2 supplémentaire). Nous avons dans un premier temps analysé l'influence de ces mutations pour la croissance de l'hypocotyle chez des plantules d'*A. thaliana* selon une gamme d'intensité de lumière bleue (figure 5a). A des fins de comparaison les allèles mutants W145-STOP et hy4-3 ont été utilisés comme témoins négatifs chez lesquels la synthèse de la protéine CRY1 n'est pas détectable (Ahmad

et al, 2002). Les résultats obtenus pour la croissance de l'hypocotyle indiquent que les mutants C-terminaux ponctuels sont tous insensibles à la lumière bleue de 2 à 90 μ E car cette croissance est identique à celle observée pour les mutants *hy4-3* et *W145-STOP*. Par contraste les plantules sauvages ont une longueur d'hypocotyle bien plus réduite en présence de lumière bleue. Les trois mutants C-terminaux analysés sont donc inactifs pour la photomorphogenèse et la synthèse des ROS en N-terminal n'a aucun rôle à jouer dans cette fonction. Nous avons analysé ensuite ces mêmes plantules mutantes ou sauvages pour leur capacité à accumuler les anthocyanines, un processus régulé par de nombreux intermédiaires de signalisation eux-mêmes régulés par les cryptochromes comme COP1 ou HY5 / HLH (Herbel *et al*, 2013). Cette accumulation peut également être induite par le stress, ce qui nous a conduits à vérifier si les ROS synthétisés par les cryptochromes pourraient en être responsable, du moins en partie. On peut affirmer au vu des résultats (**figure 5b**) que la concentration en anthocyanines est réduite de moitié chez l'ensemble des mutants pour CRY1 par rapport aux plantules sauvages et ce à des intensités de lumière bleue de 8 à 20 μ E, en accord avec les résultats obtenus par (Ahmad *et al*, 1995). Lorsque l'intensité est plus forte (90 μ E), l'accumulation de ces anthocyanines est significativement plus élevée chez les mutants R611K, E623K et E652K par rapport aux mutants nuls *W145-STOP* et *hy4-3*. Ces effets ne peuvent pas être attribués à une activité C-terminale résiduelle car à cette même intensité lumineuse il n'y a aucun effet notable concernant la croissance de l'hypocotyle. Ils ne peuvent donc qu'être induits par la capacité de ces mutants à synthétiser des ROS, cette capacité ayant été confirmée *in vitro* dans des expériences complémentaires (**voir figure supplémentaire 3**).

Finalement nous avons analysé l'expression des gènes régulés par les cryptochromes et les ROS de la figure 3 chez les 3 mutants C-terminaux et par comparaison chez les plantules sauvages ou mutantes nulles pour CRY1 (**figure 6a**). Ces 3 mutants permettent une induction de chacun de ces 12 gènes de l'ordre de 40% par rapport aux sauvages, et de l'ordre de 150 à 200% par rapport aux mutants nuls *Cry1*. L'activité de synthèse des ROS du domaine N-terminal qui correspond au différentiel des niveaux d'expression observés entre les mutants C-terminaux et les mutants nuls est donc essentielle pour la régulation de l'ensemble de ces 12 gènes régulés par les ROS. Le fait que l'expression de ces gènes soit plus importante chez les mutants C-terminaux que chez les sauvages pourrait être dû à un mécanisme inhibiteur en C-terminal qui pourrait réguler négativement ces niveaux d'expression. Les différences d'expression observées ne sont aucunement liées à des mécanismes d'autorégulation de la concentration en protéine CRY1 dans les plantules car celle-ci est identique chez le sauvage et l'ensemble des mutants (**voir figure supplémentaire 2**). Des analyses complémentaires ont été effectuées chez des plantules mutantes d'un tryptophane pour CRY1, et présentent une réduction de

leur efficacité de photoréduction de la flavine : W400FA et B. Ces protéines mutantes sont donc également incapables de synthétiser des ROS aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ils ne régulent en aucun cas les 12 gènes étudiés dont le niveau d'expression est semblable entre ces mutants et les mutants nuls Cry1 (**figure 6b**). L'ensemble de ces résultats, concernant l'accumulation d'anthocyanes et la régulation des gènes induits par les ROS par les mutants C-terminaux pour CRY1 montrent que le domaine N-terminal possède une fonction essentielle de signalisation par les ROS, et ce grâce à la synthèse enzymatique directe de ces ROS.

4. Discussion

Au cours de nos études, nous avons étudié le rôle potentiel des cryptochromes dans la signalisation ROS. Nous avons montré qu'il y a une accumulation visible des ROS dans les noyaux suite à l'activation des cryptochromes par la lumière (**figure 2**). Ce processus coïncide avec l'induction de gènes régulés par les ROS et impliqués dans de nombreuses fonctions (**figure 3**). Les allèles mutants C-terminaux confèrent toujours la capacité à synthétiser des ROS (**figure 4 et figure supplémentaire 3**), et à réguler certaines fonctions liées au stress comme l'accumulation d'anthocyanes (**figure 5**). Et ils permettent aussi d'induire l'expression de gènes régulés par les ROS (**figure 6a**). Enfin avec une photoréduction et une synthèse de ROS fortement réduite *in vivo*, aucune induction de ces mêmes gènes n'est possible (**figure 6b**). Le domaine N-terminal seul de CRY1 étant suffisant pour induire l'expression de plusieurs gènes sensibles aux ROS que nous avons analysé dans notre étude (**He et al, 2015**). Tous ces résultats concordent avec le rôle de signalisation induit par les ROS que nous avons envisagé pour le gène CRY1, bien que de nombreuses analyses transcriptomiques supplémentaires seront nécessaires pour identifier précisément quelles voies sont régulées de manière effective par ce mécanisme.

Les mécanismes décrits jusqu'alors pour la régulation des voies de signalisation ROS par les cryptochromes semblent différents de ceux que nous venons d'identifier. Ils étaient indirects et impliquent peut-être des organites spécialisés dans la production de ROS comme les chloroplastes (**Danon et al, 2006**), ou encore par des intermédiaires de signalisation en aval des cryptochromes. Tous ces processus nécessitent un changement conformationnel et sont donc distincts de ceux qui n'impliquent que le domaine N-terminal. Il est toutefois possible que ces deux mécanismes distincts agissent de manière conjointe. Il est cependant utile de rappeler qu'en conditions normales chez des plantules sauvages d'*Arabidopsis thaliana* les cryptochromes ne devraient pas avoir d'impact majeur sur la production globale des ROS, celle-ci provenant très majoritairement des chloroplastes et des

mitochondries. La demi-vie de réoxydation des cryptochromes qui est de 5 minutes étant également très longue, elle signifie qu'une seule molécule de peroxyde d'hydrogène est synthétisée durant ce laps de temps pour une protéine donnée (**Herbel et al, 2013**). Le principal aspect des cryptochromes qui pourrait les désigner comme des acteurs centraux dans la signalisation ROS cellulaire est leur localisation nucléaire. Celle-ci pourrait leur permettre de modifier localement les équilibres redox autour d'intermédiaires de signalisation sensibles à la modification de ces équilibres (**Brandes et al, 2009**). Ainsi la faible quantité de ROS produite par les cryptochromes aurait une grande efficacité, notamment sur des partenaires protéiques potentiels des cryptochromes. Les facteurs de transcription GBF1 et MYC2 se liant aux séquences promotrices G-Box pourraient être des candidats potentiels à un tel mécanisme, car ils régulent des gènes impliqués dans le stress induit par la lumière (**Gangappa et al, 2013**). Ces protéines interagissent physiquement entre-elles (**Maurya et al, 2015**). De plus l'affinité de la protéine GBF pour la fixation à l'ADN peut être modifiée par la présence d'agents oxydants comme le H₂O₂, ce qui déclenche leur séparation avec le motif G-Box et empêche l'activation transcriptionnelle des gènes correspondants (**Shaikhali et al, 2012**). Ces protéines, par leur interaction directe ou indirecte avec l'ubiquitine ligase E3 COP1 pourraient se situer à proximité des cryptochromes qui interagissent eux-mêmes avec COP1 par l'intermédiaire d'autres facteurs comme HY5 / HLH (**Gangappa et al, 2013**). Cette proximité pourrait permettre d'amplifier l'efficacité des ROS synthétisés par les cryptochromes sur une protéine telle que GBF1 même si celle-ci n'interagit pas directement avec les cryptochromes. Le fait qu'un nombre croissant d'intermédiaires de signalisation soient reconnus comme étant régulés directement par oxydation ou réduction de leurs résidus cystéine renforce cette hypothèse (**Waszczak et al, 2014**).

Une autre conclusion qu'apporte notre étude est que le mécanisme de photomorphogénèse qui dépend de CRY1 ne peut pas être relié à la synthèse de ROS en N-terminal. Ce résultat peut être expliqué par le fait que les mutants C-terminaux, dont la synthèse des ROS par les cryptochromes reste la même, ne sont pas capable de médier cette photomorphogénèse. Par conséquent un mécanisme de changement conformationnel du domaine C-terminal, permettant des interactions protéiques stables pendant plusieurs minutes semble le plus approprié pour la signalisation. Il est donc probable que la signalisation ROS des cryptochromes par synthèse directe ait lieu à de très fortes intensités lumineuses, idéalement saturantes et sur le court terme, avant que l'homéostasie cellulaire n'intervienne. Cette hypothèse peut expliquer la raison pour laquelle aucune induction du gène FMO1 par les cryptochromes sous illumination continue en lumière blanche n'avait été détectée contrairement à nos résultats qui se sont basés sur des éclairages plus courts (**Griebel & Zeier, 2008**). D'autres études allant dans ce sens ont montré que l'induction des gènes régulés par les ROS après activation du

cryptochrome pouvait varier selon les conditions d'éclairage mais aussi selon les espèces. De fortes intensités lumineuses chez *A. thaliana* induisent l'expression de gènes liés au stress de façon dépendante aux cryptochromes, alors que des conditions d'éclairage différentes chez *Brassica* ou *Rhodobacter* n'ont montré aucune induction de l'expression de ces gènes (**Kleine et al, 2007 ; Fruhwirth et al, 2012 ; Lopez et al, 2012**).

En pratique de nombreuses contraintes environnementales telles que la température, la salinité, la sécheresse, les herbicides ou les agents pathogènes induisent la formation de ROS qui à leur tour déclenchent les mécanismes de défense des plantes. Ces contraintes sont souvent à l'origine de lourdes pertes économiques. Il est cependant avéré aujourd'hui que la production de ces ROS n'est que transitoire et a principalement lieu au début des conditions de stress. Or plusieurs études ont démontré qu'une préexposition à cette production intense de ROS à un seuil inférieur que celui atteint lors du stress en lui-même permettait de déclencher une fonction protectrice, et ainsi immuniser les plantes aux contraintes environnementales futures. Ce mécanisme est connu sous le nom de tolérance au stress par acclimatation (**Dat et al, 2000 ; Bhattacharjee S, 2012 ; Apel & Hirt, 2004**). Les cryptochromes, par leurs propriétés, pourraient être des cibles idéales pour de telles interventions. Plusieurs de leurs paramètres cinétiques pour la synthèse directe des ROS étant connus, il serait possible d'obtenir une concentration en ROS désirée dans le compartiment nucléaire par simple contrôle de l'éclairage. De manière concrète on peut envisager l'utilisation de pulses de lumière bleue durant la nuit, sans pour autant interrompre le cycle jour/nuit des plantes, car c'est pendant la nuit que le stress oxydant d'origine environnementale est le moins important. Ces pulses pourraient néanmoins être suffisants pour déclencher les mécanismes de défense des plantes. La réponse des cryptochromes à la lumière pourrait ainsi devenir un nouvel outil optogénétique pour accroître la productivité de nombreuses plantes cultivées sans utiliser de molécules chimiques et pour un coût minimal.

Ma contribution à cet article :

- Observations des apex racinaires au microscope à fluorescence.
- L'identification de nombreux mutants pour CRY1 chez *A. thaliana*, dont les mutants R611K, E623K, E652K et W145-STOP. J'ai également réalisé plusieurs constructions plasmidiques pour obtenir les plantules mutantes W400F d'*A. thaliana*.
- J'ai également participé à l'obtention des spectres ainsi qu'à la détection des ROS *in vitro*, en réalisant des constructions plasmidiques qui ont servi à exprimer les protéines mutantes en cellules d'insecte Sf21 afin de pouvoir les purifier puis les analyser.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Blue-light induced biosynthesis of ROS contributes to the signaling mechanism of *Arabidopsis* cryptochrome

Mohamed El-Esawi^{1,2}, Louis-David Arthaut³, Nathalie Jourdan³, Alain d'Harlingue¹, Justin Link³, Carlos F. Martino⁴ & Margaret Ahmad^{2,3}

Cryptochromes are evolutionarily conserved blue light receptors with many roles throughout plant growth and development. They undergo conformational changes in response to light enabling interaction with multiple downstream signaling partners. Recently, it has been shown that cryptochromes also synthesize reactive oxygen species (ROS) in response to light, suggesting the possibility of an alternate signaling mechanism. Here we show by fluorescence imaging and microscopy that H₂O₂ and ROS accumulate in the plant nucleus after cryptochrome activation. They induce ROS-regulated transcripts including for genes implicated in pathogen defense, biotic and abiotic stress. Mutant cryptochrome alleles that are non-functional in photomorphogenesis retain the capacity to induce ROS-responsive phenotypes. We conclude that nuclear biosynthesis of ROS by cryptochromes represents a new signaling paradigm that complements currently known mechanisms. This may lead to novel applications using blue light induced oxidative bursts to prime crop plants against the deleterious effects of environmental stresses and toxins.

Cryptochromes are blue light sensing receptors that regulate multiple processes of plant growth and development, including photomorphogenesis, de-etiolation, flowering initiation, stress response, and hormone signaling^{1–3}. They are localized in the nucleus and function both directly and indirectly as core regulators of more than 20% of total cellular transcripts^{4–6}. Structurally, cryptochromes are flavoproteins consisting of a conserved N-terminal light sensing domain (designated the PHR domain) and a less well-conserved C-terminal domain (designated CCE) of variable length that is important for nuclear localization and signaling⁷. Upon illumination, *Arabidopsis* cryptochromes interact with protein partners including phytochromes (PhyA and PhyB), the WD-repeat protein SPA1, the E3 ubiquitin ligase COP1, and bHLH transcription factors CIB^{1,2}, PIF3 and PIF4^{8,9} which have a signaling role in photomorphogenesis or flowering initiation. Most of these partners attach to the PHR domain and release the CCE domain from the protein surface^{10,11}. The ensuing suppression of COP1/SPA1-regulated degradation of transcription factors, such as HFR1 and HY5/HYH, results in photomorphogenesis and interaction with a large network of phytochrome, hormone, and stress signaling pathways^{12–15}.

Recently, it has been reported that plant cryptochromes release reactive oxygen species (ROS) including hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide (O₂^{•−}) subsequent to illumination^{16,17}. This follows from reoxidation of the bound flavin cofactor from the light activated radical (FADH[•]) or reduced (FADH[−]) redox state back to the oxidized (FADox) resting dark-adapted state¹⁸. ROS are damaging byproducts of metabolism originating in the chloroplasts, peroxisomes or mitochondria. They are also induced by several environmental stresses and function as core regulators of cellular processes including stress tolerance, root growth, senescence, hormonal responses, pathogen defense, defense mechanisms against ROS and induction of ROS scavenging pathways^{19–22}.

Intriguingly, cryptochromes have been indirectly implicated in a variety of ROS signaling pathways including defensive responses to singlet oxygen, high light stress, and apoptosis^{23,24}. There is furthermore considerable overlap in genes regulated by ROS and by cryptochromes in microarray studies^{24–27}. Some of these effects result from

¹UMR CNRS 8256 (B2A), IBPS, Université Paris VI, Paris, 75005, France. ²Botany Department, Faculty of Science, Tanta University, 31527, Tanta, Egypt. ³Department of Physics, Xavier University, Cincinnati, Ohio, 45207, USA. ⁴Department of Biomedical Engineering, Florida Institute of Technology, Melbourne, FL, 32901, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.A. (email: margaret.ahmad@upmc.fr)

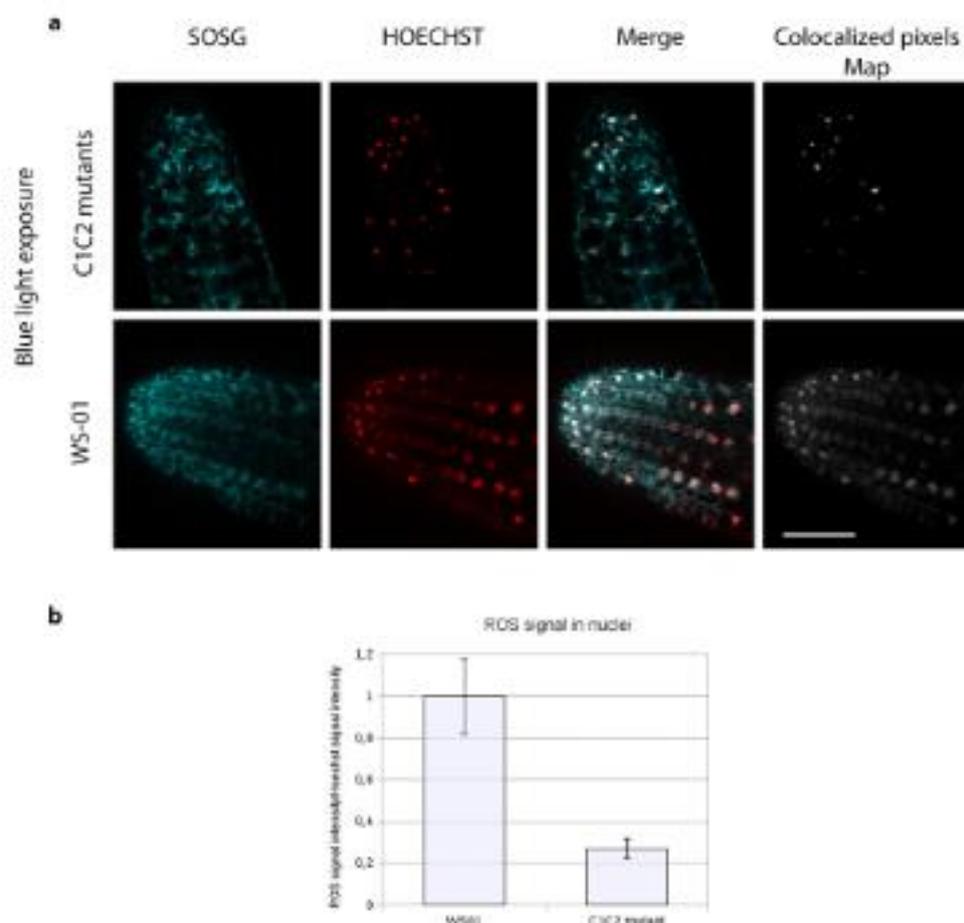


Figure 2. Production and subcellular localization of ROS in Cryptochrome-1 overexpressing (WS01) and double mutant *cry1cry2* (C1C2) seedlings exposed to blue light. Primary root tips from 8-day old etiolated Arabidopsis seedling (see methods) roots either lacking both *cry1* and *cry2* (C1C2 mutant) or over-expressing cryptochrome 1 (WS01) were treated with HOECHST for nuclear staining and SOSG for ROS staining for 30 minutes, exposed to blue light for 10 minutes, and then immediately viewed by a Zeiss AxioImager.Z1/ApoTome microscope. (a) Images show single z section that cross the nucleus. Colocalized pixels appear in white on the merged images and on the colocalized pixels maps. Scale bars are 25 μm . (b) using the segmentation and ROI manager tool on imageJ, fluorescence intensity of white and red pixels were quantified from these images for each nucleus and exported to LibreOffice calculator. The mean fluorescence intensity of >50 individual nuclei is shown.

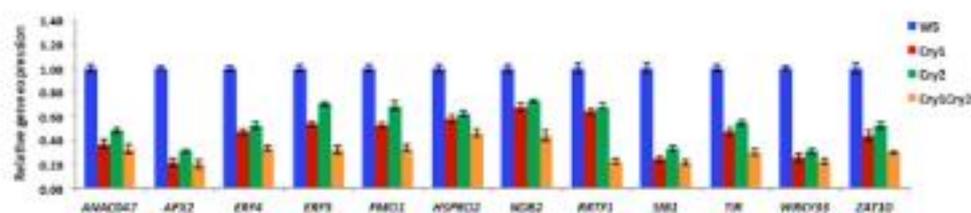


Figure 3. Effect of cryptochrome on transcription of representative ROS-regulated genes. Quantitative real-time PCR indicating the relative expression of twelve ROS-responsive genes investigated in WS (wild type), *cry1*, *cry2*, and *cry1 cry2* mutant seedlings. All seedlings were null mutants (absence of protein)²⁰. Four-day-old dark-grown seedlings were transferred to blue light ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 3 h. prior to RNA extraction and qPCR analysis. Three replicates (biological) were used to compute bar errors (representing the S.D.).

blue light. No changes in expression were observed in the dark (Supplementary Fig. 1). Interestingly, expression is lower in either *cry1* and *cry2* single mutant seedlings as well, indicating that both proteins contribute towards a threshold of signal required for the transcriptional response.

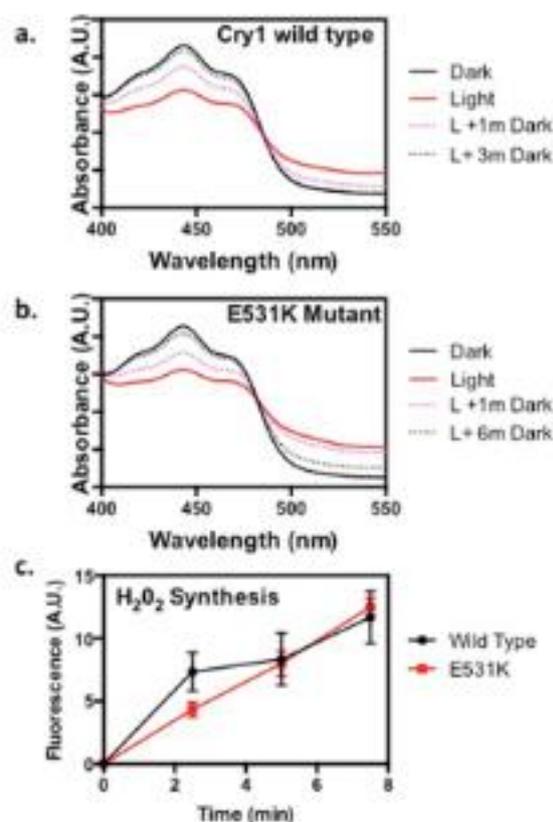


Figure 4. C-terminal point mutant of *Arabidopsis cry1* retains light response and ROS biosynthetic capacity. Wild type (a) and E531K (b) mutant proteins were expressed and purified from baculovirus expression system as previously described³⁷. 'Dark' shows spectra of isolated proteins prior to illumination. 'Light' indicates spectra after photoreduction for 30 seconds at $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ blue light in the presence of 5 mM DTT. Samples were subsequently returned to dark and spectra taken at the indicated times (in min). (c). 100 micromolar concentration of proteins were illuminated at $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ blue light and aliquots taken at the indicated time for detection of ROS by AMPLEX RED fluorescence detection method as described³⁸. Aliquots were taken at the indicated times. Error bars represent SD of three independent measurements.

Cryptochromes have been shown to undergo structural change in response to light, which allow their interaction with a number of downstream signaling partners leading to biological function^{1,2}. This light-induced conformational change is essential for photomorphogenesis^{2,12–15} and appears also to contribute to the role of cryptochrome in ROS signaling^{23–28}. To resolve the question of whether direct biosynthesis of ROS by cryptochromes may by itself play a signaling role independently of conformational change, we analysed the biological activity of mutant alleles of CRY1 which had amino acid substitutions at their C-terminal (CCE) domain. Several such mutants had been previously described as inactive in hypocotyl growth inhibition and anthocyanin accumulation^{35–39}, and as such can be concluded to be unable to undergo conformational change and partner protein interactions necessary for photomorphogenesis. To confirm that mutation of the C-terminal domain does not also affect light sensitivity or the formation of reactive oxygen (ROS) by the PHR domain of cryptochrome, we analysed protein from a mutant allele E531K³⁴ which has a point mutation in the CCE domain outside of the region required for nuclear localization³⁶. The recombinant E531K mutant protein was expressed and purified from a baculovirus expression system by established methods³⁵, and compared to wild type AtCry1 for *in vitro* light sensitivity and flavin photoreduction. The mutant protein was comparable to the wild type AtCry1 both in the ability to undergo flavin photoreduction and the time course of reoxidation from the radical (FADH[•]) state back to the oxidized (FAD) inactive redox state (Fig. 4a,b). We further tested the ability of the mutant protein to synthesise H₂O₂ in response to light, which was observed to be comparable to wild type (Fig. 4c). These data indicate that mutation within the C-terminal domain does not significantly affect cryptochrome photochemistry or the ability to synthesise ROS, and that reported loss of function in photomorphogenesis³⁴ is most likely due to inability to undergo light dependent conformational change.

To determine whether these mutant alleles retain the ability to mediate ROS signaling, we analysed the effect of amino acid substitutions in the C-terminal domain of CRY1 on responsiveness to stress and ROS regulated gene expression. We chose only C-terminal point mutant alleles of AtCry1 for analysis (R611K, E623K and E652K) which were located outside of any known functional region for signaling *in vivo*, including the nuclear localization region³⁶ and residues of the C-terminal implicated in phosphorylation³⁷. These alleles all showed levels of protein expression similar to wild type (Supplementary Fig. 2) For comparison purposes, a null mutant allele lacking detectable protein (W145 – STOP) was used as a control in addition to the *cry1* reference allele (*hy4-3*),

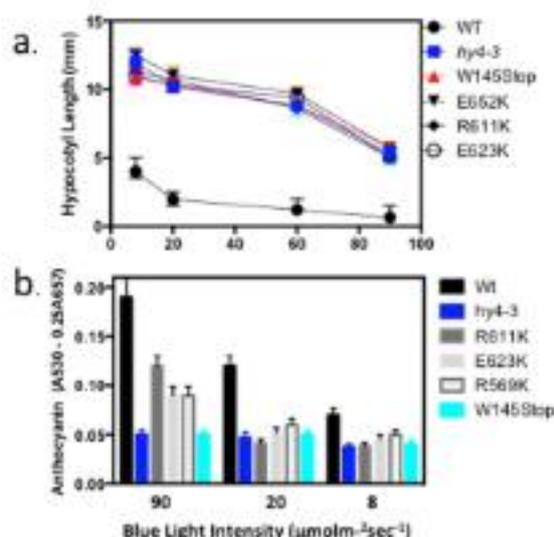


Figure 5. Phenotypes of cryptochrome C-terminal point mutants. Wild type and mutant alleles were grown for seven days on petri plates at the indicated light fluence (upper panel) and hypocotyl length of seedlings was measured. Error bars represent SD of measurement from 10 seedlings. Anthocyanin accumulation was determined as described³⁵, error represents SD of three independent measurements.

which also shows no detectable protein expression²⁹. We first analysed these mutant alleles for hypocotyl growth inhibition at a range of blue light intensities (Fig. 5a, upper panel). All mutant alleles showed impairment in hypocotyl growth inhibition at blue light intensities ranging from 2 to 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. These results indicate that all CRY C-terminal mutant alleles were biologically inactive for photomorphogenesis in spite of the fact that mutations in the C-terminal domain do not impede the capacity to synthesise ROS (Fig. 4). These results are consistent with a role for the C-terminal domain in inducing conformational change and interaction with signaling partners for these responses.

Anthocyanin accumulation is a highly regulated process occurring at the interface of numerous plant signaling pathways including photomorphogenesis. It is a consequence of both phytochrome and cryptochrome action. It is controlled by many of the same signaling intermediates that are implicated in other aspects of photomorphogenesis such as hypocotyl growth inhibition, such as HY5/HLH and COP1³⁶. However, anthocyanin accumulation also occurs more specifically in response to multiple forms of stress, and we therefore investigated whether C-terminal mutants of Cry1 which continue to synthesise ROS may also retain some capacity to regulate this response (Fig. 5b). Indeed, the levels of anthocyanin were substantially reduced in all *cry1* mutant alleles in response to moderate intensities of blue light (at either 8 or 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), consistent with previous reports^{34,35}. However, at higher blue light intensity (90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), anthocyanin accumulation in the C-terminal mutant alleles R611K, E623K and E652K was significantly enhanced as compared to both of the null mutant alleles (Fig. 5b). These effects were not due to any overall partial activity (leakiness) of these C-terminal mutants, since there is no corresponding differential response in inhibition of hypocotyl elongation at any of these blue light intensities (Fig. 5a). These results indicate that *cry1* mutants retaining the ability to synthesise ROS are also partially active in mediating anthocyanin accumulation under conditions of elevated stress (high light).

Finally, we analysed the C-terminal point mutant alleles for their ability to induce ROS regulated gene expression characterized in Fig. 3, as all of these mutants are flavin bound and synthesise ROS as isolated proteins *in vitro* (Fig. 4, see also Supplementary Fig. 3). As can be seen, all three C-terminal point mutant alleles R611K, E623K, and E652K induced the expression of ROS regulated genes in response to blue light (Fig. 6a). This was the case moreover for each of the twelve chosen target genes, which have been implicated in several distinct and independent ROS-regulated response pathways (see Fig. 3). Interestingly, levels of induced gene expression were in some cases even somewhat enhanced in these Cry mutant alleles as compared to wild type, although levels of Cry protein expression in all of the mutants was the same (Supplementary Fig. 2). This may have been due to mechanisms of homeostasis via conformational change in which the C-terminal mutants were deficient. Taken together with the results for anthocyanin accumulation (Fig. 5), these data show that C-terminal mutants of cryptochrome which have lost the ability to undergo conformational change nonetheless retain ROS signaling function.

Discussion

In this work, we have addressed the important question of how cryptochromes interact with ROS signaling pathways in response to oxidative stress. We show that there is a visible accumulation of ROS in *Arabidopsis* seedlings as a result of cryptochrome activation by light (Fig. 2). This occurs also in the nucleus, and coincides with the rapid induction of ROS-regulated genes implicated in a number of different cellular response pathways (Fig. 3). Significantly, cryptochrome C-terminal mutant alleles that are impaired in normal light regulated conformational change and photomorphogenesis still retain the ability to synthesise ROS (Fig. 4 - See also Supplementary

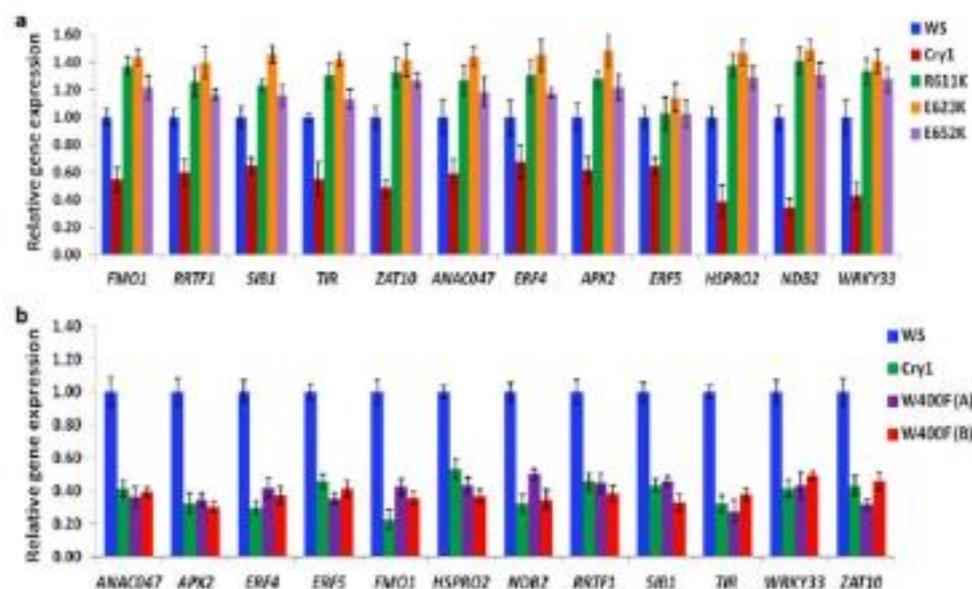


Figure 6. (a) C-terminal point mutants retain ability to induce ROS regulated gene expression. qPCR showing the relative expression of 12 ROS-responsive genes investigated in WS (wild type), Cry1 (null allele), and the indicated C-terminal point mutant seedlings. Four-day-old dark-grown seedlings were transferred to blue light ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 3 h. prior to RNA extraction and qPCR analysis. Data are from three biological replicates $n = 3$; error bars indicate \pm SD. No differences in expression were noted in dark grown seedlings without blue light treatment (supplementary Fig. 1). (b) Expression of ROS regulated genes in Trp triad W400F mutant Arabidopsis seedlings. qPCR shows expression of 12 ROS regulated genes in wild type (Ws), cry1 mutant, and expressing W400F Trp triad mutants (lines A and B - see Supplementary Fig. 3 for levels of mutant protein expression). No effect on gene expression is observed for the control cry mutant alleles. Data are from 3 biological replicates ($n = 3$), error bars indicate SD.

Fig. 3). These mutant alleles likewise retain partial activity in the regulation of stress response such as anthocyanin accumulation (Fig. 5). They furthermore retain an active signaling role in the induction of ROS-responsive genes (Fig. 6a). We note that seedlings expressing a mutation in the Trp triad residue W400F, which shows partial deficiency of flavin photoreduction *in vivo*³, and thereby deficiency in biosynthesis of ROS, did not induce ROS responsive genes (Supplementary Fig. 2, Fig. 6b). Furthermore, seedlings overexpressing solely the N-terminal flavin binding domain of CRY1 reportedly induced many of the ROS responsive genes characterized in our study²⁷. All of these data are therefore consistent with light dependent biosynthesis of ROS by cryptochrome as a possible signaling mechanism in the cases we have documented. Further transcriptome analysis will be required in order to clarify the number of cellular signaling pathways and the extent to which this mechanism may hold true.

The ROS signaling effects documented here in the C-terminal Cry1 mutant alleles appear to operate by distinct mechanisms than those described in previous reports of response to ROS in which cryptochromes have been implicated^{23,28}. The previous studies show cryptochrome are implicated in ROS signaling pathways by indirect mechanisms involving regulation of singlet oxygen production by the chloroplast²³ or by interaction with COP1 and transcription factors such as HY5/HYH which act downstream of cryptochromes in photomorphogenesis and plant growth. These processes require conformational change by cryptochromes which are lacking in C-terminal mutants of Cry1 (Fig. 4a). Therefore, blue-light induced signaling by C-terminal mutants likely involves direct synthesis of ROS and must function additively with, and act in a complementary manner, with the known signaling mechanism involving blue-light dependent conformational change.

Despite their capacity to synthesize ROS, cryptochromes would not be predicted to have a great impact on overall ROS biosynthesis in the cell; certainly nothing comparable to other sources of ROS such as in the plastid and mitochondria. This is because the cryptochrome photocycle is relatively slow, with a half-life of the reduced flavin state of several minutes²⁹. Therefore, over several minutes, only a few molecules of ROS would be synthesized per cryptochrome even under saturating blue light conditions. Nonetheless, a unique feature of cryptochromes that is not present in other generators of ROS is their nuclear localization and potential proximity to redox sensitive signaling intermediates. This can greatly increase the effective concentration of ROS induced by blue light, as the most likely targets of ROS synthesised by cryptochromes may be transcription factors or other signaling intermediates to which they are in close proximity²⁷.

One likely substrate, would be the family of G-Box binding transcription factors including GBF1 and MYC2, which are known to bind promoter elements related to high light stress signaling³⁰. G-box binding factors are negative regulators of transcription whose binding affinity to DNA is shown to be greatly impaired by the presence of H_2O_2 , resulting in their release from these promoters and subsequent induction of transcription³⁰. G-box binding transcription factors are localized in close proximity to cryptochrome in the nucleus, as both are bound either

directly or indirectly to the core regulator COP1 (E3 ubiquitin ligase)^{2,30}. Since cryptochromes bind to COP1 independently of light, they would be in permanent close proximity to the G-box binding family of transcription factors, which bind to COP1 through the intermediary of HY5/HLH transcription factors^{30,40}. Therefore, a pulse of blue light illumination would provide a localized burst of H₂O₂ sufficient to induce a transcriptional response from GBF-regulated promoters. Along these lines, biosynthesis of ROS by cryptochromes may contribute to its signaling role simply by increasing the local concentration of ROS near transcription factors to which cryptochromes have not been reported to bind directly, but which are assembled into the same complexes. Recent studies indicating a multiplicity of signaling molecules that are regulated directly by oxidation/reduction at cysteine residues greatly adds to the potential signaling substrates of cryptochromes⁴¹.

During photomorphogenesis, the predominant cryptochrome signaling mechanism is that involving conformational change and interaction with downstream signaling partners such as COP1 and SPA1. This is evident from the fact that mutants at the C-terminal domain completely abolish photomorphogenesis under normal plant growth conditions even though they can still synthesize ROS (see Fig. 4). This is consistent with the fact that, under steady state conditions, ROS levels are not primarily determined by environmental conditions (such as high light intensity) but rather by the interplay between the ROS producing and ROS-scavenging pathways, leading to a tightly regulate redox state equilibrium³⁰. Given this process of redox homeostasis, induction of ROS through cryptochrome activation would not be expected to change intracellular levels of ROS under steady state, long-term growth conditions. Furthermore, under subsaturating light conditions, the efficacy of ROS formation as a signaling mechanism is doubtful as the quantum yield of the receptor is relatively low³³, so that a mechanism of conformational change, wherein the activated form of cryptochrome is stable over a period of at least several minutes³⁸ is the optimal signaling mechanism. As a result direct induction of ROS signaling pathways through cryptochrome is likely to occur primarily under short-term illumination at high light intensities, both to ensure saturating light intensities for cryptochrome-dependent ROS biosynthesis and to evade eventual cellular ROS scavenging and downregulation mechanisms. As a validation of this prediction, we observe that under the short term, high intensity illumination conditions used in this study we have observed robust cryptochrome-dependent induction of the ROS regulated FMO1 gene (involved in pathogen defense – Figs 3 and 6), whereas in prior studies carried out under continuous illumination in white light with this same gene there was no reported evidence for cryptochrome control²². Along these lines, transcriptome analyses of cryptochrome dependent gene expression under high light shows preponderance of stress regulated transcripts in *Arabidopsis*²⁴, whereas different illumination conditions have not shown significant up-regulation of ROS responsive genes as a result of cryptochrome activation in *Rhodobacter*⁴² or in *Brassica*⁴³, for example, although the converse appear to be true for tomato⁴⁴.

From a practical perspective, almost all environmental stresses leading to economic loss such as extremes of temperature, salinity, drought, heavy metals, herbicides and pathogens involve formation of ROS, with concomitant induction of plant defense and protective mechanisms. The increase in ROS are generally transient and occur at the onset of the stress. Intriguingly, a number of studies have shown that pre-exposure to subthreshold levels of an “oxidative burst” can actively trigger a protective function or immunize plants against subsequent environmental stresses, a process known as acclamatory stress tolerance^{45–47}. Cryptochromes are therefore ideal targets for such interventions. They can be completely photoreduced within less than a minute of illumination at light intensities which can be regulated to achieve desired levels of ROS directly within the nuclear compartment. Thus, a series of appropriately spaced blue light pulses can be delivered in the course of a night break which are sub-threshold in terms of inducing any form of oxidative damage or interrupting plant sleep/wake cycles, but sufficiently strong to induce desired plant defense mechanisms against selected environmental stress. Manipulation of cryptochrome responses may thereby become a new optogenetic tool to improve crop plant productivity at minimal cost and without chemical intervention.

Materials and Methods

Seedlings and plant growth conditions. All *Arabidopsis* seedlings were of ecotype WS. *Cry1* (*hy4-3*) and *cry2* mutant reference alleles²⁸ lacked detectable protein. Other mutant alleles were either as previously described^{34,35} or screened and sequenced from genetic screens for blue light insensitive mutants as in ref.²⁵. All seedling growth was on agar petri plates at 1/2xMS salts, 2% sucrose, pH 6.0, 0.8% agar. Seeds were sterilized as in ref.²⁸, plated, retained at 4 °C for two days, then allowed to germinate for 24 hours in red light before being returned to darkness or the test light condition. Hypocotyl growth and anthocyanin content was measured as previously described²⁵.

Imaging Experiments. 10 plantlets (8–10 days old etiolated seedlings) were used per experiment and incubated in 2 ml of 200 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) comprising 2 μ L HOECHST reagent (10 μ M, Thermo Scientific), 2 μ L DMSO (5 μ M, Sigma -Aldrich) and 4 μ L of SOSG (10 μ M, Molecular Probes) for 30 minutes in the dark at room temperature. Plantlets were then rinsed 4 times in potassium phosphate buffer (200 mM), then exposed either to dark or to saturating blue light (900 μ m m⁻² s⁻¹) for 10 minutes and observed immediately with a Zeiss AxioImager.Z1/ApoTome microscope using a 20X objective, excitation/emission 350 nm/460–490 for HOECHST and 372/395–416 for SOSG reagent. Z-series were performed with a z-step of 1.5 μ m. For quantification, the images were captured using a CCD-camera. Single z section were analysed for colocalization on ImageJ software (W. S. Rasband, ImageJ). Briefly, colocalized pixels were obtained by using colocalization color map plugging. Red structures on Hoechst images have been segmented to define each nucleus as a region of interest (ROI), then by using ROI manager tool, integrated density of cyan and red signal have been quantified for each ROI and exported to LibreOffice calculator.

Quantitative RT-PCR analysis. The seedlings of *Arabidopsis thaliana* wild-type (WS), *CRY1* null mutant, *CRY2* mutant, *CRY1-CRY2* double mutant and C-terminal mutants of *Arg611Lys*, *Glu623Lys* and *Glu652Lys* were grown and germinated as described above. Four-day-old dark-grown seedlings were transferred to blue light ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 3 h or kept in dark. Seedlings were then collected and ground with liquid nitrogen. Total RNA was isolated using RNeasy Plant kit (Qiagen), and the first-strand cDNA synthesis was done using a Reverse Transcription Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. qRT-PCR was performed using a SYBR Green PCR kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. All qRT-PCR reactions were amplified as follows: 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 57 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. The expression levels were determined and normalized to the *UBIQUITIN (UBQ1)* expression using the comparative $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. Primers of the 12 ROS genes used for gene expression analysis are listed in Supplementary Table 1.

Protein Expression, extraction, and ROS detection. All methods were as previously described¹⁵. Briefly, the mutant allele E531K of *cry1* was cloned into the pBakPak9 baculovirus expression vector (Clontech, inc.) including the presence of a 6 amino acid HIS tag at the N-terminus. The vector was transfected into Sf21 insect cell cultures and protein expression carried out according to the manufacturer's instructions. Recombinant protein was isolated over a nickel affinity column as described¹⁵. Concentration of protein used in the experiments was between 30–50 micromolar. Photoreduction experiments were performed in a buffer of 50 mM NaPO_4 pH 7.5, 5 mM DTT at 18 °C. Subsequent to illumination, spectra were taken in a Cary Scan 300 UV/Vis spectrophotometer. For detection of ROS, samples of wild type *Cry1* and E531K mutant proteins at the identical concentration were illuminated in a buffer of 50 mM NaPO_4 pH 7.5 maintained on ice. Illumination was at $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in the absence of reducing agents. Aliquots were taken at the indicated times (Fig. 4) and frozen in liquid nitrogen. At the conclusion of the time course, samples were thawed and aliquots tested using the Amplex Red fluorescence detection system (Molecular Bioprobes) to determine the concentration of H_2O_2 as described¹⁵.

References

- Ahmad, M. Photocycle and signaling mechanisms of *Arabidopsis* cryptochromes. *Current Opinions in Plant Biology* **33**, 108–115 (2016).
- Liu, B. *et al.* Signaling mechanisms of plant cryptochromes in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* **129**, 137–148 (2016).
- Sancar, A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem. Rev.* **103**, 2205–2237 (2003).
- Ma, L. *et al.* Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *The Plant Cell* **13**, 2589–2607 (2001).
- Jiao, Y., Liu, C. S. & Deng, X. W. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics* **8**, 217–230 (2007).
- Phee, B. K. *et al.* Comparative proteomic analysis of blue light signaling components in the *Arabidopsis* cryptochrome 1 mutant. *Molecular Cell* **23**, 154–160 (2007).
- Chaves, L. *et al.* The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Ann. Rev. Plant. Biol.* **62**, 335–364 (2011).
- Podmale, U. V. *et al.* Cryptochromes Interact Directly with PIPs to Control Plant Growth in Limiting Blue Light. *Cell* **164**, 233–45 (2016).
- Ma, D. *et al.* Cryptochrome 1 interacts with PIP4 to regulate high temperature-mediated hypocotyl elongation in response to blue light. *Proc Natl Acad Sci USA*. **113**, 224–9 (2016).
- Kondoh, M. *et al.* Light-induced conformational changes in full-length *Arabidopsis thaliana* cryptochrome. *J. Mol. Biol.* **413**, 128–137 (2011).
- Pietch, C. L. *et al.* Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor. *Biochemistry* **44**, 3795–3805 (2005).
- Osterlund, M. Y., Hardtke, C. S., Wei, N. & Deng, X. W. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* **405**, 462–466 (2000).
- Lian, H. L. *et al.* Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism. *Genes & Development* **25**, 1023–1028 (2011).
- Duck, P. D., Elmer, M. V., van Oosten, V. R. & Pankhauwer, C. The degradation of HPR1, a putative bHLH class transcription factor involved in light signaling, is regulated by phosphorylation and requires COP1. *Current Biology* **14**, 2296–2301 (2004).
- Liu, B., Zhu, Z., Liu, H., Liu, X. & Lin, C. *Arabidopsis* cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. *Genes & Development* **25**, 1029–1034 (2011).
- Consentino, L. *et al.* Blue-light dependent reactive oxygen species formation by *Arabidopsis* cryptochrome may define a novel evolutionarily conserved signaling mechanism. *New Phytol.* **206**, 1450–62 (2015).
- Jourdan, N. *et al.* Blue-light dependent ROS formation by *Arabidopsis* Cryptochrome-2 may contribute towards its signaling role. *Plant Signaling & Behavior* **10**, e1042647 (2015).
- Muller, P. & Ahmad, M. Light activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception. *J. Biol. Chem.* **286**, 21033–21040 (2011).
- Bhattacharjee, S. The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants *Journal of Botany* **985298**, 10.1155 (2012).
- Dietz, K. J., Mittler, R. & Noctor, G. Recent Progress in Understanding the Role of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Signaling. *Plant Physiology* **171**, 1535–1559 (2016).
- Xia, X. J. *et al.* Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **66**, 2839–56 (2015).
- Brandes, N., Schmitt, S. & Jakob, U. Thiol-Based Redox Switches in Eukaryotic Proteins. *Antioxid. Redox Sign.* **11**, 997–1014 (2009).
- Danon, A., Coll, N. S. & Apel, K. Cryptochrome-1-dependent execution of programmed cell death induced by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 17036–17041 (2006).
- Kleine, T., Kindgren, P., Benedict, C., Hendrickson, L. & Strand, Å. Genome-wide gene expression analysis reveals a critical role for CRY1/UCYR/OME1 in the response of *Arabidopsis* to high irradiance. *Plant Physiol.* **144**, 1391–1406 (2007).
- Robertis, M. R. & Paul, N. D. Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pests and pathogens. *New Phytologist* **170**, 677–699 (2006).
- Chen, D. *et al.* Antagonistic basic helix-loop-helix/bZIP transcription factors form transcriptional modules that integrate light and reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 1657–75 (2013).
- Jiao, Y., Ma, L., Strickland, E. & Deng, X. W. Conservation and divergence of light-regulated genome expression patterns during seedling development in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 3239–56 (2005).
- Ahmad, M. *et al.* Action spectrum for cryptochrome-dependent hypocotyl growth inhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **129**, 774–785 (2002).

29. Laloi, C. *et al.* Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 672–677 (2007).
30. Müller, G., Shulaev, V. & Mittler, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol. Plant.* **133**, 481–489 (2008).
31. Mehterov, N. *et al.* Oxidative stress provokes distinct transcriptional responses in the stress-tolerant *atr7* and stress-sensitive *loh2* *Arabidopsis thaliana* mutants as revealed by multiplexed quantitative real-time PCR analysis of ROS marker and antioxidant genes. *Plant Physiology and Biochemistry* **59**, 20e29 (2012).
32. Griebel, Y. & Zeiger, J. Light Regulation and Daytime Dependency of Inducible Plant Defenses in *Arabidopsis*: Phytochrome Signaling Controls Systemic Acquired Resistance Rather Than Local Defense. *Plant Physiology* **147**, 790–801 (2008).
33. Procopio, M. *et al.* Kinetic modeling of the *Arabidopsis* cryptochrome photocycle: PADH⁺ accumulation correlates with biological activity. *Frontiers in Plant Science* **28**(7), 888, <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00888>. (2016).
34. Shalitin, D., Yu, X., Maymon, M., Mockler, T. & Lin, C. Blue Light-Dependent *In Vivo* and *In Vitro* Phosphorylation of *Arabidopsis* Cryptochrome 1. *Plant Cell* **15**, 2421–2429 (2003).
35. Ahmad, M., Lin, C. & Cashmore, A. Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *Plant Journal* **8**, 653–658 (1995).
36. Yu, X. *et al.* Downregulation of the NC80 motif is critical for the photoactivation of *Arabidopsis* CRY2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7289–94 (2007).
37. He, H. *et al.* The CNT1 Domain of *Arabidopsis* CRY1 Alone Is Sufficient to Mediate Blue Light Inhibition of Hypocotyl Elongation. *Mol. Plant* **8**, 822–5 (2015).
38. Herbol, V. *et al.* Lifetimes of *Arabidopsis* cryptochrome signaling states *in vivo*. *Plant J.* **74**, 583–592 (2013).
39. Gangappa, S. N., Srivastava, A. K., Maurya, J. P., Ram, H. & Chattopadhyay, S. Z-Box Binding Transcription Factors (ZBPs): A New Class of Transcription Factors in *Arabidopsis* Seedling Development. *Molecular Plant* **6**, 1758–1768 (2013).
40. Shaikhal, J. *et al.* Redox-mediated mechanisms regulate DNA binding activity of the G-group of basic region leucine zipper (bZIP) transcription factors in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **287**, 27510–25 (2012).
41. Waszczak, C. *et al.* Sulfenome mining in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 11545–50 (2014).
42. Fruhwirth, S., Tösch, K. & Klug, G. Effects of the Cryptochrome CryB from *Rhodospirillum rubrum* on Global Gene Expression in the Dark or Blue Light or in the Presence of Singlet Oxygen. *PLoS* **7**, e33791 (2012).
43. Sharma, P., Chatterjee, M., Burman, N. & Khurana, J. P. Plant Cryptochrome 1 regulates growth and development in *Brassica* through alteration in the expression of genes involved in light, phytohormone and stress signalling. *Plant Cell and Environment* **37**, 961–977 (2014).
44. Lopez, L. *et al.* Tomato plants overexpressing cryptochrome 2 reveal altered expression of energy and stress-related gene products in response to diurnal cues. *Plant Cell Environ.* **35**, 994–1012 (2012).
45. Dat, J. *et al.* Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 779–795 (2000).
46. Bhattacharjee, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science* **89**, 1115–1121 (2005).
47. Apel, K. & Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373–399 (2004).
48. Bouly, J. P. *et al.* Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *J. Biol. Chem.* **282**, 9385–9391 (2007).

Acknowledgements

We are grateful to Adam Purvis, Derek Burdick and Dorothy Engle for assistance with protein experiments, and to Eloise Fort, Victoire Fort, Catherine Arieira, Colombine Frey, Pierre-Etienne Bouchet and Jacques Witzczak for mutant screening and excellent technical support. Funding was from AFOSR (FA9550-14-0-0409) to M. Ahmad and C. Martino and NSF IRES 1658640 to J. Link.

Author Contributions

M.E.: performed experiments, designed experiments, wrote paper; L.D.A.: performed experiments, wrote paper; N.J.: performed experiments, A.D.: performed experiments, J.L.: performed experiments; C.E.M.: performed experiments, wrote paper; M.A.: performed experiments, designed experiments, wrote paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13832-z>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Supplementary Information.

Blue-light induced biosynthesis of ROS contributes to the signaling mechanism of *Arabidopsis* cryptochrome.

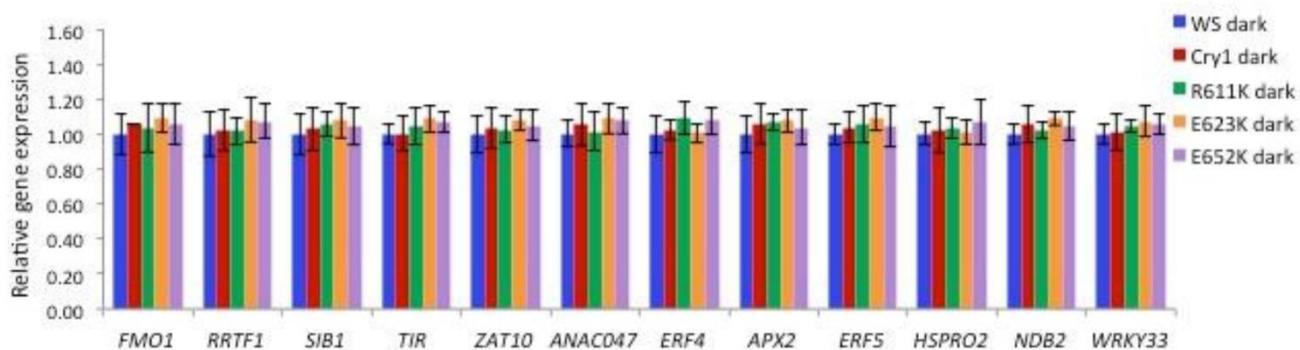
Mohamed El-Esawi^{1,2}, Louis-David Arthaut¹, Nathalie Jourdan¹, Alain d'Harlingue¹, Justin Link³, Carlos F. Martino⁴ and Margaret Ahmad^{1,3*}.

¹ UMR CNRS 8256 (B2A), IBPS, Université Paris VI, Paris, 75005 France.

² Botany Department, Faculty of Science, Tanta University, 31527 Tanta, Egypt.

³ Department of Physics, Xavier University, Cincinnati, Ohio, 45207, U.S.A.

⁴ Department of Biomedical Engineering, Florida Institute of Technology, Melbourne, FL 32901 U.S.A.



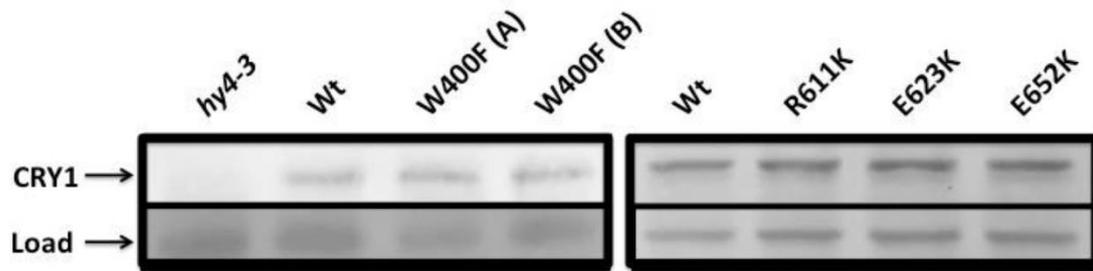
Supplementary Figure 1. Expression of ROS regulated genes in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. Quantitative real-time PCR shows expression of 12 ROS regulated genes in wild type (Ws) and cry1 mutant alleles in 4-day old dark-grown seedlings. No effect on gene expression is observed for any of the cry mutant alleles. Data are from 3 biological replicates (n=3), error bars represent S.D.

Supplementary Table 1. List of primers used in the current study

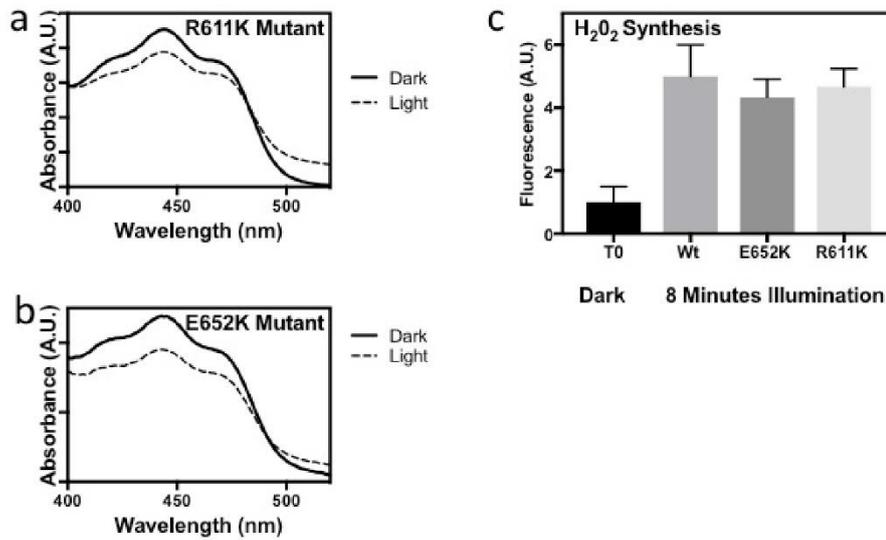
A. Primers of the ROS genes used for gene expression analysis (qRT-PCR)

Gene	AGI	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Primer Reference
<i>ANAC047</i>	At3g04070	NAC-QF	ACCCCTTAAACGCCAGAAGT	Designed in this study
		NAC-QR	ATGCCGCTTGTCTCTGAAGT	
<i>APX2</i>	At3g09640	APX2-QF	ACAAAGTTGAGCCACCTCCT	Chen <i>et al.</i> (2013)*
		APX2-QR	AAGGTGTGTCCACCAGACAA	
<i>ERF4</i>	At3g15210	ERF4-QF	GGATCGGTAACGTAGGTTCGT	Chen <i>et al.</i> (2013)
		ERF4-QR	ATCCCACCTTCGAAATCAAC	
<i>ERF5</i>	At5g47230	ERF5-QF	CATCTTCGGATCATCGTCCT	Designed in this study
		ERF5-QR	ATCTTCAATGGCGGTTTACG	
<i>FMO1</i>	At1g19250	FMO1-QF	CTTCTACTCTCCTCAGTGGCAAA	Designed in this study
		FMO1-QR	CTAATGTCGTCCCATCTTCAAAC	
<i>HSPRO2</i>	At2g40000	HSPRO2-QF	CTCCGATCTCATGTTTCAGCA	Designed in this study
		HSPRO2-QR	TGGATCTGCTTCGTGATGAG	
<i>NDB2</i>	At4g05020	NDB2-QF	TATTCTGAGGCAAACGCATC	Chen <i>et al.</i> (2013)
		NDB2-QR	AGCAGCACCACCTTCTTCTT	
<i>RRTF1</i>	At4g34410	RRTF1-QF	CACCAACAGAGTCGCAAGAA	Designed in this study
		RRTF1-QR	ACTGGAAAAACCCTGACACG	
<i>SIB1</i>	At3g56710	SIB1-QF	CGTTCGGTGAGAGAGACAGT	Chen <i>et al.</i> (2013)
		SIB1-QR	TCGATGCTTCCAAAGTCATT	
<i>TIR</i>	At1g57630	TIR-QF	GCTTTCACGGGAAGATGTA	Designed in this study
		TIR-QR	TGATCTCCACCAATTCGTCA	
<i>WRKY33</i>	At2g38470	WRKY-QF	GGGGACAATGAAACAAATGG	Designed in this study
		WRKY-QR	TGTCGTGTGATGCTCTCTCC	
<i>ZAT10</i>	At1g27730	ZAT10-QF	ATCACACGTTTGCACCATCT	Chen <i>et al.</i> (2013)
		ZAT10-QR	TGCTAACGTGGCTAGTGGAC	
<i>UBQ1</i>	At3g52590	UBQ-QF	TTCCTTGATGATGCTTGCTC	Chen <i>et al.</i> (2013)
		UBQ-QR	TTGACAGCTCTTGGGTGAAG	

*Chen, D., Xu, G., Tang, W., Jing, Y., Ji, Q., Fei, Z. & Lin, R. Antagonistic Basic Helix-Loop-Helix/bZIP Transcription Factors Form Transcriptional Modules That Integrate Light and Reactive Oxygen Species Signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell* **25**, 1657–1673 (2013).



Supplementary Figure 2. Expression of mutant cryptochrome proteins in 4-day old *Arabidopsis* seedlings. Dark-grown *Arabidopsis* seedlings of the indicated genotypes were harvested into liquid nitrogen, homogenized and equivalent protein concentrations resolved on each lane of a 10% polyacrylamide gel prior to Western blot analysis using anti-CRY1 antibodies. The blots were then probed with non-specific HSP90 antibody as loading control. Left upper panel: Western blot signal resulting from anti-Cry1 antibody for cryptochrome mutant (*hy4-3*) and W400F seedlings of two (A and B) independent transgenic lines. Left lower panel: Western blot signal of upper left panel blot probed with non-specific antibody to indicate equivalent protein load. Right upper panel: Western blot signal resulting from anti-Cry1 antibody for C-terminal Cry point mutants. Right lower panel: Western blot signal of upper right panel blot probed with non-specific antibody to indicate equivalent protein load. These blots show that expression of mutant cryptochrome proteins is comparable to wild type.



Supplementary Figure 3. Flavin binding and production of ROS by cry1 C-terminal mutants R611K and E652K. Additional mutant proteins were isolated from baculovirus expression system as described [48] – see also figure 4. a, b: Spectra were taken of purified samples before (Dark) or after (Light) 1 min illumination in blue light (450nm) at $500\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in the absence of added reductant. Shift in absorption spectra indicate flavin is bound and photochemically active. Flavin reduction of wild type sample was comparable under this illumination condition (not shown). C. Production of ROS by isolated protein samples was determined as described in the text (see Fig.4, and methods) either before (Dark) and after 8 minutes of illumination at $500\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Error bar represents S.D. of three measurements.

ARTICLE 3

Low-intensity Electromagnetic fields Stimulate Human Cryptochrome to modulate Intracellular Reactive Oxygen Species.

Sherrard M R, Morellini N, Jourdan N, El-Esawi M, Arthaut L-D, Neissner C, Rouyer F, Klarsfeld A, Procopio M, Doulazmi M, Witczak J, d' Harlingue A, Mariani J, Ritz T, Martino C & Ahmad M

1. Introduction

Les champs magnétiques créés par l'Homme polluent de plus en plus notre environnement et leurs conséquences pour la santé humaine, bien qu'étant très peu étudiées, pourraient être néfastes (**Kaszuba-Zwoinska et al, 2015**). Paradoxalement une certaine classe de champs magnétiques, les champs électromagnétiques pulsés (CEMP) sont de plus en plus utilisés comme outils thérapeutiques pour de nombreuses affections comme la dépression, la maladie de Parkinson, la perte de mémoire, le cancer... (**Markov M, 2015 ; Vadalà et al, 2015 ; Cook et al, 2015 ; Rohan et al, 2014 ; Vadalà et al, 2016 ; Rose et al, 2016**). Ce paradoxe est principalement lié au fait que les mécanismes cellulaires sous-jacents restent très peu connus. Cependant les champs électromagnétiques de faible induction (μT ou mT) semblent plus propices à avoir un impact thérapeutiques. Ils affectent un grand nombre de tissus et restent en dessous du seuil d'excitation des neurones (**Rodger et al, 2012**), tout en étant théoriquement capable d'activer un magnétorécepteur protéique. Actuellement le principal objectif dans ce domaine reste d'identifier le magnétorécepteur biologique ainsi que son mécanisme d'action, capables d'expliquer l'ensemble des effets produits par les CEMP. Les cryptochromes, par leurs propriétés et leur rôle dans la magnétoréception pourraient être ce magnétorécepteur (**Arthaut et al, 2017 ; van der Horst et al, 1999 ; Foley et al, 2011**). Leur capacité à synthétiser des ROS et leur rôle central dans la régulation des rythmes circadiens aussi bien chez les plantes que chez les animaux pourraient expliquer les effets thérapeutiques des CEMP. Les nombreuses études des effets de la stimulation par CEMP chez les mammifères rendent légitimes nos interrogations sur le fait que les

cryptochromes puissent également être responsables de la sensibilité de l'Homme aux champs magnétiques.

Dans ces travaux nous montrons principalement par imagerie qu'une exposition à un CEMP chez des cellules d'insecte et de mammifères conduit à une accumulation rapide de ROS. De plus cette exposition aux champs électromagnétiques pulsés induit l'expression de gènes sensibles aux ROS et modifie la croissance cellulaire. Tous ces effets détectés nécessitent la présence du cryptochrome. En résumé nos résultats justifient que ces CEMP puissent avoir un rôle thérapeutique, grâce à l'action des cryptochromes, tout en mettant en garde contre leur mauvaise utilisation, susceptible d'être à l'origine d'effets nocifs non souhaités.

2. Matériels et méthodes

Appareils utilisés pour les CEMP :

Ces appareils commerciaux (EC10701, GEM Pty Ltd, Perth, Western Australia) sont utilisés à l'origine pour traiter les troubles musculo-squelettiques chez l'Homme. Leur fréquence est de 10Hz et leur intensité maximale utilisable lors des expériences est de 2mT à environ 1cm de la bobine.

Expériences sur le comportement des drosophiles :

Différentes souches de drosophiles ont été utilisées (wild-type Canton S, wild-type Oregon-R, cry02, cryb ainsi que l'hétérozygote HsCRY1). La construction des souches, les conditions de croissances et de lumière ont été reprises d'un précédent protocole (**Vieira et al, 2012**). Les drosophiles adultes ont ainsi été transférées en boîte de pétri carrée sur milieu riche, après 24h elles sont retirées et seules restent les larves pondues durant ce laps de temps. Ces larves sont exposées à une lumière bleue ou rouge pendant 3 jours. Un CEMP additionnel est ajouté au niveau d'un des 4 coins des boîtes de pétri pendant 5 jours. Une fois le développement des pupes terminé elles ne bougent plus et peuvent être comptées en fonction de leur répartition. Etant donné que les drosophiles préfèrent naturellement se positionner au niveau des coins, seule une petite portion de la boîte au niveau des 4 coins est prise en compte. 10 boîtes ont été analysées pour chaque condition lumineuse. Le nombre de drosophiles pour chaque coin est comparé au nombre total de drosophiles par boîte (voir détails supplémentaires en version PDF).

Visualisation des ROS en cellules Sf21 :

Des cellules Sf21 surexprimant DmCRY ou une protéine contrôle SPA1 ont été générées selon un précédent protocole (Arthaut *et al*, 2017). La concentration en cellules observée pour chaque condition dans des chambres d'observations de 3.5cm² est de 400 000/mL. Les cellules sont d'abord incubées 2h à température ambiante, puis lavées et incubées dans un tampon phosphate (pH 6.4) contenant du DCFH-DA à 12.5µM durant 15min à l'obscurité. Puis 2 lavages dans le même tampon phosphate sans DCFH-DA sont effectués avant de les exposer en lumière bleue avec ou sans CEMP. Les cellules sont ensuite observées au microscope confocal inversé Leica TCS SP5 à l'objectif 40X. Les longueurs d'onde d'excitation / émission pour la fluorescence du DCFH-DA sont de 488 / 561nm, et la fluorescence est observée grâce à un photomultiplicateur. Deux canaux ont été ainsi analysés, les Z project ont été obtenus en utilisant les stack observés avec le logiciel imageJ.

Détection du H₂O₂ sécrété par les cellules HEK par fluorimétrie :

Les cellules HEK296 sauvages ou doubles mutantes knockdown par RNAi (voir PDF pour les détails supplémentaires), ont été utilisées à la fois pour des observations microscopiques et pour des dosages spectrofluorimétriques. Ces cellules ont d'abord été maintenues en milieu DMEM avec 10% de sérum de veau fœtal, dans des flasques de 75cm². Après confluence elles sont disposées dans des plaques 12 puits avec un volume par puits de 1mL. Ces plaques 12 puits ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂, et le milieu a été changé tous les 2 jours. Durant ce même temps des appareils de CEMP sont disposés ou non sous ces plaques 12 puits. Afin d'éviter tout effet de bruit de fond magnétique au sein de l'incubateur les positions des plaques sont changées à intervalles réguliers. Une couverture en mu-Métal sépare les cellules non exposées des cellules exposées au CEMP. Les appareils de CEMP ont été allumés après 4h d'incubation de l'ensemble des plaques, ce temps correspond au t₀. La détection fluorimétrique du H₂O₂ a été effectuée en utilisant l'Amplex Red. Pour nos expériences la concentration en cellules était de 25000 par puits. Au bout de 2 jours d'exposition ou non au CEMP le milieu de culture est éliminé, les cellules sont rincées avec du PBS et incubées pendant 2h dans 1mL de milieu DMEM contenant 2% de sérum de veau fœtal, 0.2 unités de horseradish peroxydase et 10µM d'Amplex Red. La fluorescence de la résorufine a été analysée sur des plaques noires de 96 puits à l'aide d'un spectrofluorimètre Varian Cary Eclipse. Les cellules sont comptées pour chaque puits, et la production de H₂O₂ a été normalisée par rapport au nombre de cellules. Une expérience contrôle a consisté à réaliser des courbes de calibration du H₂O₂ avec l'Amplex Red avec ou sans CEMP, et aucune différence n'a été observée, ce qui confirme que le CEMP ne perturbe pas le système de détection par l'Amplex Red.

Observations des ROS produits par les cellules HEK et MEF au microscope confocal :

Parallèlement à ces dosages les cellules HEK293 tout comme les cellules MEF ont été observées par microscopie confocale. Elles ont initialement été incubées dans du milieu DMEM supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal et 2mM de l-glutamine, avec 5% de CO₂ à 37°C. Pour déterminer la localisation intracellulaire des ROS, les cellules HEK293 et MEF ont été étalées dans des chambres d'observation, dans du tampon phosphate de potassium à pH 7 contenant 12.5µM de DCFH-DA. Ces cellules ont été incubées à 37°C et 5% de CO₂ pendant 15 minutes en présence ou non du CEMP. Elles ont enfin été rincées dans le tampon phosphate potassium pendant 15 minutes avant d'être observées au microscope inversé Leica TCS SP5 à l'objectif 63X. Les longueurs d'onde d'excitation / émission du DCFH-DA utilisées sont respectivement de : 488 / 498nm. L'émission de fluorescence est détectée à l'aide d'un photomultiplicateur et les Z project ont été réalisés à partir des stacks à l'aide du logiciel imageJ.

3. Résultats

Pour répondre aux questions soulevées dans l'introduction nous avons tout d'abord utilisé des drosophiles adultes et à l'état de larve dans un modèle d'étude de la sensibilité magnétique déjà bien établi, qui est l'évitement des champs magnétiques (**Foley *et al*, 2011**). Après avoir pondu leurs œufs pendant 24h les mouches adultes sont retirées et les larves seules se sont déplacées librement sur le milieu nutritif étalé sur la boîte de pétri, pendant plusieurs jours sous lumière bleue. Elles forment alors des pupes capables de s'accrocher au milieu en vue de la métamorphose. Ces pupes ayant une préférence naturelle pour les coins, nous avons compté le nombre de pupes accrochées dans chacun des quatre coins de la boîte, dont l'un d'eux était exposé au CEMP pendant le déplacement des larves (**figure 1a**). Plusieurs souches de drosophiles ont été utilisées pour ces expériences, et parmi celles-ci, seules celles qui expriment le cryptochrome endogène DmCRY (WTS et WTO) ou le cryptochrome humain hCRY1 montrent un évitement du coin exposé au CEMP (**figure 1b**). Le nombre moyen de pupes comptées par coin exposé est significativement plus faible que pour les coins non exposés au CEMP chez ces souches, alors qu'aucune différence n'est observable pour les souches de drosophiles sans cryptochrome actif (CRYO2, Cryb, Gal4 Cry0, UAS Cry0). En complément nous avons montré que la présence de lumière bleue est nécessaire pour qu'il y ait évitement du CEMP chez les souches exprimant le cryptochrome (**figure supplémentaire 3B**). Une autre expérience contrôle a consisté à placer l'appareil à CEMP sous une couverture en mu-métal, un métal connu pour bloquer les champs magnétiques statiques ou pulsés, le mu-métal se situant entre le CEMP et la boîte de pétri. Aucun évitement n'a été détecté dans ces conditions, ce qui confirme que les réponses observées pour ces

drosophiles ne sont pas dues à la présence de l'appareil mais bien à la présence d'un CEMP (**figure supplémentaire 3C**). Une première explication possible à cet évitement est que des ROS sont produits par les cryptochromes en lumière bleue suite à l'activation du cryptochrome (**Arthaut et al, 2017 ; Fogle et al, 2015**). Les ROS étant des métabolites toxiques impliqués dans le vieillissement (endommageant les cellules), en accord avec les réponses observées chez les drosophiles exprimant le cryptochrome. Pour confirmer cette hypothèse nous avons donc observé la formation des ROS en cellules Sf21 contrôles (SPA) ou surexprimant DmCRY après 15 minutes de lumière bleue + CEMP avec le marqueur DCFH-DA. L'analyse au microscope confocal révèle une forte augmentation de signal fluorescent chez les cellules qui expriment DmCRY lorsqu'on ajoute CEMP en plus de la lumière bleue (**figure 1C**). Alors qu'aucune différence notable n'est détectable chez les cellules contrôles dans ces mêmes conditions (**figure supplémentaire 4**). Ces données nous permettent d'affirmer qu'une stimulation par CEMP induit une accumulation de ROS intracellulaire médiée par le cryptochrome chez la drosophile.

Les cryptochromes mammifères sont capables de subir des réactions redox *in vivo* comme l'ont montré des expériences par spectroscopie EPR (**Hoang et al, 2008**). Ils sont de plus capables d'induire une sensibilité aux champs magnétiques, et ce en concordance avec de précédents travaux (**Foley et al, 2011**). Il semble donc logique qu'ils puissent être capables d'induire une production de ROS en réponse à un CEMP. Nous avons donc vérifié cette hypothèse en utilisant des cellules humaines de rein HEH293. Après croissance de ces cellules sauvages ou double knockdown pour hCRY1 et hCRY2 à l'obscurité avec ou sans CEMP pendant 2 jours nous avons vérifié si des ROS avaient été produits en les dosant par spectrofluorimétrie avec l'Amplex Red. Comme les résultats le montrent (**figure 2a**) la fluorescence obtenue pour les cellules sauvages exposées au CEMP est significativement plus élevée que celle obtenue pour les trois autres conditions. Ceci indique qu'il y a une production de ROS qui requiert à la fois la présence des cryptochromes et du CEMP. Précisons qu'aucune lumière n'a été utilisée dans l'ensemble des expériences qui concernent les cellules mammifères. Afin d'approfondir ces résultats nous avons compté le nombre moyen de cellules présentes par puits pour chaque condition, et nous avons relevé une nette diminution de la croissance cellulaire chez les cellules sauvages exposées au CEMP comparé aux cellules knockout ou celles non exposées au CEMP (**figure 2b**). Il semble donc à ce stade qu'il y ait un effet toxique du CEMP sur les cellules HEK293 et ce de manière dépendante du cryptochrome, en accord avec l'effet toxique d'une accumulation de ROS. Des expériences similaires sur ces mêmes cellules HEK293 en utilisant des siRNA pour hCRY1 et hCRY2 ont été effectuées et ont montré des résultats similaires à ceux obtenus en **figure 2** (knockout).

Nous avons complété ces résultats en observant au microscope confocal l'accumulation des ROS déjà détectée par Amplex Red chez les cellules HEK, mais en utilisant cette fois le DCFH-DA comme pour les cellules Sf21. Après 15 minutes d'exposition ou non au CEMP chez les cellules HEK sauvages, la fluorescence correspondant aux ROS est analysée, et celle-ci est plus intense lorsque les cellules sont soumises au CEMP (**figure 3, panneaux en haut**). Cette fluorescence est observable à la fois dans les noyaux et le cytoplasme avec un marquage prononcé au niveau de structures vésiculaires autour du noyau, en accord avec la localisation cellulaire des cryptochromes dans l'ensemble de la cellule (**Tamanini *et al*, 2005**). Enfin pour terminer nos observations au microscope confocal nous avons détecté la présence de ROS chez des cellules embryonnaires murines MEF sauvages ou doubles knockout mCRY1 / mCRY2 après exposition ou non au CEMP, selon le même protocole que pour les cellules HEK. Les résultats obtenus montrent à nouveau une induction de la production de ROS qui nécessite la présence à la fois du cryptochrome et du CEMP (**figure 3, panneaux du milieu et du bas**). Les cellules MEF doubles knockout ou non exposées au CEMP montrent par contraste un marquage ROS similaire, nettement inférieur à celui des cellules sauvages exposées au CEMP. L'ensemble des données concernant les cellules mammifères fournissent des preuves concluantes pour attribuer aux cryptochromes de type II un rôle dans la détection des champs électromagnétiques pulsés.

Cependant pour relier ces effets sur les ROS aux bénéfices thérapeutiques observés chez l'Homme, d'autres expériences complémentaires sont nécessaires. C'est avec cet objectif qu'une analyse par puce à ADN a été réalisée chez les cellules HEK293 sauvages après 3h d'exposition au CEMP (**tableaux supplémentaires 1 et 2 en ligne**). Des centaines de gènes ont été identifiés comme ayant une expression induite ou réprimée par ce CEMP, dont une majorité code pour des protéines localisées dans le noyau, l'appareil de golgi ou le réticulum endoplasmique (**tableau supplémentaire 5 en ligne**). C'est dans ces mêmes compartiments qu'une forte proportion de ROS a été identifiée chez les cellules HEK293 et les cellules MEF. Des analyses par qPCR ont été effectuées pour 9 de ces gènes (**figure supplémentaire 6**) dont l'expression en cellule HEK293 exposées au CEMP a été normalisée par rapport à la condition contrôle sans CEMP. Des méthodes bio-informatiques ont permis d'identifier un enrichissement de la fonction oxydoréductase, ce qui coïncide avec la production de ROS (**tableau supplémentaire 6 en ligne**). De plus la plupart de ces gènes régulés par le CEMP contiennent des éléments de promoteurs sur lesquels se fixent des facteurs de transcription sensibles aux ROS (**tableau supplémentaire 7 en ligne**). Ces données sont finalement en accord avec nos observations des cellules MEF et HEK293 au microscope confocal qui montrent une induction de la production de ROS en présence de CEMP dans les mêmes compartiments cellulaires.

4. Discussion

Une des principales hypothèses qui permettent d'expliquer la modulation de la production des ROS dans les cellules par les cryptochromes sous l'effet d'un CEMP est le mécanisme des paires radicalaires (**Hore & Mouritsen, 2016**). Il s'applique notamment à l'interconversion redox de la flavine au sein du cryptochrome. Ce mécanisme s'appuie sur l'interconversion des électrons non appariés d'un tryptophane et de la flavine entre l'état triplet et singulet, ce qui permet de contrôler théoriquement leur vitesse de réaction et donc la quantité de produit formé par unité de temps. Les ROS dont le H₂O₂ font partie de ces produits (**Arthaut et al, 2017**) et leur production par les cryptochromes pourrait donc être modulée par un CEMP. Les autres mécanismes théoriques expliquant la magnétoréception n'impliquent pas le cryptochrome et ne peuvent expliquer les différences que nous observons dans nos résultats pour la production des ROS. Grâce au modèle des paires radicalaires il est possible de calculer la différence de rendement pour l'état singulet avec ou sans CEMP, cette différence serait de 14% en utilisant nos appareils à CEMP (**figures 7 et 8**). Cet écart est théoriquement suffisant pour qu'un tel mécanisme de magnétoréception soit biologiquement significatif (**Ritz et al, 2000 ; Brocklehurst B, 2002 ; Liedvogel & Mouritsen, 2010 ; Evans et al, 2013**). Nos résultats impliquent cependant que ces faibles différences théoriques de départ puissent s'amplifier pour conduire à un différentiel bien plus évident, telles que celui que nous avons observé au microscope confocal.

Pour résumer les ROS produits en relation avec les cryptochromes représentent un des meilleurs candidats possibles pour expliquer les effets des stimulations magnétiques sur les organismes. Nos résultats sont de plus conformes aux premières études qui ont démontré que la réactivité du dioxygène tout comme celle des ROS peut être affectée par les champs magnétiques (**Markov M, 2015**). Cependant nos études attribuent ces effets à des photorécepteurs flavoprotéiques à la fois cytoplasmiques et nucléaires, et non pas aux voies métaboliques mitochondriales. Nous remarquons cependant que le signal CEMP utilisé dans nos études (**figures supplémentaires 1 et 2**) n'a pas d'application thérapeutique et semble nocif sur les cellules humaines lors d'une exposition prolongée. Malgré ce constat, il pourrait être envisageable d'induire des effets bénéfiques sur les cellules en expérimentant une large gamme de fréquences et d'amplitudes différente de ce signal, et ce en s'appuyant sur les avantages procurés par les thérapies à base de CEMP chez l'Homme (**Vadalà et al, 2016 ; Rose et al, 2016 ; Rodger et al, 2012**). Ces avantages bénéfiques étant explicables par la modulation de la concentration en ROS dans une plage thérapeutique, qui peut alors induire les mécanismes de défense des cellules (**Sies et al, 2015**).

D'un point de vue de santé publique notre travail démontre que l'exposition à des champs magnétiques aussi faibles que ceux utilisés (1.8mT) a des conséquences physiologiques. La plupart des appareils électroménagers émettent des champs magnétiques du même ordre de grandeur (**voir références 1-4 de l'article 3**). Il est aujourd'hui connu que les champs électromagnétiques émis par l'Homme dans l'environnement, tel que les bâtiments publics, suffisent à perturber l'orientation des oiseaux (**Engels *et al*, 2014**). Toutefois aucune étude épidémiologique n'a à ce jour fourni la preuve que les champs électromagnétiques peuvent induire des pathologies chez l'Homme (**voir références 1-4**). Nos résultats soulèvent la possibilité de possibles effets synergiques néfastes entre les champs électromagnétiques et certains facteurs environnementaux ou cellulaires, qui pourraient alors stimuler la production de ROS intracellulaire. De nouvelles études épidémiologiques à long terme, et prenant en compte ces différents facteurs sont certainement nécessaires pour une meilleure évaluation de l'impact réel de ces champs électromagnétiques sur la santé humaine.

Ma contribution à cet article :

- Observations au microscope confocal des cellules Sf21, HEK293 et MEF.

Low-intensity Electromagnetic Fields Stimulate Human Cryptochrome to Modulate Intracellular Reactive Oxygen Species.

Authors: Rachel M Sherrard^{1#}, Natalie Morellini^{1#}, Nathalie Jourdan², Mohamed El-Esawi^{2,3}, Louis-David Arthaut², Christine Neissner⁴, Francois Rouyer⁵, Andre Klarsfeld⁶, Maria Procopio⁷, Mohamed Doulazmi¹, Jacques Witczak², Alain d'Harlingue², Jean Mariani¹, Thorsten Ritz⁷, Carlos F Martino⁸ and Margaret Ahmad^{2,9*}.

Affiliations:

¹Sorbonne Universités – UPMC Paris 6 – CNRS, UMR8256 - IBPS, Brain Development, Repair and Ageing Team, 9 Quai St. Bernard, 75005 Paris France.

²Sorbonne Universités – UPMC Paris 6 – CNRS, UMR8256 - IBPS, Photobiology Research Group, 7 Quai St. Bernard, 75005 Paris France.

³Botany Department, Faculty of Science, Tanta University, 31527 Tanta, Egypt.

⁴Dept. of Earth and Environmental Sciences, Ludwig-Maximilians-Universität Munich, Theresienstraße 41/IV, D-80333 Munich, Germany.

⁵Institut des Neurosciences Paris-Saclay, Université Paris Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 91190, Gif-sur-Yvette, France.

⁶Brain Plasticity Unit, UMR 8249 (ESPCI Paris/CNRS), PSL Research University, 10, rue Vauquelin 75231 PARIS Cedex 05 – France.

⁷Department of Physics and Astronomy, University of California at Irvine, U.S.A.

⁸Department of Biomedical Engineering, Florida Institute of Technology, 150 W University Blvd, Melbourne, FL 32901 U.S.A.

⁹Xavier University, 3800 Victory Parkway, Cincinnati, Ohio 45207, U.S.A.

*Correspondence to: margaret.ahmad@upmc.fr.

These authors contributed equally

Abstract:

Exposure to man-made electromagnetic fields which increasingly pollute our environment have consequences to human health about which there is continuing ignorance and debate (1 – 4). At the same time as there is ongoing concern about their harmful effects, magnetic fields are being applied as therapeutic tools in regenerative medicine, oncology, orthopedics and neurology. This paradox cannot be resolved until the cellular mechanisms underlying such effects are identified. Here we show by biochemical and imaging experiments that exposure of mammalian cells to weak pulsed electromagnetic fields (PEMF) stimulates rapid accumulation of reactive oxygen species (ROS), a toxic metabolite with multiple roles in stress response and cellular ageing. Following exposure to PEMF, cell growth is slowed and ROS-responsive genes are induced. These effects require the presence of cryptochrome, a putative magnetosensor that synthesizes ROS. We conclude that modulation of intracellular ROS via cryptochromes represents a general response to weak electromagnetic fields, which can account for either therapeutic or pathological effects depending on exposure levels. Clinically, our findings provide a rationale to optimize low field magnetic stimulation for novel therapeutic applications, while warning against the possibility of harmful synergistic effects with environmental agents that further increase intracellular ROS.

Weak electromagnetic radiation (μT - mT), which increasingly pollutes our environment, has been associated with dual and seemingly contradictory effects on human health. On the one hand, possibly deleterious public health consequences have elicited considerable debate on safety and exposure limits to electromagnetic radiation (EMFs)[1 - 4]. On the other hand, weak magnetic fields have been applied as therapeutic tools, notably in the form of PEMFs (Pulsed Electro Magnetic Fields), which have shown benefits in a broad range of regenerative medicine therapeutics as well as in alleviation of depression, reducing symptoms of Parkinson's disease, and memory loss [5 - 10]. Such PEMFs affect non-excitabile tissues [7 - 9] and are below firing threshold for neurons [11 - 12] consistent with magnetic field effects and thereby activation of a biological magnetoreceptor. The current challenge is therefore to identify these putative magnetosensor(s) and to propose a mechanism that may explain the seemingly disparate effects of electromagnetic fields in medicine and in public health.

A possible class of biological magnetoreceptor [13] are the cryptochromes, which are conserved flavoprotein receptors [14] implicated in magnetosensing in organisms ranging from plants to migratory birds [14 - 16]. Cryptochrome receptors undergo redox reactions in the course of their activation which lead to the synthesis of ROS (reactive oxygen species) [17 - 19]. ROS are a class of global regulators which are toxic to cells at high concentrations and are themselves implicated in numerous cellular signaling functions related to response to stress and ageing [20 - 23]. In mammalian cells, cryptochromes are nuclear localized proteins that have been characterized for a role as core components of the circadian clock [24, 25], in which they are not known to respond to external magnetic fields. However, recombinant mammalian

cryptochromes expressed in a heterologous *Drosophila* system are reported to confer magnetic sensitivity in behavioural assays in flies [16], and recently speculated to play a role as sensors of low electromagnetic fields in the onset of childhood leukemia [26]. Since the therapeutic effects weak magnetic stimulation (PEMFs) indicates conclusively that there must indeed be a response to magnetic stimulation in mammalian cells [5 - 10], this raises the question of whether cryptochromes could also underpin human sensitivity to magnetic fields.

To explore this question, we chose to use PEMF exposure as a source of magnetic stimulation, as it has a proven effects on a wide variety of mammalian cell types. To determine whether cryptochromes are implicated in PEMF effects, we first established whether a known magnetosensitive cryptochrome can mediate a response to a PEMF signal in a well-established magnetically sensitive model system. We used the the fruitfly *Drosophila melanogaster*, where-in flies display a natural behavioral avoidance response to static magnetic fields [16]. Adult flies were placed on square petri plates to lay eggs for 24 hours and subsequently removed. The ensuing hatched larva migrated freely over the plate for several days before choosing a location to attach and form sessile pupa for metamorphosis. These pupae were located randomly around the perimeter of the plate with preference for the corners (Fig. 1). We tested magnetic sensitivity, with a coil generating continuous PEMF at 10Hz, with peak amplitude of 1.8 mT at the level of the larvae (Supplementary Fig. 1,2), placed underneath one of the four corners of the petri plate (see Material and Methods). Fly larvae grown under these conditions avoided the corner of the petri plate above the PEMF device (Fig. 1a) as compared to the other corners. Both Canton S (WTS) and Oregon (WTO) wild type fly strains showed this avoidance response (Fig. 1a,b) in blue light (which activates *Drosophila* cryptochrome; Fig. 1b) but not in red light (which does not activate *Drosophila* cryptochrome; Supplementary Fig. 3). As a control, a 0.3 mm mu-metal

plate, which blocks static or low-frequency magnetic fields, was inserted between the magnetic coil and the petri plate containing the fly larvae. In these conditions larvae did not show the avoidance response (Supplementary Fig. 3). Also, fly mutants deficient in cryptochrome (*cry^b* and *cry⁰²*; [27]) did not avoid the PEMF, confirming a role for cryptochrome in this response. Finally, we tested transgenic fruitflies expressing the human cryptochrome-1 (HsCry1) protein in *Drosophila* cryptochrome-deficient strains as described previously [16, 27]). HsCry1 expression indeed restored the behavioral avoidance response to PEMF in flies lacking their endogenous cryptochrome (Fig. 1B). These results indicate that PEMF can be detected by insects through the action of either drosophila (DmCry) or human (HsCry1) cryptochrome, consistent with the response to static magnetic fields in this organism [16]).

A possible mechanistic basis for this fly avoidance response was suggested by recent observations that reactive oxygen species (ROS) are formed during PEMF exposure [28], and are also byproducts of cryptochrome activation [29, 30] linked to signaling [31]. At high concentrations, ROS are toxic metabolites implicated in oxidative stress and ageing, which damage cell membranes, nucleic acids and proteins [20], consistent with the behavioral avoidance response. In contrast, at physiological concentrations, ROS are reported to have beneficial effects [20, 23], consistent with the observed therapeutic effects of PEMF [5 - 10]. To determine whether the PEMF signal stimulates formation of ROS, Sf21 insect cell cultures overexpressing DmCry [30] were stimulated by PEMF in blue light for 15 minutes in the presence of the ROS label, DCFH-DA ([5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorofluorecein diacetate]) [29, 30]. Confocal image analysis revealed a marked increase in fluorescent signal in PEMF treated cells as compared to unstimulated cultures (Fig. 1C). In contrast, no visible effect of PEMF stimulation was observed in Sf21 cells lacking DmCry (Supplementary Fig. 4). These

data indicate that PEMF stimulation leads to intracellular accumulation of ROS, and that this effect is mediated through *Drosophila* cryptochrome.

Mammalian cryptochromes have been previously reported to be flavoproteins able to undergo redox reactions *in vivo* [31] using a whole-cell EPR spectroscopic approach, consistent with ROS formation. We therefore tested ROS induction following PEMF stimulation of human embryonic kidney (HEK293) cells, grown in darkness for 48 hours in the presence or absence of PEMF (Fig. 2). After incubation, the extracellular media was scored for secreted hydrogen peroxide (H₂O₂), a byproduct of ROS formation, using the Amplex Ultra Red fluorescence detection substrate as described [32]). The concentration of ROS was significantly elevated in media from PEMF treated cell cultures as compared to controls (Fig. 2). To evaluate toxicity of prolonged exposure to PEMF, we counted cells at the end of the exposure period (see Methods). A marked decrease in cellular growth was observed in PEMF-exposed HEK293 cultures as compared to untreated controls, consistent with the toxicity of accumulated ROS (Fig. 2). To assess a possible effect of cryptochrome on this response, RNAi lines with both HsCry1 and HsCry2 mRNA knockdown were constructed (see Methods, Supplementary Fig. 5) and similarly analyzed. RNAi lines deficient in HsCry1 and HsCry2 showed no significant effect of PEMF either on cell growth or on ROS secretion (Fig. 2a, b), in marked contrast to wild type. Therefore these magnetic field effects involve cryptochrome function and formation of ROS in human cells.

We further analysed PEMF effects on mammalian cells using fluorescence imaging to detect multiple ROS forms. As observed for the Sf21 insect cell experiments (Fig. 1c), HEK293 cells were incubated in the presence of DCFH-DA at 37°C for 15 minutes in the presence or absence of PEMF (Fig. 3a). ROS labeling greatly increased in PEMF stimulated cells (Figure 3c)

as compared to unstimulated control cell cultures. Fluorescent ROS staining can be seen in both nuclear and cytosolic compartments, with areas of concentration in nuclear speckles (nucleoli) and vesicular structures (E.R and Golgi), consistent with subcellular localization of mammalian cryptochromes [33].

To confirm the involvement of cryptochrome in this response, we examined cells from murine cryptochrome mCry1/mCry2 double knockout mice [24, 25]). Specifically we analysed mCry1/mCry2 mutant immortalized mouse embryonic fibroblast (MEF) cell cultures using the same fluorescence imaging techniques used for the HEK cell cultures. A marked induction of intracellular ROS after 15 minutes of PEMF stimulation was observed in wild type MEF cells (Fig. 3, middle panels), equivalent to those observed for the HEK293 human cell cultures (Fig. 3, upper panels). However, mCry1mCry2 null mutant cell cultures treated in the identical manner (Fig. 3, lower panels), showed no visible increase in ROS labelling. Taken together, these data provide conclusive evidence for a mechanism involving cryptochrome as a sensor for pulsed electromagnetic fields in mammalian cells.

To further define the effects of PEMFs and relate them to therapeutic consequences observed in humans [5 - 10], we performed microarray analysis of gene expression in HEK293 cells cultured with or without 3 hours of PEMF stimulation (Supplementary Table 1 and 2). Several hundred genes were up-regulated or down-regulated by PEMF stimulation after even this short exposure. Of these transcripts, a significant proportion encoded proteins localized to nuclear, Golgi, and E.R. compartments (Supplementary Table 5). Significantly, bioinformatic GO analysis of biochemical function showed enrichment in oxidoreductase function consistent with increased production of ROS (see Materials and Methods, Supplementary Table 6). Furthermore, promoter analysis of PEMF - induced genes indicated that a majority (75%)

contained promoter elements known to interact with ROS responsive transcription factors. These data are consistent with expression of ROS-responsive genes following PEMF stimulation (Supplementary Table 7). They furthermore parallel the imaging data of these HEK293 cells which showed enhanced localization of ROS to the nuclear, Golgi, and E.R. compartments, whereas transcription of proteins localized to these compartments are particularly enriched in PEMF-regulated genes (Supplementary Table 5). Thus, the induction of ROS by PEMF is indicated by two entirely independent and complementary approaches.

A widely held paradigm for cryptochrome magnetosensing involves a radical pair-based mechanism, whereby the singlet/triplet interconversion rates of unpaired radicals formed in the course of cryptochrome redox chemistry can be altered by static magnetic fields [13]. This provides a mechanism whereby cryptochrome reaction rates and product yields, including of H_2O_2 and other ROS formed during the cryptochrome redox cycle [29, 30], can be altered by magnetic fields. We note that this mechanism is different from a recently suggested mechanism that involves ferromagnetite [34], which would not generate altered rates of ROS formation and therefore is not consistent with our experimental data. Using the radical pair model, we performed theoretical calculations to determine whether the amplitude of the PEMF signal used in the current study is sufficiently high to affect radical-pair reaction yield (Supplementary Information, section 6). Based on our calculations, a 14% differential in singlet reaction yield in a simple radical pair model is achieved in the course of a pulse of PEMF stimulation (Supplementary Fig. 7, 8), which is within the range postulated for an efficient biological magnetosensor (see Supplementary references 41 - 49). Specifically, this theory provides precedent for small primary differences in ROS synthesis in response to weak magnetic fields leading to the large changes observed in this study.

In summary, a mechanism based on regulation of ROS can explain both the beneficial and deleterious effects of magnetic stimulation that have so long puzzled the field. Proposed deleterious effects [1 – 4, 26] of low frequency electromagnetic fields could thereby result from elevated ROS, which inform about exposure to magnetic fields either in human treatment or in public health. This result is furthermore consistent with past suggestions that the lifetimes and reactivity of O_2 and ROS (both paramagnetic species) may be affected by magnetic fields in living systems [5]. However, prior speculation has focussed exclusively on ROS generated via metabolic pathways of the mitochondrial electron transfer chain, or via cell membrane-associated NADPH oxidases. Here, we implicate a flavoprotein receptor and signaling molecule which is furthermore suitably positioned within the nucleus to induce localized changes in ROS concentration and/or reactivity in close proximity to redox-sensitive and/or ROS-regulated nuclear signaling molecules. We note that the prolonged PEMF signal (Figure S1, S2) used in the current study has no therapeutic application, and is apparently harmful to cell cultures over long periods. However, a range of alternate frequencies and amplitudes of PEMF signal have been empirically derived that provide proven physiological benefits involving cellular repair and healing (16 – 20). These beneficial PEMF effects are compatible with modulation of intracellular ROS within a therapeutic range resulting in stimulation of ROS responsive cellular defense and repair mechanisms [20].

In conclusion, from a public health perspective, our work shows that exposure to even such low levels of magnetic fields as those generated by PEMF devices have definite physiological consequences. It should be noted that peak output at 1.8 mT is within an order of magnitude of emissions by household electronic devices and of current safety guidelines for exposure to EMF in humans [1 - 4]. In keeping with our results, it has also been shown that the

low level man-made EMFs emitted from electrical equipment in public buildings can totally disrupt orientation in birds, a process that has also been linked to both cryptochromes and magnetoreception [35]. Although current epidemiological studies have not provided conclusive evidence of electromagnetic field-induced pathology in humans [1 - 4], our results raise the possibility of synergistic harmful effects with other environmental or cellular factors that stimulate intracellular ROS [5, 20]. More refined epidemiological studies taking these factors into consideration are therefore essential for a true assessment of long-term impact of electromagnetic fields on public health.

Materials and Methods.

1. Pulsed electromagnetic field signal. The pulsed magnetic field was generated by a commercially available device (EC10701, GEM Pty Ltd, Perth, Western Australia), used for the treatment of musculoskeletal disorders. During *Drosophila* behavioural tests, PEMF was applied continuously at a frequency of 10Hz with the coil 1 cm below the petri plate. Peak magnetic intensity at the experimental distance was 2 mT. Further details and analysis of PEMF are in the Supplementary Materials.

1.1 The parameters of the PEMF signal were verified by measurement of the current as presented in Supplementary Figure 1, 2. The coil was 9 x 5.5 cm, 200 turns and produced a maximum magnetic field intensity 1cm above the coil of 1.8 mT.

2. Drosophila Behavioural Experiments.

Fly strains used were: wild-type Canton S, wild-type Oregon-R, *cry*⁰² and *cry*^b (described in 27). Transgenic strains *tim-gal4;cry*⁰² and *UAS-HsCry1;cry*⁰² were crossed to generate the heterozygote HsCry1-expressing strain as described in (27). Light sources and growth conditions on complete media are as previously described (27). For the larvae migration studies (pupal distribution), adult *drosophila* were transferred to a square plate (12.5cm x 12.5cm) containing complete rich medium and allowed to lay eggs. After a period of 24hours, the adults were discarded and the plates placed under the indicated light conditions (blue or red light) for 3 days

at 23°C. Subsequently, a single corner of each plate was exposed to PEMF from underneath (for further details of setup, see Supplementary Materials) for an additional 5 days. Temperature differential between corners was less than 0.5°C. The control condition was established by shielding the plate from the PEMF device with 0.35mm mu metal sheeting. Once pupal development was complete, the distribution of the now non-motile pupae could be readily scored by counting the number of pupae in a defined area of the plate. As the pupae showed a preference for the corners of the plates, we evaluated 3.12 x 3.12 cm² areas over each of the four (PEMF treated vs. untreated) corners, and compared the corners that had received no PEMF treatment with those exposed to PEMF. Statistical methods were as follows: for each experimental condition, a total of 10 plates were analysed (n=10). The number of drosophila counted in each corner was expressed as the percentage of the total number of pupae ± S.E.M. per plate. All statistical tests were carried out using SPSS (version 20, IBM Corporation, NY, USA). Data were analyzed for normality (Shapiro-Wilk test, p<0.05) and differences between the PEMF and mean of the 3 non-PEMF corners per plate were compared using Kruskal-Wallis analysis of variance and Mann-Whitney-U post-hoc where appropriate. The α value was set to p<0.05. Further details of the behavioural experimental setup are presented in the Supplement (Supplementary Figure 3).

3. Intracellular localization of ROS in DmCry expressing insect cell cultures.

Preparation of DmCry expressing and control (Spa1) expressing insect cell cultures was performed as described in (29). For imaging experiments, Sf21 cells were seeded at a density of 400 000 cells in a 3.5 cm² observation chamber. After incubation at RT during 2 h for cell attachment, Sf21 cells were incubated in 40mM potassium phosphate buffer (pH 6.4) containing 12.5 μ M DCFH-DA (Molecular Probes, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) for 15 min in the dark, rinse two times in phosphate buffer, then exposed to blue light with or without PEMF during 15 min and observed with an inverted Leica TCS SP5 microscope using a 40X objectif. Green fluorescence from DCFH-DA and differential interference contrast (DIC) were excited at 488- and 561-nm wavelengths, respectively. Emission fluorescence intensities and DIC were detected by using a photomultiplier between 498 and 561 nm, and a transmission photomultiplier, respectively. Two channels were recorded sequentially. Z series projections were performed using ImageJ software (W. S. Rasband, ImageJ). As a control for these

experiments, control cell cultures were used that did not express DmCry (Supplementary Figure 4). These cells did not show induction of ROS in response to PEMF.

4. Construction of human *CRY1* and *CRY2* - targeting siRNA plasmids and shcry1/cry2 knockdown HEK cells.

By using the InvivoGen siRNA Wizard™ tool, siRNA sequences targeting human *CRY1* (NM_004075.4) and *CRY2* (NM_021117.3) were selected and a pair of complementary (sense and antisense) oligonucleotides were designed for each sequence as followed: shCRY1 sense (5'GTACCTCGGAACGAGACGCAGCTATTAATCAAGAGTTAATAGCTGCGTCTCGTTC
CTTTTTGGAAA 3'), shCRY1 antisense (5'AGCTTTTCCAAAAAGGAACGAGACGCAGCTATTAACTCTTGATTAATAGCTGCGT
CTCGTTCCGAG3'), shCRY2 sense (5'ACCTCGTACGTATGTCACCTTCACTATCAAGAGTAGTGAAGGTGACATACGTA
T3'), shCRY2 antisense (5'CAAAAAGTACGTATGTCACCTTCACTACTCTTGATAGTGAAGGTGACATACGTAC
G3') (complementary sequences of the hairpin are underlined). Complementary oligonucleotide pairs were PAGE-purified and 25mM of each were annealed by incubation in 0.1 M NaCl at 80 °C (2 min) followed by slow (1 °C per min) cooling down to 35 °C. The resulting double-stranded DNA fragments were cloned into the same psiRNA-DUO-GFPzeo plasmid according to the manufacturer's instructions using a two-step procedure (InvivoGen). Briefly, the psiRNA-DUO plasmid was digested with Acc65I and HindIII restriction enzymes and ligated with the first insert (shCRY1 annealed oligonucleotide pairs). The resulting construct was transformed into *Escherichia coli* GT115 cells (InvivoGen), and positive colonies were selected using Fast-Media® Zeo X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-d-galactopyranoside) (InvivoGen). The plasmid containing shCRY1 was subsequently digested with BbsI restriction enzyme and ligated with the second insert (shCRY2 annealed oligonucleotide pairs). The resulting construct was transformed into *E. coli* GT115 cells (InvivoGen), and positive colonies were selected using Fast-Media® Zeo 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid, cyclohexylammonium salt (X-galuc) (InvivoGen). The obtained psiRNA-Cry1Cry2-GFPzeo expression plasmid was used for transfection of HEK cells and psiRNA-LucLac-GFPzeo encoding shRNA for the silencing of a prokaryote gene (InvivoGen) was used to transfect HEK cells as non-silencing control. Stable

transfectants were selected in complete medium containing 300 µg/ml Zeocin (InvivoGen). Expression of HsCry1 and HsCry2 was verified by qPCR (Supplementary Figure 5).

5. Fluorimetric Detection of H₂O₂ in HEK cell culture medium.

HEK293 cells were grown and maintained in EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), supplemented by 10% Fetal Bovine Serum. The cells were cultured in 75 cm² flasks to expand cell number. After reaching confluence, the cells were seeded in 12-well plates. The volume of medium totaled 1 ml. Medium was then changed every two days. The cultures were incubated in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C in the same incubator (Fisher Scientific, Model 5). The temperature and CO₂ levels were monitored daily and maintained at 37°C and 5%, respectively. All experiments were conducted in the same incubator. To control for location in the incubator and any associated electromagnetic noise or other spatial variation, the orientation of experimental and control cultures were periodically reversed, and 0.3mm mu-Metal shielding was applied between PEMF-treated and control cell culture dishes within the incubator. Cells were seeded and allowed to rest for four hours under the same magnetic background conditions, at which timed magnetic exposures began. This time is denoted as *t*₀. Fluorometric detection of H₂O₂ production was performed using the horseradish peroxidase-linked Amplex Ultra Red™ (Invitrogen) fluorometric assay. HEK cells were seeded at a concentration of 25.0×10⁴ cells per well in a 12-well plate and exposed to PEMFs for the duration of the experiment. Medium was aspirated washed with PBS and incubated for 2 hrs with DMEM containing 2% FBS, 0.2 units/ml horseradish peroxidase and 10 µM Amplex UltraRed (AUR). Resorufin fluorescence was measured by a Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter using the 96 well plate reader function. Cellular number, and resorufin fluorescence were measured at the same termination points. H₂O₂ production was normalized to cell count. H₂O₂ calibration curves with HRP-AUR in PEMFs did not show any difference compared to control, thus demonstrating that PEMFs do not interact with the detection system.

6. Intracellular localization of ROS in human HEK293 or murine MEF cell cultures using confocal imaging techniques.

Human HEK and mouse embryonic fibroblast (MEF) cells were grown in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 2 mM l-glutamine in a 95% air–5% CO₂ incubator at 37°C. For intracellular localization of ROS, living Human HEK or MEF cells were seeded on cell observation chambers were incubated in 40 mM

potassium phosphate buffer (pH 7) containing 12.5 μ M DCFH-DA (Molecular Probes) for 15 min in a 95% air–5% CO₂ incubator at 37°C, and were simultaneously exposed or not to PEMF for the same time (15 min). Cells were rinsed for 15 min in the potassium phosphate buffer solution and observed with an inverted Leica TCS SP5 microscope equipped with a 95% air–5% CO₂–37°C thermostatic observation chamber and using a 63X objective. Green fluorescence from DCFH-DA and differential interference contrast were, respectively, excited at 488-, and 561-nm wavelengths. Emission fluorescence levels and D.I.C. were detected by using a photo-multiplier between 498 and 561 nm, and a transmission photo-multiplier, respectively. Two channels were recorded sequentially. Z series projections were performed using ImageJ software (W. S. Rasband, ImageJ [U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij>, 1997-2009]).

Acknowledgments:

We are indebted to G. Van der Horst and Ines Chaves for the gift of the MEF cell lines. Funding was from AFOSR (FA9550-14-0-0409) and Human Frontiers (RGP0045). Salary to NM was from Australian Research Council (linkage grant LP110100201). Author contributions are as follows: RMS and MA designed the study; NM developed the drosophila behavior tests; NM, NJ, ME, LA, CN, FR, AK, JW, AD, CF, MA performed experiments; RMS, NM, NJ, CFM, MA interpreted and analysed results; MD performed bioinformatics analysis; MP, TR performed theoretical modeling of radical pairs; RMS, NM, NJ, FR, AK, MP, JM, TR, CFM, MA wrote paper.

References:

1. International Commission for Non-Ionizing Radiation Protection. ICNIRP statement on the “Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and

- electromagnetic fields (up to 300 GHz)". *Health Phys.* 97, 257–258 (2009).
2. World Health Organization. Extremely Low Frequency Fields. Environmental Health Criteria Monograph no. 238, http://www.who.int/peh-emf/publications/elf_ehc/en/ (2007).
 3. The INTERPHONE Study Group. Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. *Int. J. Epidemiol.* 39, 675–694 (2010).
 4. Kaszuba, Zwoińska, J., Gremba, J., Gałdzińska Calik, B., Wójcik Piotrowicz, K. & Thor, P. J. Electromagnetic field induced biological effects in humans. *Przełł Lek.* 636, 641 (2015).
 5. Markov, M. XXIst century magnetotherapy. *Electromagn Biol Med.* 34, 190-196 (2015).
 6. Vadalà, M., Vallelunga, A., Palmieri, L., Palmieri, B., Morales-Medina, J. C. & Iannitti, T. Mechanisms and therapeutic applications of electromagnetic therapy in Parkinson's disease. *Behav Brain Funct.* 11, 26 (2015).
 7. Cook, J. J., Summers, N. J. & Cook, E. A. Healing in the new millennium: bone stimulators: an overview of where we've been and where we may be heading. *Clin. Podiatr. Med. Surg.* 32, 45-59 (2015).
 8. Rohan ML, Yamamoto RT, Ravichandran CT, Cayetano KR, Morales OG, Olson DP, Vitaliano G, Paul SM, Cohen BM. Rapid mood-elevating effects of low field magnetic stimulation in depression. *Biol Psychiatry.* 76, 186-93 (2014)
 9. Vadalà, M., Morales-Medina, J. C., Vallelunga, A., Palmieri, B., Laurino, C. & Iannitti, T. Mechanisms and therapeutic effectiveness of pulsed electromagnetic field therapy in oncology. *Cancer Med.* 11, 3128-3139 (2016).
 10. Rose, N., LaRocque, J.J, Riggall, A. C., Gosseries, O., Starrett, M. J., Meyering, E. E., Postle, B.R. Reactivation of latent working memories with transcranial magnetic stimulation *Science* 02 Dec 2016. Vol. 354, Issue 6316, pp. 1136-1139.
 11. Pilla AA. Nonthermal electromagnetic fields: from first messenger to therapeutic applications. *Electromagn Biol Med.* 32, 123-136 (2013).
 12. Rodger J, Mo C, Wilkes T, Dunlop SA & Sherrard RM. Transcranial pulsed magnetic field stimulation facilitates reorganisation of abnormal neural circuits and corrects behavioural deficits without disrupting normal connectivity. *FASEB J.* 26(4),1593-606 (2012).
 13. Hore, P. J. & Mouritsen, H. The radical pair mechanism of magnetoreception. *Ann. Rev. Biophys.* 45, 299-344 (2016).
 14. Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L. O., van der Horst, G. T., Batschauer, A. & Ahmad, M. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Ann. Rev. Plant Biol.* 62, 335-364 (2011).
 15. Wiltschko, R. & Wiltschko, W. Sensing magnetic directions in birds: radical pair processes involving cryptochrome. *Biosensors* 4, 221-242 (2014).
 16. Foley, L. E., Gegear, R. J. & Reppert, S. M. Human cryptochrome exhibits light-dependent magnetosensitivity. *Nat Commun.* 2:356. doi: 10.1038/ncomms1364 (2011).
 17. Consentino, L., Lambert, S., Martino, C., Jourdan, N., Bouchet, P. E., Witczak, J., Castello, P., El-Esawi, M., Corbinau, F., d'Harlingue, A., et al. Blue-light dependent reactive oxygen species formation by arabidopsis cryptochrome may define a novel evolutionarily conserved signaling mechanism. *New Phytol.* 206, 1450–1462 (2015).
 18. Muller, P. & Ahmad, M. Light activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception. *J. Biol. Chem.* 286, 21033 – 21040 (2011).
 19. van Wilderen, L. J., Silkstone, G., Mason, M., van Thor, J. J. & Wilson, M. T. Kinetic

- studies on the oxidation of semiquinone and hydroquinone forms of Arabidopsis cryptochrome by molecular oxygen. *FEBS Open Bio.* 5, 885-892 (2015).
20. Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 4, 180–183 (2015).
 21. Höhn A., Weber, D., Jung, T., Ott, C., Hugo, M., Kochlik, B., Kehm, R., König J., Grune, T. & Castro, J. P. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol.* 11, 482-501 (2017).
 22. Barja, G. The mitochondrial free radical theory of aging. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 127, 1–27 (2014).
 23. Valko, M., Leibfritz, D., Monco, J., Cronin, M. T., Mazur, M. & Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84 (2007).
 24. Bounds, P.L., Kuster, N. Cryptochrome a Primary Sensor of Extremely Low Frequency Magnetic Fields in Childhood Leukemia? *Biophysical Journal*, Vol. 108, Issue 2, p562a.
 25. van der Horst, G. T., et al. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 627–630 (1999).
 26. Kume, K., et al. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98, 193–205 (1999).
 27. Vieira, J., Jones, A. R., Danon, A., Sakuma, M., Hoang, N., Robles, D., Tait, S., Heyes, D. J., Picot, M., Yoshii, T., Helfrich-Förster, C. T., Soubigou, G., Coppee, J. Y., Klarsfeld, A., Rouyer, F., Scrutton, N. S. & Ahmad, M. Human cryptochrome-1 confers light independent biological activity in transgenic *Drosophila* correlated with flavin radical stability. *PLoS1* : 7(3): e318671 (2012).
 28. Consentino, L., Lambert, S., Martino, C., Jourdan, N., Bouchet, P. E., Witczak, J., Castello, P., El-Esawi, M., Corbineau, F., d'Harlingue, A. & Ahmad, M. Blue-light dependent reactive oxygen species formation by Arabidopsis cryptochrome may define a novel evolutionarily conserved signaling mechanism. *New Phytol.* 206, 1450-1462 (2015).
 29. Arthaut, L.D., Jourdan, N., Mteyrek, A., Procopio, M., El-Esawi, M., d'Harlingue, A., Bouchet, P.E., Witczak, J., Ritz, T., Klarsfeld, A., Birman, S., Usselman, R.J., Hoecker, U., Martino, C.F., & Ahmad, M. Blue-light induced accumulation of reactive oxygen species is a consequence of the *Drosophila* cryptochrome photocycle. *PLoS One* 12(3):e0171836. (2017).
 30. Houl, J. H., Tran, T. T., Roberts, L., Dahm, N. A., Cao, Y., Zhou, M., and Holmes, T. C. CRYPTOCHROME-mediated phototransduction by modulation of the potassium ion channel beta-subunit redox sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 2245-2250 (2015).
 31. Hoang, N., Schleicher, E., Kacprzak, S., Bouly, J. P., Picot, M., Wu, W., Berndt, A., Wolf, E., Bittl, R. & Ahmad, M. Human and *Drosophila* cryptochromes are light activated by flavin photoreduction in living cells. *PLoS Biol.* 6, e160 (2008).
 32. Castello, P. R., Hill, I., Sivo, F., Portelli, L., Barnes, F., Usselman, R. & Martino, C. F. Inhibition of cellular proliferation and enhancement of hydrogen peroxide production in fibrosarcoma cell line by weak radio frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 35, 598-602 (2014).
 33. Tamanini, F., Yagita, K., Okamura, H. & van der Horst, G. T. Nucleocytoplasmic shuttling of clock proteins. *Methods Enzymol* 393, 418-435 (2005).
 35. Qin, S. et al. A magnetic protein biocompass. *Nature Materials* 15, 217–226 (2016) doi:10.1038/nmat4484.

35. Engels, S., Schneider, N., Lefeldt, N., Hein, C. M., Zapka, M., Michalik, A., Elbers, D., Kitte, A., Hore, P. J. & Mouritsen, H. Anthropogenic electromagnetic noise disrupts magnetic compass orientation in a migratory bird. *Nature* 509, 353-356 (2014).

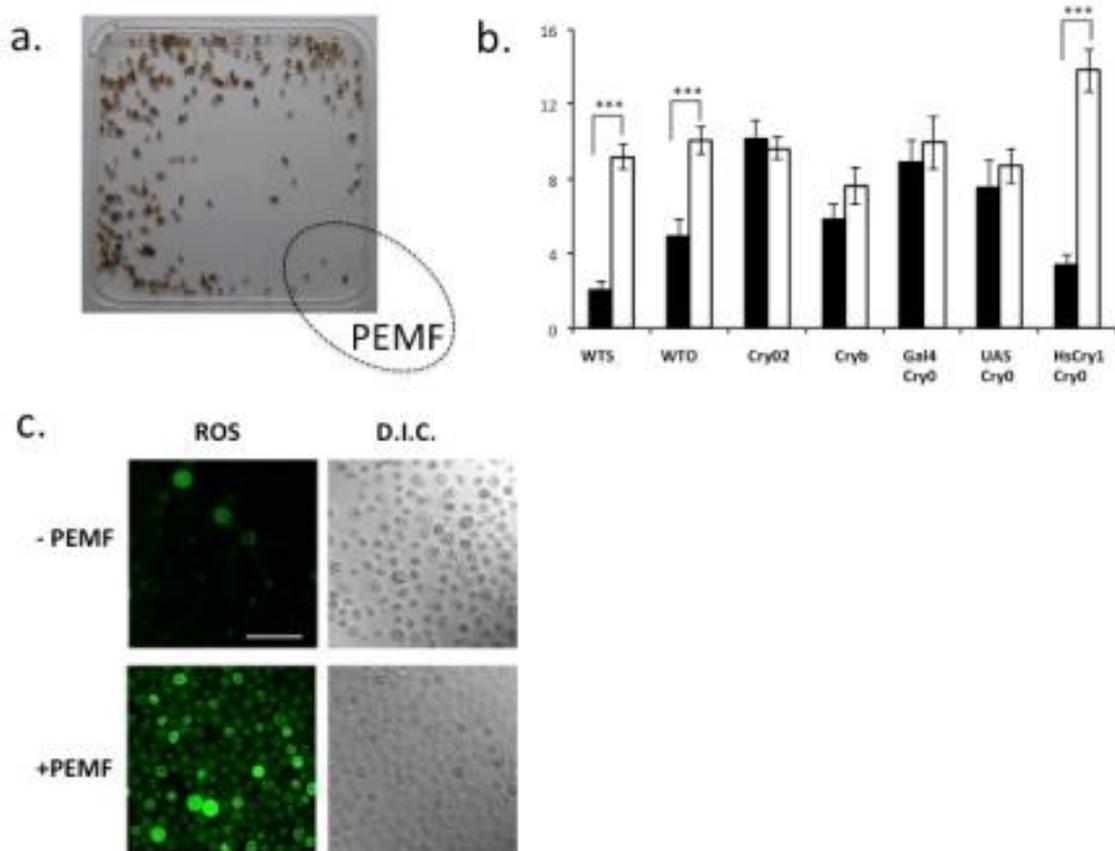


Fig. 1. Insect Behavioural and Cellular Response to PEMF. (a). Distribution of wild type Canton S larvae following 96 hours exposure in blue light ($60\mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$) to PEMF (10Hz) to the indicated corner. (b). Response to PEMF expressed as Percentage of larvae in the petri-plate corners: PEMF exposure (black bars), mean of 3 non-exposed corners (white bars). Data represents averages from nine independent experiments (see methods). Strains used are Canton S

(WTS), Oregon (WTO), cry-deficient mutants (*cry*⁰² and *cry*^b), *tim-gal4;cry*⁰² (Gal4Cry0) and *UAS-Hscry1;cry*⁰² (UASCry0) are non-expressing parental strains for the cross (*tim-gal4;cry*⁰² x *UAS-Hscry1;cry*⁰²) (HsCry1Cry0) that expresses the HsCry1 protein as described in ref. (27). ****p*<0.001 (see methods for details of statistical treatment). Error bars are S.E.M. (c). SF21 insect cells overexpressing *Drosophila* cryptochrome (DmCry) exposed to PEMF. Dark grown Sf21 insect cell cultures expressing high concentrations of DmCry as described (30) were illuminated for 15 minutes at 80μmolm⁻²sec⁻¹ blue light in the presence (+) or absence (-) of PEMF and viewed by confocal microscopy as described in Methods. Scale bar 100μm.

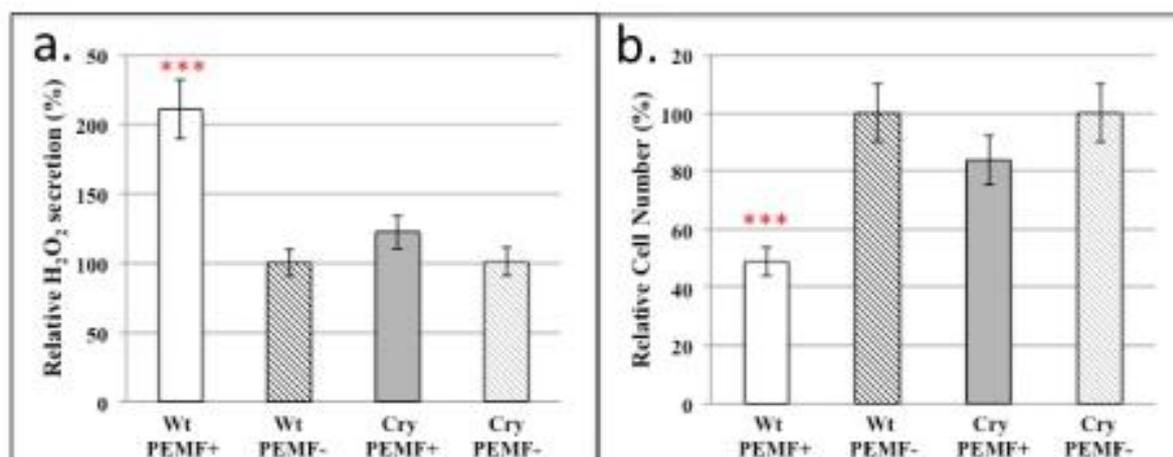


Fig. 2. PEMF response of HEK293 cell cultures. a. Cells of wild type (Wt) or *HSCRY1* and *HSCRY2* double knockdown (Cry) were seeded in 24 well cell culture dishes and grown for 48 hours in the presence (PEMF+) or absence (PEMF-) of applied PEMF as described (Methods). The concentration of H₂O₂ in the culture media was determined using the Amplex Red fluorescent detection system (Materials and Methods) and normalized to the number of cells. The graph presents the relative concentration of H₂O₂ from PEMF treated cells (PEMF+) as compared to the control (PEMF-) untreated sample. Error bar represents S.D. of 12 independent measurements. b. Relative number of cells per well in PEMF treated cells (PEMF+) as compared to the control (PEMF-) untreated sample. ****p*<0.001 (see Methods).

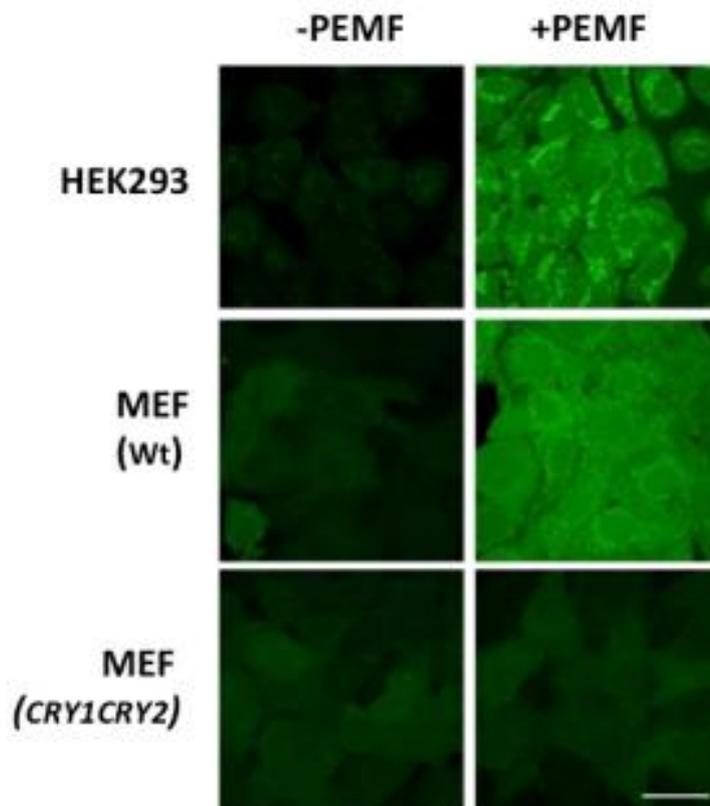
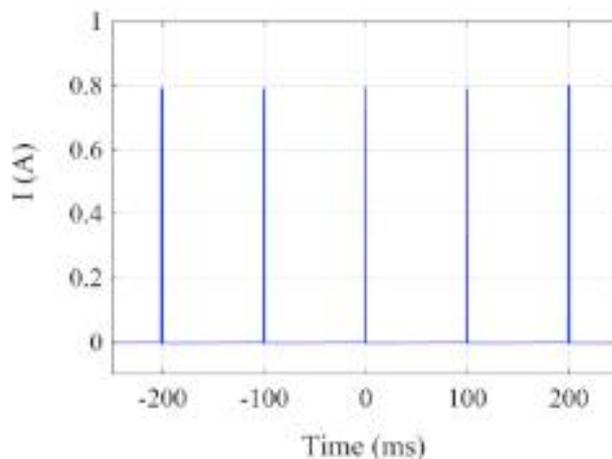


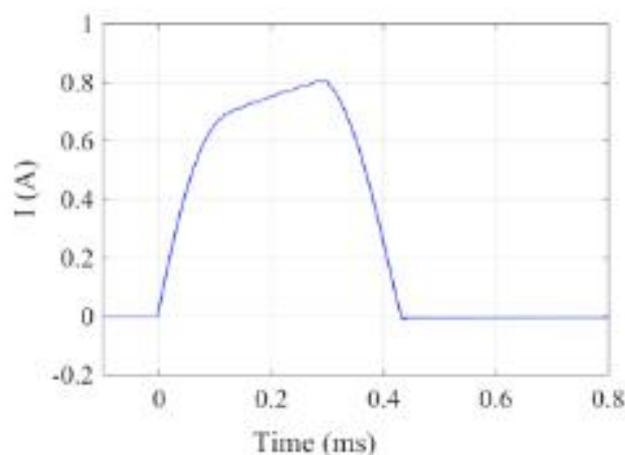
Fig. 3. Production and subcellular localization of ROS by mammalian cells exposed to PEMF. Living Human Embryonic Kidney (HEK293), Mouse Embryonic Fibroblast (MEF), or MEF *CRY1CRY2* cryptochrome – deficient double mutant knockout cell lines were exposed (+PEMF) for 15 min. in darkness while simultaneously treated with DCFH-DA [5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorofluorecein diacetate], then viewed by an inverted Leica TCS SP5 microscope. Control cell cultures not exposed to the magnetic field (-PEMF) were treated in the identical manner. Images show a single confocal z section that cross the nucleus. Diffused fluorescent ROS staining can be seen in nucleus and cytoplasm. Punctuate and intense fluorescent ROS staining colocalizes with ER and nucleoli observed respectively around the nucleus and inside the nucleus. Scale bar is 40 μ m.

Supplementary Materials :

1. Details of the PEMF signal used in the study (see Materials and Methods).



Supplementary Figure 1. Output of PEMF device. Output was measured with a current probe directly connected to E Cell. Current I as function of time.



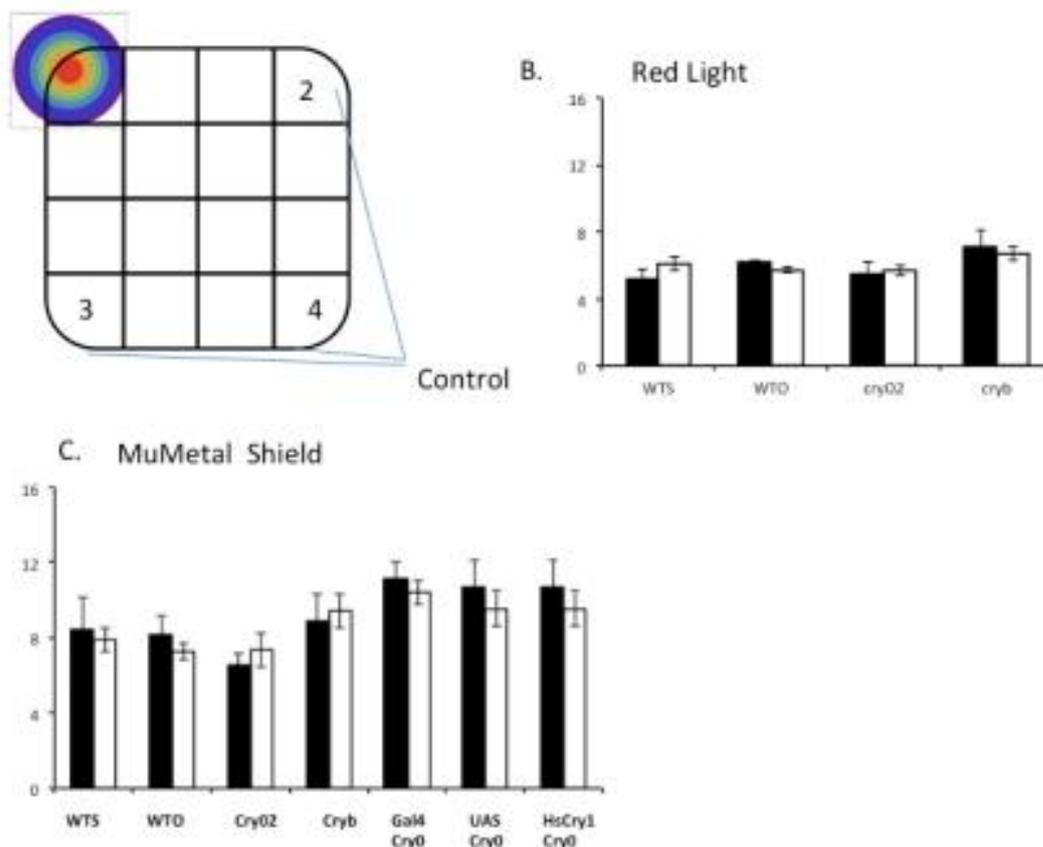
Supplementary Figure 2. Zoom of Figure 1. Output of PEMF during a pulse.

2. Further details of the experimental setup.

The position of the plate containing drosophila growth media and growing larva under which the PEMF coil was placed (upper left) is designated as the 'test corner'. The PEMF coil was at a distance of 1cm from the bottom of the test plate containing the drosophila larvae. The temperature at all four corners was measured and the PEMF device did not cause any change in temperature from the other corner positions of the test plate. A square at each corner of equivalent volume (designated positions 2, 3, and 4) serve as the internal 'control' positions

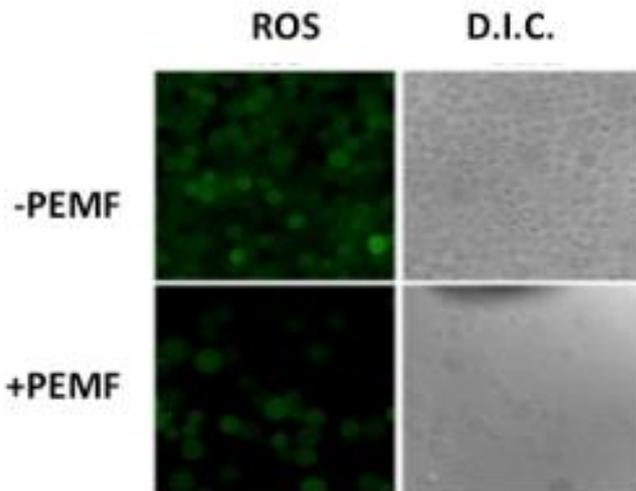
whereas position '1' served as the 'test' position. The number of pupae that were deposited beneath the PEMF coil was compared to the number of pupae deposited within an equivalent volume at each of the other three corner positions.

Additional controls to the behavioural experiments are shown in Figure S3B and S3C, below. The PEMF device was shielded from the test plate using mu-Metal sheeting of 0.3 mm thickness. Under these conditions (Supplementary Fig. 3B) no significant avoidance of the PEMF corner position was detected. In addition, response to PEMF was scored in red light, which does not activate insect (*Drosophila*) cryptochrome (Supplementary Fig. 3C). In this case also, no avoidance of the PEMF was observed.



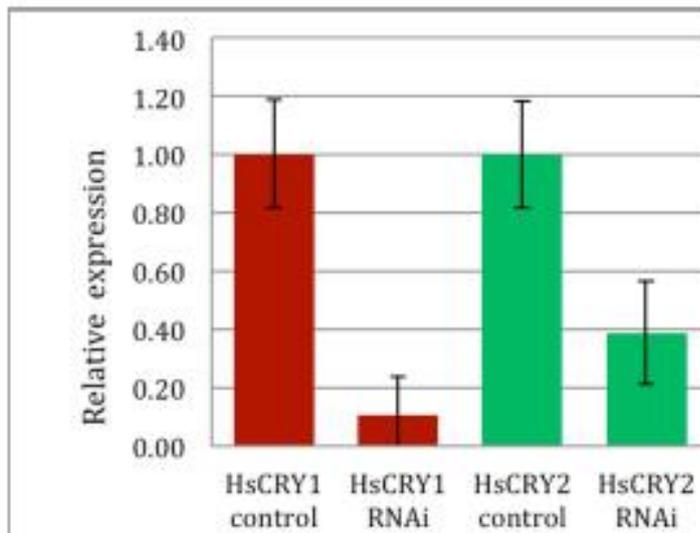
Supplementary Figure 3. *Drosophila* pupal distribution in response to PEMF. A. Diagram of experimental setup showing the position of PEMF coil (upper left), as the 'test corner'. The other corner positions of equivalent volume (designated positions 2, 3, and 4) serve as the internal 'control' positions. B. Distribution of pupae in response to PEMF in red light ($60\mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$). Strains used are wild type strains Canton S (WTS) and Oregon (WTO), and cry-deficient mutants (cry^{02} and cry^b). C. *Drosophila* strains exposed to PEMF under blue light ($60\mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$) with a 0.3 mm mu-metal sheet placed between the PEMF and the bottom of the petri plate containing the flies (at position 1). Strains used are Canton S (WTS), Oregon (WTO), cry-deficient mutants (cry^{02} and cry^b), $\text{tim-gal4};\text{cry}^{02}$ (Gal4Cry0) and $\text{UAS-Hscry1};\text{cry}^{02}$ (UASCry0) are non-expressing parental strains for the cross ($\text{tim-gal4};\text{cry}^{02} \times \text{UAS-Hscry1};\text{cry}^{02}$) (HsCry1Cry0) that expresses the HsCry1 protein as described in ref. (27). Error bars are S.E.M.

3. Effect of PEMF on Sf21 wild type cells in absence of DmCry.



Supplementary Figure 4. Effect of PEMF on Sf21 ROS production in control cell cultures. Sf21 insect cells expressing a non-photoreceptor control protein SPA1 (29) in the absence of DmCry1 were illuminated for 15 minutes at $80\mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$ blue light in the presence (+) or absence (-) of PEMF and viewed by confocal microscopy as described²⁹. No difference in ROS staining was observed. Scale bar 100 μm .

4. Construction of human *CRY1* and *CRY2* - targeting siRNA plasmids and shcry1/cry2 knockdown HEK cells.



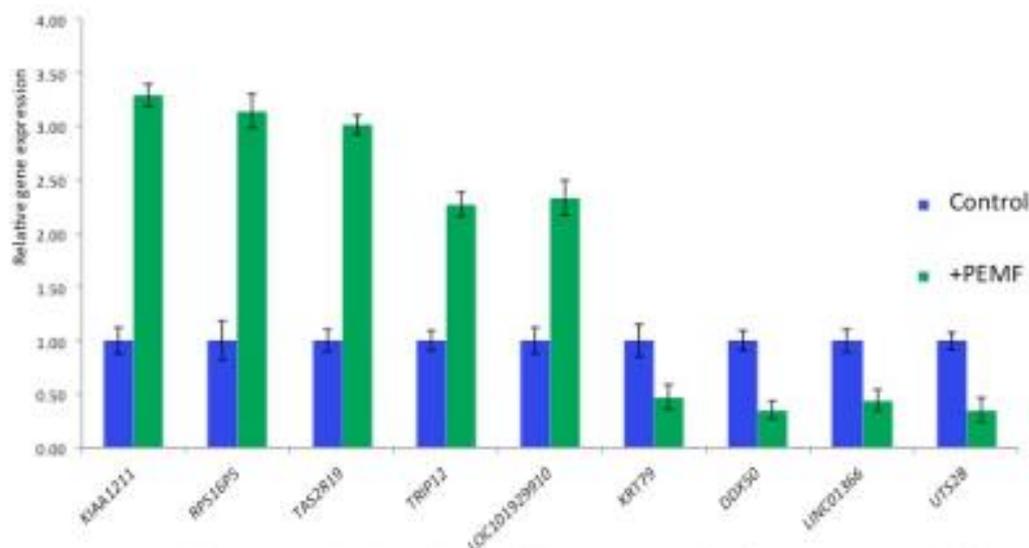
Supplementary Figure 5. qPCR analysis of *HSCRY1* and *HSCRY2* gene expression in antisense HEK293 cell lines. *HSCRY1* and *HSCRY2* gene expression is shown in control cells harboring the psiRNA-DUO-GFPzeo plasmid without RNAi insert (labelled as HsCRY1 control, HsCRY2 control in the figure) and compared to RNAi lines containing antisense constructs to *HSCRY1* and *HSCRY2* genes (labelled HsCRY1 RNAi, HsCRY2 RNAi in the figure) constructed as described above. Primers used for qPCR analysis were HsCry1 Forward: 5'-GTGTTTCCCAGGCTTTTCAA-3' HsCry1 Reverse: 5'-TGGTTCCATTTTGCTGATGA-3', HsCry2F: 5-CTCGGAACAGTGCCTCAAATC-3, HsCry2 R: 5-GATAACGACCCTTCCACACAA-3

5. Microarray Analysis of HEK293 Cell Cultures.

Human HEK cells were grown in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 2 mM l-glutamine in a 95% air–5% CO₂ incubator at 37°C. Cells were seeded into multiple 3.5cm² round cell culture dishes and grown under identical conditions for 48hrs. Prior to confluence, cell culture dishes were treated with 3 hrs of continuous PEMF in the absence of light (test condition). Control cell cultures were harvested prior to application of PEMF. Triplicate PEMF treated and control cell cultures were then harvested into liquid nitrogen and total RNA extracted by RNEasy RNA extraction kit (Promega, inc.) and related protocols. Microarray gene expression and analysis using Agilent affymatrix technology was performed by IMG M Laboratories GmbH, Martinsried, Germany.

5.1 Transcriptional analysis of altered gene expression in response to PEMF exposure of HEK293 cell cultures.

Genes induced and repressed after exposure of HEK293 cells to 3 hours of PEMF identified 488 up-regulated (Supplementary Table S1) and 80 down-regulated (Supplementary Table S2) transcripts, respectively. Microarray expression data for representative up- and down-regulated genes was verified by qPCR analysis as presented in Supplementary Figure 6, using primers as presented in Supplementary Table S1.



Supplementary Figure 6: qPCR analysis of gene expression in response to 3 hrs of stimulation by PEMF in HEK293 cell cultures. Primers used and designation of accession numbers are described in Supplementary Table S1.

Gene Symbol	Genbank accession number	Forward Primer 5' - 3'	Reverse Primer 5' - 3'
Up-regulated genes			
KIAA1211	NM_020722	AGCTGGCTGTTAAGCCAAAA	CCTCCAGTTCTCGCCAGTAG
RPS16P5	NR_046241	TGCTAATGGCTGTGTGAAGC	GCCACAACAGGAAAAGGTGT
TASC2R19	NM_176888	GCAAAGTGTGACCTCCTTCC	CGTGTCATCTGCCACAAAAC
TRIP12	BC037956	GTACCACCAGGTGCCAGAGT	TTGGCCTGTAATCCAGAAGG
LOC101929910	XR_433240	GAAAGGCTCTTTGCAACTGG	TGCTTTGAGGCTCAGGGAGT
Down-regulated genes			
KRT79	NM_175834	GAGGAGAGCAGGATGTCTGG	CGGTGCTATAGCCCACATTT
DDX50	NM_024045	GATGTCAGCTGTGCTTGAA	AGCCACTCCTCTGTCTGGAA
LINC01366	NR_026945	GCCCCCTTTTCTTCAATC	TTGGCTGTGTTTCTGCAAAG
UTS2B	NM_198152	AAACGAGCTTGCTTTTGAA	GTCCAACCTGGCATTGTCTT

Supplementary Table 3. Table showing the 9 genes selected for qPCR analysis (in Supplementary Figure 5) and their designed primers.

GO analysis of biological function (Supplementary Table S4) shows enrichment of enzymes involved in cyclic nucleotide metabolism, corticosteroid receptor pathway, and wound healing; GO analysis of subcellular localization shows enrichment in golgi, vesicles, E.R. and nucleolar compartments (Supplementary Table S5); and GO analysis of biochemical function shows enrichment in oxidoreductase function and cyclic nucleotide metabolism (Supplementary Table

S6). These functions show consistency with ROS induction and localization data presented in Figures 3 and 4 in the main text.

5.2. Enrichment of ROS responsive elements in promoters of PEMF regulated genes.

Since PEMF is shown to induce accumulation of ROS, we in addition tested whether PEMF-induced genes could be linked to ROS signaling pathways. We analysed 248 PEMF up-regulated genes with known functions (from Supplementary Table S1) for the presence of ROS response elements in their promoter regions using bioinformatics methodology as described³⁵. The number and type of ROS responsive elements were identified in 2kb of promoter regions upstream of the transcriptional start sites of PEMF regulated genes (SupplementaryTable S7). We observed that the majority (over 75%) of analysed PEMF-regulated genes showed one or more ROS-responsive upstream promoter element (Supplementary Table S7). The transcriptional analysis data thereby supports a role for PEMF in inducing ROS biosynthesis and signaling pathways.

THEORETICAL MODELING OF MAGNETOSENSING – CAN PEMF ACTIVATE A BIOLOGICAL MAGNETOSENSOR?

6. PEMF and Theoretical Considerations for Chemical Magneto-sensing.

The Radical Pair Mechanism (RPM) is the only well-established mechanism by which magnetic fields can affect biochemical reactions^{36, 37}. The RPM has been discussed as a possible source of adverse health effects of electromagnetic fields^{38 - 40} and has been proposed as the basis of migratory birds ability to sense the geomagnetic field for orientation^{41 - 55}. Research into radical-pair based magneto-reception has stimulated great interest in the past decade. Since the proposal by Ritz *et al.*⁴² that the biological receptor may be the photoreceptor cryptochrome, significant effort has been expended in collecting evidence for magnetic fields in the cryptochrome family of proteins⁴⁵.

Although our understanding of magnetic effects in biological systems is still unclear^{47 - 50}, a number of recent studies lend support to the radical pair-based magnetic sensing^{42, 51, 52}, its physiological basis^{53 - 55} and the suggested cryptochrome proteins as magneto-receptors^{56 - 60}, thereby supporting the RPM as source of magnetic field effects in biological systems.

The initial detection of the magnetic field is thought to occur in an ensemble of cryptochromes. At any given time, a subset of all cryptochromes is activated through light, leading to changes in oxidation states of their bound flavin cofactors. An external magnetic field can affect intermediate radical pair states during oxidation or reduction reactions, ultimately leading to changed kinetics in reaching the signaling states of light-activated cryptochromes, thereby influencing the concentration of, as yet unknown, downstream signaling partners^{42, 61, 62}.

Effects of static magnetic fields have been shown during bird behavioral experiments⁶³, and *in vitro* radical-pair systems⁶⁴. Effects of alternating electromagnetic fields in the range of MHz have been experimentally shown to affect bird behavior during migratory seasons^{43, 63}. Furthermore, radiofrequency effects have been experimentally shown on a flavin-based radical-pair reaction involving Reactive Oxygen Species⁶⁴. Theoretically, radiofrequency effects on radical-pair reactions are well-predicted^{64, 65}. To the best of our knowledge no studies have been performed so far on the effects of pulsed magnetic fields on radical-pair reactions.

6.1 Theory of radical pair reactions-based chemical magneto-sensing

A simplified radical-pair reaction model combines coherent quantum spin dynamics of singlet-triplet interconversion, driven by the spin Hamiltonian \hat{H} , with the kinetics of spin-selective reactions, in which singlet and triplet pairs decay into distinct singlet and triplet reaction products [equation 1]. The following phenomenological master equation describes the time evolution of a radical-pair reaction with a spin-independent decay rate:

$$\dot{\rho}(t) = \frac{i}{\hbar} [\hat{H}, \rho(t)]_- - \frac{k}{2} [P^S, \rho(t)]_+ - \frac{k}{2} [P^T, \rho(t)]_+ \quad (1)$$

where P^S and P^T are, respectively, the singlet and triplet projection operator and k denotes the reaction rates. The lifetime of a radical-pair is $\tau = k^{-1}$. If we assume that a radical-pair is

created in a singlet state at time $t=0$, $\rho(0) = \frac{p^S}{\gamma_R[p^S]}$, the singlet yield Φ_S , i.e. the amount of product decaying via singlet channel is given by:

$$\Phi_S = \int_0^{\infty} F_S(t) dt \quad (2)$$

with $F_S(t)$ being the time dependent singlet probability [32,34].

6.2 Effect of PEMF on a simple radical-pair reaction model

Here we show as a proof of principle that a magnetic pulse of the PEMF device affects a radical-pair reaction yield.

We consider the simplest radical-pair model that accounts for magnetic field effects, the so called one-proton radical-pair model, i.e. a radical-pair with one single spin-1/2 nucleus. This model has been extensively studied as a proof of principle in the literature⁶⁶⁻⁶⁸. The spin Hamiltonian for this simple model is:

$$\hat{H} = aS_A \cdot I + \gamma_e B \cdot (S_A + S_B) \quad (3)$$

in which a is the isotropic hyperfine coupling constant, S_A and S_B are the spin operators of the two electrons, and I is the spin operator of the nucleus. γ_e is the electron gyromagnetic ratio and B the external magnetic field. If the external magnetic field B is constant, as the geomagnetic field, the solution of a radical-pair reaction is straightforward^{66,69}. If a radical-pair is subject to a magnetic field that changes in time, as for example under radiofrequency, numerical methods needed to calculate the reaction yield.

Modeling the pulses.

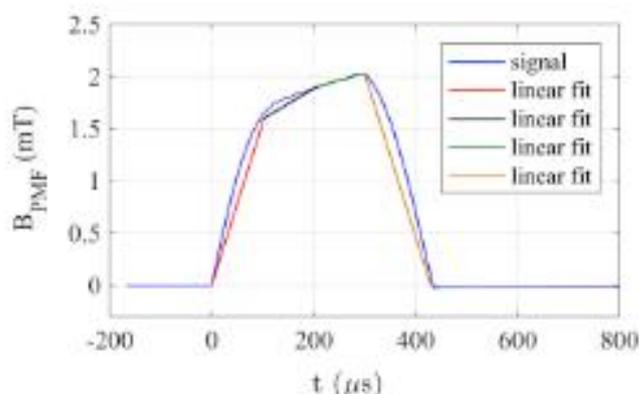
We consider that a radical-pair is exposed to the geomagnetic field and the PEMF signal. The PEMF signal, is time dependent $B_{PEMF}(t)$, and thus the Hamiltonian in Eq. 3 becomes time dependent.

$$B(t) = B_{geo} + B_{PEMF}(t)$$

The *pulse repetition frequency* is 10 Hz, which is out of the range of resonance effects in radical-pair reactions⁴³. The PEMF has a pulse duration of about 430 μs . Figure 3A reports the magnetic signal $B_{PEMF}(t)$ during a pulse. Theoretical interpretations of experimental results suggest radical pair lifetimes of the order of few microseconds, from 1 μs to 100 μs ⁶⁸. Thus, during one pulse a radical-pair with such lifetimes will undergo radical-pair reactions that are subject to a different portion of the magnetic pulse. We consider a radical-pair with a lifetime of about 100 μs , and that at time $t=0$ both a radical-pair reaction is activated and a pulse signal starts.

We consider 4 different portions of the magnetic signal, where each portion has a duration of about 100 μs . We fit each portion with a linear model $f(t)=p_1t+p_2$, and find the corresponding

magnetic fields as function of time. Supplementary Figure 7 shows the different portions considered here, and their linear fit.



Supplementary Figure 7. The signal (blue curve) was divided in 4 portions, each of a duration of about $100 \mu\text{s}$. Each portion was fitted with a linear model. The red, black, green and yellow curves represent the linear fit. For all, the goodness of the fit was about 0.98.

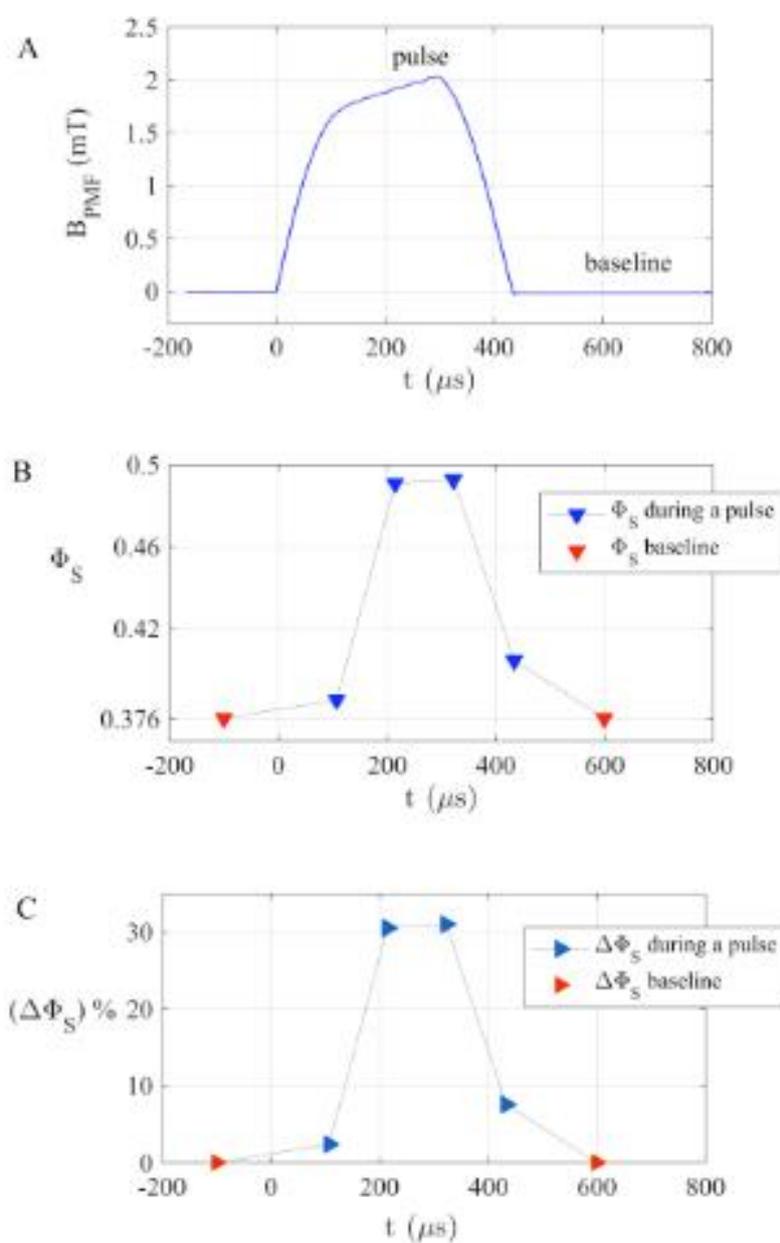
Results

We consider a simple radical-pair model with one isotropic hyperfine interaction of strength $a=0.5$ mT, and we suppose that a radical-pair starts in a singlet state. We set the geomagnetic field to $B=0.05$ mT. First of all we calculate the singlet yield Φ_s for a radical-pair under only the geomagnetic field (control), which resulted 0.376, in agreement with previous results⁶⁹. Then we add the PEMF signal, and calculate the reaction yield under each portion of the magnetic pulse. Results are reported in Supplementary Figure S8. In particular Supplementary Figure 8A reports the magnetic pulse signal. Supplementary Figure 8B reports the singlet yields for each portion of the pulse signal (red triangles), and during the baseline (blue triangles). Supplementary Figure 8C reports the percentage changes in singlet yield due to a portion of the pulse with respect to the control.

We consider that a pulse starts at time $t=0$. For the first $100 \mu\text{s}$ a radical-pair is subject to a portion of the signal where the magnetic field increases from 0 to about 1.6 mT, and the singlet yield resulted 0.385, leading to about 2.5% variation in product yield with respect to the control (or geomagnetic field only). In the second portion ($100 - 200 \mu\text{s}$) a radical-pair is subject to magnetic field which increases from 1.6 mT to about 1.8 mT, and the reaction yield resulted 0.490, leading to 30% variation with respect to the control. In the 3th portion ($200-300 \mu\text{s}$) the radical-pair is subject to magnetic field which increases from 1.8 mT to about 2 mT, the singlet yield resulted 0.493, with 31% variation. During the last portion the radical-pair is subject to a magnetic field which decreases from 2mT to 0, and the singlet yield resulted 0.401, with 7.5% variation. During the baseline the PEMF-magnetic field is about 0, and the only external magnetic field is the geomagnetic field. Thus during the baseline the singlet yield equals 0.376 (i.e. the singlet yield value for the control).

The average singlet yield during a pulse is 0.44, which corresponds to about 14% change in singlet product yield with respect to the control.

Moreover, if we consider that a radical-pair is subject to the average of a magnetic pulse, i.e. 0.1 mT, the singlet yield would result in 0.475 (about 30% variation), which is different from the averaged singlet yields during a pulse. This is because during a pulse the magnetic intensity increases and/or decreases with time. We point out, that such numbers are specific to the radical-pair model considered here, and that for other and more realistic radical-pair models the size of variation would be different.



Supplementary Figure 8. Effect of PEMF on a simple radical-pair model. The radical-pair lifetime was set to 100 microsec. A) Magnetic field B (mT) generated the PEMF device. During a pulse the magnetic field reaches the maximum value of 2 mT. The baseline value is 0 mT. By using the Biot-Savart law we calculated the magnetic field generated by electric current I in a N=200 circular loops. More detailed information in the section 1.1. B) Singlet yields of a simple radical-pair reaction during one pulse magnetic field added to the geomagnetic field. We set the geomagnetic field to 0.05 mT. The duration of a pulse is about 430 μ s. We set the lifetime of the radical-pair to 100 μ s. During a pulse we consider that a radical-pair reaction occurs about every 100 μ s. The blue triangles report the singlet yield during the pulse plus the geomagnetic field, while the red triangles show the singlet yield during the baseline. The baseline value is the geomagnetic field. During a pulse the average singlet yield is $\bar{\Phi}_S = 0.43$. C) Percentage variation $\Delta\Phi_S$ of the singlet yield during a pulse with respect to the baseline $\Delta\Phi_S = (\Phi_S^{pulse} - \Phi_B^{baseline} / \Phi_B^{baseline}) * 100$. The average variation of the singlet yield during a pulse, with respect to the baseline, is about 14 %.

Conclusion.

Our calculations open up an entirely new paradigm for chemical magnetosensing, by demonstrating that pulsed electromagnetic fields as from the PEMF device used in this study are able to activate biological magnetoreceptors. In biological systems, the phenomenon of signal amplification is a well-known feature of response to even very subtle gradients of stimulant (for instance as in chemotactic sensing or avoidance response, or as in tropic responses of plant to directional light signals). The calculated differential in singlet yield of a putative radical pair (14%) under pulsed field conditions is well within the estimates provided for radical pairs implicated in avian migration and other instances of magnetic sensitivity⁷⁰. Future challenges will be to fully define the radical pairs involved in the cryptochrome-dependent magnetosensing response. Identification of the signal amplification pathways will also be required in order to determine how putative small local variations in reactive oxygen resulting through cryptochrome stimulation by PEMF may lead to the observed physiological changes that are of clinical significance.

Supplementary Information References

35. G. Tan, S. Lenhard, TFBSTools: an R/bioconductor package for transcription factor binding site analysis. *Bioinformatics* 32, 1555–1556 (2016).
36. U. E. Steiner, T. Ulrich, Magnetic field effects in chemical kinetics and related phenomena. *Chem. Rev.* 89, 51–147 (1989).
37. C. R. Timmel, K. B. Henbest, A study of spin chemistry in weak magnetic fields. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 362, 2573–2589 (2004).
38. A. Ahlbom, N. Day, M. Feychting, E. Roman, J. Skinner, J. Dockerty, M. Linet, M. McBride, J. Michaelis, J. H. Olsen, T. Tynes, P. K. Verkasalo, A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br. J. Cancer* 83, 692–698 (2000).
39. International Agency for Research on Cancer, Static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 80 Lyon, France: IARC (2002).

40. National Radiological Protection Board, ELF electromagnetic fields and the risk of cancer. Report of an Advisory Group on Non-ionising Radiation. Documents of the NRPB, vol 12 Chilton, Oxon, UK: NRPB (2001).
41. K. Schulten, Magnetic field effects in chemistry and biology. *Adv. Solid State Phys.* 22, 61–83 (1982).
42. T. Ritz, S. Adem, K. A. Schulten, A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds. *Biophys. J.* 78, 707–718 (2000).
43. T. Ritz, P. Thalau, J. B. Phillips, R. Wiltschko, W. Wiltschko, Resonance effects indicate a radical-pair mechanism for avian magnetic compass. *Nature* 429, 177–180 (2004).
44. C. T. Rodgers, P. J. Hore, Chemical magnetoreception in birds: the radical pair mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 353–360 (2009).
45. M. Liedvogel, H. Mouritsen, Cryptochromes: a potential magnetoreceptor: what do we know and what do we want to know? *J. R. Soc. Interface* 7, S147–S162 (2010).
46. E. W. Evans, C. A. Dodson, K. Maeda, T. Biskup, C. J. Wedge, C. R. Timmel, Magnetic field effects in flavoproteins and related systems. *Interface Focus* 3, 20130037 (2013).
47. B. Brocklehurst, K. A. McLauchlan, Free radical mechanism for the effects of environmental electromagnetic fields on biological systems. *Int. J. Radiat. Biol.* 69, 3–24 (1996).
48. B. Brocklehurst, Magnetic fields and radical reactions: recent developments and their role in nature. *Chem. Soc. Rev.* 31, 301–311 (2002).
49. K. J. Q. Lohmann, Animal behaviour: Magnetic-field perception. *Nature* 464, 1140–1142 (2010).
50. H. Mouritsen, P. Hore, The magnetic retina: light-dependent and trigeminal magnetoreception in migratory birds. *Current Opinion in Neurobiology* 22, 343 – 352 (2012).
51. A. M. Stoneham, E. M. Gauger, K. Porfyraakis, S. C. Benjamin, B. W. Lovett, A new type of radical-pair-based model for magnetoreception. *Biophys. J.* 102, 961 – 968 (2012).
52. K. Maeda, K. B. Henbest, P. Cintolesi, I. Kuprov, C. T. Rodgers, P. A. Liddell, D. Gust, C. R. Timmel, P. J. Hore, Chemical compass model of avian magnetoreception. *Nature* 453, 387–390 (2008).
53. H. Mouritsen, U. Janssen-Bienhold, M. Liedvogel, G. Feenders, J. Stalleicken, P. Dirks, R. Weiler, Cryptochromes and neuronal-activity markers colocalize in the retina of migratory birds during magnetic orientation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* 101, 14294–14299 (2004).
54. A. Moller, S. Sagasser, W. Wiltschko, B. Schierwater, Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible transducer for the avian magnetic compass. *Naturwissenschaften* 91, 585–588 (2004).
55. C. Nießner, S. Denzau, J. C. Gross, L. Peichl, H. J. Bischof, G. Fleissner, W. Wiltschko, R. Wiltschko, Avian ultraviolet/violet cones identified as probable magnetoreceptors. *PLoS ONE* 6, e20091 (2011).
56. M. Ahmad, P. Galland, T. Ritz, R. Wiltschko, W. Wiltschko, Magnetic intensity affects cryptochromedependent responses in *arabidopsis thaliana*. *Planta* 225, 615–624 (2007).
57. R. J. Gegear, A. Casselman, S. Waddell, S. M. Reppert, Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *drosophila*. *Nature* 454, 1014–1018 (2008).
58. T. Yoshii, M. Ahmad, C. Helfrich-Forster, Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity of *drosophila* circadian clock. *PLoS Biol* 7, e1000086 (2009).
59. R. Marley, C. N. G. Giachello, N. S. Scrutton, R. A. Baines, A. R. Jones, Cryptochrome-

- dependent magnetic field effect on seizure response in drosophila larvae. *Scientific Reports* 4 , 5799 (2014).
60. K. Maeda, A. J. Robinson, K. D. Henbest, H. J. Hogben, T. Biskup, M. Ahmad, E. Schleicher, S. Weber, C. R. Timmel, P. J. Hore, Magnetically sensitive light-induced reactions in cryptochrome are consistent with its proposed role as a magnetoreceptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* 109 , 4774–4779 (2012).
 61. S. R. T. Neil, J. Li, D. M. W. Sheppard, J. Storey, K. Maeda, K. B. Henbest, P. J. Hore, C. R. Timmel, S. R. Mackenzie, Broadband cavity-enhanced detection of magnetic field effects in chemical models of a cryptochrome magnetoreceptor. *The Journal of Physical Chemistry B* 118 , 4177–4184 (2014).
 62. M. Procopio, T. Ritz, Inhomogeneous ensembles of radical pairs in chemical compasses, , *Scientific Reports* 6, Article number: 35443 (2016),
 63. S. Engels, N. Schneider, N. Lefeldt, C. M. Hein, M. Zapka, A. Michalik, D. Elbers, A. Kitte, P. J. Hore, H. Mouritsen, Anthropogenic electromagnetic noise disrupts magnetic compass orientation in a migratory bird. *Nature* 509, 353-356 (2014).
 64. R. J. Usselman, C. Chavarriaga, P. R. Castello, M. Procopio, T. Ritz, E. Dratz, D. A. Singel, C. F. Martino, The Quantum Biology of Reactive Oxygen Species Partitioning Impacts Cellular Bioenergetics. *Scientific Reports* 6, Article number: 38543 (2016).
 65. T. Ritz, R. Wiltschko, P. J. Hore, T. C. Rodgers, K. Stapput, P. Thalau, C. R. Timmel, W. Wiltschko, Magnetic compass of birds is based on a molecule with optimal directional sensitivity. *Biophys. J.* 96, 3451–3457 (2009).
 66. C. Timmel, F. Cintolesi, B. Brocklehurst, P. Hore, Model calculations of magnetic field effects on the recombination reactions of radicals with anisotropic hyperfine interactions. *Chem. Phys. Lett.* 334 , 387 – 395 (2001).
 67. J. Cai, F. Caruso, M. B. Plenio, Quantum limits for the magnetic sensitivity of a chemical compass. *Phys. Rev. A* 85 , 040304 (2012).
 68. C. Timmel, U. Till, B. Brocklehurst, K. Mclauchlan, P. Hore, Effects of weak magnetic fields on free radical recombination reactions. *Mol. Phys.* 95 , 71–89 (1998).
 69. D. R. Kattnig, I. A. Solov'yov, P. J. Hore, Electron spin relaxation in cryptochrome-based magnetoreception. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18, 12379–13132 (2016).
 70. R. Wiltschko, W. Wiltschko, *Magnetic Orientation in Animals* (Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1995).

*** NOTE TO EDITORS: SUPPLEMENTARY TABLES 1, 2, 4, 5, and 6 were not included in this document as they require separate uploads of large EXCEL files.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ma thèse j'ai contribué à mettre en évidence plusieurs aspects du fonctionnement des cryptochrome. Nous avons pour la première fois mis en évidence qu'il y a une induction de la synthèse des ROS à la fois dans des cellules et avec la protéine purifiée pour les cryptochromes animaux de type I (DmCRY). Cette synthèse qui a déjà été mise en évidence chez *A. thaliana* semble également avoir un rôle important à jouer au niveau de l'organisme, grâce entre autre à de multiples régulations transcriptionnelles induites par la présence de ces ROS. Enfin la présence de CEMP influe également sur la synthèse des ROS par les cryptochromes animaux, et pourrait même influencer sur les fonctions cellulaires normalement régulées par la signalisation ROS des cryptochromes.

Une des principales difficultés que j'ai rencontrées au cours de mes études a été pour chaque expérience d'obtenir un protocole qui permettait d'obtenir des résultats reproductibles. Pour le premier article cela a été principalement le cas pour les tests de détection des ROS en utilisant l'Amplex Red et le DCFH-DA. J'ai expérimenté une large gamme d'intensités lumineuses de longueurs d'onde variables, comprenant le vert (500-550nm), le bleu (400-450nm) et le rouge (600-650nm), et cela pour des durées variables. Ces remarques sont également valables pour les tests de détection des ROS dans des cellules Sf21. Au-delà d'une certaine durée (quelques dizaines de minutes), plus aucune différence n'est observable entre les cellules SPA et les cellules DmCRY. La lumière bleue déclenche donc des mécanismes indépendants du cryptochrome qui induisent également la synthèse de ROS et / ou la mort cellulaire. Une expérience complémentaire que nous pourrions réaliser consisterait à déterminer quelle proportion de protéine cryptochrome purifiée est liée à la flavine. Il suffirait, après avoir déterminé la concentration en protéine par un test de Bradford, de comparer l'absorbance à 450nm du cryptochrome à une gamme étalon concentration / absorbance de la FAD. Nous avons entrepris d'autres expériences complémentaires qui ont confirmé que la flavine seule *in vitro* était néanmoins capable de synthétiser des ROS, mais à un niveau très faible comparé à la synthèse de ROS par la protéine DmCRY. En utilisant une protéine contrôle comme la BSA (albumine bovine de sérum), aucune synthèse de ROS n'a toutefois été détectée en lumière bleue. Nous avons également vérifié que le H₂O₂ était stable dans le tampon d'éluion de nos protéines, composé d'imidazole. Au niveau de la microscopie les différences observées pour la synthèse de ROS entre les cellules SPA et DmCRY sont bien plus évidentes à l'apoptome à faible grossissement (10X) qu'en utilisant le fort grossissement (60X) du microscope confocal. C'est pourquoi nous n'avons pas utilisé les images obtenues au microscope confocal. Il faut enfin préciser que les expériences avec la protéine DmCRY purifiée, nous avons utilisé une intensité de lumière 20 à 30 fois plus importante qu'avec les cellules. Étant donné la présence probable d'agents réducteurs dans les cellules, on peut supposer que la photoréduction est facilitée *in vivo*. Durant certaines expériences complémentaires qui n'ont pas été publiées nous avons mis la

protéine DmCRY en présence de β -mercaptoéthanol, ce qui a grandement accéléré le cycle de photoréduction. Une quantité bien plus importante de ROS a été alors détectée.

Dans ma seconde série d'études j'ai observé la présence de ROS dans les apex racinaires d'*A.thaliana* exprimant les protéines CRY1 et CRY2. Toutefois dans les autres tissus (tige, racines et cotylédons) le marquage des ROS était très faible et / ou irréguliers. De plus dans les tiges et les cotylédons, les cellules contiennent notamment des chloroplastes susceptibles de synthétiser des ROS. Ceci est moins vrai dans le cas particulier de nos apex racinaires obtenus à partir de plantules cultivées à l'obscurité. Deux marqueurs ont été utilisés pour observer les ROS : le DCFH-DA et le SOSG. Néanmoins le marquage des ROS avec le SOSG nous est apparu beaucoup plus net, ceci étant probablement dû à une meilleure pénétration du fluorochrome dans les cellules. Les marqueurs utilisés pour mettre en évidence l'ADN et les ROS (HOECHST et SOSG/DCFH-DA) ont été exposés à la lumière bleue avant leur observation au microscope à fluorescence. Or ces marqueurs sont eux-mêmes excitables par certaines longueurs d'onde proches de celles que nous utilisons. Ceci pourrait être à l'origine de certains signaux fluorescents parasites, ce qui nous a obligés à faire nos observations le plus rapidement possible. Ceci est également valable pour certaines observations des 1^{er} et 3^{ème} articles. Nous n'avons pas utilisé de marqueur spécifique du superoxyde tel que le dihydroéthidium. Il serait donc nécessaire de l'utiliser afin de confirmer la théorie générale de la réoxydation des cryptochromes. Il est également envisageable d'utiliser d'autres mutants C-terminaux pour CRY1, CRY2 et les doubles mutants CRY1/CRY2. Pour nos études de qPCR, nous avons utilisé des plantules d'*A. thaliana* sauvages et mutantes pour CRY1 dans le but d'étudier l'influence de cette protéine dans la régulation de l'expression génétique de 12 gènes connus dans la signalisation ROS. Il n'est pas encore possible de déterminer si ces 12 gènes dont nous avons analysé l'expression sont directement régulés par les ROS synthétisés par les cryptochromes, par interaction directe ou non. Pour étudier ces hypothèses, nous pourrions réaliser des expériences de double hybride avec des levures et vérifier s'il y a interaction entre les cryptochromes et ces différentes protéines en réalisant des dosages colorimétriques ou des mesures de croissance.

Nos études concernant la sensibilité magnétique des cryptochromes ne confirment pas le modèle théorique des paires radicalaires, bien que de nets effets aient été observés sur la synthèse des ROS. Les résultats obtenus concernant les effets du CEMP sur les protéines purifiées CRY1, CRY2, DmCRY n'ont pas montré d'effets clairs sur la production de ROS (résultats non publiés). Notre objectif était d'obtenir un résultat reproductible, mais également de définir les conditions expérimentales adéquates, pour l'intensité et la durée de l'éclairage, la température, l'intensité du champ magnétique, la nature du champ magnétique (pulsé ou statique) ainsi que l'influence d'agents

réducteurs et/ou partenaires protéiques. Aucun effet n'a été observé de manière reproductible, la sensibilité des cryptochromes aux champs magnétiques *in vitro* n'est pas encore prouvée à ce jour. Cependant nos études *in vivo* présentées dans l'article montrent que le cryptochrome reste sensible aux effets induits par les CEMP. Les figures 5A du premier article et 1C du troisième article, montrent toutes les deux des effets cryptochrome-dépendants sur la synthèse des ROS dans des cellules Sf21 en présence de lumière bleue et / ou de CEMP. La figure C montre nettement un effet additionnel du CEMP sur la production de ROS par les cryptochromes. Il serait intéressant de compléter ces observations en réalisant les mêmes expériences en utilisant d'autres constructions protéiques, comme des cellules d'insecte Sf21 surexprimant CRY1 ou CRY2 d'*A. thaliana* ainsi que hCRY1 (CRY1 humain).

A l'issue de mes travaux, de nouveaux objectifs ont été définis et un certain nombre d'expérimentations sont actuellement en cours :

- Après avoir étudié la sensibilité magnétique des cryptochromes animaux, nous étudions à présent cette sensibilité chez les plantes avec *A. thaliana*. Le rôle des cryptochromes dans la sensibilité magnétique chez *A. thaliana*, notamment pour la régulation génétique ou la synthèse des ROS reste à déterminer. Toutefois nous sommes récemment parvenus à comprendre en partie le mécanisme théorique de magnétoreception. Il apparaît en effet que lorsque l'on expose des plantules d'*A. thaliana* sauvages à un champ magnétique statique ainsi qu'à de la lumière bleue, on observe des effets sur la croissance de l'hypocotyle. Des résultats significatifs (**Article accepté, Planta**) sur cette croissance ont été obtenus dans les conditions suivantes : alternance de champ magnétique (5min OFF / 10min ON) et de lumière bleue (5min ON / 10min OFF). Un effet remarquable a été observé en présence de champ magnétique pendant les périodes d'obscurité (20% de croissance supplémentaire par rapport au contrôle sans champ magnétique). Ce résultat semble indiquer que le champ magnétique joue un rôle important pendant la réoxydation des cryptochromes. Nous avons également remarqué que la phosphorylation de CRY1 d'*A. thaliana* est plus importante après 30 minutes d'exposition en lumière bleue lorsqu'un champ magnétique est présent, comparé au témoin sans champ magnétique. La phosphorylation des requiert un changement conformationnel du domaine C-terminal, afin que certaines kinases puissent accéder à leur substrat (**Wang et al, 2015**). Cependant seule la forme active est phosphorylée, ce qui signifie que l'augmentation de la phosphorylation que nous avons détecté en présence des champs magnétiques correspond à une augmentation de la proportion de cryptochrome actif.

- Suite aux résultats de notre premier article sur le DmCRY, et à d'autres travaux étudiant le rôle de cette protéine sur le stress oxydant et la longévité chez la drosophile (**Rakshit & Giebultowicz, 2013**), nous nous sommes fixé de nouveaux objectifs. Il est en effet possible que les effets bénéfiques de la surexpression de DmCRY en conditions d'hyperoxie soient dus à la synthèse des ROS par le domaine N-terminal. Il serait théoriquement possible de contrôler la synthèse de ces ROS par les cryptochromes, notamment en modulant l'intensité de l'éclairage auxquelles les drosophiles sont soumises. Nous étudions donc actuellement deux souches de drosophiles, mutantes nulles pour DmCRY et sauvages. Ces drosophiles sont exposées à un éclairage continu en lumière bleue à différentes intensités, soit laissées à l'obscurité. Les courbes de survie correspondantes à chacune des populations sont finalement obtenues après comptage régulier du nombre de mouches mortes et vivantes. Les premiers résultats que nous avons obtenus indiquent que la mortalité des drosophiles sauvages exposées à une forte lumière bleue augmente très rapidement pour atteindre 100% au bout de 10 jours. Lorsque l'intensité d'éclairage à laquelle ont été soumises les drosophiles est plus faible, la mortalité augmente bien plus lentement chez la souche sauvage, et n'atteint 100% qu'après 30 jours. Les souches mutantes pour DmCRY ont une durée de vie moyenne bien supérieure à leurs homologues sauvages. On peut attribuer ces résultats aux effets toxiques d'une activation prolongée de DmCRY, par sa signalisation C-terminale et/ou sa synthèse de ROS par son domaine N-terminal. En revanche aucun effet bénéfique n'a pour le moment été détecté après éclairage en lumière bleue de faible intensité, supposée activer les défenses antioxydantes, sans que la quantité de ROS produite ne soit trop nocive pour les mouches. Ces résultats bien que reproductibles nécessitent toutefois un certain approfondissement.
- Afin de vérifier l'hypothèse que nous avons formulée, et selon laquelle les cryptochromes pourraient directement modifier les équilibres rédox de leur environnement proche, dont leurs partenaires protéiques, nous expérimentons des expériences de triple hybride chez la levure. La protéine GBF est connue chez *A. thaliana* comme étant un facteur de transcription dont la liaison à l'ADN est modulable par les ROS (**Shaikhali et al, 2012**). Elle est également connue comme étant un des partenaires protéiques de HY5 et HYH, qui interagissent eux-mêmes avec COP1 (**Singh et al, 2012**). Récemment, certains de nos résultats en double hybride chez la levure ont suggéré qu'il y a une interaction entre CRY1 d'*A. Thaliana* et GBF. Afin d'approfondir ces résultats, nous réalisons plusieurs expériences de triple hybride entre GBF, CRY1 et la séquence promotrice sur laquelle se fixe GBF. L'expression du gène rapporteur sous le contrôle du promoteur GBF est coréllée à la croissance des levures. Une

baisse ou une diminution de leur croissance entre la condition contrôle (sans le gène CRY1) et l'autre condition pour laquelle CRY1 est présent renforcerait l'hypothèse selon laquelle CRY1 régulerait GBF par sa synthèse de ROS. De la même manière, chez la drosophile, dFOXO est un facteur de transcription dont la fixation à l'ADN est modulée par la présence des ROS. De plus nous soupçonnons dFOXO d'être en lien étroit avec DmCRY, notamment pour leur implication commune dans la longévité et la signalisation ROS (Klotz *et al*, 2015). Il est donc possible que DmCRY interagisse avec dFOXO grâce à une synthèse de ROS de son domaine N-terminal.

- Les mécanismes expliquant l'interaction des cryptochromes avec leurs partenaires protéiques n'étant pas bien compris, nous étudions l'hypothèse selon laquelle les ROS puissent avoir un rôle à jouer dans ce processus. Les protéines CIB1 et SPA1 sont connues pour interagir avec CRY1 et CRY2 chez *A. thaliana* (Liu *et al*, 2011 ; Zuo *et al*, 2011). Il est possible d'étudier les mécanismes permettant l'interaction de CRY1, CRY2 avec leurs partenaires protéiques en étudiant la force de leurs interactions. Les protéines mutantes ponctuelles CRY1 et CRY2 pour lesquelles un seul acide aminé est modifié sont étudiées. Ainsi dans notre système de double hybride, chez la levure, la force de l'interaction entre les deux protéines est proportionnelle à la croissance des cellules. Certaines des mutations concernent des résidus histidine ou cystéine. Ces acides aminés sont sensibles à l'état redox de la cellule, et ont dans le cas des cystéines un rôle majeur pour la structure tertiaire des protéines. Il est possible que les ROS synthétisés par les cryptochromes entraînent des modifications redox pour ces résidus, et déclenchent au sein de ces protéines des changements structuraux et/ou des modifications de leur affinité à leurs partenaires protéiques. Les deux modèles que nous étudions actuellement sont les interactions CRY1 / SPA1 d'une part, et CRY2 / CIB1 d'autre part. En parallèle, nous réalisons ces mêmes analyses pour les protéines DmCRY et dFOXO, ce qui pourrait en outre approfondir nos connaissances sur la longévité des drosophiles en relation avec le cryptochrome.

En conclusion, mes trois années de thèse m'ont permis d'approfondir de manière considérable mes connaissances en biologie moléculaire, en microbiologie, en culture cellulaire ainsi qu'en biologie végétale. J'ai également eu l'occasion d'interagir avec l'ensemble des membres de l'équipe qui m'ont prodigué de précieux conseils pour l'ensemble de mes études. Leurs profils variés, qu'ils soient ingénieurs, techniciens, maître de conférence ou doctorants, étaient très complémentaires et m'ont permis de m'épanouir aussi bien personnellement que scientifiquement.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, Kerlavage, Fleischmann, Fuldner, Bult, Lee, Kirkness, Weinstock, Gocayne & White (1995)** Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* 377, 3–174.
- Ahmad M (2016)** Photocycle and signaling mechanisms of plant cryptochromes. *Curr Opin Plant Biol* 33, 108–115.
- Ahmad M, Galland P, Ritz T, Wiltschko R & Wiltschko W (2007)** Magnetic intensity affects cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 225, 615–624.
- Ahmad M, Grancher N, Heil M, Black R, Giovani B, Galland P & Lardemer D (2002)** Action Spectrum for Cryptochrome-Dependent Hypocotyl Growth Inhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129, 774–785.
- Ahmad M, Jarillo J & Cashmore A (1998)** Chimeric Proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* Blue Light Photoreceptors Indicate Overlapping Functions and Varying Protein Stability. *Plant Cell Online* 10, 197–207.
- Ahmad M, Jarillo J, Smirnova O & Cashmore A (1998)** Cryptochrome blue-light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism. *Nature* 392, 33701.
- Ahmad M, Lin C & Cashmore A (1995)** Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *Plant J* 8, 653–658.
- Ahmad, M., and Cashmore, A.R. (1993).** HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366: 162–166.
- Apel K & Hirt H (2004)** REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55, 373–399.
- Arman D (2006)** Free Radical Theory of Aging: An Update. *Ann Ny Acad Sci* 1067, 10–21.
- Arthaut L-D, Jourdan N, Mteyrek A, Procopio M, El-Esawi M, d' Harlingue A, Bouchet P-E, Witczak J, Ritz T, Klarsfeld A, Birman S, Usselman R, Hoecker U, Martino C & Ahmad M (2017)** Blue-light induced accumulation of reactive oxygen species is a consequence of the *Drosophila* cryptochrome photocycle. *Plos One* 12, e0171836.
- Assmann, S. M. and X. Q. Wang (2001)** From milliseconds to millions of years: guard cells and environmental responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 421–428.
- Aubert C, Vos M, Mathis P, Eker A & Brettel K (2000)** Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* 405, 586.
- Awad J, Stotz H, Fekete A, Krischke M, Engert C, Havaux M, Berger S & Mueller M (2015)** 2-Cysteine Peroxiredoxins and Thylakoid Ascorbate Peroxidase Create a Water-Water Cycle That Is Essential to Protect the Photosynthetic Apparatus under High Light Stress Conditions. *Plant Physiol* 167, 1592–1603.

- Balazadeh S, Kwasniewski M, Caldana C, Mehrnia M, Zanor M, Xue G-P & Mueller-Roeber B** (2011) ORS1, an H₂O₂-Responsive NAC Transcription Factor, Controls Senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 4, 346–360.
- Banerjee R, Schleicher E, Meier S, Viana R, Pokorny R, Ahmad M, Bittl R & Batschauer A** (2007) The Signaling State of *Arabidopsis* Cryptochrome 2 Contains Flavin Semiquinone. *J Biol Chem* 282, 14916–14922.
- Benito J, Houlihan J, Roman G & Hardin P** (2008) The Blue-Light Photoreceptor CRYPTOCHROME Is Expressed in a Subset of Circadian Oscillator Neurons in the *Drosophila* CNS. *J Biol Rhythm* 23, 296–307.
- Berndt A, Kottke T, Breitzkreuz H, Dvorsky R, Hennig S, Alexander M & Wolf E** (2007) A Novel Photoreaction Mechanism for the Circadian Blue Light Photoreceptor *Drosophila* Cryptochrome. *J Biol Chem* 282, 13011–13021.
- Bhattacharjee S** (2012) The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *J Botany* 2012, 1–22.
- Bienert G & Chaumont F** (2014) Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Gen Subj* 1840, 1596–1604.
- Biernat M, Eker A, van Oers M, Vlak J, van der Horst G & Chaves I** (2012) A Baculovirus Photolyase with DNA Repair Activity and Circadian Clock Regulatory Function. *J Biol Rhythm* 27, 3–11.
- Biswas, K. K., R. Neumann, K. Haga, O. Yatoh and M. Iino** (2003) Photomorphogenesis of rice seedlings: a mutant impaired in phytochrome-mediated inhibition of coleoptile growth. *Plant Cell Physiol.* 44, 242–254.
- Blatt, M. R.** (2000) Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 221–241.
- Bolte P, Bleibaum F, Einwich A, Günther A, Liedvogel M, Heyers D, Depping A, Wöhlbrand L, Rabus R, Janssen-Bienhold U & Mouritsen H** (2016) Localisation of the Putative Magnetoreceptive Protein Cryptochrome 1b in the Retinae of Migratory Birds and Homing Pigeons. *Plos One* 11, e0147819.
- Bouly J-P, Schleicher E, Dionisio-Sese M, Vandenbussche F, Straeten D, Bakrim N, Meier S, Batschauer A, Galland P, Bittl R & Ahmad M** (2007) Cryptochrome Blue Light Photoreceptors Are Activated through Interconversion of Flavin Redox States. *J Biol Chem* 282, 9383–9391.
- Brandes N, Schmitt S & Jakob U** (2009) Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins. *Antioxidants Redox Signal* 11, 997–1014.
- Brautigam C, Smith B, Ma Z, Palnitkar M, Tomchick D, Machius M & Deisenhofer J** (2004) Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 12142–12147.
- Brazard J, Usman A, Lacombe F, Ley C, Martin M & Plaza P** (2011) New Insights into the Ultrafast Photophysics of Oxidized and Reduced FAD in Solution. *J Phys Chem* 115, 3251–3262.
- Brocklehurst B** (2002) Magnetic fields and radical reactions: recent developments and their role in nature. *Chem Soc Rev* 31, 301–311.

- Brown S, Ripperger J, Kadener S, Fleury-Olela F, Vilbois F, Rosbash M & Schibler U** (2005) PERIOD1-Associated Proteins Modulate the Negative Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Science* 308, 693–696.
- Brudler R, Hitomi K, Daiyasu H, Toh H, Kucho K, Ishiura M, Kanehisa M, Roberts V, Todo T, Tainer J & Getzoff E** (2003) Identification of a New Cryptochrome Class Structure, Function, and Evolution. *Mol Cell* 11, 59–67.
- Burney S, Hoang N, Caruso M, Dudkin E, Ahmad M & Bouly J-P** (2009) Conformational change induced by ATP binding correlates with enhanced biological function of Arabidopsis cryptochrome. *Febs Lett* 583, 1427–1433.
- Burney S, Wenzel R, Kottke T, Roussel T, Hoang N, Bouly J, Bittl R, Heberle J & Ahmad M** (2012) Single Amino Acid Substitution Reveals Latent Photolyase Activity in Arabidopsis cry1. *Angewandte Chemie Int Ed* 51, 9356–9360.
- Busino L, Bassermann F, Maiolica A, Lee C, Nolan P, Godinho S, Draetta G & Pagano M** (2007) SCFFbx13 Controls the Oscillation of the Circadian Clock by Directing the Degradation of Cryptochrome Proteins. *Science* 316, 900–904.
- Busza A, Emery-Le M, Rosbash M & Emery P** (2004) Roles of the Two *Drosophila* CRYPTOCHROME Structural Domains in Circadian Photoreception. *Science* 304, 1503–1506.
- Calabrò E, Condello S, Currò M, Ferlazzo N, Caccamo D, Magazù S & Ientile R** (2013) Effects of low intensity static magnetic field on FTIR spectra and ROS production in SH-SY5Y neuronal-like cells. *Bioelectromagnetics* 34, 618–629.
- Canamero R, Bakrim N, Bouly J-P, Garay A, Dudkin E, Habricot Y & Ahmad M** (2006) Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in Arabidopsis thaliana. *Planta* 224, 995–1003.
- Chatterjee, M., P. Sharma and J. P. Khurana** (2006) Cryptochrome 1 from *Brassica napus* is up-regulated by blue light and controls hypocotyl/stem growth and anthocyanin accumulation. *Plant Physiol.* 141, 61–74.
- Chaves I, Pokorny R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, Essen L-O, van der Horst G, Batschauer A & Ahmad M** (2011) The Cryptochromes: Blue Light Photoreceptors in Plants and Animals. *Plant Biol* 62, 335–364.
- Chaves I, Yagita K, Barnhoorn S, Okamura H, van der Horst G & Tamanini F** (2006) Functional Evolution of the Photolyase/Cryptochrome Protein Family: Importance of the C Terminus of Mammalian CRY1 for Circadian Core Oscillator Performance. *Mol Cell Biol* 26, 1743–1753.
- Chen A, Du L, Xu Y, Chen L & Wu Y** (2005) The Effect of Blue Light Exposure on the Expression of Circadian Genes: Bmal1 and Cryptochrome 1 in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Jaundiced Neonates. *Pediatr Res* 58, pr2005820.
- Chen D, Xu G, Tang W, Jing Y, Ji Q, Fei Z & Lin R** (2013) Antagonistic Basic Helix-Loop-Helix/bZIP Transcription Factors Form Transcriptional Modules That Integrate Light and Reactive Oxygen Species Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 1657–1673.
- Cheung M, Daizadeh I, Stuchebrukhov AA & Heelis P** (1999) Pathways of Electron Transfer in Escherichia coli DNA Photolyase: Trp306 to FADH. *Biophys J* 76, 1241–1249.

- Chou D & Elledge S** (2006) Tipin and Timeless form a mutually protective complex required for genotoxic stress resistance and checkpoint function. *Proc National Acad Sci* 103, 18143–18147.
- Collins B, Mazzoni E, Stanewsky R & Blau J** (2006) Drosophila CRYPTOCHROME Is a Circadian Transcriptional Repressor. *Curr Biol* 16, 441–449.
- Consentino L, Lambert S, Martino C, Jourdan N, Bouchet P, Witczak J, Castello P, El-Esawi M, Corbineau F, d' Harlingue A & Ahmad M** (2015) Blue-light dependent reactive oxygen species formation by Arabidopsis cryptochrome may define a novel evolutionarily conserved signaling mechanism. *New Phytologist*, 1450–1462.
- Cook J, Summers J & Cook E** (2015) *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, sciencedirect.
- Corbesier L & Coupland G** (2006) The quest for florigen: a review of recent progress. *J Exp Bot* 57, 3395–3403.
- Cumming R, Andon N, Haynes P, Park M, Fischer W & Schubert D** (2004) Protein Disulfide Bond Formation in the Cytoplasm during Oxidative Stress. *J Biol Chem* 279, 21749–21758.
- Czarna A, Breitzkreuz H, Mahrenholz C, Arens J, Strauss H & Wolf E** (2011) Quantitative Analyses of Cryptochrome-mBMAL1 Interactions MECHANISTIC INSIGHTS INTO THE TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE MAMMALIAN CIRCADIAN CLOCK. *Journal of Biological Chemistry*, 22414–22425.
- Danon A, Coll N & Apel K** (2006) Cryptochrome-1-dependent execution of programmed cell death induced by singlet oxygen in Arabidopsis thaliana. *Proc National Acad Sci* 103, 17036–17041.
- Darwin C & Darwin F** (1880) The power of movement in plants /.
- Dat, Vandenabeele, Vranová, Montagu V, Inzé* & Breusegem V** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci Cmls* 57, 779–795.
- Devlin P & Kay S** (2000) Cryptochromes Are Required for Phytochrome Signaling to the Circadian Clock but Not for Rhythmicity. *Plant Cell* 12, 2499–2509.
- Dietz K-J, Mittler R & Noctor G** (2016) Recent Progress in Understanding the Role of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Signaling. *Plant Physiol* 171, 1535–1539.
- Dodson C, Hore PJ & Wallace M** (2013) A radical sense of direction: signalling and mechanism in cryptochrome magnetoreception. *Trends Biochem Sci* 38, 435–446.
- Dröge W** (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 82, 47–95.
- El-Assal S, Alonso-Blanco C, Peeters A, Wagemaker C, Weller J & Koornneef M** (2003) The Role of Cryptochrome 2 in Flowering in Arabidopsis. *Plant Physiol* 133, 1504–1516.
- El-Assal, Alonso-Blanco, Hanhart & Koornneef** (2004) Pleiotropic Effects of the Arabidopsis Cryptochrome 2 Allelic Variation Underlie Fruit Trait-Related QTL. *Plant Biol* 6, 370–374.
- El-Esawi M, Glascoe A, Engle D, Ritz T, Link J & Ahmad M** (2015) Cellular metabolites modulate in vivo signaling of Arabidopsis cryptochrome-1. *Plant Signal Behav* 10, e1063758.

- Emery P, So WV, Kaneko M, Hall J & Rosbash M** (1998) CRY, a Drosophila Clock and Light-Regulated Cryptochrome, Is a Major Contributor to Circadian Rhythm Resetting and Photosensitivity. *Cell* 95, 669–679.
- Engelen E, Janssens R, Yagita K, Smits V, van der Horst G & Tamanini F** (2013) Mammalian TIMELESS Is Involved in Period Determination and DNA Damage-Dependent Phase Advancing of the Circadian Clock. *Plos One* 8, e56623.
- Engelhard C, Wang X, Robles D, Moldt J, Essen L-O, Batschauer A, Bittl R & Ahmad M** (2014) Cellular Metabolites Enhance the Light Sensitivity of Arabidopsis Cryptochrome through Alternate Electron Transfer Pathways. *Plant Cell Online* 26, 4519–4531.
- Engels S, Schneider N-L, Lefeldt N, Hein C, Zapka M, Michalik A, Elbers D, Kittel A, Hore & Mouritsen H** (2014) Anthropogenic electromagnetic noise disrupts magnetic compass orientation in a migratory bird. *Nature* 509, 353.
- Evans E, Dodson C, Maeda K, Biskup T, Wedge & Timmel C** (2013) Magnetic field effects in flavoproteins and related systems. *Interface Focus* 3, 20130037.
- Evans J, Pan H, Liu A & Welsh D** (2012) Cry1^{-/-} Circadian Rhythmicity Depends on SCN Intercellular Coupling. *J Biol Rhythm* 27, 443–452.
- Evans M, Choi W-G, Gilroy S & Morris R** (2016) A ROS-Assisted Calcium Wave Dependent on the AtRBOHD NADPH Oxidase and TPC1 Cation Channel Propagates the Systemic Response to Salt Stress. *Plant Physiol* 171, 1771–1784.
- Fanjul-Moles M** (2013) ROS signaling pathways and biological rhythms: perspectives in crustaceans. *Front Biosci* 18, 665.
- Fedele G, Edwards M, Bhutani S, Hares J, Murbach M, Green E, Dissel S, Hastings M, Rosato E & Kyriacou C** (2014) Genetic Analysis of Circadian Responses to Low Frequency Electromagnetic Fields in *Drosophila melanogaster*. *Plos Genet* 10, e1004804.
- Feldman, L. J.** (1984) Regulation of root development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 223–242.
- Filipski E, King V, Li X, Granda T, Mormont M-C, Liu X, Claustrat B, Hastings M & Lévi F** (2002) Host Circadian Clock as a Control Point in Tumor Progression. *Jnci J National Cancer Inst* 94, 690–697.
- Flors C & Nonell S** (2006) Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxic phenalenone phytoalexins. *Accounts Chem Res* 39, 293–300.
- Fogle K, Baik L, Houl J, Tran T, Roberts L, Dahm N, Cao Y, Zhou M & Holmes T** (2015) CRYPTOCHROME-mediated phototransduction by modulation of the potassium ion channel β -subunit redox sensor. *Proc National Acad Sci* 112, 2245–2250.
- Foley L, Gegear R & Reppert S** (2011) Human cryptochrome exhibits light-dependent magnetosensitivity. *Nat Commun* 2, 356.
- Frahry & Schopfer** (2001) NADH-stimulated, cyanide-resistant superoxide production in maize coleoptiles analyzed with a tetrazolium-based assay. *Planta* 212, 175–183.

- Frühwirth S, Teich K & Klug G** (2012) Effects of the Cryptochrome CryB from *Rhodospira rubra* on Global Gene Expression in the Dark or Blue Light or in the Presence of Singlet Oxygen. *Plos One* 7, e33791.
- Gangappa S, Srivastava A, Maurya J, Ram H & Chattopadhyay S** (2013) Z-Box Binding Transcription Factors (ZBFs): A New Class of Transcription Factors in Arabidopsis Seedling Development. *Mol Plant* 6, 1758–1768.
- Ganguly A, Manahan C, Top D, Yee E, Lin C, Young M, Thiel W & Crane B** (2016) Changes in active site histidine hydrogen bonding trigger cryptochrome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 10073–10078.
- Gao Y, Guo Y-K, Lin S-H, Fang Y-Y & Bai J-G** (2010) Hydrogen peroxide pretreatment alters the activity of antioxidant enzymes and protects chloroplast ultrastructure in heat-stressed cucumber leaves. *Sci Horticulture-amsterdam* 126, 20–26.
- Gauger M & Sancar A** (2005) Cryptochrome, Circadian Cycle, Cell Cycle Checkpoints, and Cancer. *Cancer Res* 65, 6828–6834.
- Gegear R, Casselman A, Waddell S & Reppert S** (2008) Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. *Nature* 454, 1014–1018.
- Gegear R, Foley L, Casselman A & Reppert S** (2010) Animal cryptochromes mediate magnetoreception by an unconventional photochemical mechanism. *Nature* 463, 804.
- Gelder R, Wee R, Lee J & Tu D** (2003) Reduced Pupillary Light Responses in Mice Lacking Cryptochromes. *Science* 299, 222–222.
- Giovani B, Byrdin M, Ahmad M & Brettel K** (2003) Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nat Struct Mol Biology* 10, nsb933.
- Gorman AA & Rodgers MAJ** (1992) New trends in photobiology Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *J Photochem Photobiology B Biology* 14, 159–176.
- Griebel T & Zeier J** (2008) Light Regulation and Daytime Dependency of Inducible Plant Defenses in Arabidopsis: Phytochrome Signaling Controls Systemic Acquired Resistance Rather Than Local Defense. *Plant Physiol* 147, 790–801.
- Grima B, Lamouroux A, Chélot E, Papin C, Limbourg-Bouchon B & Rouyer F** (2002) The F-box protein Slimb controls the levels of clock proteins Period and Timeless. *Nature* 420, 178–182.
- Guo H, Yang H, Mockler T & Lin C** (1998) Regulation of Flowering Time by Arabidopsis Photoreceptors. *Science* 279, 1360–1363.
- Gustafson C & Partch C** (2015) Emerging Models for the Molecular Basis of Mammalian Circadian Timing. *Biochemistry-us* 54, 134–149.
- Han Y, Chaouch S, Mhamdi A, Queval G, Zechmann B & Noctor G** (2013) Functional Analysis of Arabidopsis Mutants Points to Novel Roles for Glutathione in Coupling H₂O₂ to Activation of Salicylic Acid Accumulation and Signaling. *Antioxid Redox Sign* 18, 2106–2121.
- HARMAN D** (2006) Free Radical Theory of Aging: An Update. *Ann Ny Acad Sci* 1067, 10–21.

- Harris S-R, Henbest K, Maeda K, Pannell J, Timmel C, Hore PJ & Okamoto H** (2009) Effect of magnetic fields on cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *J R Soc Interface* 6, 1193–1205.
- Hayami, J., A. Kadota and M. Wada** (1986) Blue light-induced phototropic response and the intracellular photoreceptive site in *Adiantum protonemata*. *Plant Cell Physiol.* 27, 1571–1577.
- He S-B, Wang W-X, Zhang J-Y, Xu F, Lian H-L, Li L & Yang H-Q** (2015) The CNT1 Domain of Arabidopsis CRY1 Alone Is Sufficient to Mediate Blue Light Inhibition of Hypocotyl Elongation. *Mol Plant* 8, 822–825.
- Helfrich-Förster C, Winter C, Hofbauer A, Hall J & Stanewsky R** (2001) The Circadian Clock of Fruit Flies Is Blind after Elimination of All Known Photoreceptors. *Neuron* 30, 249–261.
- Herbel V, Orth C, Wenzel R, Ahmad M, Bittl R & Batschauer A** (2013) Lifetimes of Arabidopsis cryptochrome signaling states in vivo. *Plant J* 74, 583–592.
- Hill E & Ritz T** (2010) Can disordered radical pair systems provide a basis for a magnetic compass in animals? *J R Soc Interface* 7, S265–S271.
- Hirano A, Kurabayashi N, Nakagawa T, Shioi G, Todo T, Hirota T & Fukada Y** (2014) In Vivo Role of Phosphorylation of Cryptochrome 2 in the Mouse Circadian Clock. *Mol Cell Biol* 34, 4464–4473.
- Hirayama J, Nakamura H, Ishikawa T, Kobayashi Y & Todo T** (2003) Functional and Structural Analyses of Cryptochrome VERTEBRATE CRY REGIONS RESPONSIBLE FOR INTERACTION WITH THE CLOCK:BMAL1 HETERODIMER AND ITS NUCLEAR LOCALIZATION. *Journal of Biological Chemistry*, 35620–35628.
- Hitomi K, Okamoto K, Daiyasu H, Miyashita H, Iwai S, Toh H, Ishiura M & Todo T** (2000) Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Nucleic Acids Res* 28, 2353–2362.
- Hitomi K, Okamoto K, Daiyasu H, Miyashita H, Iwai S, Toh H, Ishiura M & Todo T** (2000) Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Nucleic Acids Res* 28, 2353–2362.
- Hoang N, Schleicher E, Kacprzak S, Bouly J-P, Picot M, Wu W, Berndt A, Wolf E, Bittl R & Ahmad M** (2008) Human and Drosophila Cryptochromes Are Light Activated by Flavin Photoreduction in Living Cells. *Plos Biol* 6, e160.
- Hoffman, Batschauer & Hays** (1996) PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *Mol Gen Genetics* 253, 259–265.
- Hogben H, Efimova O, Wagner-Rundell N, Timmel C & Hore PJ** (2009) Possible involvement of superoxide and dioxygen with cryptochrome in avian magnetoreception: Origin of Zeeman resonances observed by in vivo EPR spectroscopy. *Chem Phys Lett* 480, 118–122.
- Hogben L, Liu B, Zhao C, Pepper M & Lin C** (2011) The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends Plant Sci* 16, 684–691.

- Holmgren, Johansson, Berndt, Lönn ME, Hudemann & Lillig CH** (2005) Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem Soc T* 33, 1375–1377.
- Hong F** (1977) Photoelectric and magneto-orientation effects in pigmented biological membranes. *J Colloid Interf Sci* 58, 471–497.
- Hong F** (1995) Magnetic field effects on biomolecules, cells, and living organisms. *Biosystems* 36, 187–229.
- Hore PJ & Mouritsen H** (2016) The Radical-Pair Mechanism of Magnetoreception. *Annu Rev Biophys* 45, 1–46.
- Hsu D, Zhao X, Zhao S, Kazantsev A, Wang R-P, Todo T, Wei Y-F & Sancar A** (1996) Putative Human Blue-Light Photoreceptors hCRY1 and hCRY2 Are Flavoproteins[†]. *Biochemistry-us* 35, 13871–13877.
- Hu X, Bidney D, Yalpani N, Duvick J, Crasta O, Folkerts O & Lu G** (2003) Overexpression of a Gene Encoding Hydrogen Peroxide-Generating Oxalate Oxidase Evokes Defense Responses in Sunflower. *Plant Physiol* 133, 170–181.
- Hwangbo D, Gershman B, Gersham B, Tu M-P, Palmer M & Tatar M** (2004) Drosophila dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 429, nature02549.
- Ilbert M, Horst J, Ahrens S, Winter J, Graf P, Lillig H & Jakob U** (2007) The redox-switch domain of Hsp33 functions as dual stress sensor. *Nat Struct Mol Biology* 14, 556–563.
- Imaizumi T, Kadota A, Hasebe M & Wada M** (2002) Cryptochrome Light Signals Control Development to Suppress Auxin Sensitivity in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 14, 373–386.
- Imaizumi, Kanegae & Wada** (2000) Cryptochrome nucleocytoplasmic distribution and gene expression are regulated by light quality in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *The Plant cell*, 81–96.
- Ishibashi Y, Yamaguchi H, Yuasa T, Iwaya-Inoue M, Arima S & Zheng S-H** (2011) Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. *J Plant Physiol* 168, 1562–1567.
- Ito C & Tomioka K** (2016) Heterogeneity of the Peripheral Circadian Systems in *Drosophila melanogaster*: A Review. *Frontiers Physiology* 7, 8.
- Jajic I, Sarna T & Strzalka K** (2015) Senescence, Stress, and Reactive Oxygen Species. *Plants* 4, 393–411.
- Jiao Y, Lau O & Deng X** (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet* 8, nrg2049.
- Jiao Y, Ma L, Strickland E & Deng X** (2005) Conservation and Divergence of Light-Regulated Genome Expression Patterns during Seedling Development in Rice and Arabidopsis. *Plant Cell Online* 17, 3239–3256.
- Jiao Y, Yang H, Ma L, Sun N, Yu H, Liu T, Gao Y, Gu H, Chen Z, Wada M, Gerstein M, Zhao H, Qu L-J & Deng X** (2003) A Genome-Wide Analysis of Blue-Light Regulation of Arabidopsis Transcription Factor Gene Expression during Seedling Development. *Plant Physiol* 133, 1480–1493.

- Jourdan N, Martino C, El-Esawi M, Witczak J, Bouchet P-E, d' Harlingue A & Ahmad M** (2015) Blue-light dependent ROS formation by Arabidopsis cryptochrome-2 may contribute toward its signaling role. *Plant signaling & behavior*, e1042647.
- Kagawa, T. and M. Wada** (1994) Brief irradiation with red or blue light induces orientational movement of chloroplasts in dark-adapted prothallial cells of the fern *Adiantum*. *J. Plant Res.* 107, 389–398.
- Kanegae, T. and M. Wada** (1998) Isolation and characterization of homologues of plant blue-light photoreceptor (cryptochrome) genes from the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Mol. Gen. Genet.* 259, 345–353.
- Kang T-H & Leem S-H** (2014) Modulation of ATR-mediated DNA damage checkpoint response by cryptochrome 1. *Nucleic Acids Res* 42, 4427–4434.
- Kang T-H, Lindsey-Boltz L, Reardon J & Sancar A** (2010) Circadian control of XPA and excision repair of cisplatin-DNA damage by cryptochrome and HERC2 ubiquitin ligase. *Proc National Acad Sci* 107, 4890–4895.
- Kasahara M, Swartz T, Olney M, Onodera A, Mochizuki N, Fukuzawa H, Asamizu E, Tabata S, Kanegae H, Takano M, Christie J, Nagatani A & Briggs W** (2002) Photochemical Properties of the Flavin Mononucleotide-Binding Domains of the Phototropins from Arabidopsis, Rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 129, 762–773.
- Kaszuba-Zwolińska J, Gremba J, Gałdzińska-Calik B, Wójcik-Piotrowicz K & Thor P** (2015) Electromagnetic field induced biological effects in humans. *Przegląd Lekarski* 72, 636–41.
- Kavakli I, Baris I, Tardu M, Gül Ş, Öner H, Çal S, Bulut S, Yarpavvar D, Berkel Ç, Ustaoglu P & Aydın C** (2017) The Photolyase/Cryptochrome Family of Proteins as DNA Repair Enzymes and Transcriptional Repressors. *Photochem Photobiol* 93, 93–103.
- Kinoshita H, Nagasaki J, Yoshikawa N, Yamamoto A, Takito S, Kawasaki M, Sugiyama T, Miyake H, Weber A & Taniguchi M** (2010) The chloroplastic 2-oxoglutarate/malate transporter has dual function as the malate valve and in carbon/nitrogen metabolism. *Plant J* 65, 15–26.
- Kinoshita, T., M. Doi, N. Suetsugu, T. Kagawa, M. Wada and K. Shimazaki** (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414, 656–660.
- Kirschvink J & Gould J** (1981) Biogenic magnetite as a basis for magnetic field detection in animals. *Biosystems* 13, 181–201.
- Kleine T & Leister D** (2016) Retrograde signaling: Organelles go networking. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Bioenergetics* 1857, 1313–1325.
- Kleine T, Kindgren P, Benedict C, Hendrickson L & Strand Å** (2007) Genome-Wide Gene Expression Analysis Reveals a Critical Role for CRYPTOCHROME1 in the Response of Arabidopsis to High Irradiance. *Plant Physiol* 144, 1391–1406.
- Kloss B, Price J, Saez L, Blau J, Rothenfluh A, Wesley C & Young M** (1998) The Drosophila Clock Gene double-time Encodes a Protein Closely Related to Human Casein Kinase Iε. *Cell* 94, 97–107.
- Klotz L-O, Sánchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, Urbánek P, Steinbrenner H & Monsalve M** (2015) Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biology* 6, 51–72.

- Kobayashi K, Kanno S, Takao M, Yasui A, Smit B & van der Horst G** (1998) Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells. *Nucleic Acids Res* 26, 5086–5092.
- Koh E, Carmieli R, Mor A & Fluhr R** (2016) Singlet Oxygen-Induced Membrane Disruption and Serpin-Protease Balance in Vacuolar-Driven Cell Death. *Plant Physiol* 171, 1616–1625.
- Koh K, Zheng X & Sehgal A** (2006) JETLAG Resets the *Drosophila* Circadian Clock by Promoting Light-Induced Degradation of TIMELESS. *Science* 312, 1809–1812.
- Koike N, Yoo S-H, Huang H-C, Kumar V, Lee C, Kim T-K & Takahashi J** (2012) Transcriptional Architecture and Chromatin Landscape of the Core Circadian Clock in Mammals. *Science* 338, 349–354.
- Kondoh M, Shiraishi C, Müller P, Ahmad M, Hitomi K, Getzoff E & Terazima M** (2011) Light-Induced Conformational Changes in Full-Length Arabidopsis thaliana Cryptochrome. *Journal of Molecular Biology*, 128–137.
- Koornneef M, Rolff E & Spruit CJP** (1980) Genetic Control of Light-inhibited Hypocotyl Elongation in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 100, 147–160.
- Krieger-Liszkay A** (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot* 56, 337–346.
- Krishnan B, Levine J, Lynch K, Dowse H, Funes P, Hall J, Hardin P & Dryer S** (2001) A new role for cryptochrome in a *Drosophila* circadian oscillator. *Nature* 411, 35077094.
- Krishnan N, Rakshit K, Chow E, Wentzell J, Kretzschmar D & Giebultowicz J** (2012) Loss of circadian clock accelerates aging in neurodegeneration-prone mutants. *Neurobiol Dis* 45, 1129–1135.
- Kurabayashi N, Hirota T, Sakai M, Sanada K & Fukada Y** (2010) DYRK1A and Glycogen Synthase Kinase 3 β , a Dual-Kinase Mechanism Directing Proteasomal Degradation of CRY2 for Circadian Timekeeping. *Mol Cell Biol* 30, 1757–1768.
- Kyriacou C** (2009) Clocks, cryptochromes and Monarch migrations. *J Biology* 8, 55.
- Laloi C, Stachowiak M, Pers-Kamczyc E, Warzych E, Murgia I & Apel K** (2007) Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in Arabidopsis thaliana. *Proc National Acad Sci* 104, 672–677.
- Lamia K, Papp S, Yu R, Barish G, Uhlentaut H, Jonker J, Downes M & Evans R** (2011) Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. *Nature* 480, nature10700.
- Lariguet P, Ranocha P, Meyer M, Barbier O, Penel C & Dunand C** (2013) Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in Arabidopsis. *Planta* 238, 381–395.
- Lau J, Wagner-Rundell N, Rodgers C, Green N & Hore** (2010) Effects of disorder and motion in a radical pair magnetoreceptor. *J R Soc Interface* 7, S257–S264.
- Lau O & Deng X** (2012) The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci* 17, 584–593.
- Le C, Brumbarova T, Ivanov R, Stoof C, Weber E, Mohrbacher J, Fink-Straube C & Bauer P** (2016) ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA12 (ZAT12) Interacts with FER-LIKE IRON DEFICIENCY-

INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR (FIT) Linking Iron Deficiency and Oxidative Stress Responses. *Plant Physiol* 170, 540–557.

- Leask M** (1977) A physicochemical mechanism for magnetic field detection by migratory birds and homing pigeons. *Nature* 267, 144–145.
- Lee A, Lau J, Hogben H, Biskup T, Kattnig D & Hore** (2014) Alternative radical pairs for cryptochrome-based magnetoreception. *J R Soc Interface* 11, 20131063.
- Lee Y, Jang R, Francey L, Sehgal A & Hogenesch J** (2015) KPNB1 mediates PER/CRY nuclear translocation and circadian clock function. *Elife* 4, e08647.
- Li X, Wang Q, Yu X, Liu H, Yang H, Zhao C, Liu X, Tan C, Klejnot J, Zhong D & Lin C** (2011) Arabidopsis cryptochrome 2 (CRY2) functions by the photoactivation mechanism distinct from the tryptophan (trp) triad-dependent photoreduction. *Proc National Acad Sci* 108, 20844–20849.
- Li YF, Heelis PF, Sancar A.** (1991) Active site of DNA photolyase: tryptophan-306 is the intrinsic hydrogen atom donor essential for flavin radical photoreduction and DNA repair in vitro. *Biochemistry* 30:6322–29
- Li, Kim & Sancar** (1993) Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans. *Proc National Acad Sci* 90, 4389–4393.
- Lian H-L, He S-B, Zhang Y-C, Zhu D-M, Zhang J-Y, Jia K-P, Sun S-X, Li L & Yang H-Q** (2011) Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism. *Genes Dev* 25, 1023–1028.
- Liedvogel M & Mouritsen H** (2010) Cryptochromes—a potential magnetoreceptor: what do we know and what do we want to know? *J R Soc Interface* 7, S147–S162.
- Ligeng, Li, Qu, Hager, Chen, Zhao & Deng** (2001) Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* 13, 2589–607.
- Lim C, Chung B, Pitman J, McGill J, Pradhan S, Lee J, Keegan K, Choe J & Allada R** (2007) clockwork orange Encodes a Transcriptional Repressor Important for Circadian-Clock Amplitude in Drosophila. *Curr Biol* 17, 1082–1089.
- Lin C & Todo T** (2005) The cryptochromes. *Genome Biol* 6, 220.
- Lin C, Top D, Manahan C, Young M & Crane B** (2018) Circadian clock activity of cryptochrome relies on tryptophan-mediated photoreduction. *Proc National Acad Sci* 115, 201719376.
- Lin C., Robertson D.E., Ahmad M., Raibekas A.A., Jorns M.S., Dutton P.L., and Cashmore A.R.** (1995) Association of flavin adenine dinucleotide with the Arabidopsis blue light receptor CRY1. *Science* 269: 968
- Lin CT, Yang HY, Guo HW, Mockler T, Chen J, Cashmore AR** (1998) Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2686–90
- Lin, C., M. Ahmad and A. R. Cashmore** (1996) Arabidopsis cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. *Plant J.* 10, 893–902.

- Liu B, Liu H, Zhong D & Lin C** (2010) Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors. *Curr Opin Plant Biol* 13, 578–586.
- Liu B, Yang Z, Gomez A, Liu B, Lin C & Oka Y** (2015) Signaling mechanisms of plant cryptochromes in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* 129, 137–148.
- Liu B, Zuo Z, Liu H, Liu X & Lin C** (2011) *Arabidopsis* cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. *Genes Dev* 25, 1029–1034.
- Liu H, Yu X, Li K, Klejnot J, Yang H, Lisiero D & Lin C** (2008) Photoexcited CRY2 Interacts with CIB1 to Regulate Transcription and Floral Initiation in *Arabidopsis*. *Science* 322, 1535–1539.
- Liu L-J, Zhang Y-C, Li Q-H, Sang Y, Mao J, Lian H-L, Wang L & Yang H-Q** (2008) COP1-Mediated Ubiquitination of CONSTANS Is Implicated in Cryptochrome Regulation of Flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 292–306.
- Liu N & Zhang E** (2016) Phosphorylation Regulating the Ratio of Intracellular CRY1 Protein Determines the Circadian Period. *Frontiers Neurology* 7, 159.
- Liu Q, Wang Q, Deng W, Wang X, Piao M, Cai D, Li Y, Barshop W, Yu X, Zhou T, Liu B, Oka Y, Wohlschlegel J, Zuo Z & Lin C** (2017) Molecular basis for blue light-dependent phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 2. *Nat Commun* 8, 15234.
- Lopez L, Carbone F, Bianco L, Giuliano G, Facella P & Perrotta G** (2012) Tomato plants overexpressing cryptochrome 2 reveal altered expression of energy and stress-related gene products in response to diurnal cues. *Plant Cell Environ* 35, 994–1012.
- Ma, Li, Qu, Hager, Chen, Zhao & Deng** (2001) Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* 13, 2589–607.
- Maeda K, Henbest K, Cintolesi F, Kuprov I, Rodgers C, Liddell P, Gust D, Timmel C & Hore** (2008) Chemical compass model of avian magnetoreception. *Nature* 453, nature06834.
- Maeda K, Robinson A, Henbest K, Hogben H, Biskup T, Ahmad M, Schleicher E, Weber S, Timmel C & Hore** (2012) Magnetically sensitive light-induced reactions in cryptochrome are consistent with its proposed role as a magnetoreceptor. *Proc National Acad Sci* 109, 4774–4779.
- Malhotra K, Kim ST, Batschauer A, Dawut L, Sancar A.** (1995) Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry* 34:6892–99
- Mallappa C, Singh A, Ram H & Chattopadhyay S** (2008) GBF1, a Transcription Factor of Blue Light Signaling in *Arabidopsis*, Is Degraded in the Dark by a Proteasome-mediated Pathway Independent of COP1 and SPA1. *J Biol Chem* 283, 35772–35782.
- Mao, J., Y. C. Zhang, Y. Sang, Q. H. Li and H. Q. Yang** (2005) A role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 12270–12275.
- Markov M** (2015) XXIst century magnetotherapy. *Electromagn Biol Med* 34, 190–196.
- Matsumoto, N., T. Hirano, T. Iwasaki and N. Yamamoto** (2003) Functional analysis and intracellular localization of rice cryptochromes. *Plant Physiol.* 133, 1494–1503.

- Maurya J, Sethi V, Gangappa S, Gupta N & Chattopadhyay S** (2015) Interaction of MYC2 and GBF1 results in functional antagonism in blue light-mediated Arabidopsis seedling development. *Plant J* 83, 439–450.
- Mehterov N, Balazadeh S, Hille J, Toneva V, Mueller-Roeber B & Gechev T** (2012) Oxidative stress provokes distinct transcriptional responses in the stress-tolerant *atr7* and stress-sensitive *loh2* Arabidopsis thaliana mutants as revealed by multi-parallel quantitative real-time PCR analysis of ROS marker and antioxidant genes. *Plant Physiol Bioch* 59, 20–29.
- Mhamdi A, Noctor G & Baker A** (2012) Plant catalases: Peroxisomal redox guardians. *Arch Biochem Biophys* 525, 181–194.
- Michael A, Fribourgh J, Gelder R & Partch C** (2017) Animal Cryptochromes: Divergent Roles in Light Perception, Circadian Timekeeping and Beyond. *Photochem Photobiol* 93, 128–140.
- Millar, Straume, Chory, Chua & Kay** (1995) The regulation of circadian period by phototransduction pathways in Arabidopsis. *Science* 267, 1163–1166.
- Miller G, Shulaev V & Mittler R** (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol Plantarum* 133, 481–489.
- Miyaji T, Kuromori T, Takeuchi Y, Yamaji N, Yokosho K, Shimazawa A, Sugimoto E, Omote H, Ma J, Shinozaki K & Moriyama Y** (2015) AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in Arabidopsis. *Nat Commun* 6, 5928.
- Miyamoto Y & Sancar A** (1998) Circadian regulation of cryptochrome genes in the mouse. *Mol Brain Res* 71, 238–243.
- Miyata, M., M. Wada and M. Furuya** (1979) Effects of phytochrome and blue-near ultraviolet light-absorbing pigment on duration of component phases of the cell cycle in *Adiantum* gametophytes. *Dev. Growth Differ.* 21, 577–584.
- Moldt J, Pokorny R, Orth C, Linne U, Geisselbrecht Y, Marahiel M, Essen L-O & Batschauer A** (2009) Photoreduction of the Folate Cofactor in Members of the Photolyase Family. *J Biol Chem* 284, 21670–21683.
- Montagne-Larmurier, Etard, Razafimandimby, Morello & Dollfus** (2009) Two-day treatment of auditory hallucinations by high frequency rTMS guided by cerebral imaging: A 6 month follow-up pilot study. *Schizophr Res* 113, 77–83.
- Mteyrek A, Filipski E, Guettier C, Oklejewicz M, van der Horst G, Okyar A & Lévi F** (2017) Critical cholangiocarcinogenesis control by cryptochrome clock genes. *Int J Cancer* 140, 2473–2483.
- Müller P & Ahmad M** (2011) Light-activated Cryptochrome Reacts with Molecular Oxygen to Form a Flavin–Superoxide Radical Pair Consistent with Magnetoreception. *J Biol Chem* 286, 21033–21040.
- Müller P, Yamamoto J, Martin R, Iwai S & Brettel K** (2015) Discovery and functional analysis of a 4th electron-transferring tryptophan conserved exclusively in animal cryptochromes and (6-4) photolyases. *Chem Commun* 51, 15502–15505.
- Nangle S, Xing W & Zheng N** (2013) Crystal structure of mammalian cryptochrome in complex with a small molecule competitor of its ubiquitin ligase. *Cell Res* 23, cr2013136.

- Nießner C, Denzau S, Gross J, Peichl L, Bischof H-J, Fleissner G, Wiltchko W & Wiltchko R** (2011) Avian Ultraviolet/Violet Cones Identified as Probable Magnetoreceptors. *Plos One* 6, e20091.
- Nießner C, Denzau S, Malkemper E, Gross J, Burda H, Winklhofer M & Peichl L** (2016) Cryptochrome 1 in Retinal Cone Photoreceptors Suggests a Novel Functional Role in Mammals. *Sci Reports* 6, 21848.
- Nießner C, Denzau S, Peichl L, Wiltchko W & Wiltchko R** (2014) Magnetoreception in birds: I. Immunohistochemical studies concerning the cryptochrome cycle. *J Exp Biology* 217, 4221–4224.
- Noctor G & Foyer C** (2016) Intracellular Redox Compartmentation and ROS-Related Communication in Regulation and Signaling. *Plant Physiol* 171, 1581–1592.
- Ohgishi M, Saji K, Okada K & Sakai T** (2004) Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1, and phot2, by using combinatorial multiple mutants in Arabidopsis. *P Natl Acad Sci Usa* 101, 2223–2228.
- Okafuji A, Biskup T, Hitomi K, Getzoff E, Kaiser G, Batschauer A, Bacher A, Hidema J, Teranishi M, Yamamoto K, Schleicher E & Weber S** (2010) Light-induced activation of class II cyclobutane pyrimidine dimer photolyases. *DNA Repair*, 495–505.
- Osterlund M, Hardtke C, Wei N & Deng X** (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* 405, 35013076.
- Ozgür S & Sancar A** (2006) Analysis of autophosphorylating kinase activities of Arabidopsis and human cryptochromes. *Biochemistry-us* 45, 13369–74.
- Ozturk N, Lee J, Gaddameedhi S & Sancar A** (2009) Loss of cryptochrome reduces cancer risk in p53 mutant mice. *Proc National Acad Sci* 106, 2841–2846.
- Ozturk N, Selby C, Annayev Y, Zhong D & Sancar A** (2011) Reaction mechanism of Drosophila cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 516–521.
- Ozturk N, Selby C, Zhong D & Sancar A** (2014) Mechanism of Photosignaling by Drosophila Cryptochrome ROLE OF THE REDOX STATUS OF THE FLAVIN CHROMOPHORE. *J Biol Chem* 289, 4634–4642.
- Öztürk N, Song S-H, Selby C & Sancar A** (2008) Animal Type 1 Cryptochromes ANALYSIS OF THE REDOX STATE OF THE FLAVIN COFACTOR BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS. *J Biol Chem* 283, 3256–3263.
- Ozturk N, VanVickle-Chavez S, Akileswaran L, Gelder R & Sancar A** (2013) Ramshackle (Brwd3) promotes light-induced ubiquitylation of Drosophila Cryptochrome by DDB1-CUL4-ROC1 E3 ligase complex. *Proc National Acad Sci* 110, 4980–4985.
- Ozturk, Song S-H, Özgür, Selby, Morrison, Partch, Zhong & Sancar** (2007) Structure and Function of Animal Cryptochromes. *Cold Sh Q B72*, 119–131.
- Paget M & Buttner M** (2003) Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet* 37, 91–121.
- Pang K, You H, Chen Y, Chu P, Hu M, Shen J, Guo W, Xie C & Lu B** (2017) MagR Alone Is Insufficient to Confer Cellular Calcium Responses to Magnetic Stimulation. *Front Neural Circuit* 11, 11.

- Papagiannakopoulos T, Bauer M, Davidson S, Heimann M, Subbaraj L, Bhutkar A, Bartlebaugh J, Vander Heiden M & Jacks T** (2016) Circadian Rhythm Disruption Promotes Lung Tumorigenesis. *Cell Metab* 24, 324–331.
- Park, Kim, Sancar & Deisenhofer** (1995) Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science* 268, 1866–1872.
- Parsons H & Fry S** (2012) Oxidation of dehydroascorbic acid and 2,3-diketogulonate under plant apoplastic conditions. *Phytochemistry* 75, 41–49.
- Partch C, Clarkson M, Ozgür S, Lee A & Sancar A** (2005) Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor. *Biochemistry-us* 44, 3795–805.
- Paulus B, Bajzath C, Melin F, Heidinger L, Kromm V, Herkersdorf C, Benz U, Mann L, Stehle P, Hellwig P, Weber S & Schleicher E** (2015) Spectroscopic characterization of radicals and radical pairs in fruit fly cryptochrome – protonated and nonprotonated flavin radical-states. *Febs J* 282, 3175–3189.
- Pedmale U, Huang S, Zander M, Cole B, Hetzel J, Ljung K, Reis P, Sridevi P, Nito K, Nery J, Ecker J & Chory J** (2016) Cryptochromes Interact Directly with PIFs to Control Plant Growth in Limiting Blue Light. *Cell* 164, 233–245.
- Perrotta, G. Y. G., E. Nebuloso, L. Renzi and G. Giuliano** (2001) Tomato and barley contain duplicated copies of cryptochrome 1. *Plant Cell Environ.* 24, 991–997.
- Peschel N, Chen K, Szabo G & Stanewsky R** (2009) Light-Dependent Interactions between the *Drosophila* Circadian Clock Factors Cryptochrome, Jetlag, and Timeless. *Curr Biol* 19, 241–247.
- Phee B-K, Park S, Cho J-H, Jeon J-S, Bhoo S & Hahn T-R** (2007) Comparative proteomic analysis of blue light signaling components in the *Arabidopsis* cryptochrome 1 mutant. *Mol Cells* 23, 154–60.
- Platten, J. D., E. Foo, R. C. Elliott, V. Hecht, J. B. Reid and J. L. Weller** (2005) Cryptochrome 1 contributes to blue-light sensing in pea. *Plant Physiol.* 139, 1472–1482.
- Plautz J, Kaneko M, Hall J & Kay S** (1997) Independent Photoreceptive Circadian Clocks Throughout *Drosophila*. *Science* 278, 1632–1635.
- Poniedziałek B, Rzymiski P, Karczewski J, Jaroszyk F & Wiktorowicz K** (2013) Reactive oxygen species (ROS) production in human peripheral blood neutrophils exposed in vitro to static magnetic field. *Electromagn Biol Med* 32, 560–568.
- Pritchett D & Reddy A** (2017) No FAD, No CRY: Redox and Circadian Rhythms. *Trends Biochem Sci* 42, 497–499.
- Procopio M, Link J, Engle D, Witczak J, Ritz T & Ahmad M** (2016) Kinetic Modeling of the *Arabidopsis* Cryptochrome Photocycle: FADHo Accumulation Correlates with Biological Activity. *Front Plant Sci* 7, 888.
- Qin S, Yin H, Yang C, Dou Y, Liu Z, Zhang P, Yu H, Huang Y, Feng J, Hao J, Hao J, Deng L, Yan X, Dong X, Zhao Z, Jiang T, Wang H-W, Luo S-J & Xie C** (2015) A magnetic protein biocompass. *Nat Mater* 15, 217–226.

- Quan L, Zhang B, Shi W & Li H** (2008) Hydrogen Peroxide in Plants: a Versatile Molecule of the Reactive Oxygen Species Network. *J Integr Plant Biol* 50, 2–18.
- Rakshit K & Giebultowicz J** (2013) Cryptochrome restores dampened circadian rhythms and promotes healthspan in aging *Drosophila*. *Aging Cell* 12, 752–762.
- Rakshit K, Krishnan N, Guzik E, Pyza E & Giebultowicz J** (2012) Effects of Aging on the Molecular Circadian Oscillations in *Drosophila*. *Chronobiol Int* 29, 5–14.
- Ramel F, Birtic S, Ginies C, Soubigou-Taconnat L, Triantaphylidès C & Havaux M** (2012) Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proc National Acad Sci* 109, 5535–5540.
- Reppert S-M** (2007) The Ancestral Circadian Clock of Monarch Butterflies: Role in Time-compensated Sun Compass Orientation. *Cold Sh Q B* 72, 113–118.
- Reppert S-M, Gegear R & Merlin C** (2010) Navigational mechanisms of migrating monarch butterflies. *Trends Neurosci* 33, 399–406.
- Ritz T, Adem S & Schulten K** (2000) A Model for Photoreceptor-Based Magnetoreception in Birds. *Biophys J* 78, 707–718.
- Ritz T, Wiltschko R, Hore PJ, Rodgers C, Stapput K, Thalau P, Timmel C & Wiltschko W** (2009) Magnetic Compass of Birds Is Based on a Molecule with Optimal Directional Sensitivity. *Biophys J* 96, 3451–3457.
- Roberts M & Paul N** (2006) Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pests and pathogens. *New Phytol* 170, 677–699.
- Rodger J, Mo C, Wilks T, Dunlop S & Sherrard R** (2012) Transcranial pulsed magnetic field stimulation facilitates reorganization of abnormal neural circuits and corrects behavioral deficits without disrupting normal connectivity. *Faseb J* 26, 1593–1606.
- Rodgers C & Hore** (2009) Chemical magnetoreception in birds: The radical pair mechanism. *Proc National Acad Sci* 106, 353–360.
- Rodriguez-Serrano M, Romero-Puertas M, Zalda A, Corpas F, Gomez M, Rio L & Sandalio L** (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell Environ* 29, 1532–1544.
- Rohan M, Yamamoto R, Ravichandran C, Cayetano K, Morales O, Olson D, Vitaliano G, Paul S & Cohen B** (2014) Rapid Mood-Elevating Effects of Low Field Magnetic Stimulation in Depression. *Biol Psychiat* 76, 186–193.
- Rosato E, Codd V, Mazzotta G, Piccin A, Zordan M, Costa R & Kyriacou C** (2001) Light-dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY. *Curr Biol* 11, 909–917.
- Rose N, LaRocque J, Riggall A, Gosseries O, Starrett M, Meyering E & Postle B** (2016) Reactivation of latent working memories with transcranial magnetic stimulation. *Science* 354, 1136–1139.

- Rosensweig C, Reynolds K, Gao P, Laothamatas I, Shan Y, Ranganathan R, Takahashi J & Green C** (2018) An evolutionary hotspot defines functional differences between CRYPTOCHROMES. *Nature communications*, 1138.
- Salmeen A, Andersen J, Myers M, Meng T-C, Hinks J, Tonks N & Barford D** (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* 423, 769–773.
- Sanada K, Harada Y, Sakai M, Todo T & Fukada Y** (2004) Serine phosphorylation of mCRY1 and mCRY2 by mitogen-activated protein kinase. *Genes Cells* 9, 697–708.
- Sang Y, Li Q-H, Rubio V, Zhang Y-C, Mao J, Deng X-W & Yang H-Q** (2005) N-Terminal Domain-Mediated Homodimerization Is Required for Photoreceptor Activity of Arabidopsis CRYPTOCHROME 1. *Plant Cell Online* 17, 1569–1584.
- Scarpeci T, Zanon M, Carrillo N, Mueller-Roeber B & Valle E** (2008) Generation of superoxide anion in chloroplasts of Arabidopsis thaliana during active photosynthesis: a focus on rapidly induced genes. *Plant Mol Biol* 66, 361–378.
- Schroeder, J. I., G. J. Allen, V. Hugouvieux, J. M. Kwak and D. Waner** (2001) Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52, 627–658.
- Schulten K, Staerk H, Weller A, Werner H-J and Nickel B** (1976) Magnetic field dependence of the geminate recombination of radical ion pairs in polar solvents. *Z. Phys. Chem.* NF101: 371–390
- Semo M, Peirson S, Lupi D, Lucas R, Jeffery G & Foster R** (2003) Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light in aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Eur J Neurosci* 17, 1793–1801.
- Shaikhali J, Norén L, de Barajas-López J, Srivastava V, König J, Sauer U, Wingsle G, Dietz K-J & Strand Å** (2012) Redox-mediated Mechanisms Regulate DNA Binding Activity of the G-group of Basic Region Leucine Zipper (bZIP) Transcription Factors in Arabidopsis. *J Biol Chem* 287, 27510–27525.
- Shalitin D, Yang H, Mockler T, Maymon M, Guo H, Whitelam G & Lin C** (2002) Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature* 417, nature00815.
- Shalitin D, Yu X, Maymon M, Mockler T & Lin C** (2003) Blue Light-Dependent in Vivo and in Vitro Phosphorylation of Arabidopsis Cryptochrome 1. *Plant Cell* 15, 2421–2429.
- Sheerin D, Menon C, zur Oven-Krockhaus S, Enderle B, Zhu L, Johnen P, Schleifenbaum F, Stierhof Y-D, Huq E & Hiltbrunner A** (2015) Light-Activated Phytochrome A and B Interact with Members of the SPA Family to Promote Photomorphogenesis in Arabidopsis by Reorganizing the COP1/SPA Complex. *Plant Cell* 27, 189–201.
- Shenton D & Grant C** (2003) Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 374, 513–519.
- Shi S, Ansari T, McGuinness O, Wasserman D & Johnson C** (2013) Circadian Disruption Leads to Insulin Resistance and Obesity. *Curr Biol* 23, 372–381.

- Siegelman, Turner & Hendricks** (1966) The Chromophore of Phytochrome. *Plant Physiol* 41, 1289–1292.
- Sies H** (2015) Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology* 4, 180–183.
- Singh A, Ram H, Abbas N & Chattopadhyay S** (2012) Molecular Interactions of GBF1 with HY5 and HYH Proteins during Light-mediated Seedling Development in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 287, 25995–26009.
- Sitia R & Molteni S** (2004) Stress, Protein (Mis)folded, and Signaling: The Redox Connection. *Sci Stke* 2004, pe27–pe27.
- Soares N, Wojtkowska J & Jackson P** (2011) A proteomic analysis of the wound response in *Medicago* leaves reveals the early activation of a ROS-sensitive signal pathway. *J Proteomics* 74, 1411–1420.
- Solov'yov I, Mouritsen H & Schulten K** (2010) Acuity of a Cryptochrome and Vision-Based Magnetoreception System in Birds. *Biophys J* 99, 40–49.
- Spek PJ, Kobayashi, Bootsma, Takao, Eker APM & Yasui** (1996) Cloning, Tissue Expression, and Mapping of a Human Photolyase Homolog with Similarity to Plant Blue-Light Receptors. *Genomics* 37, 177–182.
- Stanewsky R** (2003) Genetic analysis of the circadian system in *Drosophila melanogaster* and mammals. *J. Neurobiol.* 54, 111–147.
- Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay S, Rosbash M & Hall J** (1998) The cryb Mutation Identifies Cryptochrome as a Circadian Photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95, 681–692.
- Stanner, Hughes, Kelly C & Buttriss** (2004) A review of the epidemiological evidence for the “antioxidant hypothesis.” *Public Health Nutr* 7, 407–422.
- Stratmann M, Stadler F, Tamanini F, van der Horst G & Ripperger J** (2010) Flexible phase adjustment of circadian albumin D site-binding protein (Dbp) gene expression by CRYPTOCHROME1. *Genes Dev* 24, 1317–1328.
- Sugai, M. and M. Furuya** (1985) Action spectrum in ultraviolet and blue light region for the inhibition of red-light-induced spore germination in *Adiantum capillus-veneris* L. *Plant Cell Physiol.* 26, 953–956.
- Tamanini F, Yagita K, Okamura H & van der Horst G** (2005) Nucleocytoplasmic shuttling of clock proteins. *Method Enzymol* 393, 418–35.
- Tamanini, Chaves, Bajek & van der Horst** (2007) Structure Function Analysis of Mammalian Cryptochromes. *Cold Sh Q B* 72, 133–139.
- Tan S-T, Dai C, Liu H-T & Xue H-W** (2013) Arabidopsis Casein Kinase1 Proteins CK1.3 and CK1.4 Phosphorylate Cryptochrome2 to Regulate Blue Light Signaling. *Plant Cell* 25, 2618–2632.
- Thöing C, Oldemeyer S & Kottke T** (2015) Microsecond Deprotonation of Aspartic Acid and Response of the α/β Subdomain Precede C-Terminal Signaling in the Blue Light Sensor Plant Cryptochrome. *J Am Chem Soc* 137, 5990–5999.

- Thornton, R. M. and K. V. Thimann** (1967) Transient effects of light on auxin transport in the *Avena* coleoptile. *Plant Physiol.* 111, 433–440.
- Todo T, Takemori H, Ryo H, Ihara M, Matsunaga T, Nikaido O, Sato K & Nomura T** (1993) A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. *Nature* 361, 361371a0.
- Tomioka K & Matsumoto A** (2010) A comparative view of insect circadian clock systems. *Cell Mol Life Sci* 67, 1397–1406.
- Tóth R, Kevei É, Hall A, Millar A, Nagy F & Kozma-Bognár L** (2001) Circadian Clock-Regulated Expression of Phytochrome and Cryptochrome Genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* 127, 1607–1616.
- Triantaphylidès C, Krischke M, Hoerberichts F, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Breusegem F & Mueller M** (2008) Singlet Oxygen Is the Major Reactive Oxygen Species Involved in Photooxidative Damage to Plants. *Plant Physiol* 148, 960–968.
- Turck F, Fornara F & Coupland G** (2008) Regulation and Identity of Florigen: FLOWERING LOCUS T Moves Center Stage. *Annu Rev Plant Biol* 59, 573–594.
- Uenaka, H., M. Wada and A. Kadota** (2005) Four distinct photoreceptors contribute to light-induced side branch formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* 222, 623–631.
- Usami, T., N. Mochizuki, M. Kondo, M. Nishimura and A. Nagatani** (2004) Cryptochromes and phytochromes synergistically regulate *Arabidopsis* root greening under blue light. *Plant Cell Physiol.* 45, 1798–1808.
- Vadalà M, Morales-Medina J, Vallelunga A, Palmieri B, Laurino C & Iannitti T** (2016) Mechanisms and therapeutic effectiveness of pulsed electromagnetic field therapy in oncology. *Cancer Medicine* 5, 3128–3139.
- Vadalà M, Vallelunga A, Palmieri L, Palmieri B, Morales-Medina J & Iannitti T** (2015) Mechanisms and therapeutic applications of electromagnetic therapy in Parkinson's disease. *Behav Brain Funct* 11, 1–12.
- Vaidya A, Top D, Manahan C, Tokuda J, Zhang S, Pollack L, Young M & Crane B** (2013) Flavin reduction activates *Drosophila* cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 20455–20460.
- Van Belkum SM, Bosker FJ, Kortekaas, Beersma DGM & Schoevers RA** (2016) Treatment of depression with low-strength transcranial pulsed electromagnetic fields: A mechanistic point of view. *Prog Neuro-psychopharmacology Biological Psychiatry* 71, 137–143.
- Van der Horst G, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker A, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers J & Yasui A** (1999) Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 19323.
- VanVickle-Chavez S & Gelder R** (2007) Action Spectrum of *Drosophila* Cryptochrome. *J Biol Chem* 282, 10561–10566.
- Vieira J, Jones A, Danon A, Sakuma M, Hoang N, Robles D, Tait S, Heyes D, Picot M, Yoshii T, Helfrich-Förster C, Soubigou G, Coppee J-Y, Klarsfeld A, Rouyer F, Scrutton N & Ahmad M** (2012)

Human Cryptochrome-1 Confers Light Independent Biological Activity in Transgenic *Drosophila* Correlated with Flavin Radical Stability. *Plos One* 7, e31867.

von Middendorff, A (1859) Die Isepiptesen Russlands. *Mem. Acad. Sci. St. Petersburg VI, Ser. Tome. 8*: 1–143

Wang H & Zhang X (2017) Magnetic Fields and Reactive Oxygen Species. *Int J Mol Sci* 18, 2175.

Wang H, Ma L-G, Li J-M, Zhao H-Y & Deng X (2001) Direct Interaction of *Arabidopsis* Cryptochromes with COP1 in Light Control Development. *Science* 294, 154–158.

Wang Q, Barshop W, Bian M, Vashisht A, He R, Yu X, Liu B, Nguyen P, Liu X, Zhao X, Wohlschlegel J & Lin C (2015) The Blue Light-Dependent Phosphorylation of the CCE Domain Determines the Photosensitivity of *Arabidopsis* CRY2. *Mol Plant* 8, 631–643.

Wang, X. and M. Iino (1997) Blue-light-induced shrinking of protoplasts from maize coleoptiles and its relationship to coleoptile growth. *Plant Physiol.* 114, 1009–1020.

Waszczak C, Akter S, Eeckhout D, Persiau G, Wahni K, Bodra N, Molle I, Smet B, Vertommen D, Gevaert K, Jaeger G, Montagu M, Messens J & Breusegem F (2014) Sulfenome mining in *Arabidopsis thaliana*. *Proc National Acad Sci* 111, 11545–11550.

Watari R, Yamaguchi C, Zemba W, Kubo Y, Okano K & Okano T (2012) Light-dependent Structural Change of Chicken Retinal Cryptochrome4. *J Biol Chem* 287, 42634–42641.

Weber S, Biskup T, Okafuji A, Marino A, Berthold T, Link G, Hitomi K, Getzoff E, Schleicher E & Norris J (2010) Origin of Light-Induced Spin-Correlated Radical Pairs in Cryptochrome†. *J Phys Chem B* 114, 14745–14754.

Weller, J. L., G. Perrotta, M. E. Schreuder, A. Van Tuinen, M. Koornneef, G. Giuliano and R. E. Kendrick (2001) Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2. *Plant J.* 25, 427–440.

Werner H-J, Schulten K & Weller A (1978) Electron transfer and spin exchange contributing to the magnetic field dependence of the primary photochemical reaction of bacterial photosynthesis. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Bioenergetics* 502, 255–268.

Wiltschko & Wiltschko (1996) Magnetic orientation in birds. *J Exp Biology* 199, 29–38.

Wiltschko R & Wiltschko W (2014) Sensing Magnetic Directions in Birds: Radical Pair Processes Involving Cryptochrome. *Biosensors* 4, 221–242.

Wiltschko W, Gesson M & Wiltschko R (2001) Magnetic compass orientation of European robins under 565 nm green light. *Naturwissenschaften* 88, 387–390.

Wiltschko, W. & Merkel, F (1966) Orientierung zugunruhiger Rotkehlchen im statischen Magnetfeld. *Verh. dt. zool. Ges.* 59: 362–367

Winterbourn C (2014) The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Gen Subj* 1840, 730–738.

Woo H, Chae H, Hwang S, Yang K-S, Kang S, Kim K & Rhee S (2003) Reversing the Inactivation of Peroxiredoxins Caused by Cysteine Sulfinic Acid Formation. *Science* 300, 653–656.

- Wu A, Allu A, Garapati P, Siddiqui H, Dortay H, Zanol M-I, Asensi-Fabado M, Munné-Bosch S, Antonio C, Tohge T, Fernie A, Kaufmann K, Xue G-P, Mueller-Roeber B & Balazadeh S** (2012) JUNGBRUNNEN1, a Reactive Oxygen Species–Responsive NAC Transcription Factor, Regulates Longevity in Arabidopsis. *Plant Cell Online* 24, 482–506.
- Wu G & Spalding E** (2007) Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of Arabidopsis seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 18813–18818.
- Wu L & Yang H-Q** (2010) CRYPTOCHROME 1 Is Implicated in Promoting R Protein-Mediated Plant Resistance to *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *Mol Plant* 3, 539–548.
- Xia X-J, Zhou Y-H, Shi K, Zhou J, Foyer C & Yu J-Q** (2015) Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J Exp Bot* 66, 2839–2856.
- Xu C, Li Y, Yu Y, Zhang Y & Wei S** (2015) Suppression of Arabidopsis flowering by near-null magnetic field is affected by light. *Bioelectromagnetics* 36, 476–479.
- Xu P, Zhu H, Xu H, Zhang Z, Zhang C, Zhang L & Ma Z** (2010) Composition and phylogenetic analysis of wheat cryptochrome gene family. *Mol Biol Rep* 37, 825–832.
- Yang H-Q, Tang R-H & Cashmore A** (2001) The Signaling Mechanism of Arabidopsis CRY1 Involves Direct Interaction with COP1. *Plant Cell Online* 13, 2573–2587.
- Yang H-Q, Wu Y-J, Tang R-H, Liu D, Liu Y & Cashmore A** (2000) The C Termini of Arabidopsis Cryptochromes Mediate a Constitutive Light Response. *Cell* 103, 815–827.
- Yang Y-J, Zuo Z-C, Zhao X-Y, Li X, Klejnot J, Li Y, Chen P, Liang S-P, Yu X-H, Liu X-M & Lin C-T** (2008) Blue-Light-Independent Activity of Arabidopsis Cryptochromes in the Regulation of Steady-State Levels of Protein and mRNA Expression. *Mol Plant* 1, 167–177.
- Yang Z, Liu B, Su J, Liao J, Lin C & Oka Y** (2017) Cryptochromes Orchestrate Transcription Regulation of Diverse Blue Light Responses in Plants. *Photochem Photobiol* 93, 112–127.
- Yanovsky M, Mazzella MA & Casal J** (2000) A quadruple photoreceptor mutant still keeps track of time. *Curr Biol* 10, 1013–1015.
- Yoo S-H, Mohawk J, Siepka S, Shan Y, Huh S, Hong H-K, Kornblum I, Kumar V, Koike N, Xu M, Nussbaum J, Liu X, Chen Z, Green C & Takahashi J** (2013) Competing E3 Ubiquitin Ligases Govern Circadian Periodicity by Degradation of CRY in Nucleus and Cytoplasm. *Cell* 152, 1091–1105.
- Yoshii T, Ahmad M & Helfrich-Förster C** (2009) Cryptochrome Mediates Light-Dependent Magnetosensitivity of *Drosophila*'s Circadian Clock. *Plos Biol* 7, e1000086.
- Yoshii T, Hermann-Luibl C & Helfrich-Förster C** (2015) Circadian light-input pathways in *Drosophila*. *Commun Integr Biology* 9, e1102805.
- Yoshii T, Todo T, Wülbeck C, Stanewsky R & Helfrich-Förster C** (2008) Cryptochrome is present in the compound eyes and a subset of *Drosophila*'s clock neurons. *J Comp Neurol* 508, 952–966.
- Yu C-X, Li S & Whorton R** (2005) Redox Regulation of PTEN by S-Nitrosothiols. *Mol Pharmacol* 68, 847–854.

- Yu W, Hardin PE** (2006) Circadian oscillators of *Drosophila* and mammals. *J. Cell Sci.* 119, 4793–4795.
- Yu X, Klejnot J, Zhao X, Shalitin D, Maymon M, Yang H, Lee J, Liu X, Lopez J & Lin C** (2007) Arabidopsis Cryptochrome 2 Completes Its Posttranslational Life Cycle in the Nucleus. *Plant Cell* 19, 3146–3156.
- Yu X, Sayegh R, Maymon M, Warpeha K, Klejnot J, Yang H, Huang J, Lee J, Kaufman L & Lin C** (2009) Formation of Nuclear Bodies of Arabidopsis CRY2 in Response to Blue Light Is Associated with Its Blue Light–Dependent Degradation. *Plant Cell Online* 21, 118–130.
- Yu X, Shalitin D, Liu X, Maymon M, Klejnot J, Yang H, Lopez J, Zhao X, Bendehakkalu K & Lin C** (2007) Derepression of the NC80 motif is critical for the photoactivation of Arabidopsis CRY2. *Proc National Acad Sci* 104, 7289–7294.
- Zarepour M, Kaspari K, Stagge S, Rethmeier R, Mendel R & Bittner F** (2010) Xanthine dehydrogenase AtXDH1 from Arabidopsis thaliana is a potent producer of superoxide anions via its NADH oxidase activity. *Plant Mol Biol* 72, 301–310.
- Zeugner A, Byrdin M, Bouly J-P, Bakrim N, Giovani B, Brettel K & Ahmad M** (2005) Light-induced Electron Transfer in Arabidopsis Cryptochrome-1 Correlates with in Vivo Function. *J Biol Chem* 280, 19437–19440.
- Zhang E, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul P, Liu A, Hirota T, Nusinow D, Sun X, Landais S, Kodama Y, Brenner D, Montminy M & Kay S** (2010) Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med* 16, nm.2214.
- Zhang R, Lahens N, Ballance H, Hughes M & Hogenesch J** (2014) A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. *Proc National Acad Sci* 111, 16219–16224.
- Zhao G, Chen S, Wang L, Zhao Y, Wang J, Wang X, Zhang W, Wu R, Wu L, Wu Y & Xu A** (2011) Cellular ATP content was decreased by a homogeneous 8.5 T static magnetic field exposure: Role of reactive oxygen species. *Bioelectromagnetics* 32, 94–101.
- Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N & Haugland R** (1997) A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. *Anal Biochem* 253, 162–168.
- Zhu H, Conte F & Green C** (2003) Nuclear Localization and Transcriptional Repression Are Confined to Separable Domains in the Circadian Protein CRYPTOCHROME. *Current Biology*, 1653–1658.
- Zhu H, Sauman I, Yuan Q, Casselman A, Emery-Le M, Emery P & Reppert S** (2008) Cryptochromes Define a Novel Circadian Clock Mechanism in Monarch Butterflies That May Underlie Sun Compass Navigation. *Plos Biol* 6, e4.
- Zoltowski B, Vaidya A, Top D, Widom J, Young M & Crane B** (2011) Structure of full-length *Drosophila* cryptochrome. *Nature* 480, 396.
- Zuo Z, Liu H, Liu B, Liu X & Lin C** (2011) Blue Light-Dependent Interaction of CRY2 with SPA1 Regulates COP1 activity and Floral Initiation in Arabidopsis. *Curr Biol* 21, 841–7.