



HAL
open science

Photoactivation femtoseconde de deux nouvelles protéines de la famille des cryptochrome/photolyase, issues de l'algue verte *Ostreococcus tauri*. Photocycle ultrarapide et état signalant de la photophobie du protozoaire *Blepharisma japonicum*

Johanna Brazard

► **To cite this version:**

Johanna Brazard. Photoactivation femtoseconde de deux nouvelles protéines de la famille des cryptochrome/photolyase, issues de l'algue verte *Ostreococcus tauri*. Photocycle ultrarapide et état signalant de la photophobie du protozoaire *Blepharisma japonicum*. Autre. Université Pierre et Marie Curie (Paris, France), 2009. Français. NNT : 2009PA066368 . tel-03184590

HAL Id: tel-03184590

<https://theses.hal.science/tel-03184590>

Submitted on 29 Mar 2021

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.

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Chimie Physique et Chimie Analytique

Présentée par

Johanna BRAZARD

Photoactivation femtoseconde de deux nouvelles protéines de la famille des cryptochrome/photolyase, issues de l'algue verte *Ostreococcus tauri*.

Photocycle ultrarapide et état signalant de la photophobie du protozoaire *Blepharisma japonicum*.

Soutenue le 30/09/2009, devant le jury composé de :

Alain DUBOIS

Président du jury

Olivier POIZAT

Rapporteur

Marten VOS

Rapporteur

Chris BOWLER

Examineur

Klaus BRETTEL

Examineur

François GUILLAUME

Examineur

Pascal PLAZA

Directeur de thèse

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Chimie Physique et Chimie Analytique

Présentée par

Johanna BRAZARD

Photoactivation femtoseconde de deux nouvelles protéines de la famille des cryptochrome/photolyase, issues de l'algue verte *Ostreococcus tauri*.

Photocycle ultrarapide et état signalant de la photophobie du protozoaire *Blepharisma japonicum*.

Soutenue le 30/09/2009, devant le jury composé de :

Alain DUBOIS

Président du jury

Olivier POIZAT

Rapporteur

Marten VOS

Rapporteur

Chris BOWLER

Examineur

Klaus BRETTEL

Examineur

François GUILLAUME

Examineur

Pascal PLAZA

Directeur de thèse

Remerciements

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans le groupe de Photochimie Ultrarapide au sein de l'UMR « Processus d'Activation Sélectif par Transfert d'Énergie Uni électronique ou Radiative » du département de Chimie de l'École Normale Supérieure de Paris. Je remercie Christian Amatore, Directeur de l'UMR CNRS 8640 PASTEUR, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir conseillée à mainte reprise au cours de ces trois années. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Ludovic Jullien, Directeur du Département de Chimie de l'ENS, pour m'avoir prodigué de précieux conseils tout au long de cette thèse.

J'exprime mes remerciements chaleureux à Monique Martin, ancienne directrice du Groupe de Photochimie Ultrarapide, pour ses multiples conseils toujours pertinents. Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude à Pascal Plaza pour son encadrement et sa disponibilité dont il a fait preuve à mon égard tout au long de mon stage de M2 et de ma thèse. Ils m'ont fait confiance et permis de développer certaines thématiques supplémentaires. Ils m'ont également inculqué les fondements de la démarche scientifique : la curiosité, le travail, la rigueur, l'humilité et surtout la prudence...

Messieurs Alain Dubois, Olivier Poizat, Marten Vos, Chris Bowler, Klaus Brettel et François Guillaume ont accepté de juger ce travail et de participer à cette soutenance de thèse, qu'ils trouvent ici l'expression de mes plus vifs remerciements.

Je remercie chaleureusement les membres du groupe de Photochimie Ultrarapide durant ces trois années : Pascale Changenet-Barret pour nos nombreuses conversations instructives, Christian Ley et Fabien Lacombe de m'avoir formé sur l'expérience d'absorption transitoire femtoseconde. Je leur témoigne toute ma gratitude pour leur soutien quotidien, leur disponibilité et leur amitié. Un grand merci également à Tareq Youssef, Anwar Usman, Tetsuro Katayama, Emeline Barbet-Massin, Pierre Perrodin, avec qui j'ai eu l'honneur de travailler au laboratoire.

Je témoigne ma gratitude à Gérald Zabulon de m'avoir enseignée la surexpression de protéines ainsi que leur purification au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire des Organismes Photosynthétiques du département de Biologie de l'ENS. Je remercie aussi Chris Bowler, directeur du laboratoire, ainsi que tous les membres du laboratoire, en particulier, Clara Bourbousse, Agnès Meichenin, Frédy Barneche, Enric Castells-Canela et Jean-Claude

Remerciements

Thomas, pour leur gentillesse et leurs conseils. Je n'oublie pas Marc Heijde, ancien doctorant du laboratoire et fournisseur initial des échantillons biologiques.

J'exprime toute ma reconnaissance à Laetitia Mony, amie de promotion, de m'avoir consacré de nombreuses heures à m'expliquer la modélisation par homologie de protéines et à réaliser les modèles présentés dans ce manuscrit. Je remercie également Francine Acher, directrice du Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques de l'université Paris Descartes, de m'avoir consacré un peu de son temps précieux.

Un petit mot pour remercier Francesco Lenci et les membres de son groupe, de l'université de Pise, pour leurs échantillons précieux en OBIP ainsi que leur gentillesse. Je n'oublie pas Jacob Petrich, de l'université de l'Iowa, pour l'étude de l'O-hexaméthoxyhypéricine, ainsi que François Hache du LOB de l'École Polytechnique pour les derniers résultats obtenus par dichroïsme circulaire résolu en temps sur OBIP.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres anciens ou présents du département de Chimie de l'ENS que je croise depuis plus ou moins sept ans : Hakim, Nico, Frédéric Z., Matthieu, Ludovic, Luminita, ...

Sur un plan plus personnel, je voudrais remercier affectueusement toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à égayer ma vie au quotidien. Merci en particulier à Béné (avec ses inventions pour me rendre le sourire en toute circonstance), Damien (toujours présent même outre-atlantique), Céline C. (mon éternelle binôme), Xavier (toujours partant pour me remonter le moral surtout en conduisant de nuit), Ismaël et Céline T., Claire (pour son enthousiasme : vive les repas au laboratoire), Lucie (colocataire pleine de vie), Adrien, Isa, Elodie, Olivier, Jon, Mariannick, Flore,.... Je n'oublie pas mes amis kayakistes pour ces grands moments passés « sur » l'eau : Diane, Laurent, Manu, Guillaume, Sylvia, Vincent, Christophe, ... Un grand merci également à mon professeur de guitare Michel ainsi qu'à mes camarades Valentin et Mathieu. Je témoigne toute mon affection à mes compagnons de randonnée : Roberto, Seb, Stephen, Benoît, ...

Je suis heureuse de pouvoir exprimer ma reconnaissance et toute ma tendresse à ceux sans qui rien n'aurait été possible : mes parents.

Table des matières

<i>Introduction générale</i>	1
<i>CHAPITRE I : Contexte bibliographique</i>	7
Introduction	8
1 Le chromophore flavine en solution.....	10
1.1 Flavines oxydées.....	11
1.1.1 Spectroscopies UV-vis stationnaires.....	11
1.1.1.1 Absorption.....	11
1.1.1.2 Fluorescence.....	13
1.1.1.3 Photolyse.....	14
1.1.2 Spectroscopies UV-vis résolues en temps.....	15
1.2 Flavines réduites	16
1.2.1 Spectroscopies UV-vis stationnaires.....	17
1.2.1.1 Formation.....	17
1.2.1.2 Structure.....	17
1.2.1.3 Absorption.....	18
1.2.2 Spectroscopies UV-vis résolues en temps.....	19
2 Photolyases et cryptochromes	22
2.1 Classification selon leurs fonctions biologiques.....	22
2.1.1 Photolyases.....	22
2.1.1.1 Photolyases CPD.....	22
2.1.1.2 Photolyases (6-4).....	23
2.1.2 Cryptochromes	23
2.1.2.1 Cryptochromes de plante : photomorphogénèse	23
2.1.2.2 Cryptochromes animaux : cycle circadien	24
2.1.2.3 Cryptochromes DASH : photoréparation de l'ADN	24
2.2 Structure.....	25
2.2.1 Chromophores.....	25
2.2.2 Protéine	26
2.2.2.1 Interaction avec le chromophore FAD.....	28
2.2.2.2 Interaction avec une photoantenne : MTHF ou 8-HDF	28
2.2.2.3 Interaction avec de l'ADN endommagé.....	28
2.2.2.4 Mécanisme de photoréduction	29
2.3 Mécanismes réactionnels	29
2.3.1 Photolyases CPD.....	29
2.3.1.1 Interaction substrat enzyme.....	30
2.3.1.2 Cycle catalytique de photoréparation.....	30

2.3.1.3	Photophysique.....	30
2.3.1.3.1	Caractérisation du chromophore actif.....	30
2.3.1.3.2	Transfert d'énergie.....	31
2.3.1.3.3	Transfert d'électron vers le dimère de pyrimidines	32
2.3.2	Photolyases (6-4).....	33
2.3.2.1	Interaction substrat enzyme.....	33
2.3.2.2	Spectroscopie d'action	33
2.3.2.3	Cycle catalytique de photoréparation.....	33
2.3.3	Cryptochromes	34
2.4	Photoréduction	35
2.4.1	Caractérisation du réducteur	35
2.4.2	Mécanisme du transfert d'électron dans EcCPD contenant FADH [*]	36
2.4.2.1	Transfert d'électron à longue distance	36
2.4.2.2	Transfert d'électron avec des relais.....	37
2.4.2.2.1	Chaîne de trois tryptophanes.....	37
2.4.2.2.2	Passage par la phénylalanine 366.....	41
2.4.3	Photoréduction dans les protéines CPF portant FAD _{ox}	41
2.4.4	Photoréduction dans d'autres flavoprotéines	42
3	L'algue verte <i>Ostreococcus tauri</i>	44
3.1	Description.....	44
3.2	Photorécepteurs.....	45
Conclusion		46
<i>CHAPITRE II : Photophysique intrinsèque des flavines et MTHF libres.....</i>		47
Introduction		48
1	Flavines oxydées	50
1.1	FMN _{ox}	50
1.1.1	Spectroscopie d'absorption UV-vis stationnaire : Effet de concentration ...	50
1.1.2	Spectroscopie d'absorption transitoire	53
1.1.2.1	Solution diluée	54
1.1.2.1.1	Analyse spectrale	54
1.1.2.1.2	Analyse cinétique.....	56
1.1.2.2	Solution concentrée.....	58
1.1.2.2.1	Analyse spectrale	58
1.1.2.2.2	Analyse cinétique.....	59
1.1.2.2.3	Dynamique intrinsèque des dimères	60
1.2	FAD _{ox}	61

1.2.1	Spectroscopie d'absorption UV-vis stationnaire : Effet de concentration ...	61
1.2.2	Spectroscopie d'absorption transitoire	63
1.2.2.1	Solution diluée	63
1.2.2.1.1	Analyse spectrale	63
1.2.2.1.2	Analyse cinétique	64
1.2.2.1.3	Dynamique intrinsèque de la conformation ouverte	66
1.2.2.1.4	État à transfert de charge intramoléculaire	67
1.2.2.1.5	Désactivation d'un état à transfert de charge intramoléculaire	68
1.2.2.1.6	Formation d'un état à transfert de charge intramoléculaire	70
1.2.2.2	Solution concentrée	72
1.2.2.2.1	Analyse spectrale	72
1.2.2.2.2	Analyse cinétique	73
1.2.2.2.3	Dynamique intrinsèque des dimères	74
2	Flavines réduites	76
2.1	Flavine réduite déprotonée : FADH ⁻	77
2.1.1	Spectroscopie UV-vis stationnaire	77
2.1.2	Spectroscopie d'absorption transitoire	78
2.1.2.1	Basse fluence	78
2.1.2.1.1	Analyse spectrale	78
2.1.2.1.2	Analyse cinétique	80
2.1.2.2	Haute fluence	82
2.1.2.2.1	Analyse spectrale	82
2.1.2.2.2	Analyse cinétique	83
2.1.2.2.3	Présence de l'électron hydraté	84
2.1.2.2.4	Origine de la formation de l'électron hydraté	85
2.2	Flavine réduite protonée : FADH ₂	87
2.2.1	Spectroscopie UV-vis stationnaire	87
2.2.2	Spectroscopie d'absorption transitoire	88
2.2.2.1	Basse fluence	88
2.2.2.1.1	Analyse spectrale	88
2.2.2.1.2	Analyse cinétique	89
2.2.2.2	Haute fluence	90
2.2.2.2.1	Analyse spectrale	90
2.2.2.2.2	Analyse cinétique	91
2.2.2.2.3	Présence de l'électron hydraté	93
2.2.2.2.4	Origine de la formation de l'électron hydraté	94
3	Photoantenne : MTHF	96

3.1	Analyse spectrale	96
3.2	Analyse cinétique.....	97
	Conclusion	99
	<i>CHAPITRE III : Étude spectroscopique de la photolyase (6-4) de</i>	
	<i>Ostreococcus tauri</i>.....	101
	Introduction	102
1	Caractérisation spectrale de OtCPF1.....	104
1.1	Nature du cofacteur flavine.....	104
1.2	Existence d'une photoantenne	106
1.3	Distribution des différents états d'oxydo-réduction de FAD.....	107
1.4	Rapport molaire FAD/apoprotéine.....	110
1.5	Présence de flavine libre	111
1.5.1	Spectre de fluorescence.....	111
1.5.2	Rendement quantique de fluorescence.....	112
2	Stabilité de OtCPF1.....	114
2.1	Stabilité thermique.....	114
2.2	Stabilité chimique	115
2.3	Photostabilité.....	119
2.3.1	Excitation à 450 nm	120
2.3.2	Excitation à 620 nm	122
2.4	Élimination du réducteur externe.....	125
3	Spectroscopie d'absorption transitoire de OtCPF1	127
3.1	Analyse spectrale	127
3.1.1	Spectre différentiel pour un retard pompe-sonde de 200 fs	127
3.1.2	Évolution temporelle.....	130
3.2	Analyse cinétique.....	131
3.3	Discussion.....	134
3.3.1	Identification des photoproduits.....	134
3.3.2	Modélisation cinétique.....	141
	Conclusion	144
	<i>CHAPITRE IV : Étude spectroscopique du cryptochrome DASH de</i>	
	<i>Ostreococcus tauri</i>.....	145
	Introduction	146
1	Spectroscopies électroniques UV-vis stationnaires de OtCPF2.....	148

1.1	Chromophores.....	148
1.1.1	Identification de la photoantenne.....	148
1.1.2	Nature du cofacteur flavine.....	150
1.1.3	Distribution des différents états d'oxydo-réduction de FAD et de MTHF.....	152
1.1.4	Rapport molaire chromophores/apoprotéine.....	154
1.2	Présence de flavine libre.....	155
1.2.1	Spectre de fluorescence.....	155
1.2.2	Rendement quantique de fluorescence.....	156
1.3	Stabilité de OtCPF2.....	157
1.3.1	Stabilité thermique.....	157
1.3.2	Stabilité chimique.....	158
1.3.3	Photostabilité.....	159
2	Spectroscopie d'absorption transitoire de OtCPF2.....	161
2.1	Photoréduction de FAD _{ox} au sein de OtCPF2.....	161
2.1.1	Absorption transitoire isotrope.....	161
2.1.1.1	Analyse spectrale.....	162
2.1.1.1.1	Spectre différentiel pour un retard pompe-sonde de 250 fs.....	162
2.1.1.1.2	Évolution temporelle.....	164
2.1.1.2	Analyse cinétique.....	166
2.1.1.3	Discussion.....	168
2.1.1.3.1	Hétérogénéité à l'état fondamental.....	168
2.1.1.3.2	Nature de la population non réactive.....	170
2.1.1.3.3	Composantes temporelles des populations non réactive et réactive	
	171	
2.1.1.3.4	Identification des photoproduits.....	172
2.1.1.3.5	Modèle cinétique.....	177
2.1.1.3.6	Comparaison avec d'autres protéines CPF.....	179
2.1.2	Absorption transitoire anisotrope.....	182
2.1.2.1	Analyse spectrale.....	183
2.1.2.2	Analyse cinétique.....	185
2.1.2.3	Anisotropie.....	187
2.1.3	Transfert d'énergie au sein de OtCPF2.....	189
2.1.4	Échantillon OtCPF2-TE1.....	190
2.1.4.1	Analyse spectrale.....	190
2.1.4.2	Analyse cinétique.....	192
2.1.4.3	Discussion.....	193
2.1.4.3.1	Identification des accepteurs d'énergie.....	193

2.1.4.3.2 État excité de FADH ⁻	194
2.1.4.3.3 État excité de FAD _{ox}	195
2.1.5 Échantillon OtCPF2-TE2	195
2.1.5.1 Analyse spectrale	196
2.1.5.2 Analyse cinétique	197
2.1.5.3 Discussion	198
2.1.6 Orientations relatives de la photoantenne et de la flavine	199
Conclusion	201
<i>CHAPITRE V : Étude structurale de OtCPF1 et OtCPF2.....</i>	203
Introduction	204
1 Étude structurale de OtCPF1	206
1.1 Alignement de la structure primaire.....	206
1.2 Génération d'un modèle tridimensionnel par homologie.....	209
1.2.1 Interaction avec le chromophore FAD	211
1.2.2 Interaction avec une photoantenne : MTHF ou 8-HDF	213
1.2.2.1 MTHF	214
1.2.2.2 8-HDF	215
1.2.3 Mécanisme de photoréduction	217
2 Étude structurale de OtCPF2.....	220
2.1 Alignement de la structure primaire.....	220
2.2 Génération d'un modèle tridimensionnel par homologie.....	223
2.2.1 Interaction avec le chromophore FAD	224
2.2.2 Interaction avec la photoantenne MTHF	225
2.2.3 Mécanisme de photoréduction	228
Conclusion	230
<i>CHAPITRE VI : Méthodes expérimentales</i>	231
Introduction	232
1 Spectroscopies stationnaires.....	233
1.1 Spectroscopie d'absorption.....	233
1.2 Spectroscopie d'excitation et d'émission de fluorescence.....	233
2 Spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde.....	234
2.1 Source laser femtoseconde.....	234
2.1.1 Oscillateur titane-saphir	235
2.1.2 Amplificateur régénératif.....	235

2.2	Montage de spectroscopie d'absorption transitoire.....	236
2.2.1	Faisceau pompe.....	236
2.2.1.1	Amplificateur paramétrique optique non-colinéaire (NOPA).....	236
2.2.1.2	Génération de la seconde harmonique	237
2.2.1.3	Dispositif expérimental.....	237
2.2.2	Faisceau sonde	238
2.2.3	Échantillon	240
2.3	Acquisition d'un spectre	240
2.4	Correction des artéfacts.....	241
2.4.1	Normalisation de l'énergie de pompage.....	241
2.4.2	Correction du chirp	242
2.4.3	Artéfact « temps zéro »	243
2.5	Analyse des données.....	244
2.5.1	Analyse spectrale	244
2.5.2	Analyse cinétique.....	247
2.5.2.1	Théorie	247
2.5.2.2	Exemple : FAD _{ox} en solution concentrée.....	250
2.5.3	Modélisation cinétique.....	252
2.5.4	Anisotropie.....	254
2.5.5	Théorie du transfert d'énergie par résonance de type Förster	255
3	Préparation des échantillons.....	257
3.1	Chromophores libres.....	257
3.1.1	Flavines réduites déprotonées : FADH ⁻	257
3.1.2	Flavines réduites protonées : FADH ₂	257
3.2	Chromoprotéines.....	258
3.2.1	Culture des cellules.....	258
3.2.2	Purification des chromoprotéines.....	258
3.2.3	Dénaturation.....	259
3.2.4	Réduction du MTHF	260
3.2.5	Oxydation de OtCPF2.....	260
4	Caractérisation des chromoprotéines.....	261
4.1	Apoprotéine.....	261
4.2	Présence de FAD.....	261
4.3	Présence de MTHF	262
4.4	Distribution des différents chromophores.....	262
4.5	Évaluation de la stabilité des échantillons protéiques.....	265
4.5.1	Stabilité thermique	265

4.5.2	Stabilité chimique.....	265	
4.5.3	Photostabilité.....	265	
5	Modélisation par homologie.....	267	
5.1	Alignement de séquences primaires.....	267	
5.2	Structure tertiaire modélisée	267	
5.3	Ancrage des photoantennes MHF et 8-HDF	268	
 CHAPITRE VII : Photocycle ultrarapide et état signalant du photorécepteur			
de <i>Blepharisma japonicum</i>			271
Introduction			272
1	Photophobie du protozoaire <i>Blepharisma japonicum</i>	274	
1.1	Nouvelle étude du photocycle rapide de rOBIP.....	276	
1.1.1	Les chromophores libres	276	
1.1.2	OBIP.....	277	
1.2	État signalant de la photophobie.....	279	
2	Étude de complexes blépharismines- α -cristalline.....	293	
3	Étude de la photophysique intrinsèque d'un dérivé de l'Hypéricine :		
	l' <i>O</i> -hexaméthoxyhypéricine.....	306	
Conclusion			314
Conclusion			317
Bibliographie			323

Introduction générale

De nombreux processus biologiques ont pour origine la lumière. La lumière contrôle différentes fonctions au sein des organismes vivants : vision, croissance, rythme circadien, mouvement, morphogénèse, réparation génétique,... Les photorécepteurs sensoriels permettent de collecter les photons et de convertir le stimulus lumineux en un message chimique. Ils sont constitués d'un chromophore qui absorbe la lumière et d'une protéine qui convertit l'énergie absorbée afin de transmettre un signal ou remplir une fonction biochimique précise. Les photons sont considérés comme des « catalyseurs » parce qu'ils permettent d'abaisser la barrière d'activation facilitant la première étape de la réaction biochimique. Cependant ce ne sont pas de réels « catalyseurs » au sens chimique puisqu'ils ne sont pas régénérés lors du cycle catalytique. Les photorécepteurs sont en général classés selon la nature du chromophore qu'ils utilisent : rétinol, acide coumarique, flavine, tétrapyrrole et ptéridine.

La chaîne de phototransduction sensorielle est une cascade d'évènements moléculaires déclenchée par le photorécepteur, ayant absorbé un photon. Cette chaîne se décompose en trois étapes :

- réaction photochimique primaire induite au sein du chromophore excité,
- formation d'un nouvel état du photorécepteur (chromophore-protéine), dit état signalant,
- cascade de réactions biochimiques (transduction du signal) qui conduit à la fonction biologique.

Lorsque j'ai commencé ma thèse, deux thématiques sur les photorécepteurs sensoriels (chromoprotéines cytosolique et membranaire) mis en jeu dans le photomouvement de microorganismes unicellulaires phototiles (bactérie dont la protéine photoréceptrice est Photoactive Yellow Protein : PYP, protozoaire avec pour photorécepteur Oxyblepharismine Binding Protein : OBIP) étaient en développement dans mon groupe d'accueil. Par ailleurs dans le cadre d'un projet financé par l'ANR, le groupe avait entrepris une collaboration avec le groupe Bowler du département de biologie de l'École Normale Supérieure (Paris) afin d'étudier des flavoprotéines nucléaires de microorganismes marins. Leurs fonctions photobiologiques exactes ne sont pas totalement connues. C'est dans ce contexte que nous avons étudié les processus photoinduits au sein de deux flavoprotéines de l'algue verte

Ostreococcus tauri et nous avons poursuivi l'étude des photoprocessus primaires induits dans OBIP, entreprise au préalable par Mathilde Mahet lors de sa thèse.

L'algue verte *Ostreococcus tauri* est le plus petit eucaryote connu au monde [1]. Le groupe Bowler a pu y identifier cinq protéines appartenant aux protéines CPF (Cryptochromes and Photolyases Family, en anglais). Les photolyases sont des enzymes photoréparatrices de l'ADN endommagé par irradiation UV. Les cryptochromes semblent être les protéines photoréceptrices de la régulation du cycle circadien, de la photomorphogénèse et de la perception du champ magnétique terrestre pour les oiseaux migrateurs. Deux des cinq protéines CPF identifiées dans *Ostreococcus tauri* (notées OtCPF1 et OtCPF2) ont pu être surexprimées dans *Escherichia coli* et purifiées [2]. Par analyse phylogénétique, il a été démontré que OtCPF1 appartiendrait au groupe des photolyases (6-4) ainsi que des cryptochromes animaux ; tandis que OtCPF2 serait un cryptochrome DASH. Ces sous-catégories de protéines CPF seront décrites dans le chapitre I de cette thèse, dédié aux rappels et contexte bibliographique.

Le chromophore des protéines CPF est une flavine, capable d'absorber des photons UV et bleus [3]. Les flavines sont des molécules qui peuvent exister sous trois formes oxydo-réductrices différentes, dites oxydées, semi-réduites et réduites, ce qui les implique facilement dans des réactions biochimiques au sein de divers organismes vivants.

La photoréduction de la flavine adénine dinucléotide semi-réduite ($FADH^*$) mise en jeu par la photolyase CPD de *Escherichia coli* a été étudiée en détails par les groupes Brettel et Vos [4-10] par spectroscopies résolues en temps. Leurs travaux constituent une référence pour cette réaction. En revanche la photoréduction de la flavine adénine dinucléotide oxydée (FAD_{ox}) au sein des protéines CPF n'avait jamais fait l'objet d'étude par spectroscopie résolue en temps ultrarapide lorsque nous avons commencé ce travail. En effet en 2003 l'étude de la photoréduction de FAD_{ox} au sein d'un cryptochrome avait été réalisée avec une résolution temporelle de 100 μs [11]. Cette réaction avait néanmoins été étudiée pour des flavoprotéines non CPF et ces études révélaient que la photoréduction de FAD_{ox} est ultrarapide (régime sub-picoseconde) [12-17]. Savoir si cette réaction n'est plus cinétiquement déterminante et si par conséquent les étapes ultérieures sont observables, nous a motivés pour réaliser l'étude de la photoréduction de FAD_{ox} au sein de ces deux nouvelles protéines CPF, OtCPF1 et OtCPF2. Alors que notre étude était bien avancée, une étude similaire du groupe Zhong est apparue dans la littérature. Ce sont encore les seules études connues à ce jour.

L'étude par spectroscopie femtoseconde de OtCPF1 et OtCPF2 a nécessité dans un premier temps de la part du groupe Bowler, la mise au point de méthodes de génie génétique et de protocoles de purification permettant d'obtenir ces chromoprotéines en quantité suffisante pour réaliser des expériences de spectroscopie d'absorption transitoire. Une fois connus et mis au point les protocoles de surexpression et de purification de OtCPF1 et OtCPF2, j'ai moi-même réalisé leur surexpression et en partie modifié les étapes de leur purification, dans le groupe Bowler.

Avant d'aborder cette étude, nous avons travaillé sur les quelques questions laissées ouvertes par la thèse de Mathilde Mahet sur le photorécepteur appelé OBIP (OxyBlépharismine bInding Protein, en anglais) du protozoaire cilié photomotile *Blepharisma japonicum*. Une nouvelle fonction de protection solaire avait été proposée pour expliquer un photocycle anormalement rapide (56 ps) de OBIP, mais des expériences avec une résolution temporelle femtoseconde et un meilleur rapport signal/bruit étaient nécessaires pour confirmer les mécanismes mis en jeu. Par ailleurs, excluant qu'un état de ce photocycle soit l'état signalant de la réponse photophobique connue de *Blepharisma japonicum*, nous avons cherché à caractériser les processus photochimiques nanosecondes (transfert de proton) potentiellement impliqués dans cette réponse. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de F. Lenci à l'Institut de Biophysique du CNR de Pise.

Ce manuscrit s'articulera en sept chapitres.

Le premier chapitre présentera le contexte bibliographique sur les protéines CPF. Nous commencerons par la description des résultats connus sur la photophysique intrinsèque des chromophores flavines, oxydées et réduites, chromophores toujours présents chez les protéines CPF. La description de l'activité biologique des photolyases et des cryptochromes sera ensuite détaillée. Plus particulièrement, nous présenterons les résultats connus sur la photoréduction de FADH[•] portée par la photolyase CPD de *E. coli*, ainsi que celle de FAD_{ox} au sein des flavoprotéines et d'une protéine CPF. Nous terminerons ce chapitre par une présentation rapide de l'algue verte *Ostreococcus tauri*.

Dans le deuxième chapitre, nous exposerons les résultats de nos études spectroscopiques des chromophores flavines oxydées : FMN_{ox} et FAD_{ox}, flavines réduites :

FADH⁻ et FADH₂ et de la photoantenne : MTHF. Nous avons initialement entrepris ces études des chromophores isolés en solution pour obtenir des données utiles à l'interprétation des résultats obtenus lors de l'étude spectroscopique des chromoprotéines OtCPF1 et OtCPF2. Nous verrons que nous avons obtenus des résultats intéressants en soi sur certaines questions touchant ces molécules.

L'étude de OtCPF1, protéine appartenant aux photolyases (6-4) et aux cryptochromes animaux, par spectroscopies stationnaire d'une part et d'absorption transitoire femtoseconde (résolution <100 fs) d'autre part, sera décrite dans le troisième chapitre. Elle mettra en évidence la photoréduction ultrarapide de FAD_{ox} au sein de OtCPF1, la caractérisation spectroscopique du donneur d'électron ainsi que les étapes suivantes.

L'étude de OtCPF2, un nouveau cryptochrome DASH, fera l'objet du quatrième chapitre. La photoréduction de OtCPF2 sera détaillée, ainsi qu'une expérience supplémentaire d'anisotropie résolue en temps, qui nous a permis de confirmer le mécanisme de photoréduction proposé. Par ailleurs, puisque OtCPF2 possède une photoantenne MTHF et FAD sous différentes formes oxydo-réductrices, nous avons réalisé l'étude des processus photoinduits après excitation de la photoantenne. Nous présenterons les résultats du transfert d'énergie de la photoantenne vers les deux principales formes oxydo-réductrices de FAD existantes au sein de OtCPF2.

Le cinquième chapitre sera consacré à l'analyse structurale par homologie de ces deux protéines CPF (OtCPF1 et OtCPF2). Pour ce faire, nous avons établi une collaboration avec l'équipe dirigée par Francine Acher au Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques (UMR 8601) de l'université Paris Descartes. Les modèles ont été générés par Laetitia Mony, alors doctorante dans ce laboratoire.

Dans le sixième chapitre, nous décrivons les méthodes expérimentales utilisées au cours de l'étude de OtCPF1 et OtCPF2. Nous présenterons, tout d'abord, les dispositifs expérimentaux de spectroscopies d'absorption et de fluorescence stationnaires et d'absorption transitoire femtoseconde ; puis la préparation ainsi que la caractérisation des échantillons chimiques et biologiques ; enfin la modélisation par homologie.

Le dernier chapitre sera consacré à l'étude, par spectroscopie d'absorption transitoire sub-100 fs, des photoprocessus primaires dans le photorécepteur du protozoaire cilié photomotile *Blepharisma japonicum*. Nous présenterons également l'analyse des processus photoinduits d'un complexe artificiel entre son chromophore OxyBP et une importante protéine constitutive du cristallin, l' α -cristalline réalisée à l'initiative de T. Youssef du NILES (Égypte) dans le cadre d'une coopération EGIDE France-Egypte. Enfin nous présenterons les résultats d'un travail réalisé avec C. Ley, ancien maître de conférence du groupe. Il s'agit d'une étude de l'*O*-hexaméthoxyhypéricine entreprise dans le but de résoudre une controverse sur la photophysique de l'hypéricine. Ce dernier chapitre est en fait constitué des articles publiés sur ces sujets avec des introductions pour chaque partie.

CHAPITRE I : Contexte bibliographique

Introduction

Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, le génome de l'algue verte unicellulaire *Ostreococcus tauri* (cf. la partie 3) contient cinq gènes codant pour des protéines appartenant à la famille des cryptochromes et photolyases (notée CPF). Ma thèse concerne l'étude de la photoactivité de deux d'entre elles, OtCPF1 et OtCPF2, après surexpression dans *Escherichia coli* et purification. Nous avons plus spécifiquement porté notre attention sur la caractérisation spectrocinétique des processus primaires photoinduits dans la photoactivation de ces deux nouvelles flavoprotéines. Le présent chapitre est dédié au contexte bibliographique de notre étude.

Les flavoprotéines sont des protéines contenant un chromophore de type flavine (cf. la Figure 1.1 dans la partie 1). Les flavines sont toutes constituées d'un cycle isoalloxazine, capable d'absorber des photons UV et bleus [3]. Elles sont impliquées dans des réactions d'oxydo-réduction au sein de nombreux organismes et peuvent exister sous trois formes oxydo-réductrices différentes : oxydées, semi-réduites et réduites (cf. la Figure 1.2).

Trois familles de flavoprotéines photoactives ont été identifiées à l'heure actuelle : les protéines à domaine LOV (Light, Oxygen or Voltage, incluant les phototropines), les protéines à domaine BLUF (Blue-Light sensing Using FAD) et les protéines CPF. Les phototropines contrôlent notamment certaines réponses mécaniques chez les plantes, comme le phototropisme, la relocation des chloroplastes et l'ouverture stomatale. Les protéines BLUF interviennent dans la photorégulation de l'expression génétique, par exemple des protéines photosynthétiques de la bactérie pourpre *Rhodobacter sphaeroides*, mais aussi dans la réponse photophobique à la lumière bleue de l'algue unicellulaire *Euglena gracilis* [18]. Parmi les protéines CPF, les photolyases sont spécialisées dans la photoréparation de l'ADN endommagé par irradiation UV alors que les cryptochromes sont impliqués dans diverses fonctions telles que la photomorphogénèse des plantes ou la régulation du cycle circadien [19].

La première partie du présent chapitre est essentiellement consacrée aux études des propriétés photophysiques du chromophore FAD en solution. En effet, de toutes les flavines existantes, seule FAD a été observée dans les protéines CPF. Nous présenterons les études des formes oxydée et réduite de FAD. La photophysique de ces formes isolées en solution

constitue en effet une référence pour la compréhension des phénomènes induits par la lumière au sein des protéines qui les utilisent.

La deuxième partie est consacrée aux protéines CPF. Elle commence par leur classification selon leurs fonctions biologiques et par la description de leurs caractéristiques structurales communes. Les mécanismes réactionnels de l'activité biologique des photolyases et des cryptochromes seront esquissés dans une troisième sous-partie. L'état photocatalytique du chromophore dans les photolyases est la forme réduite déprotonée, c'est l'excitation de cette forme qui permet de réparer l'ADN endommagé par un mécanisme de transfert d'électron intermoléculaire photoinduit. Il a été montré que les photolyases purifiées présentent une perte d'activité photoréparatrice due à l'oxydation du chromophore FAD. Ces protéines intègrent cependant un second mécanisme, dit de photoactivation, qui permet la régénération de l'état photocatalytique actif grâce à une réaction de photoréduction de la flavine. En ce qui concerne les cryptochromes, l'état signalant n'est pas encore déterminé de façon irrévocable : il semblerait cependant qu'il s'agisse de la forme semi-réduite de la flavine. Dans le cas des cryptochromes de type 1 (cryptochromes d'insectes, photorécepteurs circadiens) il a été suggéré que la flavine semi-réduite déprotonée pourrait donner lieu à une réaction photocatalytique similaire à celle de la forme réduite des photolyases [20]. Dans le cas des cryptochromes de plantes (photomorphogénèse) l'état signalant contiendrait la flavine semi-réduite protonée [21, 22]. Il est intéressant de noter que l'état sensible, inactif, de la flavine est alors FAD_{ox} et que l'activation de ces cryptochromes, c'est-à-dire la formation de l'état signalant, est une réaction de photoréduction de la flavine, en tout point homologue à la photoactivation des photolyases. Dans une quatrième sous-partie, l'état de la connaissance sur cette réaction de photoréduction de la flavine sera présenté.

Les travaux décrits dans ce chapitre serviront de base à la discussion de nos propres résultats, qui seront détaillés dans les chapitres II à V. Pour terminer ce chapitre bibliographique, nous donnerons quelques informations générales sur l'algue verte *Ostreococcus tauri* dont sont issues les deux protéines CPF que nous avons étudiées.

1 Le chromophore flavine en solution

Les flavines, sous forme de riboflavine (RF), flavine mononucléotide (FMN) ou flavine adénine dinucléotide (FAD) sont représentées sur la Figure 1.1. Les flavines ont suscité un grand intérêt parce que ce sont des agents oxydo-réducteurs capables de transférer un ou deux électrons et surtout parce qu'elles sont impliquées dans de nombreux mécanismes biologiques [3]. La flavine toujours présente dans les protéines CPF est FAD.

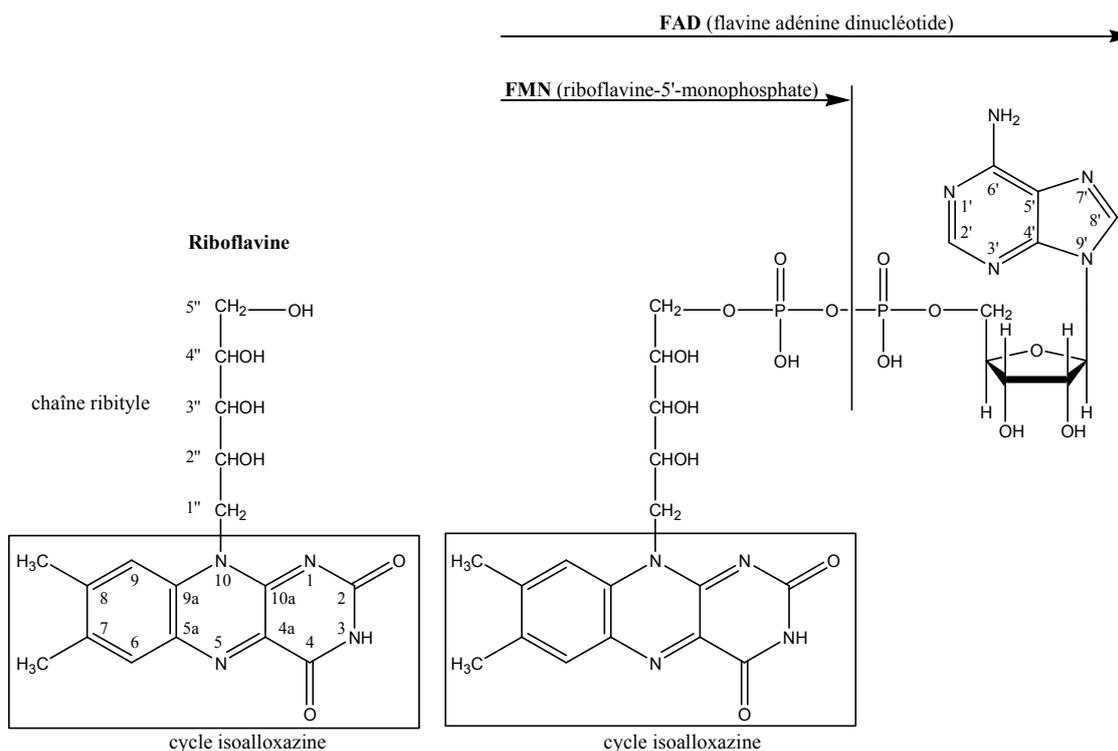


Figure 1.1 : Formule semi-développée de RF (riboflavine, à gauche), de FMN (flavine mononucléotide, à droite jusqu'à la première flèche) et de FAD (flavine adénine dinucléotide, à droite jusqu'à la seconde flèche). Le cycle isoalloxazine est encadré, la chaîne ribityle non encadrée sur la riboflavine. Les numéros de chaque atome sont indiqués sur la riboflavine pour le cycle isoalloxazine, avec une double apostrophe sur la riboflavine pour la chaîne ribityle, avec une apostrophe sur FAD pour l'adénine.

FAD peut exister sous trois formes d'oxydo-réduction : oxydée, semi-réduite et réduite, représentées sur la Figure 1.2. En solution, les flavines semi-réduites ne sont pas stables. Seules les flavines réduites et oxydées peuvent être étudiées [3]. Cependant l'étude des flavines réduites nécessite l'élimination du dioxygène dissous car celui-ci les oxyde rapidement en flavines oxydées [23].

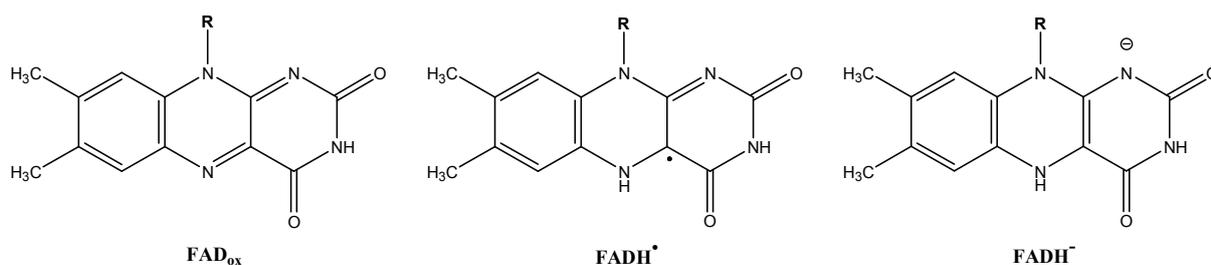


Figure 1.2 : Formule semi-développée de la flavine adénine dinucléotide oxydée (FAD_{ox}), semi-réduite (FADH^{\bullet}) et réduite (FADH^{-}). La chaîne latérale est commune à ces différentes formes d'oxydo-réductions (cf. la Figure 1.1) et est notée R.

Il faut aussi noter que chaque état d'oxydo-réduction des flavines présente des équilibres acido-basiques rappelés sur la Figure 1.3 :. Dans un milieu neutre à pH 7,0, les formes majoritaires sont : la flavine adénine dinucléotide oxydée neutre (FAD_{ox}), semi-réduite neutre (FADH^{\bullet}) et réduite déprotonée (FADH^{-}).

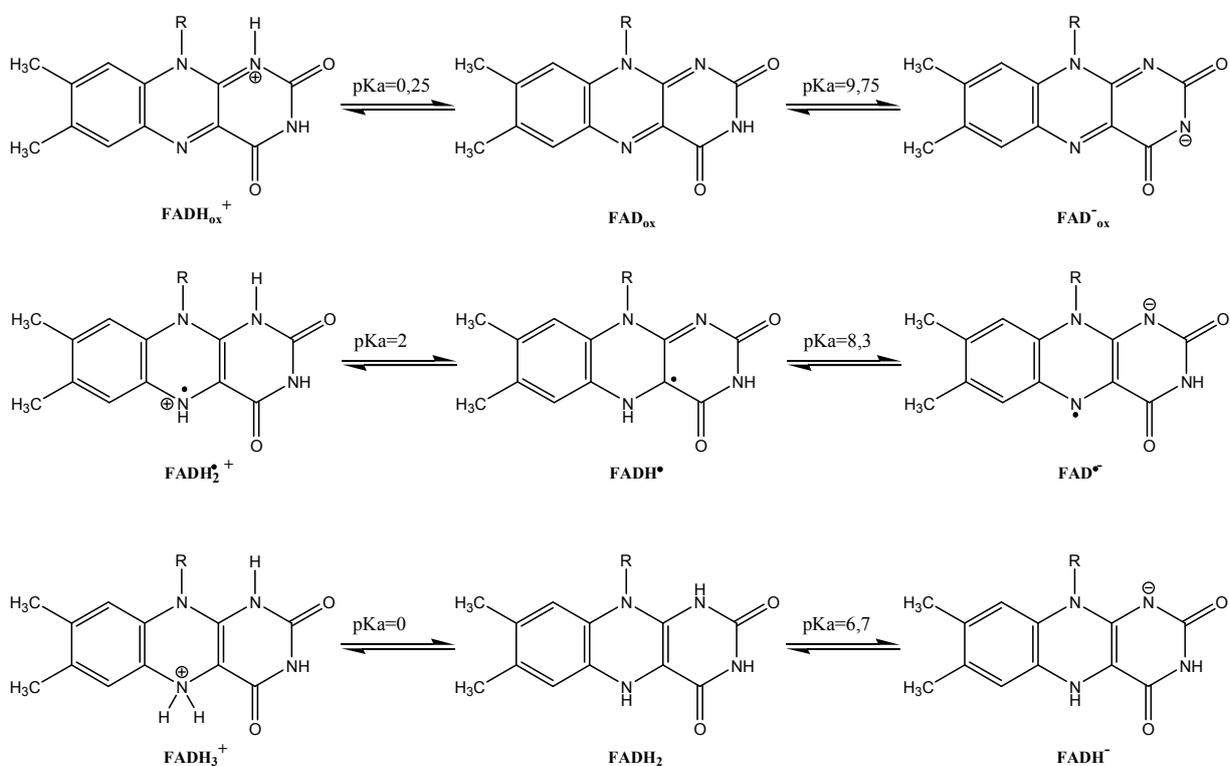


Figure 1.3 : Équilibres acido-basiques de la flavine adénine dinucléotide oxydée (FAD_{ox}), semi-réduite (FADH^{\bullet}) et réduite (FADH^{-}) ainsi que les valeurs des pKa correspondants [24, 25].

1.1 Flavines oxydées

1.1.1 Spectroscopies UV-vis stationnaires

1.1.1.1 Absorption

Les spectres d'absorption stationnaire des différentes flavines en solution RF, FMN, ou FAD présentent les mêmes caractéristiques spectrales. Le spectre d'absorption stationnaire

de FMN, sous ses formes oxydées neutre et réduite anionique sont représentées sur la Figure 1.4 (extraite de l'article de Ghisla et al. [23]), entre 270 nm et 530 nm.

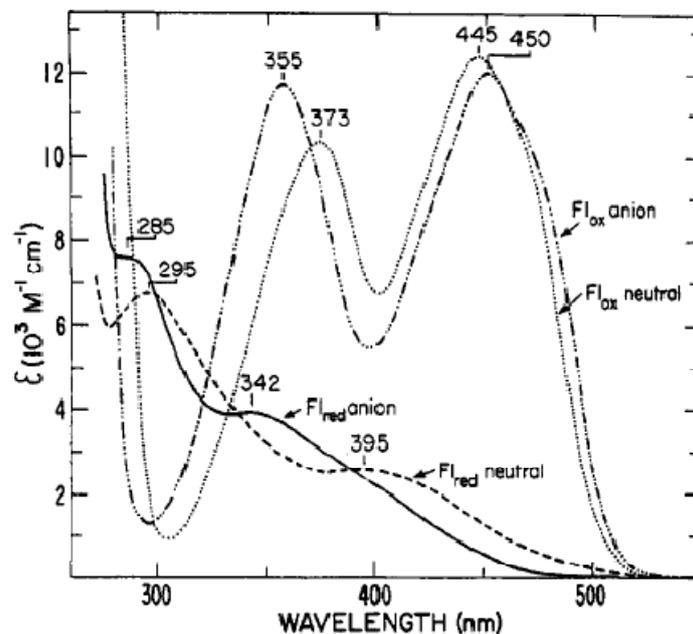


Figure 1.4 : Spectres de coefficients d'extinction molaire de FMN en solution aqueuse sous forme oxydée neutre (pointillés, pH = 5), oxydée anionique (alternance tirets et pointillés, pH = 12,5), réduite neutre (tirets, pH = 5) et réduite anionique (trait plein, pH = 8,5). Les réductions sont faites par irradiations en présence de l'acide tétraacétique-diamine-éthylène (EDTA). Cette figure est extraite de l'article de Ghisla et al., *Biochem.*, 1974, 13 (3), 589-597 [23].

En ce qui concerne la forme oxydée neutre (FMN_{ox}), le spectre d'absorption stationnaire présente deux bandes larges, centrées à 445 nm et 373 nm. Les coefficients d'extinction molaire sont supérieurs à $10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, caractéristiques de transitions $\pi\pi^*$ [24]. Des calculs semi-empiriques [26] et Hückel étendu [27] sur la lumiflavine montrèrent que la bande homologue à la bande centrée à 445 nm de FMN_{ox} correspond à la transition électronique $\pi\pi^*$ de plus basse énergie (S_0S_1). Cette bande n'est pas déplacée lorsque la polarité du solvant est modifiée. Cependant trois structures vibroniques apparaissent quand le milieu devient apolaire ou lors d'un abaissement de température [28]. Sun et al. assignèrent par spectroscopie stationnaire et par des calculs semi-empiriques que les transitions électroniques observées dans les différentes flavines ont pour l'origine des transitions $\pi\pi^*$ [29]. Ils trouvèrent aussi que les états $n\pi^*$ jouent un rôle significatif dans les processus de luminescence. D'après des calculs TD-DFT sur différents dérivés méthylés de la 10-méthylalloxazine [30] et *ab initio* sur l'isoalloxazine [31], la deuxième transition observée à 375 nm serait également de nature $\pi\pi^*$. Les auteurs rapportèrent également qu'un couplage entre les états $\pi\pi^*$ et $n\pi^*$ est possible. Il faut noter que la deuxième bande est beaucoup plus

sensible que la première bande à la polarité du solvant : en solvant polaire, la bande est décalée vers le rouge [32, 33]. Weigel et al. [34] rapportèrent qu'après excitation de la première transition dans la riboflavine en solution, le couplage ultrarapide (~ 20 fs) de cet état avec un état $n\pi^*$ proche est alors observé.

1.1.1.2 Fluorescence

La fluorescence des flavines oxydées neutres en solution aqueuse est intense avec un spectre centré vers 520 nm (cf. la Figure 1.5, extraite de l'article de Li et al. [25]).

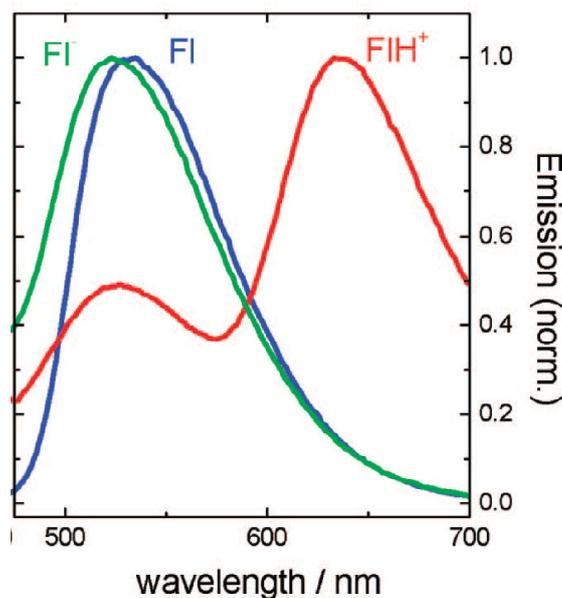


Figure 1.5 : Spectres de fluorescence de FMN oxydée anionique (vert, pH = -0,5), neutre (bleu, pH = 7) et protonée (rouge, pH = 13). Cette figure est extraite de l'article de Li et al., *J. Phys. Chem. A*, 2008, 112 (20), 4573-4583 [25].

À pH 7, le rendement quantique de fluorescence des RF et FMN est de 0,26 [35]. Le rendement quantique ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation, ce qui indique que le peuplement d'états électroniques excités supérieurs est suivi d'une conversion interne très rapide [36]. Dans des solvants moins polaires que l'eau, le maximum de fluorescence est décalé vers le bleu et le rendement quantique de fluorescence augmente [37].

Le rendement quantique de fluorescence de FAD oxydée neutre est dix fois plus faible que celui de FMN en solution aqueuse neutre [38]. Il faut rappeler que la structure moléculaire de FAD contient une adénine absente dans FMN. Il a été proposé qu'en solution aqueuse, FAD_{ox} existe dans les deux conformations schématisées sur la Figure 1.6 : une conformation fermée dans laquelle les cycles isoalloxazine et adénine sont face à face et en interaction π et une conformation ouverte où ils sont séparés [39]. En solution aqueuse avec un pH compris entre 4 et 8, à température ambiante, 80% des molécules de FAD_{ox} , à l'état fondamental, sont en conformation fermée [39, 40]. Dans la conformation fermée, la

fluorescence de FAD_{ox} est fortement inhibée. Cette inhibition a été attribuée à un transfert d'électron photoinduit depuis l'adénine vers l'isoalloxazine excitée sur la base de résultats de dynamique moléculaire et de fluorescence résolue en temps [41, 42].

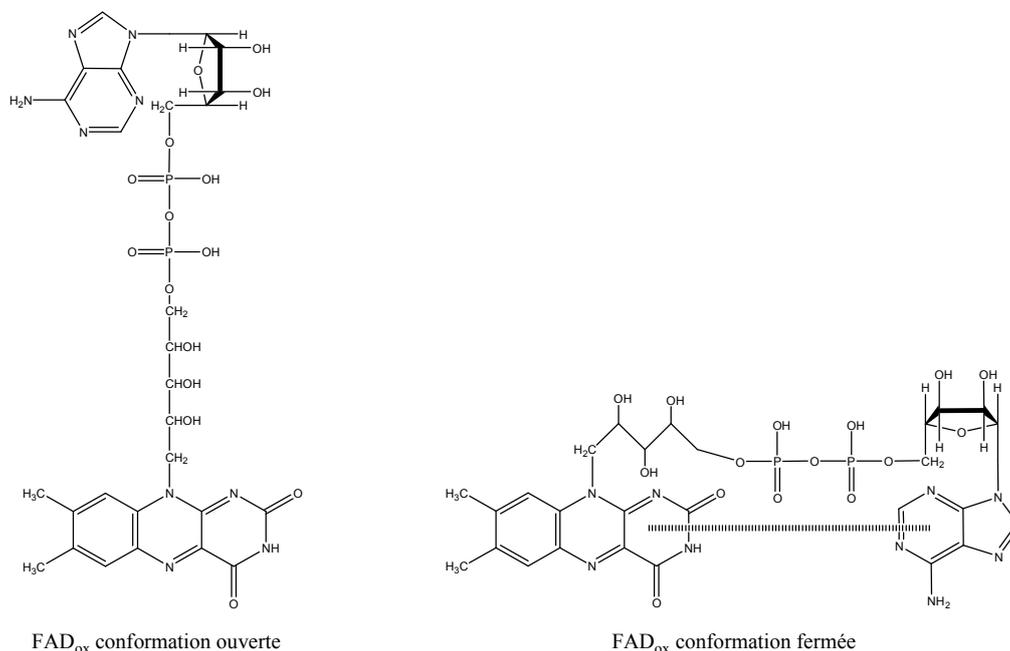


Figure 1.6 : Représentation schématique des formules semi-développées de FAD_{ox} en conformation ouverte à gauche et en conformation fermée à droite. L'interaction π entre l'isoalloxazine et l'adénine de FAD_{ox} dans la conformation fermée est schématisée par des traits hachurés.

1.1.1.3 Photolyse

Sous irradiation, FAD_{ox} est stable avec un rendement de photodégradation de $3,7 \times 10^{-4}$ à pH 8 [43]. En revanche, la photodégradation de FMN_{ox} est importante avec un rendement environ dix fois plus grand ($4,6 \times 10^{-3}$ à pH 8) [43]. Les photoproduits de FMN_{ox} sont à 75% du lumichrome et à 25 % des dérivés des lumiflavines représentés sur la Figure 1.7. Dans ces derniers, le groupe méthyle en N10 de la lumiflavine est remplacé par un fragment de la chaîne ribityle présente chez FMN.

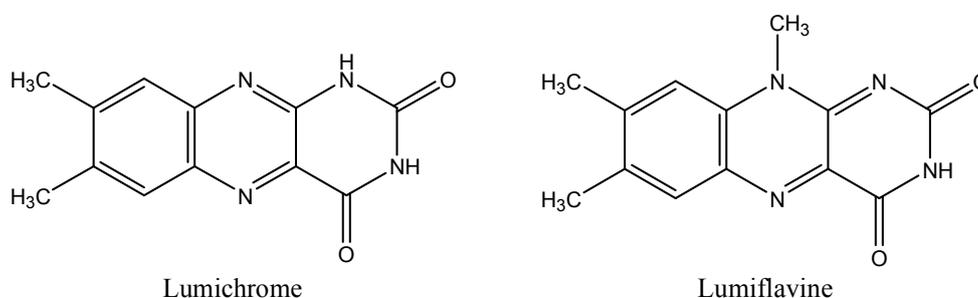


Figure 1.7 : Formules semi-développées du lumichrome à gauche et de la lumiflavine à droite.

1.1.2 Spectroscopies UV-vis résolues en temps

Depuis 2000, plusieurs groupes de recherche essayèrent de vérifier l'hypothèse du transfert d'électron intramoléculaire photoinduit dans la conformation fermée de FAD_{ox} , par différentes méthodes de spectroscopies résolues en temps [25, 42, 44-47]. Les résultats obtenus par ces groupes dans l'analyse des cinétiques photoinduites de FMN_{ox} et FAD_{ox} sont résumés dans le Tableau 1.1.

Auteurs	FMN_{ox}	FAD_{ox}
Leenders et al., 1993 (F) [48]	4,8 ns	—
Stanley et al., 2000 (A) [46]	5 ps (25%) + long	5 ps (65%) + long
van den Berg et al., 2002 (F) [49]	1,5 ns + 4,7 ns (82%)	7 ps (83%) + 2,7 ns
Chosrowjan et al., 2003 (F) [42]	—	0,81 ps + 9,5 ps + 2,6 ns
Kondo et al., 2006 (IR) [45]	—	15 ps + >500 ps
Kao et al., 2008 (F) [44]	—	9,2 ps (50%) + 2,5 ns (50%)
Kao et al., 2008 (A) [44]	—	5-9 ps + 30-40 ps + 2,5 ns
Li et al., 2008 (A) [25]	$k_{\text{lumichrome}} = 5,4 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ $k_{\text{triplet}} = 2 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$	20 ps + ns

Tableau 1.1: Résumé des analyses des cinétiques photoinduites dans FMN_{ox} et FAD_{ox} par spectroscopies résolues en temps : absorption transitoire UV-vis (notée A), fluorescence (notée F) et absorption transitoire infra-rouge (notée IR). Le signe « + » indique que les cinétiques expérimentales ont été ajustées par une somme de déclin exponentiels dont les durées de vie sont indiquées ici.

En 1993, des expériences de fluorescence résolues en temps sur FMN_{ox} (résolution temporelle de 80 ps, excitation à 457,9 nm) furent conduites par Leenders et al. [48], montrant un déclin de fluorescence monoexponentiel de 4,8 ns [48].

En 2000, Stanley et al. étudièrent FMN_{ox} et FAD_{ox} par spectroscopie d'absorption transitoire sub-picoseconde (impulsion d'excitation de 80 fs à 389 nm) [46]. Les cinétiques furent ajustées avec la somme d'un déclin exponentiel de 5 ps et d'une fonction plateau. L'amplitude relative de la composante courte fut trouvée plus grande pour FAD_{ox} que pour FMN_{ox} . Cette composante courte fut attribuée à l'inhibition de la fluorescence de l'état excité de l'isoalloxazine par l'adénine pour FAD_{ox} et à une inhibition due à des dimères pour FMN_{ox} . La composante longue fut attribuée au déclin de la conformation ouverte de FAD_{ox} , identique à FMN_{ox} qui ne peut exister que sous une seule conformation.

En 2002, van den Berg et al. réalisèrent des expériences de fluorescence résolue en temps sur FMN_{ox} et FAD_{ox} (impulsion d'excitation de 4 ps à 450 nm ou 460 nm) [49]. FAD_{ox} présente deux déclin de composantes principales 7 ps et 2,7 ns. La désexcitation lente de

l'état excité est attribuée à la conformation ouverte. La désexcitation rapide est attribuée à la conformation fermée et interprétée par un transfert d'électron depuis l'adénine vers l'isoalloxazine, suivi d'une recombinaison de charge. Pour FMN_{ox} la composante courte ne fut pas observée, appuyant l'hypothèse que l'inhibition de fluorescence est liée à la présence d'adénine.

En 2003, Chosrowjan et al. firent des expériences de fluorescence résolue en temps sur FAD_{ox} avec une meilleure résolution temporelle (impulsion d'excitation de 120 fs à 410 nm). Ils observèrent une composante ultracourte de 0,81 ps qu'ils attribuèrent à la dynamique de solvation de FAD_{ox} excitée [42]. Les deux autres composantes observées 9,5 ps et 2,6 ns furent attribuées au déclin des conformations fermée et ouverte, respectivement.

Des expériences d'absorption IR résolues en temps en excitant FAD_{ox} avec des impulsions inférieures à 150 fs à 400 nm, furent réalisées par Kondo et al. en 2006. Ils montrèrent que l'état excité de la conformation fermée décline sans intermédiaire détectable vers l'état fondamental en 15 ps [45].

Kao et al., en 2008, réalisèrent des expériences d'absorption transitoire sur FAD_{ox} en solution aqueuse avec une résolution inférieure à 300 fs et des expériences de fluorescence résolue en temps avec une résolution comprise entre 400 fs et 500 fs [44]. Ils décrivent leurs observations à l'aide d'un mécanisme de séparation de charge photoinduite en 5-9 ps suivie d'une recombinaison de charge en 30-40 ps avec retour à l'état fondamental de la conformation fermée de FAD_{ox}. Un déclin de 2,5 ns fut attribué au déclin de l'état excité de la conformation ouverte.

La même année, Li et al. rapportèrent ne pas observer la signature spectrale de l'espèce à transfert de charge dans des expériences de spectroscopie d'absorption transitoire sur FAD_{ox} (impulsion d'excitation de 110 fs à 400 nm) [25]. Ils proposèrent alors que la recombinaison de charge soit trop rapide pour être observée. Pour FMN_{ox} ils observèrent la dégradation, partielle, de FMN_{ox} en lumichrome, avec une vitesse de $5,4 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ et la formation de l'état triplet de FMN_{ox} par croisement intersystème avec la vitesse de $2 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$.

1.2 Flavines réduites

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les flavines réduites sont particulièrement intéressantes puisque ce sont les espèces photocatalytiques actives chez les photolyases, les cryptochromes DASH et potentiellement chez d'autres cryptochromes.

1.2.1 Spectroscopies UV-vis stationnaires

1.2.1.1 Formation

Les formes les plus étudiées des flavines réduites sont la forme acide FADH_2 et la forme basique FADH^- du second couple acido-basique (cf. la Figure 1.3), dont le pK_a vaut 6,7 [50]. La forme cationique FADH_3^+ n'est pas étudiée parce qu'il est difficile de travailler à un pH inférieur à 0 et cette forme n'a pas été observée dans les organismes biologiques. L'obtention des flavines réduites se fait par réduction des flavines oxydées dont le potentiel standard vaut 200 mV, au moyen d'un agent réducteur [51]. Le choix du réducteur (dithionite, tétrahydroborate de sodium, dihydrogène, substances naturelles) dépend du type d'analyse réalisée ensuite. Pour les études spectroscopiques, la photoréduction à 450 nm des flavines oxydées après ajout d'un réducteur et dégazage de la solution est la technique de choix. La concentration en dioxygène doit être réduite, parce qu'il oxyde très rapidement (quelques minutes) les flavines réduites [52]. Le mécanisme mis en jeu est le suivant : la photoexcitation porte la flavine oxydée dans son état singulet et l'état triplet est obtenu par croisement intersystème. La réduction a ensuite lieu depuis l'état triplet dont la durée de vie longue permet l'interaction, contrôlée par la diffusion, avec le réducteur [53]. Les réducteurs utilisés sont l'acide tétraacétique-diamine-éthylène (EDTA), les amines, les acides aminés, les acides carboxyliques, l'ion oxalate [54]. Le rendement quantique de photoréduction de FMN par l'EDTA en conditions anaérobies et aérobies vaut 15% et 8% respectivement [52].

1.2.1.2 Structure

Les flavines réduites existent sous plusieurs structures tautomères. Les formes les plus souvent rencontrées sont représentées sur la Figure 1.8-A : di-substituées en 1 et 5 (1,5-dihydroflavine adénine dinucléotide, notée (1, 5) FADH_2) ou en 4a et 5 (4a,5-dihydroflavine adénine dinucléotide, notée (4a, 5) FADH_2 , aussi appelée conformère iminol).

Les (1, 5) FADH_2 existent sous différentes conformations, représentées sur la Figure 1.8-B. Les deux conformations extrêmes, avec un pliage important selon l'axe N5-N10, sont appelées conformations « papillons » [54]. En conformation plane, les 1,5-dihydroflavines sont anti-aromatiques avec 8 électrons π sur le cycle pyrazine. En revanche dans chaque conformation « papillons », la délocalisation des électrons π sur les trois noyaux aromatiques de l'isoalloxazine est empêchée. L'aromaticité de la molécule est retrouvée avec six électrons π délocalisés sur le cycle xylène.

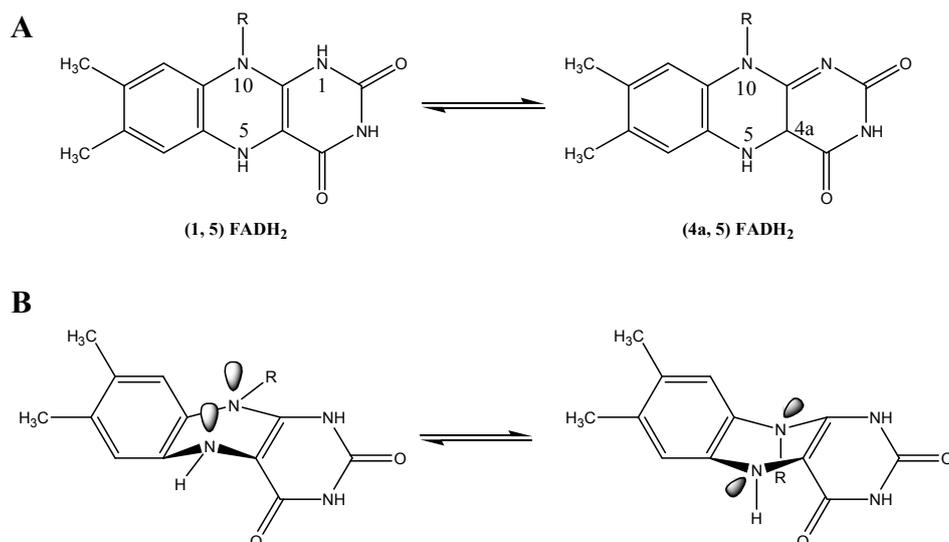


Figure 1.8 : **A :** Formules semi-développées des différentes formes tautomères de la dihydroflavine adénine dinucléotide FADH₂ substituée en 1 et 5 à gauche ((1, 5) FADH₂) et substituée en 5 et 4a à droite ((4a, 5) FADH₂, conformère iminol). **B :** Les deux conformères « papillon » de la (1, 5) FADH₂.

1.2.1.3 Absorption

Les spectres d'absorption stationnaire des flavines réduites sont peu structurés dans le visible et l'UV proche (cf. la Figure 1.4, extraite de l'article de Ghisla et al. [23]) avec des maxima à 285 nm et 342 nm pour FMNH⁻ et à 295 nm et 395 nm pour (1, 5) FMNH₂. Ces maxima sont liés à des transitions $\pi\pi^*$. Les flavines réduites sont des espèces peu fluorescentes en solution et à température ambiante. Les spectres d'émission de FADH⁻ et FADH₂ présentent un maximum à 450 nm et 470 nm, respectivement (cf. la Figure 1.9, extraite de l'article de Kao et al. [44]).

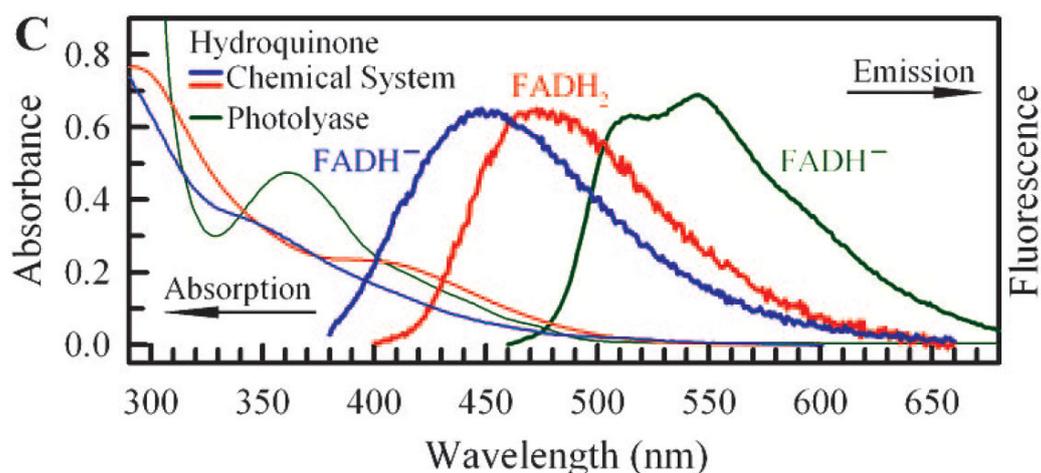


Figure 1.9 : Spectres stationnaires normalisés d'absorption et de fluorescence ($\lambda_{exc} = 360$ nm) des flavines adénines réduites anioniques FADH⁻ (bleu) et neutre FADH₂ (rouge) en solution. Les spectres stationnaires d'absorption et de fluorescence de la photolyase CPD de *E. coli* sont représentés en noir. Cette figure est extraite de l'article de Kao et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130 (39), 13132-13139 [44].

1.2.2 Spectroscopies UV-vis résolues en temps

Depuis 1998, plusieurs groupes de recherche étudièrent les flavines réduites en solution par différentes techniques spectroscopiques résolues en temps [44, 48, 55, 56]. Les résultats obtenus par ces groupes sont résumés dans les Tableau 1.2 et Tableau 1.3 pour les flavines réduites anioniques et neutres, respectivement.

Auteurs	FMNH ⁻	FADH ⁻
Enescu et al., 1998 (A) [55]	60 ps + 1,5 ns	17 ps + 1,5 ns
Li et al., 2008 (A) [56]	40 ps + 529 ps + long	23 ps + 401 ps + long
Kao et al., 2008 (F) [44]	5,8 ps (80%) + 35 ps + 1,5 ns	5 ps (84%) + 31 ps + 2 ns
Kao et al., 2008 (A) [44]	8-18 ps + 40-70 ps + 2-3 ns	8-18 ps + 40-70 ps + 2-3 ns

Tableau 1.2 : Résultats obtenus pour FMNH⁻ et FADH⁻ par spectroscopie résolue en temps : absorption transitoire (notée A) et fluorescence (notée F). Le signe « + » indique que les cinétiques expérimentales ont été ajustées par une somme de déclin exponentiels dont les durées de vie sont indiquées ici.

En 1998, Enescu et al. réalisèrent les premières expériences d'absorption transitoire avec une résolution sub-picoseconde en excitant à 312 nm FMNH₂ et FADH₂ à pH 5,7 et FMNH⁻ et FADH⁻ à pH 8,2 [55]. Aux temps courts, pour un retard pompe-sonde de 2 ps, les spectres d'absorption transitoire présentent deux bandes positives centrées à 525 nm et 725 nm, avec un épaulement à 410 nm pour les flavines réduites déprotonées. Aux temps longs, pour un retard pompe-sonde de plus de 50 ps, les spectres sont plus plats avec la perte des maxima et des épaulements pour toutes les espèces. Les cinétiques furent ajustées paramétriquement par la somme de deux exponentielles dont la durée du déclin de la composante longue fut fixée à 1,5 ns. Le déclin rapide est identique pour FADH₂ et FMNH₂ et vaut 4 ps. En revanche, le déclin trouvé pour FADH⁻ est trois fois plus rapide que celui trouvé pour FMNH⁻ : 17 ps et 60 ps respectivement. Ces résultats furent interprétés comme la présence d'une hétérogénéité de l'échantillon avec deux populations excitées : une première qui décline rapidement (entre 4 ps et 60 ps) et une seconde de durée de vie plus longue (1,5 ns). Il fut proposé que cette hétérogénéité pourrait provenir de structures différentes pouvant s'interconvertir rapidement [57]. Une seconde hypothèse fut émise concernant la durée de vie longue : la formation d'électron hydraté par une photoionisation biphotonique. Enescu et al. écartèrent cette hypothèse parce que le spectre résiduel aux temps longs s'avère différent de celui attendu pour l'électron hydraté et parce que le signal observé est proportionnel à l'intensité de pompage.

Auteurs	FMNH ₂	FADH ₂
Enescu et al., 1998 (A) [55]	4 ps + 1,5 ns	4 ps + 1,5 ns
Li et al., 2008 (A) [56]	3 ps + 43 ps + 793 ps + long	4 ps + 53 ps + 1,8 ns + long
Kao et al., 2008 (F) [44]	—	2,9 ps (50%) + 40 ps + 1 ns
Kao et al., 2008 (A) [44]	—	8-18 ps + 40-70 ps + 2-3 ns

Tableau 1.3 : Résultats obtenus pour FMNH₂ et FADH₂ par spectroscopie résolue en temps (mêmes notations qu’au Tableau 1.2)

En 2008, Li et al. publièrent une étude réalisée sur des flavines réduites par spectroscopie d’absorption transitoire femtoseconde [56]. Ils décrivent les cinétiques relatives aux quatre flavines réduites FMNH⁻, FMNH₂, FADH⁻ et FADH₂ par des déclin multiexponentiels (cf. les Tableau 1.2 et Tableau 1.3). Les deux premiers déclin de FMNH⁻ sont attribués aux deux conformères « papillons » de la molécule. FMNH₂ présente un déclin supplémentaire plus rapide attribué à la désexcitation de l’état excité d’un tautomère iminol (cf. la Figure 1.8-A) des conformères précédents. La composante de durée de vie longue de ces deux premières flavines réduites est attribuée au produit de l’ionisation spontanée de la molécule à partir du conformère excité lent, c’est-à-dire à la forme semi-quinone des flavines et à l’électron hydraté. Le comportement de FADH⁻ est jugé essentiellement identique à celui de FMNH⁻ même si la dynamique un peu plus rapide de FADH⁻ pourrait provenir d’une faible contribution de transfert d’électron intramoléculaire, de l’isoalloxazine vers l’adénine. En ce qui concerne FADH₂, les auteurs rapportèrent une différence qualitative avec FMNH₂. Les deux premiers déclin sont attribués à la désexcitation de deux tautomères de la molécule (iminol et un conformère « papillon », respectivement) comme pour FMNH₂ mais les deux déclin de durée de vie longue sont proposés provenir d’une compétition entre deux processus de transfert d’électron : le premier est intramoléculaire, de l’isoalloxazine vers l’adénine alors que le second s’effectue vers le solvant, aboutissant à la création d’électron hydraté (comme pour les trois autres flavines réduites). Li et al. proposèrent que le transfert d’électron intramoléculaire existerait très peu dans FADH⁻ car la charge négative induirait une solvation forte de l’isoalloxazine empêchant la formation de la conformation fermée. En revanche dans FADH₂, la conformation fermée pourrait exister, même si elle est moins abondante que dans FAD_{ox} parce que l’isoalloxazine dans FADH₂ n’est pas plane.

En 2008 également, Kao et al. montrèrent par spectroscopie d’absorption transitoire femtoseconde et par fluorescence résolue en temps, que les désactivations de FADH⁻, FMNH⁻ et FADH₂ peuvent être décrites par un ajustement paramétrique à trois exponentielles dont les durées de vie sont situées dans les intervalles suivants : 2,9-18 ps, 31-70 ps, 1-3 ns [44].

Comme ils observèrent les mêmes déclin pour FADH^- et FMNH^- , le transfert d'électron intramoléculaire vers l'adénine fut écarté. Les auteurs attribuèrent ces différents déclin à différentes voies de désactivation (trajectoires) le long d'une surface de potentiel aboutissant à une intersection conique. La coordonnée de réaction est essentiellement ici le mouvement de pliage « papillon » de la molécule. Ils observèrent qu'une excitation plus énergétique de FADH^- et FMNH^- entraîne une désactivation plus rapide (l'intersection conique est atteinte plus tôt) et que l'utilisation d'un solvant plus visqueux entraîne une dynamique plus lente (ralentissement de la dynamique de friction).

2 Photolyases et cryptochromes

2.1 Classification selon leurs fonctions biologiques

2.1.1 Photolyases

L'absorption de photons UV-vis (300-500 nm) par les photolyases permet la réparation de l'ADN endommagé par une irradiation UV (200-300 nm) sans être des agents anti-cancéreux. L'irradiation UV entraîne en effet des lésions de l'ADN qui induisent, à leur tour, la mutation de gènes, un retard dans le développement, la mort cellulaire et le cancer. Les principaux photoproduits (défauts) connus, représentés sur la Figure 2.1, sont les suivants :

- le dimère de pyrimidine de type cyclobutane, noté CPD (Cyclobutane Pyrimidine Dimer) ou Pyr\diamondPyr ;
- le dimère de type (6-4) pyrimidine-pyrimidone, noté (6-4) ou Pyr[6-4]Pyr et son isomère de Dewar, noté Pyr[6-4]Pyr Dewar.

Les défauts CPD représentent entre 80% et 90% des photoproduits tandis que les défauts Pyr[6-4]Pyr en constituent 10 à 20%. Les photoproduits de type CPD sont formés à partir de l'état triplet des pyrimidines [58], alors que ceux de type (6-4) sont produits à partir de l'état singulet. Les bases nucléiques endommagées sont des bases pyrimidiques : thymine (T), uracile (U, pour l'ARN) et cytosine (C).

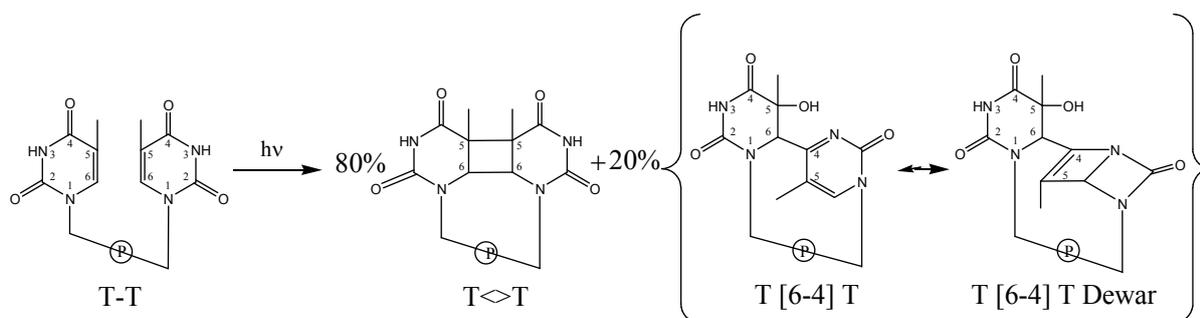


Figure 2.1 : L'ADN modélisé ici par deux bases thymine (T-T), sous irradiation UV (200-300 nm), présente deux principaux types de lésions : 80% de lésions CPD notées T\diamondT et 20 % de lésions (6-4) notées T[6-4]T avec son isomère de Dewar.

Les photolyases réparatrices des défauts CPD sont appelées photolyase CPD ou, pour des raisons historiques, simplement photolyases. Les défauts de type Pyr[6-4]Pyr sont réparés par d'autres photolyases, appelées photolyases (6-4).

2.1.1.1 Photolyases CPD

Kelner découvrit en 1949 la photoréparation de cellules de *Streptomyces griseus* endommagées par UV [59]. Après excitation en lumière visible, il put observer le retour à un

fonctionnement normal des cellules endommagées. Cette photoréparation par des photons moins énergétiques semblait contre intuitive et entraîna de nombreuses recherches. En 1958, Rupert découvrit finalement la première photolyase CPD chez *Escherichia coli* [60]. Il proposa alors que cette enzyme suit une cinétique de type Michaelis-Menten [61] avec comme spécificité que la réaction est strictement dépendante de la lumière. Rupert commença à étudier les photolyases CPD par des expériences de photolyse éclair afin de déterminer quelques paramètres fondamentaux du cycle catalytique *in vitro* et *in vivo* [62, 63].

2.1.1.2 Photolyases (6-4)

La première photolyase réparatrice des défauts Pyr[6-4]Pyr ne fut identifiée qu'en 1993 par Todo [64]. Jusqu'à cette découverte, l'excision était le seul mécanisme connu d'élimination des défauts Pyr[6-4]Pyr ou Pyr[6-4]Pyr Dewar, mécanisme au demeurant très efficace [65]. Comme les photolyases (6-4) et les photolyases CPD sont homologues génétiquement et ont des chromophores identiques, il fut proposé que le mécanisme de réparation soit identique dans les deux systèmes [66-68].

2.1.2 Cryptochromes

Les cryptochromes sont des protéines photoréceptrices de lumière bleue, capables de jouer un rôle de signalisation. En 1993, Ahmad et Cashmore découvrirent le premier gène codant pour un cryptochrome chez *Arabidopsis thaliana* [69]. Par homologie, des cryptochromes furent rapidement trouvés dans d'autres plantes et chez des animaux. Les cryptochromes présentent un haut taux d'homologie avec les photolyases, mais sont dépourvus de leur activité de photoréparation de l'ADN endommagé [19, 70, 71]. Ce sont des photorécepteurs contrôlant la photomorphogénèse des plantes. Il a été proposé qu'ils assurent l'entraînement de l'horloge circadienne chez les animaux et les plantes et qu'ils sont impliqués dans la détection du champ magnétique terrestre notamment dans les espèces migratoires. Les cryptochromes peuvent être classés en trois sous-familles : les cryptochromes de plante, les cryptochromes animaux et pour des raisons historiques les cryptochromes DASH [71].

2.1.2.1 Cryptochromes de plante : photomorphogénèse

À titre d'exemple, le cryptochrome 1 de *A. thaliana* (AtCry1) [69] est notamment à l'origine d'une inhibition de l'élongation de l'hypocotyle de la plante pendant son développement sous l'effet d'une irradiation par lumière bleue [69]. D'autres réponses sont également déclenchées par AtCry1 : expansion du cotylédon, production de chlorophylle et d'anthocyanine.

Le rôle joué par AtCry1 est celui d'un régulateur de l'expression de plusieurs gènes exprimés pendant la morphogénèse, via son interaction avec d'autres facteurs importants de l'expression génétique [72]. Nous ne rentrerons pas dans les détails de ces processus.

2.1.2.2 Cryptochromes animaux : cycle circadien

En 1996, le premier cyrptochrome animal fut découvert chez l'homme par homologie à la photolyase (6-4) de *Drosophila melanogaster* et est noté hCry1 [67, 73]. Les cryptochromes animaux furent identifié dans de nombreux animaux comme les poissons, les insectes, les mammifères et les amphibiens [71]. Ces protéines sont impliquées dans le cycle circadien.

La plupart des organismes vivants sont capables d'anticiper l'alternance des jours et des nuits [74] au moyen d'un oscillateur interne [75] fonctionnant grâce à l'expression d'un ensemble de protéines, contrôlée par la concentration de ces mêmes protéines dans le noyau. L'oscillateur engendre un rythme d'environ 24 heures qui, en l'absence de l'alternance nuit/jour, se déphase progressivement [76].

Nous savons que les cryptochromes sont constitutifs de l'oscillateur circadien de nombreux organismes et nous pensons qu'il serait aussi, pour certains organismes, un récepteur dédié à la perception de l'alternance nuit/jour, dont l'activation permettrait de contrôler la phase du rythme circadien (fonction dite d'entraînement) [77]. Pour les mammifères, il semble cependant que ce rôle soit joué par la mélanopsine [78] et non un cryptochrome.

2.1.2.3 Cryptochromes DASH : photoréparation de l'ADN

La découverte, en 2000, du premier cryptochrome bactérien [79] donna lieu à la création d'une troisième sous-famille des cryptochromes : les cryptochromes DASH (notés Cry-DASH) [80]. L'adjectif DASH a pour origine les noms des premiers organismes découverts contenant un tel cryptochrome : *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* et *Homo*. Les Cry-DASH sont présents dans de très nombreux autres organismes comme les bactéries, les plantes [81], les algues, les champignons et les vertébrés [82].

Le Cry-DASH de *Synechocystis* régule la transcription génétique. En effet des analyses révélèrent que l'invalidation (knock out) du gène codant pour ce Cry-DASH affecte l'expression dépendante de la lumière de plusieurs autres gènes [80]. Un fait remarquable est que les Cry-DASH de *Synechocystis* et *A. thaliana* [83] peuvent se lier à l'ADN, comme les photolyases. Une faible activité de photoréparation de l'ADN endommagé par UV fut observée *in vivo* chez *Synechocystis* [79]. Par ailleurs, il fut récemment démontré que trois

Cry-DASH (chez *A. thaliana*, *Xenopus laevis* et *Vibrio cholerae*) peuvent réparer spécifiquement l'ADN monobrin endommagé présentant des lésions de type CPD [84]. Les auteurs proposèrent que ces enzymes ne soient pas des cryptochromes mais de « simples » photolyases pour ADN monobrin [84].

2.2 Structure

Nous allons décrire la structure des protéines CPF, en particulier, celle de la photolyase CPD de *E. coli*, notée EcCPD. Les cryptochromes et les photolyases présentent un fort taux d'homologie tant au niveau de la structure primaire, que tertiaire et contiennent les mêmes chromophores.

2.2.1 Chromophores

Le photorécepteur présent dans les photolyases et les cryptochromes est une flavine de type FAD (cf. la Figure 1.1) dont les études photophysiques ont été rapportées dans la partie 1. Les protéines CPF portent également un second chromophore, qui joue le rôle de photoantenne, en absorbant les photons avec une section efficace élevée et en transférant l'énergie à la flavine, rendant ainsi les protéines plus efficaces. Le 5,10-méthényl-tetrahydrofolate (5,10-MTHF, noté par la suite MTHF et représenté sur la Figure 2.2) est la photoantenne présente dans la plupart des photolyases et des cryptochromes analysés à ce jour [85, 86]. Une autre photoantenne, le 8-hydroxy-7,8-didesméthyl-5-deazariboflavine (8-HDF), a pu être observée chez la photolyase CPD d'*Anacystis nidulans* [87]. Finalement dans certaines bactéries thermophiles le second chromophore identifié est FMN_{ox} ou FAD_{ox} [88, 89]. Les spectres de coefficients d'extinction molaire de deux principales photoantennes présentes dans les protéines CPF sont représentés sur la Figure 2.3.

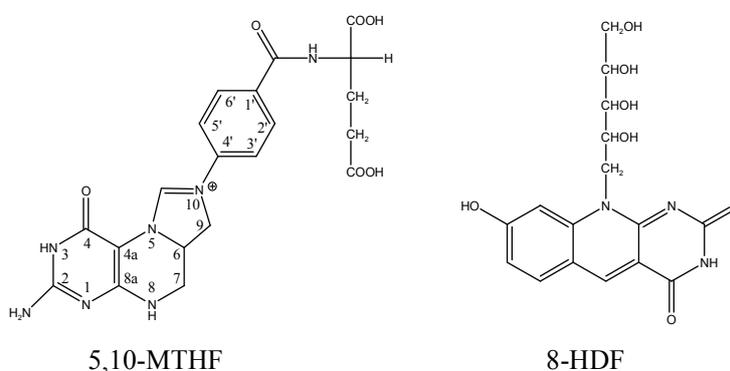


Figure 2.2 : Formule semi-développée des deux photoantennes principales rencontrées chez les protéines CPF. Le 5,10-MTHF (5,10-méthényl-tetrahydrofolate) à gauche et le 8-HDF (8-hydroxy-7,8-didesméthyl-5-deazariboflavine) à droite. Les numéros des atomes sont donnés pour MTHF.

Chez les photolyases, *in vivo*, le chromophore photocatalytique actif est la forme réduite et déprotonée de FAD : FADH⁻ ($\epsilon_{360} = 5\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). La couleur jaunâtre des solutions de protéine est essentiellement due à la présence de la photoantenne, MTHF, qui présente un maximum d'absorption à 385 nm avec un coefficient d'extinction molaire de $25\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [19] (cf. la Figure 2.3). Cependant lors de la purification des photolyases CPD, la photoantenne est souvent perdue et la flavine est oxydée en FADH[•] (la solution devient bleue). Si le temps d'exposition au dioxygène augmente, alors FADH[•] est oxydée en FAD_{ox} (solution jaune). La purification des photolyases (6-4) conduit également à la perte de la photoantenne et à l'oxydation de FADH⁻ en FAD_{ox}, suggérant un accès du dioxygène facilité chez les photolyases (6-4) [90].

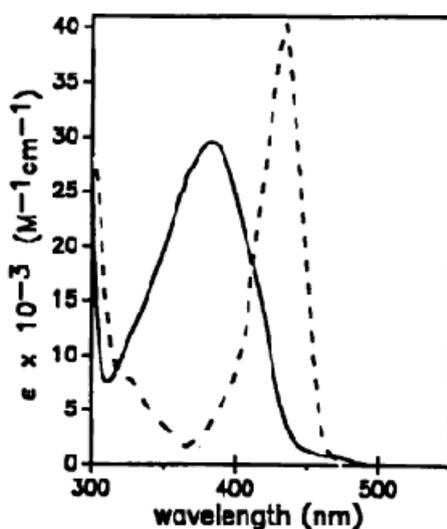


Figure 2.3 : Spectres de coefficients d'extinction molaire de MTHF dans la photolyase CPD de *E. coli* (trait plein) et du 8-HDF dans la photolyase CPD de *A. nidulans* (en pointillés). Cette figure est extraite de l'article de Sancar, *Chem. Rev.*, 2003, 103 (6), 2203-2237 [19].

2.2.2 Protéine

Les protéines CPF sont constituées de 400 à 600 acides aminés. En général, un alignement de leurs séquences primaires d'acides aminés suffit à les classer dans leur famille respective. Les protéines appartenant à un même groupe présentent des taux d'homologie voisins de 15% à 70% [19]. Les photolyases CPD des animaux et des plantes ont un faible taux d'homologie avec celles du monde microbien. Une sous-division fut donc opérée : le type I comprend les photolyases CPD d'organismes microbiens et le type II celles des animaux et des plantes. Avec le nombre croissant de gènes pour les CPF, la classification n'est pas encore totalement arrêtée [19]. Les cryptochromes ont en général une extension C-terminale absente sur les séquences des photolyases. Le fragment de cryptochrome sans

l'extension C-terminale est appelé domaine Phr (photolyase homology region). L'extension C-terminale est nécessaire pour assurer leurs fonctions biologiques de cryptochrome [91].

Les structures tertiaires de quelques protéines CPF sont connues, par exemple celles de : EcCPD [85], la photolyase CPD de *Anacystis nidulans* [87], la photolyase (6-4) de *Drosophila melanogaster* [92], le domaine Phr du cryptochrome 1 de *Arabidopsis thaliana* [93] et le cryptochrome DASH de *Arabidopsis thaliana* (noté AtCry3) [86]. Nous allons décrire plus précisément la structure tertiaire bien connue de EcCPD (1DNP, code de la base de données PDB des protéines), représentée sur la Figure 2.4, extraite de l'article de Sancar [19]. Les autres structures cristallographiques présentent de grandes similarités avec celle de EcCPD. Les structures cristallographiques de la photolyase (6-4) de *D. melanogaster* et du Cry-DASH de *A. thaliana* seront détaillées dans le chapitre V.

EcCPD est une protéine globulaire avec deux domaines bien définis : la partie N-terminale (acides aminés 1-131) et la partie C-terminale (acides aminés 204-472). La partie N-terminale contient des hélices α et des feuillets β , tandis que la partie C-terminale n'a que des hélices α . Les deux domaines sont reliés par une grande boucle (acides aminés 132-203) qui s'enroule autour de la partie N-terminale. Aucun des deux chromophores n'est lié par liaison covalente à la protéine.

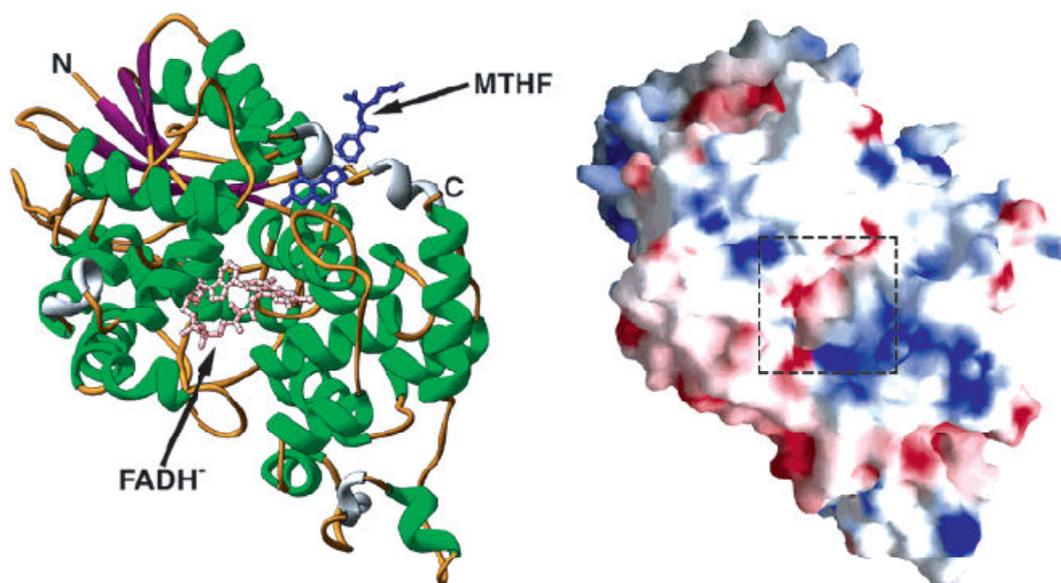


Figure 2.4 : À gauche : Structure cristallographique de la photolyase CPD de *E. coli* (EcCPD) avec une représentation en ruban montrant les parties N-terminale et C-terminale et la position des deux chromophores, MTHF et FADH⁻. À droite : Représentation du potentiel de surface montrant la répartition de charges sur la protéine. Les acides aminés basiques sont représentés en bleu, les acides aminés acides en rouge, et en blanc les acides aminés hydrophobes. Le carré indique le trou permettant l'accès au FAD au sein du domaine hélicoïdal de la protéine [19, 85]. Cette figure est extraite de l'article de Sancar, *Chem. Rev.*, 2003, 103 (6), 2203-2237 [19].

2.2.2.1 Interaction avec le chromophore FAD

La flavine est profondément enfouie dans une cavité du domaine d'hélices α . FAD est en conformation fermée (cf. la partie 1.1). Chez EcCPD, les acides aminés impliqués dans la fixation de FAD sont au nombre de quinze [85] et sont assez bien conservés chez les cryptochromes et photolyases. FAD est stabilisée par liaison hydrogène avec quatre acides aminés et par des interactions de type Van der Waals avec deux acides aminés [85]. L'asparagine 378 joue un rôle essentiel dans la stabilisation de FAD sous forme réduite par un réseau de liaisons hydrogènes [94]. La glycine 381 est remplacée par une asparagine chez d'autres protéines CPF, entraînant une altération de la structure électronique de FAD par la création de nouvelles liaisons hydrogènes avec l'adénine de FAD [80].

2.2.2.2 Interaction avec une photoantenne : MTHF ou 8-HDF

Comme il a été vu, les photoantennes les plus souvent rencontrées dans les photolyases et les cryptochromes sont le MTHF et le 8-HDF. Elles possèdent chacune un site de fixation spécifique. Le MTHF est présent dans un trou peu profond entre les deux domaines de la protéine [85, 86]. Les acides aminés en interaction avec le MTHF diffèrent selon que la photoantenne est dans une photolyase [85] ou dans un Cry-DASH [86]. Six acides aminés sont en interaction avec le MTHF dans EcCPD, avec notamment l'acide glutamique 109 qui stabilise le MTHF en créant deux liaisons hydrogène avec sa chaîne latérale. Le MTHF, chez le Cry-DASH AtCry3, est en interaction avec douze acides aminés différents de ceux présents chez EcCPD. La mutation de l'acide glutamique 149 en alanine chez AtCry3 implique la perte de MTHF [88].

En revanche le 8-HDF est enfoui dans une cavité du domaine α/β de la photolyase de *A. nidulans* (notée AnCPD) [87]. Le 8-HDF est 1,2 nm plus enfoui que le MTHF dans ces protéines. Onze acides aminés sont en interaction avec le 8-HDF. La lysine 248 est un acide aminé très important dans la stabilisation par liaison hydrogène du 8-HDF au sein des protéines CPF. L'acide glutamique 109 présent chez EcCPD est trop encombrant et empêche ainsi le 8-HDF d'être présent dans la protéine.

2.2.2.3 Interaction avec de l'ADN endommagé

Les photolyases photoréparent l'ADN endommagé. Un site d'interaction est présent sur ces protéines. La répartition des charges sur EcCPD (cf. la Figure 2.4, à droite) révèle un ruban chargé positivement le long de la protéine. Ce ruban servirait à ancrer de l'ADN par interactions électrostatiques. Au milieu de ce ruban, il y a un trou de taille adaptée à l'introduction d'un dimère CPD dans la cavité contenant FAD. La cavité présente un premier

bord hydrophobe en interaction avec le cycle de dimère et un second bord polaire interagissant avec les atomes O et N du dimère par liaison hydrogène [47]. Treize acides aminés sont impliqués dans la structure du ruban au sein des protéines CPF. Un de ces acides aminés est conservé chez toutes ces chromoprotéines, il s'agit de l'arginine 397. Sa mutation entraîne la perte de la photoréparation [94].

Deux résidus tryptophanes (277 et 384) s'intercalent entre l'isoalloxazine de FAD et le dimère de l'ADN endommagé [19, 47]. La mutation du tryptophane 277 entraîne une perte d'interaction entre le dimère Pyr \leftrightarrow Pyr et FAD [95]. Le résidu tryptophane 277 semble donc jouer un rôle essentiel dans l'interaction du dimère avec FAD. Ces acides aminés sont conservés chez toutes les photolyases CPD et (6-4), ainsi que dans les cryptochromes animaux. En revanche une tyrosine remplace le tryptophane 384 chez AtCry3. Chez le cryptochrome de *A. thaliana* le premier tryptophane est remplacé par une leucine et le second par une tyrosine. Ceci est normal puisque le mécanisme de photoréparation de l'ADN semble être conservé chez toutes les photolyases mais pas chez les cryptochromes.

2.2.2.4 Mécanisme de photoréduction

Comme nous le verrons dans les chapitres III et IV, les protéines CPF peuvent être oxydées par le dioxygène et FADH⁻ est alors oxydé facilement en FADH[•] ou plus difficilement en FAD_{ox}. Il fut montré que les photolyases possèdent un mécanisme de photoréduction, qui permet de reconstituer FADH⁻. Chez EcCPD, cette réaction photoinduite, sans rapport avec la photoréparation de l'ADN, met en jeu une chaîne de trois tryptophanes 306, 359, et 382 [5, 96]. Cette chaîne est très bien conservée au sein de toutes les protéines CPF [19, 20], ce qui suggère que le mécanisme de photoréduction pourrait être conservé quelle que soit la fonctionnalité de la protéine CPF.

2.3 Mécanismes réactionnels

Les structures des photolyases et des cryptochromes sont des éléments précieux à la compréhension de leur fonctionnement. Nous allons maintenant décrire succinctement les mécanismes réactionnels mis en jeu dans la photoréparation de l'ADN endommagé par UV chez les photolyases et ceux mis en jeu par les cryptochromes.

2.3.1 Photolyases CPD

Les photolyases CPD suivent un cycle enzymatique de type Michaelis-Menten. La première étape est la complexation de l'enzyme au substrat (ADN endommagé) donnant le complexe enzyme-substrat. Elle est suivie de la photoréparation de l'ADN endommagé, en présence de lumière dans la région spectrale 300-500 nm.

2.3.1.1 Interaction substrat enzyme

Les photolyases CPD ne réparent que l'ADN endommagé présentant des défauts de type Pyr<>Pyr. La fixation de l'ADN endommagé sur l'enzyme photolyase CPD peut se dissocier en trois parties : interaction ADN endommagé avec le ruban chargé positivement de la photolyase CPD ($K_{ADN,s} = 10^{-9}$, constante de dissociation de l'ADN pour l'ADN endommagé) [85], retournement du dimère pour accéder à la cavité contenant FAD et interaction entre $FADH^-$ et le dimère [97, 98]. Après photoréparation de la lésion, il y a dissociation de l'ADN réparé et de l'enzyme. Cette dissociation se fait en moins d'une minute [99, 100].

2.3.1.2 Cycle catalytique de photoréparation

Le clivage des liaisons du dimère Pyr<>Pyr est déclenché par transfert d'électron depuis le chromophore excité de la photolyase. Le cycle catalytique de photoréparation s'effectue selon les trois phases suivantes :

- excitation électronique de $FADH^-$, soit par absorption directe de la lumière par la flavine soit par transfert d'énergie à partir de la photoantenne, MTHF ou 8-HDF.
- transfert d'électron depuis $FADH^-$ excitée vers le dimère Pyr<>Pyr pour donner $FADH^\bullet$ et $[Pyr<>Pyr]^{*\bullet-}$. Dans le dimère de pyrimidines réduit, les liaisons 5-5 et 6-6 ne respectent plus la règle de Hückel ; elles sont rompues.
- après dissociation du dimère, l'électron est restitué à la flavine, avec régénération de $FADH^-$. Le cycle peut alors recommencer.

2.3.1.3 Photophysique

La photophysique du cycle photocatalytique a été étudiée par trois techniques spectroscopiques différentes : les spectroscopies stationnaires d'absorption, de fluorescence et d'action ; la spectroscopie d'absorption transitoire ; la spectroscopie de fluorescence résolue en temps.

2.3.1.3.1 Caractérisation du chromophore actif

La spectroscopie d'action consiste à représenter un paramètre caractéristique de la photoréponse en fonction de la longueur d'onde d'irradiation. En utilisant l'efficacité de la photoréparation des dimères CPD par les photolyases CPD, il fut montré que les spectres d'action de la photoréparation de l'ADN par les photolyases CPD de *E. coli* et de *A. nidulans* avec ou sans photoantenne sont superposables au spectre d'absorption de l'enzyme portant $FADH^-$ et que l'enzyme ne portant que la photoantenne est inactive [101-103]. Ces mesures

démontrent que l'espèce active est la flavine sous forme réduite (FADH^-) et que le second chromophore n'est qu'une photoantenne ne catalysant pas la photoréparation.

2.3.1.3.2 Transfert d'énergie

Le transfert d'énergie de la photoantenne MTHF excitée vers le chromophore FADH^- fut étudié par spectroscopie de fluorescence stationnaire sur EcCPD. Jordan et al. montrèrent qu'il y a inhibition de la fluorescence du MTHF par FAD dans ses trois états d'oxydo-réduction [104]. En effet le spectre de fluorescence de MTHF recouvre les spectres d'absorption de FAD dans ses différents états d'oxydo-réduction. La spectroscopie de fluorescence résolue en temps montra que la durée de vie de fluorescence du MTHF diminue de 350 ps à 140 ps quand FADH^- est présente dans la protéine [98], ce qui correspond à un rendement de transfert d'énergie de 0,62 (cf. le Tableau 2.1). À partir de la structure cristallographique de EcCPD [85] et de quelques hypothèses émises sur les orientations des moments dipolaires de transition, le facteur d'orientation κ^2 (défini dans la partie 2.5.5 du chapitre VI) fut rapporté pour FADH^- : 0,2 [105]. Des expériences d'absorption transitoire furent menées sur EcCPD portant MTHF seulement [98]. Le déclin du signal transitoire en 480 ps est attribué à la désexcitation de MTHF^* (cette valeur se compare au déclin de fluorescence de 350 ps). Dans le cas de EcCPD portant MTHF et FADH^- , la durée de vie du déclin de MTHF diminue à 180 ps (valeur comparable à la durée de vie de fluorescence de 140 ps) et une espèce apparaît avec une bande d'absorption transitoire large entre 600 nm et 900 nm. Cette bande large, qui décline avec une constante de temps de 2 ns, est reconnue comme la signature spectrale de l'état excité de FADH^- [106], démontrant le transfert d'énergie depuis MTHF^* vers FADH^- .

Les mêmes expériences furent réalisées sur AnCPD [96]. Le déclin de fluorescence du 8-HDF passe de 2,0 ns en absence de FADH^- , à 50 ps en présence de FADH^- (cf. le Tableau 2.1). Une première approximation du rendement quantique de transfert d'énergie fut ainsi obtenue et vaut 0,98. Le facteur d'orientation κ^2 fut estimé à 1,6 grâce à la structure cristallographique de AnCPD [87]. Même si la distance entre le donneur et l'accepteur d'énergie est plus grande chez AnCPD (1,75 nm) que chez EcCPD (1,68 nm), le facteur d'orientation est plus favorable pour AnCPD et explique le meilleur rendement de transfert d'énergie. Des expériences d'absorption transitoire, avec des impulsions de 30 ps, montrèrent que pour AnCPD portant 8-HDF et FADH^- , le transfert d'énergie est trop rapide pour pouvoir observer la signature spectrale du 8-HDF*. Seul l'accepteur excité, soit FADH^-* , est observé [96].

Propriétés physiques	EcCPD (MTHF)	AnCPD(8-HDF)
Durée de vie de l'état excité (ns)		
E-PA*	0,35 (F) 0,48 (A)	2,0 (F)
E-FADH ⁻ -PA*	0,14 (F) 0,18 (A)	0,05 (F)
E-FADH [•] -PA*	<0,03	<0,03
Transfert d'énergie		
k _{TE} (s ⁻¹)	4,6×10 ⁹	> 1,9 × 10 ¹⁰
Φ _{TE} (%)	62	98
Distance FAD-PA (nm)	1,68	1,75
Durée de vie de l'état excité (ns)		
E-FADH ⁻ *	1,5 (F) 1,7 (A)	1,8 (F)
E-FADH ⁻ *+ T<>T (U<>U)	0,16 (F) 0,2 (0,05) (A)	0,16 (F) 0,2 (0,05) (A)
Transfert d'électron (FADH ⁻ *-T<>T)		
k _{te} (s ⁻¹)	~(1-2)×10 ¹⁰	~(1-2)×10 ¹⁰
Φ _{te} (%)	89	92

Tableau 2.1 : Propriétés photophysiques des photolyases CPD extraites d'expériences d'absorption transitoire (notées A) et de fluorescence (notées F) résolues en temps. Ces résultats sont extraits des articles suivants [19, 103, 107, 108]. Une enzyme E, portant la flavine réduite FADH⁻ et la photoantenne PA est notée E-FADH⁻-PA.

2.3.1.3.3 Transfert d'électron vers le dimère de pyrimidines

Comme il a été décrit précédemment, l'espèce active de la photoréparation de l'ADN endommagé est la forme réduite FADH⁻. Des expériences de fluorescence résolue en temps montrèrent que le déclin de fluorescence de EcCPD portant FADH⁻ diminue de 1,4 ns à 0,16 ns lors de l'ajout d'un substrat type T<>T [109]. Chez AnCPD, Kim et al. observèrent la même tendance et les déclin de fluorescence sont de 1,8 ns sans substrat et de 0,14 ns avec substrat [96].

Des expériences d'absorption transitoire furent réalisées, par Okamura et al., en excitant FADH⁻ dans EcCPD à 340 nm en présence de dimères U<>U [106, 107]. Les résultats sont en bon accord avec ceux trouvés par spectroscopie de fluorescence résolue en temps. Le déclin de l'état excité de FADH⁻ en 0,2 ns est accompagné par la montée d'une espèce absorbant entre 400 nm et 420 nm et de durée de vie comprise entre 0,5 ns et 2,0 ns. Un pic vers 410 nm est aussi observé avec le dimère U<>T mais pas avec le dimère T<>T. La bande centrée à 410 nm est attribuée au radical anion uracile. De plus il semblerait que FADH[•] soit présent en même temps que le radical anion U<>U^{•-} mais que la montée du radical anion U<>U^{•-} soit retardée [106].

Kao et al. réalisèrent des expériences sur la photoréparation d'un dimère T \leftrightarrow T dans EcCPD par spectroscopie d'absorption transitoire et de fluorescence résolue en temps [110]. Ces expériences permettent d'observer le transfert d'électron depuis FADH⁻ excité vers le dimère T \leftrightarrow T avec une constante de temps de 170 ps (exponentielle étirée, $\beta=0,71$). Le retour d'électron pour réduire FADH^{*} en FADH⁻ est observé avec une constante de temps de 560 ps (exponentielle étirée, $\beta=0,71$). Les auteurs s'intéressèrent à l'hypothétique rôle de l'adénine comme intermédiaire du transfert d'électron depuis l'isoalloxazine excitée vers le dimère T \leftrightarrow T [110] mais ne purent caractériser le transfert d'électron vers l'adénine. Les auteurs proposèrent que l'adénine favoriserait la photoréparation par ancrage du dimère près de l'isoalloxazine et permettrait d'augmenter la vitesse du transfert d'électron par un mécanisme de superéchange.

La question du mécanisme de rupture du dimère a fait l'objet d'études théoriques [111, 112] mais n'est pas encore totalement résolue.

2.3.2 Photolyases (6-4)

Les photolyases (6-4) et les photolyases CPD présentent des structures cristallographiques très proches et il fut proposé qu'elles mettent en œuvre le même mécanisme réactionnel [66-68].

2.3.2.1 Interaction substrat enzyme

Les photolyases (6-4) forment des interactions spécifiques avec l'ADN endommagé ayant des défauts Pyr[6-4]Pyr ($K_D = 10^{-9}$) et, à l'instar des photolyases CPD, entraînent le retournement du défaut dans la cavité où la photoréparation a lieu [68]. Une différence majeure est le rendement de photoréparation. Il est quatre fois plus faible pour les photolyases (6-4) que pour les photolyases CPD ($\Phi_{\text{rép}} = 0,11$ pour la photolyase (6-4) de *X. laevis*) [113].

2.3.2.2 Spectroscopie d'action

Le premier spectre d'action d'une photolyase (6-4) identifiant clairement le chromophore actif comme FADH⁻ fut rapporté, en 1997, pour la photolyase (6-4) de *X. laevis* [113].

2.3.2.3 Cycle catalytique de photoréparation

Étant donné les ressemblances des protéines (structures primaires proches, même chromophore jouant le rôle de catalyseur), il fut proposé que le mécanisme de réparation des lésions de type Pyr[6-4]Pyr serait essentiellement identique à celui employé par les photolyases CPD pour les lésions de type Pyr \leftrightarrow Pyr. Cependant, afin de garantir une

dissociation correcte des dimères Pyr[6-4]Pyr, il fut émis l'hypothèse qu'une structure cyclique du défaut appelée oxétane (rappelant les défauts CPD) soit thermiquement produite dans l'enzyme avant la photoréparation [66, 68].

Cependant Maul et al. proposèrent récemment un nouveau mécanisme, inspiré de leur structure cristallographique de la photolyase (6-4) de *Drosophila melanogaster* (Dm64) complexée à de l'ADN endommagé avec un défaut T[6-4]T, n'incluant pas l'étape de formation de l'oxétane.

Jusqu'à présent, aucune photolyase (6-4) ne fut purifiée avec une photoantenne. Lors d'une semi-purification (c'est-à-dire avant élimination de l'extension GST, nécessaire à la purification par chromatographie d'affinité fonctionnalisée à la GST), la présence du MTHF fut observée par spectroscopie d'absorption stationnaire [113]. Le transfert d'énergie s'opèrerait de façon identique chez les deux types de photolyases.

2.3.3 Cryptochromes

Le mécanisme de photoactivation et d'action des cryptochromes activés est encore mal connu (nous connaissons mieux le rôle, indépendant de la lumière, des cryptochromes dans l'oscillateur circadien). L'état actif de FAD est encore débattu [114-116], mais la plupart des spectres d'action révèlent que l'état actif contient la flavine semi-réduite protonée (FADH^\bullet) ou déprotonée ($\text{FAD}^{\bullet-}$) [21, 117]. Ce radical pourrait être impliqué dans la sensibilité de certains animaux comme les oiseaux migrateurs aux champs magnétiques [118, 119]. Comme nous avons vu précédemment, les cryptochromes sont des protéines avec un domaine photolyase et une extension C-terminale. Il fut montré que cette extension C-terminale est capitale dans la fonction des cryptochromes de plante et animaux.

Kao et al. effectuèrent des études par spectroscopies d'absorption transitoire et de fluorescence résolue en temps de cryptochromes de type 1. Ils montrèrent que la désactivation de $\text{FAD}^{\bullet-}$ photoexcitée présente un déclin multiexponentiel (interprété comme résultant du passage, modulé par un mouvement de pliage de la molécule, par des intersections coniques) dont la durée de vie la plus longue est d'environ 500 ps [20]. Cette composante est supposée suffisamment longue pour permettre une réaction photocatalytique, c'est-à-dire un transfert d'électron de la flavine excitée ($\text{FAD}^{\bullet-*}$) vers un substrat encore à identifier, à l'instar de la photoréparation de l'ADN par les photolyases. En ce qui concerne les cryptochromes de plantes les groupes Ahmad et Batschauer mirent en lumière le rôle de FADH^\bullet comme état signalant [120], sans évoquer de réaction photocatalytique dans cet état.

2.4 Photoréduction

Nous avons vu que les différents mécanismes réactionnels, mis en jeu dans l'activité biologique des protéines CPF utilisent la forme réduite ou semi-réduite de FAD. *In vivo*, le dioxygène oxyde facilement le chromophore FAD des protéines CPF en des formes inactives comme FADH[•] ou FAD_{ox} [121, 122]. Il se trouve que les photolyases possèdent un mécanisme photoactivé, entièrement distinct de leur fonction photoréparatrice de l'ADN, capable de régénérer le chromophore actif de FADH⁻ [123, 124]. Il s'agit d'une réaction de photoréduction qui, nous le verrons, pourrait être universelle chez les photolyases [125-127] et les cryptochromes. Notons que cette photoréduction ne serait pas d'après Sancar un processus significatif *in vivo* pour les photolyases (présence de FADH⁻ dans des cellules cultivées dans l'obscurité) [19] mais semble assurément capitale pour l'activation des cryptochromes de plantes par interconversion d'états d'oxydo-réduction, ainsi que la décrivent les groupes Ahmad et Batschauer [120].

2.4.1 Caractérisation du réducteur

En 1986, Heelis et Sancar réalisèrent des expériences d'absorption transitoire sur EcCPD, qui contient la flavine FADH[•] après purification, avec des impulsions de 20 ns à 532 nm [124]. Sur le spectre d'absorption différentielle mesuré pour un retard pompe-sonde de 1 µs, ils caractérisèrent la réduction de FADH[•] en FADH₂ et ils observèrent que la réoxydation de FADH₂ en FADH[•] est plus lente en présence qu'en l'absence d'un réducteur externe. Ils en déduisirent que la photoréduction de FADH[•] n'avait pas comme réactif un réducteur externe à la chromoprotéine, mais un réducteur présent dans la chromoprotéine. Ils proposèrent que le réducteur soit un acide aminé, ou le second chromophore non identifié à ce moment là.

Heelis et al., en 1990, comparèrent les spectres différentiels de EcCPD portant FADH[•], enregistrés pour des retards pompe-sonde de 4 µs et de 1 min [128] et identifièrent pour la première fois le réducteur impliqué dans la photoréduction de FADH[•] chez EcCPD comme étant un résidu tryptophane.

Li et al. entreprirent, en 1991, la mutation des quinze acides aminés tryptophanes en phénylalanine présents chez EcCPD afin d'isoler le tryptophane impliqué dans la photoréduction de FADH[•] [129]. Des expériences d'absorption transitoire furent réalisées, avec des impulsions de 8 ns à 532 nm, sur EcCPD et ses mutants. Elles montrèrent que la photoréduction de FADH[•] avait lieu dans tous les mutants sauf W306F. Ils en conclurent que

le tryptophane impliqué dans la photoréduction de FADH^\bullet en FADH_2 chez EcCPD est le tryptophane 306.

En 1993, Kim et al. réalisèrent des expériences de RPE résolue en temps (avec une résolution temporelle de 17 μs) sur EcCPD et son mutant W306F après marquage isotopique du résidu W306 [130, 131]. Ces expériences permirent d'identifier le réducteur oxydé primaire : le radical cation tryptophane 306 non déprotoné. Ils en conclurent que le produit de la photoréduction ne devait pas être FADH_2 mais FADH^- .

2.4.2 Mécanisme du transfert d'électron dans EcCPD contenant FADH^\bullet

2.4.2.1 Transfert d'électron à longue distance

En 1989, le groupe Mataga réalisa, en collaboration avec Heelis et Sancar, des expériences d'absorption transitoire sur EcCPD (portant FADH^\bullet), avec des impulsions de 22 ps à 355 nm [127]. Ils proposèrent que l'excitation de FADH^\bullet produirait l'état doublet excité le plus bas énergétiquement et que l'état quadruplet serait obtenu par croisement intersystème en 100 ps. La durée de vie de l'état quartet fut estimée à 1 μs .

Sur cette base, les groupes Heelis et Sancar proposèrent finalement le mécanisme décrit sur la Figure 2.5 [126, 128]. Dans ce mécanisme, l'excitation de FADH^\bullet dans EcCPD est suivi d'une conversion intersystème qui produit le quartet en 100 ps. Un transfert d'électron intramoléculaire depuis le tryptophane 306 vers l'état excité quartet de FADH^\bullet , pour former la flavine réduite FADH^- et le radical cation tryptophanyl 306 en ~ 500 ns. Ce radical tryptophanyl reste ensuite protoné.

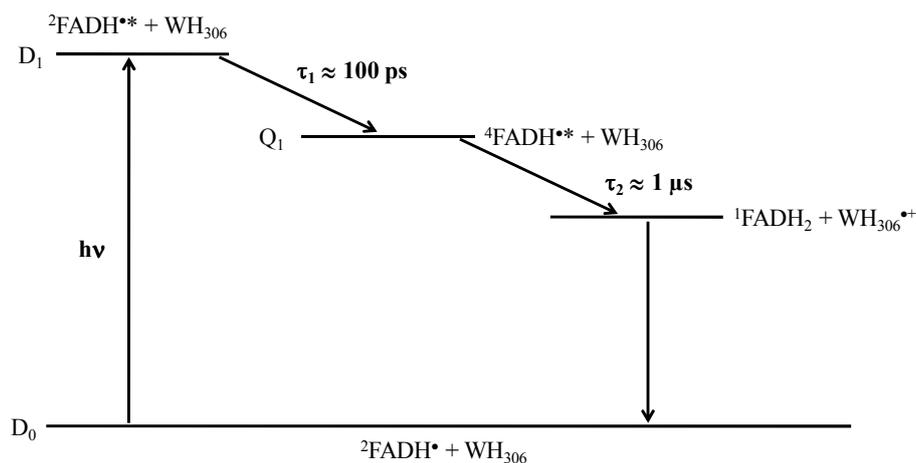


Figure 2.5 : Schéma réactionnel du transfert d'électron lors de la photoréduction de EcCPD précédé du passage à un état quartet à longue durée de vie de FADH^\bullet [126].

En 1995, la première structure cristallographique de EcCPD fut résolue par Park et al. [85] et la distance entre le chromophore FADH^\bullet et le tryptophane 306 fut calculée. Cette

distance vaut 1,34 nm. Le transfert d'électron du modèle du quartet se fait donc à très longue distance, ce qui est envisageable dans la mesure où la durée de vie du quartet est très longue.

2.4.2.2 Transfert d'électron avec des relais

La structure cristallographique de EcCPD montre que le W306 n'est pas le tryptophane le plus proche de FADH[•] et qu'il est en contact avec le milieu extérieur. Les auteurs proposèrent en conséquence deux chemins possibles pour le transfert d'électron depuis le W306 vers FADH[•] :

- le premier chemin impliquerait deux résidus relais, W359, W382, situés entre W306 et FADH[•] (cf. la Figure 2.6-A). Le chemin de photoréduction mettrait en jeu trois sauts.
- le second chemin impliquerait l'hélice α (α -15) située entre les résidus D358 et F366 (importance de sa chaîne latérale, cf. la Figure 2.6-B). Le chemin de photoréduction ne mettrait ici en jeu que deux sauts.

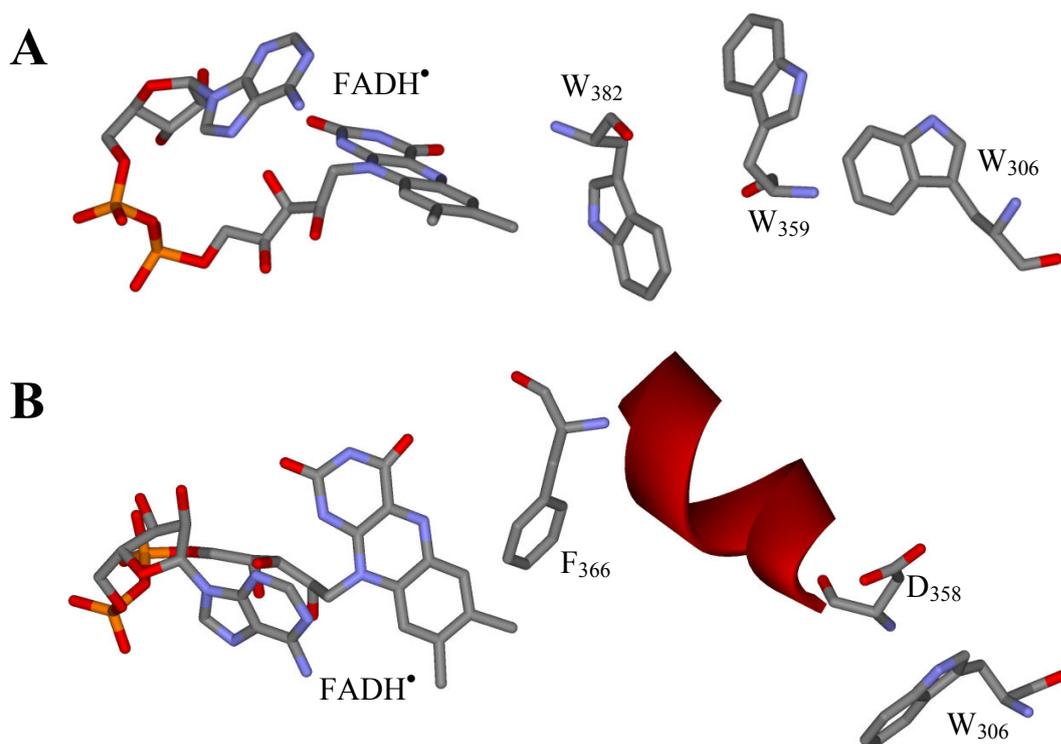


Figure 2.6 : A : résidus de tryptophanes (W359 et W382) supposés relayer le transfert d'électron depuis le W306 vers FADH[•] dans la photoréduction de FADH[•] portée par EcCPD proposés par Park et al. [85]. B : chemin alternatif de transfert d'électron (hélice α comprise entre les résidus 358 et 366) proposé par les mêmes auteurs [85].

2.4.2.2.1 Chaîne de trois tryptophanes

En 1999, Cheung et al. réalisèrent des calculs théoriques sur les chemins du transfert d'électron au sein de EcCPD [132]. Ces calculs suggérèrent que « le chemin principal de

transfert d'électron soit dû à un ensemble de trois systèmes π orthogonaux se recouvrant, qui commence par le donneur W306, passe par W359 et W382 et finalement atteint le groupe flavine ». Ils trouvèrent aussi que la substitution des tryptophanes 359 ou 382 par une phénylalanine réduit seulement le couplage électronique entre les résidus et ne détruit pas totalement le transfert d'électron, en bon accord avec les observations faites par Li et al. sur les mutants de EcCPD [129].

En 2000, Aubert et al. (groupes Vos et Brettel) réalisèrent des expériences d'absorption transitoire femtoseconde (impulsions d'excitation de 70 fs à 620 nm) et nanoseconde (impulsion de 7 ns à 635 nm ou 675 nm) sur EcCPD (portant FADH \bullet) [4]. Ils excitèrent ainsi uniquement FADH \bullet . Ils purent identifier précisément, sur des spectres différentiels pour un retard pompe-sonde supérieur à 5 μ s, que le radical tryptophanyl formé lors de la photoréduction est déprotoné. Ils montrèrent que le radical tryptophanyl (W \bullet) est formé par transfert d'électron depuis WH vers FADH \bullet suivi de la déprotonation du radical cation WH \bullet^+ . La photoréduction de FADH \bullet excité par le résidu WH306 est plus rapide que la résolution temporelle de l'expérience d'absorption transitoire nanoseconde, soit 10 ns. La déprotonation du WH \bullet^+ se fait en 300 ns. En faisant varier les concentrations des espèces présentes dans la solution tampon contenant EcCPD, ils purent déterminer que la déprotonation du WH \bullet^+ met en jeu les molécules du solvant. Par ailleurs, les expériences d'absorption transitoire femtoseconde sur EcCPD révélèrent un déclin de l'état excité FADH \bullet^* en environ 30 ps. À partir de leurs données et de la structure cristallographique de EcCPD [85], les auteurs proposèrent un mécanisme en trois étapes avec deux relais impliquant les résidus tryptophane 382 et 359. La première étape consiste en un transfert d'électron depuis WH382 vers FADH \bullet^* en 30 ps. Les deux étapes suivantes, correspondant au transfert d'électron depuis le WH359 vers le radical cation WH \bullet^+ 382 et au transfert d'électron depuis le WH306 vers le radical cation WH \bullet^+ 359, devraient, d'après les expériences d'absorption transitoire nanoseconde, avoir lieu en moins de 10 ns.

Ces résultats contredisent le mécanisme du transfert d'électron de type quartet à longue durée de vie. L'état quartet était en effet supposé oxyder directement le WH306, à longue distance, en radical cation protoné WH \bullet^+ 306 en 1 μ s [126]. Aubert et al. proposèrent que le désaccord provient de ce qu'en utilisant une source d'excitation à 355 nm, d'autres espèces que FADH \bullet avaient été excitées dans les expériences précédentes [4]. Le mécanisme à état quartet à longue distance fut ainsi abandonné.

En 2003, Byrdin et al. réalisèrent des expériences d'absorption transitoire (impulsion de 200 fs à 620 nm) sur EcCPD et sur le mutant W382F où le tryptophane 382 est remplacé par une phénylalanine, électrochimiquement inerte [5]. Le déclin de l'état excité de FADH^\bullet est plus lent (80 ps) dans la protéine mutée que dans la protéine native (26 ps). Par ailleurs, les auteurs ne purent pas reconnaître la signature spectrale de la flavine réduite ni du tryptophane oxydé dans la protéine mutée. Ils démontrèrent ainsi que le premier tryptophane impliqué dans la photoréduction est le WH382. Ils suggérèrent que la durée de vie intrinsèque de l'état excité de FADH^\bullet soit égale à 80 ps.

En 2004, Byrdin et al. étudièrent plus précisément le mécanisme de recombinaison de charge entre le radical cation du tryptophanyl 306 et FADH^- , au sein de EcCPD [6]. Ils proposèrent un modèle cinétique avec :

- un équilibre rapide entre le radical tryptophanyl 306 protoné ($\text{WH306}^{\bullet+}$) et déprotoné (W306^\bullet)
- une réduction rapide du $\text{WH306}^{\bullet+}$ par FADH^- (k_1 est la constante de vitesse décrivant cette étape), donnant WH306 et FADH^\bullet ,
- une réduction lente du radical W306^\bullet par FADH^- (k_2 est la constante de vitesse décrivant cette étape), donnant W306^- et FADH^\bullet , suivie de la reprotonation du W306^- .

Les auteurs déduisirent les constantes de vitesse k_1 (de l'ordre de $(25 \mu\text{s})^{-1}$) et k_2 ($(23,4 \mu\text{s})^{-1}$) à partir de la mesure de la vitesse de recombinaison de charge en fonction du pH.

En 2006, Luckas et al. étudièrent, par spectroscopie d'absorption transitoire (impulsion de 50 fs à 550 nm ou 620 nm), le mutant W359F de EcCPD dans lequel le tryptophane W359, situé au milieu de la chaîne de transfert, est remplacé par une phénylalanine [10]. Comme dans la protéine native, les auteurs observèrent un déclin de l'état excité de $\text{FADH}^{\bullet*}$ avec une durée de vie de 30 ps. Le photoproduit FADH^- (l'autre produit de réaction attendu étant $\text{WH382}^{\bullet+}$) ne fut cependant pas détecté. Les auteurs en déduisirent que la recombinaison de charge entre FADH^- et $\text{WH382}^{\bullet+}$ a lieu en moins de 4 ps, ce qui ne permet pas la production d'une concentration suffisante de photoproduits pour être observée. Pour expliquer le fait qu'un photoproduit de réaction est pourtant observé dans la protéine native, les auteurs suggérèrent que le transfert d'électron depuis le WH359 vers $\text{WH382}^{\bullet+}$ se fasse aussi en moins de 4 ps. Ainsi il pourrait y avoir une accumulation de $\text{WH}^{\bullet+}$ sur le résidu tryptophane 359 et/ou 306.

En 2008, le groupe Brettel réalisa des expériences d'anisotropie d'absorption transitoire nanoseconde polarisée (résolution temporelle de 10 ns et excitation à 620 nm) sur EcCPD et son mutant W306F [8]. L'orientation des résidus tryptophanes W359 et W306 est très différente avec des angles, par rapport à l'axe principal de l'isoalloxazine, de 30° et 75°, respectivement. Les mesures montrèrent que les spectres d'anisotropie initiale (à l'échelle de temps ns, c'est-à-dire après photoréduction primaire de la flavine en 30 ps) de la protéine native et son mutant diffèrent et sont compatibles avec l'oxydation de WH306 pour EcCPD et de WH359 pour le mutant W306F. Ce résultat confirme que le transfert d'électron depuis WH306 vers WH359^{•+} a lieu en moins de 10 ns. En collaboration avec le groupe Vos, des expériences d'absorption transitoire femtoseconde polarisée (impulsion d'excitation de 50 fs à 550 nm ou 620 nm) furent ensuite réalisées sur ces mêmes systèmes [9]. Les mesures d'anisotropie permirent de prouver qu'après une phase de durée de vie de 30 ps le radical cation WH^{•+} est porté par le WH306. Ceci implique qu'il n'y a pas d'accumulation de WH359^{•+} et que le transfert d'électron depuis le WH306 et le WH359^{•+} a lieu en moins de 30 ps.

L'ensemble de ces travaux sont résumés sur le schéma réactionnel représenté sur la Figure 2.7.

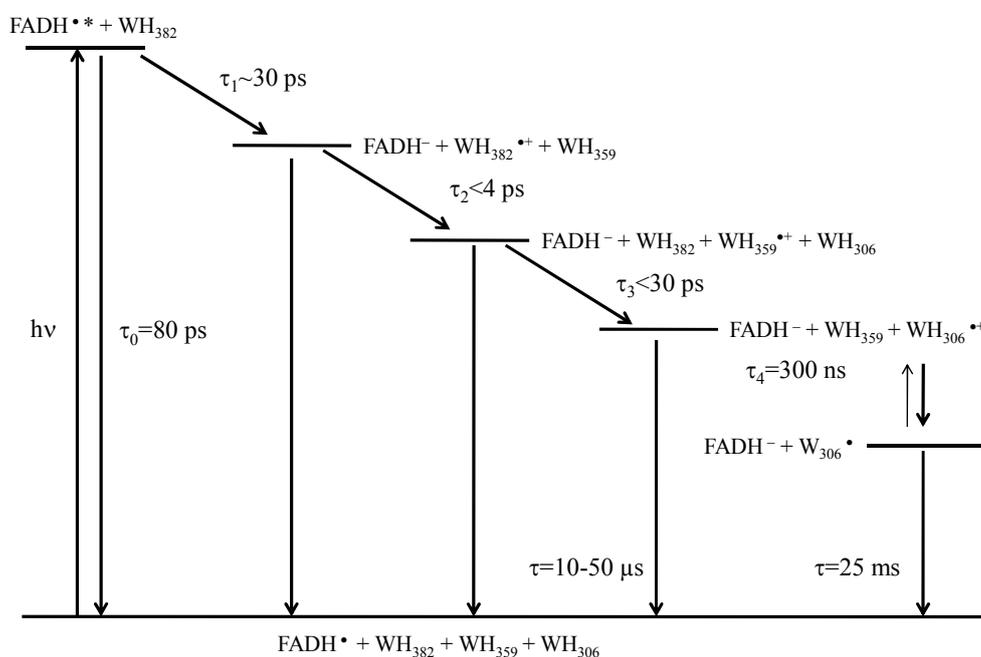


Figure 2.7 : Schéma réactionnel du transfert d'électron par une chaîne de trois tryptophanes lors de la photoréduction de EcCPD [6, 9].

2.4.2.2.2 Passage par la phénylalanine 366

En 2004, Saxena et al. proposèrent que le second chemin de transfert d'électron, proposé dans la partie 2.4.2.2 (cf. la Figure 2.6-B), soit impliqué dans la photoréduction de EcCPD [133]. Ils réalisèrent des expériences d'absorption transitoire (impulsion de 60 fs à 580 nm) sur EcCPD. Ils observèrent un déclin biexponentiel des signaux mesurés à 690 nm et 400 nm avec des durées de vie d'environ 11 ps et 42 ps. Ils attribuèrent ces durées de vie aux deux chemins de désactivation de l'état excité de FADH[•], proposés sur la Figure 2.6, respectivement : le premier (en 11 ps) est celui mettant en jeu la triade de tryptophanes décrite précédemment et le second (en 42 ps) est celui impliquant la phénylalanine 366 (considérée ici comme électrochimiquement active) avec l'hélice α 15 et le tryptophane 306.

Le même groupe rapporta d'autres expériences d'absorption transitoire sur EcCPD (impulsion de 60 fs à 620 nm), en 2005 [134]. Ils ajustèrent la cinétique des phénomènes transitoires observés avec une somme de quatre exponentielles de durée de vie : ~ 2 ps, 11 ps, 42 ps et ~ 3 ns. La durée de vie d'environ 2 ps est attribuée à la dynamique de solvation autour du chromophore excité, la durée de vie longue au retour vers l'état fondamental avec recombinaison de charge et les déclins de 11 ps et de 42 ps, respectivement, aux deux chemins de transfert d'électron (cf. la Figure 2.6).

Comme il a été vu précédemment, l'hypothèse du second chemin du transfert d'électron (cf. la Figure 2.6-B) fut contestée et discutée par les groupes Vos et Brettel, qui ont pu caractériser chaque étape du mécanisme du transfert d'électron avec une triade de tryptophanes. Il semble que les groupes Zhong et Sancar ne le maintiennent plus dans leurs dernières publications [20].

2.4.3 Photoréduction dans les protéines CPF portant FAD_{ox}

L'étude de la photoréduction de FAD_{ox} en FADH[•] dans EcCPD ainsi que dans la photolyase (6-4) de *A. thaliana* et trois cryptochromes de type 1 d'insectes (*Anopheles gambia*, *Danaus plexippus* et *Drosophila melanogaster*) fut publiée par les groupes Zhong et Sancar en 2008* [20]. Les techniques employées furent les spectroscopies d'absorption transitoire femtoseconde (résolution temporelle inférieure à 300 fs) et d'up-conversion de fluorescence (résolution temporelle de 400-500 fs), mises en œuvre à une sélection de longueurs d'onde de sonde. La photoréduction primaire de FAD_{ox} fut trouvée plus rapide que celle de FADH[•] avec une durée de vie de 0,8 ps pour EcCPD et comprise entre 0,5 et 1,8 ps

* Nous portons à votre attention que les derniers résultats de Kao et al. [19] sur la photoréduction de FAD_{ox} au sein des protéines CPF n'étaient pas connus lorsque j'ai commencé ma thèse en 2006.

pour les autres protéines. Cette différence s'explique par une enthalpie libre de réaction plus favorable lors de la photoréduction de FAD_{ox}^* en FADH^\bullet que pour $\text{FADH}^{\bullet*}$ en FADH^- . Les auteurs rapportèrent également des composantes temporelles situées dans les gammes 20-54 ps et ns qu'ils attribuèrent aux étapes de transfert d'électron le long de la triade de tryptophanes (très bien conservée parmi les protéines CPF) du modèle Brettel-Vos de photoréduction.

Chez les photolyases (6-4), une expérience de photoréduction par RPE résolue en temps fut réalisée en 2002 par le groupe Todo. Les auteurs observèrent, 100 ns après une excitation de la photolyase (6-4) de *X. laevis*, la flavine semi-réduite protonée et la signature du radical d'une tyrosine [135]. En considérant le mécanisme établi pour EcCPD et l'observation de l'oxydation d'une tyrosine pour AnCPD, les auteurs proposèrent que le réducteur le plus externe soit une tyrosine, les donneurs intermédiaires pourraient être des tryptophanes ou des tyrosines.

2.4.4 Photoréduction dans d'autres flavoprotéines

La photoréduction du cofacteur flavine au sein d'autres flavoprotéines, n'appartenant pas à la famille des cryptochromes et des photolyases, furent aussi étudiées par spectroscopies résolues en temps.

Depuis 1998, le groupe Mataga étudia plusieurs flavoprotéines par spectroscopie de fluorescence résolue en temps : la riboflavine binding protein (notée RBP, portant RF_{ox}) [12-14, 136], la glucose oxidase (GOD, portant FAD_{ox}) [12, 14] et la flavodoxine (FD, portant FMN_{ox}) [14, 16]. Dans RBP et FD, l'isoalloxazine des flavines est intercalée entre un tryptophane et une tyrosine. Des résidus tryptophane et tyrosine se trouvent dans l'environnement immédiat de FAD_{ox} dans GOD. Ils observèrent que l'inhibition de fluorescence de GOD (413 fs) est plus lente que celle de RBP (98 fs). Ils attribuèrent cette observation à la nature de l'oxydant au sein des protéines : tryptophane et tyrosine, respectivement [12] et surtout au fait que dans GOD le tryptophane réducteur n'est pas parallèle au cycle isoalloxazine et en est plus éloigné que pour RBP [14]. Leur dernière étude de RBP montra que le transfert d'électron photoinduit a lieu en 167 fs dans la protéine native, principalement en 18,2 ps dans un premier mutant W32Y et en 30,1 ps dans un deuxième mutant W32A [136]. Ils confirmèrent que l'acide aminé impliqué dans l'inhibition de fluorescence de l'isoalloxazine par transfert d'électron est un tryptophane (W32). Le transfert d'électron est moins efficace lors de la substitution du tryptophane par une tyrosine, qui a un

potentiel d'ionisation plus grand et encore moins avec une alanine, qui n'est pas réducteur. En ce qui concerne FD, ils observèrent une inhibition de fluorescence en 158 fs de la protéine native et une augmentation de la durée de ce déclin par mutation en phénylalanine du tryptophane 60 (W60F : 322 fs) ou de la tyrosine 98 (Y98F : 245 fs) [16]. Ils en déduisirent des constantes de vitesse de transfert d'électron et montrèrent que la somme des constantes de vitesse de transfert d'électron des deux mutants est égale à celle de la protéine native.

En 2001, Zhong et Zewail étudièrent par spectroscopies d'absorption transitoire (résolution fs, impulsion d'excitation à 480 nm et 510 nm, sonde entre 310 nm et 700 nm) et de fluorescence résolues en temps (résolution femtoseconde, impulsion d'excitation à 480 nm, sonde à 510 nm), GOD et RBP [17]. Dans RBP, ils montrèrent que la relaxation de RF_{ox}^* a lieu en ~ 100 fs et 700 fs. Ils montrèrent qu'un transfert d'électron photoinduit a lieu avec cette dynamique, produisant le radical RF^{\bullet} et le radical tryptophanyl $Trp^{\bullet+}$. La recombinaison de charge de ces espèces se produirait avec une durée de vie de ~ 8 ps. Le déclin de l'état excité de FAD_{ox} dans GOD est quant à lui plus lent avec deux composantes de 1,8 ps et 10 ps, attribuées globalement à des réductions de la flavine excitée par quatre résidus tryptophane et tyrosine se trouvant dans son entourage immédiat. Les espèces radicalaires formées se recombinaient avec des durées de vie de 30 ps, attribuée à la réduction du radical tryptophanyl et dans le régime nanoseconde, attribuée à la réduction du radical tyrosyl.

Pan et al., en 2004, firent une comparaison de la dynamique de $FADH^{\bullet}$ au sein de EcCPD et de GOD et de $FMNH^{\bullet}$ au sein de la FD, en les excitant à 620 nm (impulsion de 200 fs) [137]. La relaxation de $FADH^{\bullet*}$ a lieu en 59 ps dans GOD. Cette valeur est proche de celle trouvée dans le mutant W306F de EcCPD avec une durée de vie de l'état excité de 80 ps pour $FADH^{\bullet*}$. Le déclin de $FMNH^{\bullet*}$, dans FD, est beaucoup plus rapide : 2,3 ps. Les auteurs proposèrent que cette courte durée de vie de l'état excité soit due à la formation d'un intermédiaire à transfert de charge de durée de vie très courte (recombinaison de charge en moins de 0,7 ps). Les mêmes auteurs remarquèrent pour EcCPD la présence d'une bande d'absorption vers 550 nm, dans la bande de blanchiment de $FADH^{\bullet*}$, qui n'est pas observée chez les deux autres protéines. Ils écartèrent l'éventualité que cette bande soit due au radical cation tryptophanyl, parce qu'elle est observée dans le mutant W306F de EcCPD [5]. Ils proposèrent qu'elle résulte de l'interaction spécifique entre l'adénine et l'isoalloxazine de $FADH^{\bullet}$ en conformation fermée, possiblement due à un changement de distribution de charge entre $FADH^{\bullet*}$ et l'adénine.

3 L'algue verte *Ostreococcus tauri*

3.1 Description

En 1994, dans l'étang de Thau, situé dans l'Hérault (34) en France, fut découvert le plus petit eucaryote autotrophe connu à ce jour : *Ostreococcus tauri* [1]. Il s'agit d'une algue verte photosynthétique marine unicellulaire vivant dans différents écosystèmes : la Manche, la mer Méditerranée, les océans Indien, Pacifique et Atlantique [138]. Une analyse phylogénétique conduisit à la classification de *O. tauri* dans la famille des Prasinophyceae, l'ordre des mamiellales, le genre *Ostreococcus* et l'espèce *tauri* [139].

Des mesures de microscopie électronique permirent de déterminer les dimensions d'*O. tauri*. La longueur et la largeur de la cellule valent $0,97 \pm 0,28 \mu\text{m}$ et $0,70 \pm 0,17 \mu\text{m}$ respectivement [1].

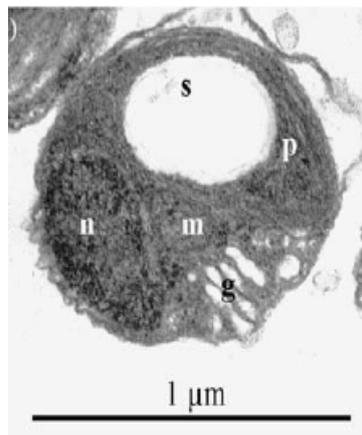


Figure 3.1 : Image extraite de l'article de Farinas et al., *Plant Mol. Biol.*, 2006, 60 (2), 277-292, d'une cellule de *Ostreococcus tauri* par microscopie de transmission électronique, contenant un noyau (n), une mitochondrie (m), un chloroplaste (p), un appareil de Golgi (g) et un granule d'amidon (s) [140].

L'abondance d'*O. tauri* dans l'étang de Thau peut s'expliquer par une culture intensive d'huîtres qui, tout d'abord, ne consomment que du phytoplancton de diamètre supérieur à $2 \mu\text{m}$ et qui, de plus, ont des excréments enrichis en ammonium favorisant le développement d'*O. tauri* [1, 141].

O. tauri est une algue verte proche des ancêtres des plantes vertes chez les eucaryotes et qui évolua peu au cours des siècles. Une cellule d'*O. tauri* est inusuellement simple : elle est constituée d'un noyau, d'un seul chloroplaste et d'une seule mitochondrie. Le génome d'*O. tauri* est très dense, avec 1,3 kilobases par gène, sachant que celui de l'homme contient 128 bases par gène. Malgré ses dimensions réduites, *O. tauri* possède toutes les fonctions biologiques principales des eucaryotes plus complexes. Il est ainsi un organisme de choix

pour l'étude des mécanismes structurels et fonctionnels des eucaryotes plus complexes [138, 142, 143].

3.2 Photorécepteurs

Le groupe Bowler au département de biologie de l'École Normale Supérieure (Paris), isola des gènes codant pour des photorécepteurs connus. Des analyses par homologie des séquences d'acides aminés d'*O. tauri* sur celles connues des plantes et des bactéries permirent d'identifier une phototropine, photorécepteur végétal intervenant dans la photomorphogénèse et cinq gènes susceptibles de coder des protéines CPF [2]. Une analyse phylogénétique montra que trois de ces gènes coderaient des photolyases CPD (classe II), une quatrième protéine, appelée OtCPF1, appartiendrait au groupe des photolyases (6-4) et cryptochromes animaux, enfin la dernière protéine, dite OtCPF2, serait un cryptochrome DASH. *O. tauri* ne possède pas de protéines appartenant à la classe des cryptochromes de plante. Ceci est une grande nouveauté au sein des espèces végétales vertes.

Marc Heijde, alors étudiant en thèse dans le groupe Bowler, réalisa des tests physiologiques sur les protéines exprimées de OtCPF1 et OtCPF2. Ces tests révélèrent une double fonctionnalité chez OtCPF1. OtCPF1 se lie d'une part à l'ADN endommagé présentant des défauts (6-4) et les répare. OtCPF1 démontre par ailleurs la capacité d'inhiber l'expression d'un gène contrôlé par l'horloge circadienne (expression induite par l'hétérodimère de Clk-Bmal), ce qui est une fonction de type cryptochrome. OtCPF1 conserve aussi une rythmicité de son expression sous illumination constante, ce qui suggère que son expression est sous contrôle de l'oscillateur circadien.

OtCPF2 répare l'ADN endommagé de type CPD. Les tests furent réalisés sur de l'ADN double-brin seulement. Il n'est donc pas possible de dire si le rendement de photoréparation de l'ADN ayant des défauts CPD est beaucoup plus grand pour l'ADN mono-brin que pour le double-brin, comme le groupe Sancar l'observa pour plusieurs cryptochromes DASH [84]. OtCPF2 exprime une rythmicité de son expression dans une alternance nuit/jour mais la perd sous illumination constante. OtCPF2 présente également, mais dans une bien moindre mesure, l'effet d'inhibition de l'hétérodimère de transcription Clk-Bmal.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté un état de la littérature sur la photophysique intrinsèque des chromophores flavines sous différentes formes oxydo-réductrices en solution. Ces études sont d'un intérêt fondamental pour la compréhension des flavoprotéines. Nos propres résultats seront décrits dans le chapitre II.

Nous avons ensuite vu que les protéines de la famille des cryptochromes et des photolyases (CPF) sont des protéines photoréceptrices homologues structurellement mais qui présentent des fonctions biologiques différentes. Le cofacteur photoactif des protéines CPF est une flavine adénine dinucléotide, sous forme réduite anionique (FADH^-) pour les photolyases et les cryptochromes DASH et, semble-t-il, sous forme semi-réduite neutre (FADH^\bullet) ou déprotonée ($\text{FAD}^{\bullet-}$) pour les cryptochromes. Les photolyases possèdent, en général, une photoantenne qui permet d'augmenter le rendement de photoréparation de l'ADN endommagé. Le mécanisme de photoréparation des défauts de type CPD de l'ADN est bien connu, en revanche celui des défauts de type (6-4) est encore sujet à controverse. Les photolyases présentent un mécanisme de photoréduction du cofacteur flavine qui permet de le restituer à sa forme réduite photobiologiquement active, pour les photolyases, ou encore de signaler la lumière dans le cas des cryptochromes. Ce mécanisme a été étudié en détail pour EcCPD portant la flavine semi-réduite FADH^\bullet , mais peu pour les autres membres de la famille CPF, notamment lorsque la protéine porte la flavine sous sa forme oxydée FAD_{ox} .

Ostreococcus tauri, la plus petite algue verte connue à ce jour, possède cinq protéines CPF, dont deux ont pu être isolées et purifiées afin d'en étudier la photoactivité primaire par spectroscopie femtoseconde. La présente thèse s'attachera à décrire la photoréduction de FAD_{ox} chez une photolyase (6-4), OtCPF1 et chez un cryptochrome DASH, OtCPF2, ainsi que le transfert d'énergie au sein de OtCPF2.

**CHAPITRE II : Photophysique intrinsèque des
flavines et MTHF libres**

Introduction

Comme il a été décrit dans la partie 2.2.1 du chapitre I, les photolyases et les cryptochromes sont des protéines photoréceptrices portant une photoantenne, le plus souvent le 5-10-méthényltétrahydrofolate (MTHF) et un chromophore actif, la flavine adénine dinucléotide (FAD) [19]. Les processus photoinduits dans les flavines FAD et FMN en solution, oxydées et réduites, ont déjà fait l'objet de plusieurs études par spectroscopies résolues en temps [25, 42, 44-46, 48, 49, 55, 56] mais certains mécanismes sont encore discutés.

En ce qui concerne FAD_{ox}, nous avons vu, dans la partie 1.1 du chapitre I, que la molécule présente en solution deux conformations en équilibre, une ouverte et une fermée, et que l'état excité de la conformation fermée (stacked, en anglais) a une durée de vie courte (~5 ps). Il a été proposé que le mécanisme de désactivation mis ici en jeu est un transfert de charge intramoléculaire de l'adénine (notée Ade) vers le noyau isoalloxazine (noté Iso) excité, suivi d'une recombinaison de charge. La caractérisation spectroscopique de l'état à transfert de charge dans la conformation fermée est encore sujette à controverse. Alors que la plupart des auteurs [25, 42, 45, 46, 49] n'ont pu détecter aucun intermédiaire dans le déclin de l'état excité de la conformation fermée de FAD_{ox}, Kao et al. [44] rapportent la formation de la paire Iso^{•-}...Ade^{•+} dont le déclin par recombinaison de charge s'effectuerait en 30-40 ps. Nous avons réexaminé les processus photoinduits dans les flavines oxydées FAD_{ox} et FMN_{ox} par spectroscopies d'absorption et de fluorescence stationnaires, ainsi que par spectroscopie d'absorption transitoire. Nous voulions vérifier si le transfert de charge intramoléculaire dans la conformation fermée de FAD_{ox} était caractérisable ou non. L'effet de concentration a été examiné afin de tester le rôle possible de dimères, bien connus pour FMN_{ox} [144-146], dans les spectres transitoires et cinétiques observés. Ces travaux sont présentés dans une première partie.

Quant aux flavines réduites, le déclin de leur état excité singulet est connu pour être complexe, multiexponentiel et être dominé par des temps courts (régime ps ; cf. la partie 1.2.2 du chapitre I). L'interprétation de cette dynamique complexe varie selon les groupes. Li et al. [25] proposent que cette dynamique soit due à la coexistence de deux conformères, à l'ionisation spontanée de la molécule dans l'un des conformères excité (aboutissant à la production d'électron solvaté) et à un transfert de charge intramoléculaire en ce qui concerne

FADH₂. Kao et al. [44] proposent que la désexcitation de l'état excité des flavines réduites se fasse suivant plusieurs trajectoires le long d'une surface de potentiel, impliquant une coordonnée de pliage dit papillon de la molécule, aboutissant à une intersection conique. Nous avons voulu réexaminer la question de l'ionisation photoinduite des flavines réduites et de la formation d'électron solvaté. Enescu et al. [55] avaient envisagé un mécanisme d'ionisation biphotonique de la molécule pour expliquer un spectre d'absorption transitoire résiduel aux temps longs, mais avaient rejeté l'hypothèse parce que ce spectre s'avère différent de celui attendu pour l'électron hydraté et parce que le signal observé est proportionnel à l'intensité d'excitation. En revanche Li et al. [25] évoquent le transfert spontané d'un électron de la molécule au solvant à partir de l'état excité d'un des conformères de la flavine. Nous comprenons que cette ionisation-là est fondamentalement monophotonique. Nous avons réalisé des expériences d'absorption transitoire sur les flavines réduites FADH₂ et FADH⁻, notamment à différentes fluences afin de tester l'existence de phénomènes multiphotoniques. Ces résultats font l'objet de la deuxième partie.

Dans le but de préparer l'étude du transfert d'énergie au sein de OtCPF2, cryptochrome DASH portant la photoantenne MTHF (cf. le chapitre IV), nous avons également réalisé une brève étude de MTHF en solution, par spectroscopie d'absorption transitoire. La photophysique de cette molécule n'a en effet fait l'objet que de peu d'études par spectroscopie ultrarapide [98]. La troisième partie de ce chapitre lui est consacrée.

1 Flavines oxydées

Un aspect de la chimie des flavines oxydée qui ne doit pas être ignoré lorsque nous cherchons à analyser en détail le comportement photophysique de ces molécules est leur capacité à former des dimères. La dimérisation de la flavine mononucléotide (FMN_{ox}) en solution concentrée est en particulier bien connue et a fait l'objet d'études systématiques par le groupe Grajek [144-146]. Sachant que des dimères sont observés en solution aqueuse dès que la concentration excède quelques 10^{-5} mol L⁻¹ à température ambiante, il peut être supposé que ces dimères existent dans les solutions relativement concentrées qui sont habituellement utilisées pour la spectroscopie d'absorption transitoire et qu'ils peuvent éventuellement contribuer aux phénomènes spectrocinétiques observés. Ce point est particulièrement crucial si nous souhaitons, comme Kao et al. [44], attribuer une composante temporelle minoritaire à la recombinaison d'un état à transfert de charge intramoléculaire photoinduit dans la conformation fermée de FAD_{ox} en solution. Afin de caractériser cet état à transfert de charge dans FAD_{ox}, nous avons réalisé une étude comparative entre FMN_{ox} et FAD_{ox}. Sachant que FMN_{ox} ne possède pas de groupe adénine, le transfert de charge intramoléculaire invoqué pour FAD_{ox} ne peut en effet pas avoir lieu dans cette molécule. Avant de procéder à de nouvelles mesures par absorption transitoire femtoseconde, nous avons examiné la question des dimères de FMN_{ox} et FAD_{ox} en solution aqueuse, par spectroscopie d'absorption stationnaire.

1.1 FMN_{ox}

1.1.1 Spectroscopie d'absorption UV-vis stationnaire : Effet de concentration

La dimérisation de FMN_{ox} en solution, à concentration croissante, a été rapportée et étudiée par le groupe Grajek [144-146]. Nous avons cependant repris l'étude dans nos conditions expérimentales afin de disposer de notre propre constante d'équilibre. La Figure 1.1 présente les spectres d'absorption de FMN_{ox} en solution (exprimés en coefficient d'extinction molaire effectif, c'est-à-dire comme le rapport de l'absorbance sur la concentration totale multipliée par le trajet optique) à différentes concentrations, allant de 9,67 $\mu\text{mol L}^{-1}$ à 2,42 mmol L⁻¹. Les expériences ont été menées à 5°C pour se ramener aux conditions expérimentales dans lesquelles nous avons étudié OtCPF1 et OtCPF2 (dont les résultats sont présentés dans les chapitres III et IV). Ces spectres d'absorption présentent deux bandes larges centrées à 445 nm et 372 nm, qui correspondent aux transitions de l'état fondamental S₀ au premier et au deuxième état électronique excité singulet S₁ et S₂,

respectivement [24]. Ces bandes larges ne sont pas structurées et la deuxième est moins intense que la première.

Sur la Figure 1.1, nous voyons que lors de l'augmentation de la concentration de FMN_{ox}, les coefficients d'extinction molaire effectifs diminuent sans que la forme du spectre ne change beaucoup. Ce phénomène d'hypochromisme, connu pour des solutions contenant des agrégats de macromolécules, protéines et acides aminés [147, 148] s'explique par l'écrantage de la lumière incidente par des chromophores empilés face à face. L'évolution spectrale observée sur la Figure 1.1, pour FMN_{ox} s'apparente à ce qui a été attribué à des dimères [144-146]. Nous voyons donc qualitativement que dans une solution concentrée de FMN_{ox}, à pH 8,0, FMN_{ox} peut exister sous forme de monomères et de dimères.

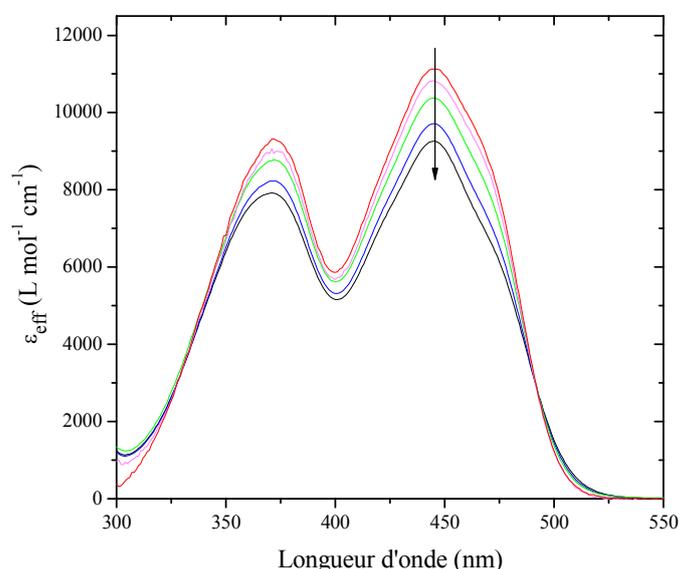


Figure 1.1 : Spectres de coefficient d'extinction molaire effectif de FMN_{ox} à différentes concentrations dans une solution tampon de TRIS à pH 8,0 et à 5°C. Les concentrations de FMN_{ox} sont de 9,67 μmol L⁻¹ (rouge), 80,5 μmol L⁻¹ (rose), 403 μmol L⁻¹ (vert), 1,21 mmol L⁻¹ (bleu) et 2,42 mmol L⁻¹ (noir). La flèche indique l'augmentation de la concentration des solutions de FMN_{ox}.

La description la plus simple du système que nous puissions proposer consiste à supposer qu'il n'est composé que de la flavine monomère (M) en équilibre avec le dimère (D), sans participation d'agrégats de plus grande taille. L'équilibre s'écrit alors : $M + M = D$.

La constante d'équilibre de cette réaction est : $K_{\text{dim},5^\circ\text{C}}^{\text{FMN}_{\text{ox}}} = \frac{[D] \times C_{\text{réf}}}{[M]^2}$. $C_{\text{réf}}$ est une concentration de référence prise égale à 1,0 mol L⁻¹. Par conservation de la concentration totale en FMN_{ox}, notée C ($C = [M] + 2[D]$), nous obtenons l'expression suivante pour les concentrations en monomère et dimère :

$$[M] = \frac{\sqrt{8 \times K_{\text{dim},5^\circ\text{C}}^{\text{FMNox}} \times C + 1} - 1}{4 \times K_{\text{dim},5^\circ\text{C}}^{\text{FMNox}}} \quad (2.1)$$

$$[D] = \frac{C - [M]}{2} \quad (2.2)$$

Chaque spectre de coefficients d'extinction molaires effectifs (ϵ_{eff}), représenté sur la Figure 1.1, peut être décrit par une combinaison linéaire des coefficients d'extinction molaires du monomère (ϵ_M) et du dimère (ϵ_D), selon l'équation :

$$\epsilon_{\text{eff}} = \frac{\epsilon_M \times [M] + \epsilon_D \times [D]}{C} \quad (2.3)$$

Les spectres du monomère et du dimère ainsi que la constante d'équilibre sont obtenus grâce à un ajustement paramétrique global des données expérimentales (spectres $\epsilon_{\text{eff}}(C)$) au moyen des fonctions trouvées précédemment. Nous procédons d'une manière entièrement similaire à ce qui est décrit dans la partie 2.5 du chapitre VI pour l'ajustement global de données spectrocinétiques (la concentration jouant ici le rôle du temps). La qualité de l'ajustement est acceptable compte tenu du bruit comme l'atteste la Figure 1.2 qui représente les courbes de variation de ϵ_{eff} en fonction de C , aux longueurs d'onde des deux maxima d'absorption et leurs ajustements par notre « modèle du dimère ».

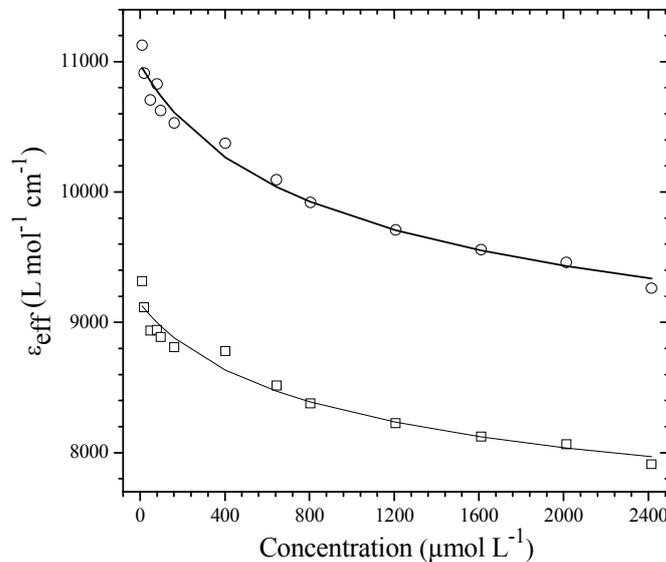


Figure 1.2 : Courbes de variation du coefficient d'extinction molaire effectif ϵ_{eff} , aux longueurs d'onde des deux maxima d'absorption : 372 nm (carrés) et 445 nm (ronds), en fonction de la concentration totale C et leurs ajustements par le modèle du dimère (traits pleins).

La constante d'équilibre que nous avons déterminée est $K_{\text{dim},5^\circ\text{C}}^{\text{FMNox}} = 470 \pm 10$, en assez bon accord avec la valeur de Lukasiewicz et al. ($K_{\text{dim},3^\circ\text{C}}^{\text{FMNox}} = 314$, à 3°C) [145]. Les spectres de coefficients d'extinction molaires du monomère et du dimère sont donnés sur la Figure 1.3.

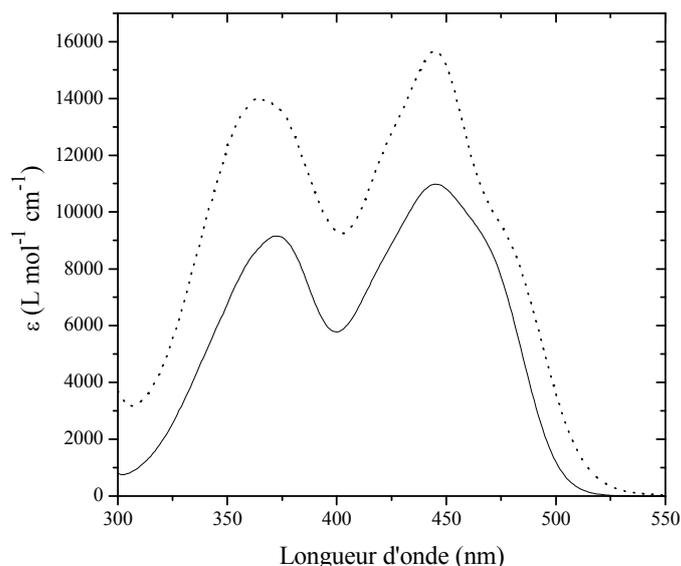


Figure 1.3 : Spectres de coefficient d'extinction molaire de FMN_{ox} en monomère (trait plein) et dimère (en pointillés) à 5°C.

1.1.2 Spectroscopie d'absorption transitoire

Nous avons réalisé l'étude par spectroscopie d'absorption transitoire de FMN_{ox} en solution aqueuse à pH 8, à deux concentrations différentes afin de tester la contribution éventuelle des dimères de FMN_{ox} aux phénomènes transitoires observés. Les expériences d'absorption transitoire décrites ici sont effectuées sur un échantillon contenu dans une cuve en silice fondue (~300 μL) montée sur une platine en translation continue afin de renouveler le volume excité entre deux tirs de pompe, à 5°C pour se ramener aux conditions expérimentales des échantillons biologiques (cf. les chapitres III et IV), avec des impulsions de 55 fs à 470 nm et dans une configuration des polarisations des faisceaux pompe et sonde à l'angle magique (cf. le chapitre VI). Ces expériences sont réalisées en régime linéaire, c'est-à-dire que le signal transitoire est directement proportionnel à l'énergie de pompe (fraction excitée faible et pas d'absorption multiphotonique).

Malgré ces précautions, nous avons observé la photodégradation de FMN_{ox} pendant ces expériences. Nous précisons que nous n'avons pas réalisé ces expériences en cuve à circulation parce que le produit commercial est onéreux et aussi parce que nous ne possédons pas de porte-cuve thermostatable permettant l'utilisation d'une cuve à circulation. Dans ces conditions expérimentales, nous avons observé la photolyse de FMN_{ox}. Il est en effet connu que FMN_{ox} se photolyse plus facilement que FAD_{ox}. Les photoproduits sont à 75% le lumichrome et à 25% des dérivés de la lumiflavine (cf. la partie 1.1.1.3 du chapitre I) [43]. Pour la riboflavine, le mécanisme de formation du lumichrome par photolyse est décrit par un

transfert d'hydrogène depuis le groupe hydroxyle en C2' vers N1 de l'isoalloxazine à partir de l'état triplet [149].

Le lumichrome n'absorbe pas à 470 nm, longueur d'onde d'excitation des expériences d'absorption transitoire. En revanche les dérivés de la lumiflavine absorbent à cette longueur d'onde [43] et, à mesure qu'ils s'accumulent dans l'échantillon au cours de l'expérience, pourraient graduellement contribuer aux signaux enregistrés. Nous avons testé cette possibilité en répétant la mesure d'un même temps (délai pompe-sonde) au long des expériences. Nous avons uniquement observé une diminution de l'amplitude de ce spectre transitoire (lié à la perte de population de FMN_{ox}) sans modification de la forme. Ceci révèle que les dérivés de la lumiflavine ne contribuent pas sensiblement aux spectres d'absorption transitoire dans nos conditions expérimentales.

La diminution d'amplitude des spectres différentiels étant corrélée à la diminution d'absorbance de FMN_{ox} (~6% de fluctuations à 446 nm), nous avons effectué une correction du signal d'absorption différentielle, $\Delta A(\lambda, t)$, en appliquant l'équation suivante :

$$\Delta A_{\text{corr}}(\lambda, t) = \Delta A(\lambda, t) \times \frac{1-10^{-A_{\text{ref}}}}{1-10^{-A_{470}}} \quad (2.4)$$

$\Delta A_{\text{corr}}(\lambda, t)$ est l'absorbance différentielle corrigée, A_{470} l'absorbance à 470 nm enregistrée pour la mesure au délai pompe-sonde t et A_{ref} est une absorbance de référence prise égale à la moyenne des absorbances à 470 nm enregistrées au cours de l'expérience. Nous pouvons appliquer cette correction parce que nous travaillons en régime linéaire, c'est-à-dire que le nombre de photons absorbés (égal au nombre de molécules excitées) est donné par l'absorbance stationnaire de l'échantillon. Les spectres différentiels de FMN_{ox} présentés dans les sous-parties à venir ont été corrigés selon l'équation (2.4). Sachant que le facteur de correction est compris entre 0,97 et 1,03 –le facteur 1,03 ne traduit pas la diminution réelle d'amplitude des spectres différentiels puisque nous avons travaillé avec une absorbance de référence inférieure à l'absorbance initiale–, la correction réalisée est assez faible.

1.1.2.1 Solution diluée

1.1.2.1.1 Analyse spectrale

Nous commencerons l'exposé par le cas de la solution diluée car cette situation correspond à des conditions de concentrations telles que la présence de dimères est limitée.

La Figure 1.4 présente les spectres d'absorption transitoire de FMN_{ox} en solution tampon à pH 8,0 diluée pour des retards pompe-sonde allant de 0,2 ps à 1400 ps. L'absorbance de l'échantillon à 446 nm vaut 0,26 pour 1 mm de trajet optique, ce qui correspond à une concentration totale en FMN_{ox} de 0,24 mmol L⁻¹ répartie en 85% de

monomères ($[M]/[C]$) et 15% de dimères (fraction comptabilisée en unités monomériques, $2[D]/[C]$). Les impulsions de la pompe ont ici une énergie de $0,29 \mu\text{J}$, focalisées sur une section de l'échantillon de l'ordre de $4800 \mu\text{m}^2$.

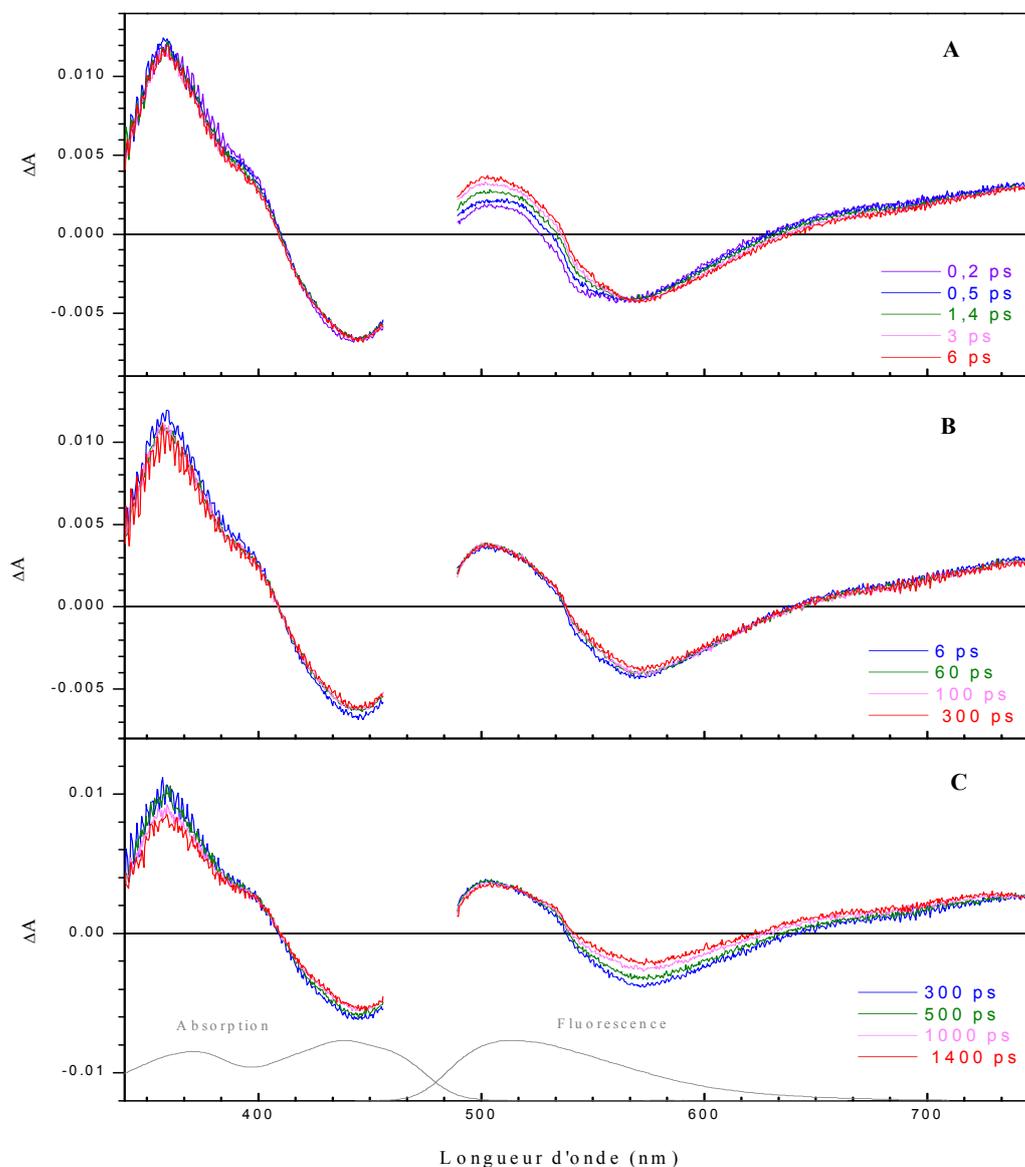


Figure 1.4 : Spectres d'absorption transitoire de FMN_{ox} diluée ($A_{446} = 0,26$ pour 1 mm de trajet optique ; $C = 0,24 \text{ mmol L}^{-1}$) en solution tampon TRIS à pH 8,0, mesurés après excitation à 470 nm et après correction de la diminution d'absorbance de FMN_{ox} pour des retards pompe-sonde de 0,2 ps à 6 ps (A), de 6 ps à 300 ps (B) et de 300 ps à 1400 ps (C). Les spectres normalisés d'absorption et de fluorescence stationnaires de FMN_{ox} libre sont rappelés en gris.

Les spectres différentiels présentent :

- une bande négative entre 408 nm et 456 nm, traduisant la contribution de la bande de blanchiment (dépopulation de l'état fondamental de FMN_{ox}),
- une autre bande négative entre 537 nm et 634 nm dans la région attendue pour la bande d'émission stimulée,

- trois larges bandes positives dans les plages spectrales 340-408 nm (AT-UV), 489-537 nm (AT) et 634-750 nm (AT-IR[†]), dominées par de l'absorption transitoire.

Les spectres sont masqués aux alentours de la longueur d'onde d'excitation (470 nm) afin d'éliminer les erreurs dues à la diffusion du faisceau de pompe. Leur évolution se divise en trois phases :

- phase 1 (Figure 1.4-A) : les bandes AT-UV, de blanchiment n'évoluent pas entre 0,2 ps et 6 ps. En revanche un déplacement du maximum de la bande d'émission stimulée de 12 nm vers le rouge est observé entre 0,2 ps et 6 ps. Ce déplacement s'accompagne d'une légère croissance de la bande AT et d'un déclin de l'amplitude de la bande AT-IR.
- phase 2 (Figure 1.4-B) : pour des retards pompe-sonde de 6 ps à 300 ps, les bandes déclinent de façon quasi-homothétique.
- phase 3 (Figure 1.4-B) : pour des retards pompe-sonde de 300 ps à 1400 ps, les bandes déclinent avec l'apparition de structures à 655 nm et 710 nm, ainsi que la présence de points isosbestiques à 515 nm et 745 nm.

1.1.2.1.2 *Analyse cinétique*

Nous avons procédé à l'analyse cinétique des données (corrigées du chirp, temporellement tronquée pour $t < 100$ fs) en effectuant un ajustement paramétrique global des trois premières cinétiques orthogonales pondérées obtenues par la procédure SVD décrite dans la partie 2.5.2 du chapitre VI. La meilleure fonction d'ajustement que nous avons trouvée est la somme de deux exponentielles convoluées à une gaussienne représentant la réponse expérimentale de notre dispositif[‡].

Nous avons trouvé les durées de vie suivantes : $\tau_1 = 2,5 \pm 0,3$ ps et $\tau_2 = 4,6 \pm 0,2$ ns, avec un écart quadratique moyen $\sigma = 2,7 \times 10^{-3}$. Ces durées de vie sont en bon accord avec celles rapportées dans la littérature (entre 4,7 ns et 5 ns, cf. la partie 1.1.2 du chapitre I) [34,

[†] Les notations AT-UV, AT et AT-IR sont de simples abréviations des termes : absorption transitoire située dans l'UV proche, dans le visible et dans l'IR proche, respectivement. Le sens n'est pas celui de nommer une transition précise d'une molécule précise (par exemple, la bande Q des porphyrines) mais de localiser spectralement une bande positive dominée par de l'absorption transitoire.

[‡] La largeur de la gaussienne et la valeur du temps $t = 0$ s (superposition maximale pompe-sonde) sont déterminées au moyen d'un ajustement préalable incluant une fonction empirique modélisant l'artéfact temps zéro, décrite au chapitre VI. Cet ajustement plus complet n'est cependant pas conservé car notre connaissance insuffisante de la forme artéfact temps zéro (fort) induit des erreurs sur l'analyse des signaux moléculaires (faibles).

42, 44]. Pour chaque déclin exponentiel, nous avons calculé le spectre des facteurs pré-exponentiels encore appelé spectre différentiel associé au déclin (Decay-Associated Difference Spectra, DADS, en anglais). Les DADS sont présentés sur la Figure 1.5 (le spectre différentiel associé à la durée de vie τ_i est noté DADSi).

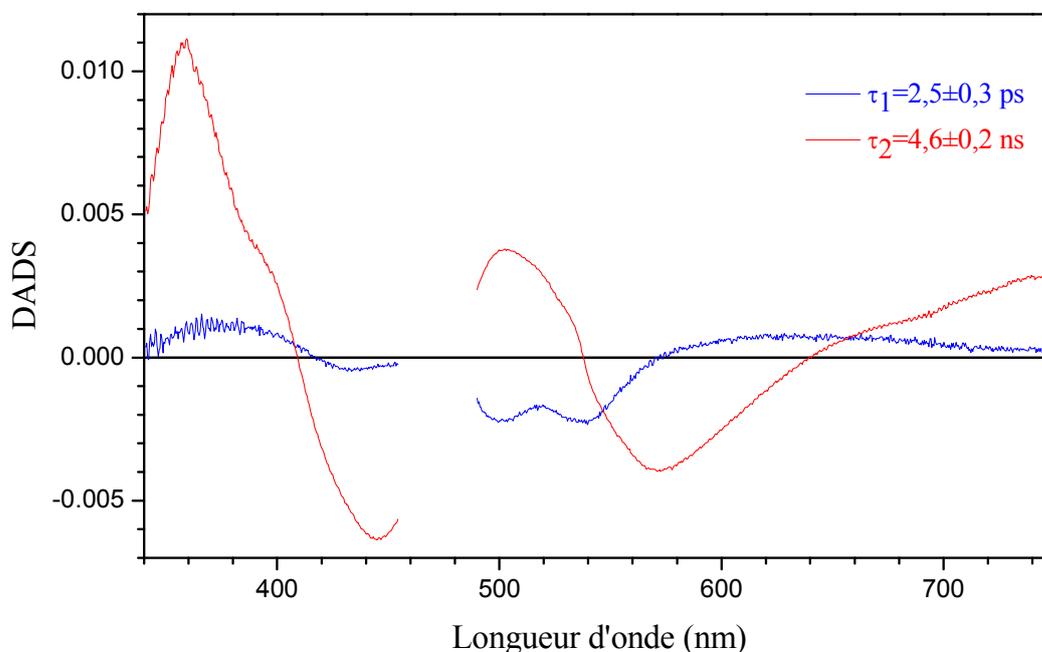


Figure 1.5 : Spectres de facteurs pré-exponentiels ou DADS associés aux durées de vie de 2,5 ps (bleu) et 4,6 ns (rouge) pour FMN_{ox} diluée en solution aqueuse (pH = 8,0 et $A_{446} = 0,26$ sur 1 mm).

La première durée de vie trouvée lors de l'analyse cinétique vaut 2,5 ps. Le processus correspondant est concomitant au déplacement du maximum de la bande d'émission stimulée de 12 nm vers le rouge, entre 0,2 ps et 6 ps. Le DADS1 pourrait donc traduire, d'une manière approximative et globale[§], la dynamique de relaxation du solvant autour de l'état excité de FMN_{ox} produit par l'impulsion de la pompe. Les composantes temporelles caractéristiques de la dynamique de solvation dans l'eau sont en fait au nombre de trois : un temps plus court que 100 fs, 126 fs et 880 fs avec des poids relatifs de 45%, 20% et 35%, respectivement[150]. Notre durée de vie de 2,5 ps semble trop longue pour être simplement attribuée à la dynamique de relaxation du solvant (eau) autour de l'état excité de FMN_{ox}. Pour expliquer notre durée de vie, nous pouvons envisager qu'à la dynamique de solvation s'ajoute un autre phénomène comme la relaxation de structure évoquée par Weigel et al. [34].

Le DADS2, associé à la durée de vie de 4,6 ns, est positif dans les régions spectrales correspondant aux bandes d'absorption transitoires des spectres différentiels et négatif dans

[§] Il faut garder à l'esprit qu'une analyse globale n'est, par construction, pas adaptée à la description d'un déplacement de bandes. Le résultat obtenu n'est qu'approximatif.

les régions des bandes de blanchiment et d'émission stimulée. Cela traduit un déclin des espèces excitées avec un retour à l'état fondamental. Cela confirme l'observation, faite lors de l'analyse de l'évolution des spectres, d'un comportement homothétique entre 6 ps et 1400 ps.

Comme nous l'avons vu précédemment (cf. la partie 1.1.2 du chapitre I), la durée de vie de 4,6 ns est en assez bon accord avec les valeurs connues du déclin de l'état singulet de FMN_{ox} (entre 4,7 ns et 5 ns [25, 48, 49]), compte tenu du fait que notre fenêtre d'observation temporelle est limitée à 1,4 ns. Étant donné que nous avons observé la présence de points isobestiques non triviaux encore présents à 1,4 ns, nous proposons que l'état excité ne revienne pas entièrement vers l'état fondamental. Ceci pourrait s'expliquer par le peuplement de l'état triplet par conversion inter-système.

Nous avons vu que la fraction de dimères dans les conditions expérimentales de la présente expérience est de 15%. Cette fraction ne semble pas contribuer aux spectres d'absorption transitoire, nous avons réalisé de nouvelles expériences sur un échantillon de FMN_{ox} plus concentré.

1.1.2.2 Solution concentrée

1.1.2.2.1 Analyse spectrale

La Figure 1.6 montre les spectres d'absorption transitoire de FMN_{ox} en solution concentrée d'un facteur 3,3 ($A_{446} = 0,86$ pour 1 mm de trajet optique ; $C = 0,78 \text{ mmol L}^{-1}$), mesurés dans les mêmes conditions expérimentales que lors de l'étude de FMN_{ox} en solution diluée (cf. la partie 1.1.2.1). Dans ces conditions la fraction de dimères de FMN_{ox} passe de 15% à 32%. Les spectres transitoires présentent les mêmes caractéristiques que celles décrites pour FMN_{ox} en solution diluée (cf. la Figure 1.4) :

- une bande de blanchiment entre 408 nm et 456 nm,
- une bande d'émission stimulée entre 537 nm et 634 nm,
- trois bandes dominées par de l'absorption transitoire, situées dans les plages spectrales 340-408 nm (AT-UV), 489-537 nm (AT) et 634-750 nm (AT-IR).

L'évolution des spectres différentiels de la solution de FMN_{ox} concentrée est également similaire à celle de ceux de la solution diluée. Une première phase avec déplacement du maximum de la bande d'émission stimulée vers le rouge, est observée et terminée en 6 ps (cf. la Figure 1.6-A), attribuable à du solvatochromisme dynamique et de la relaxation structurale [34]. Un déclin quasi-homothétique des spectres différentiels pour des retards pompe-sonde de 6 ps à 300 ps est observé sur la Figure 1.6-B. Les spectres différentiels présentent toutefois

un décalage spectral vers le rouge du premier point isosbestique temporaire à 525 nm et vers le bleu du second point isosbestique temporaire à 740 nm relevés pour des retards pompe-sonde supérieurs à 300 ps.

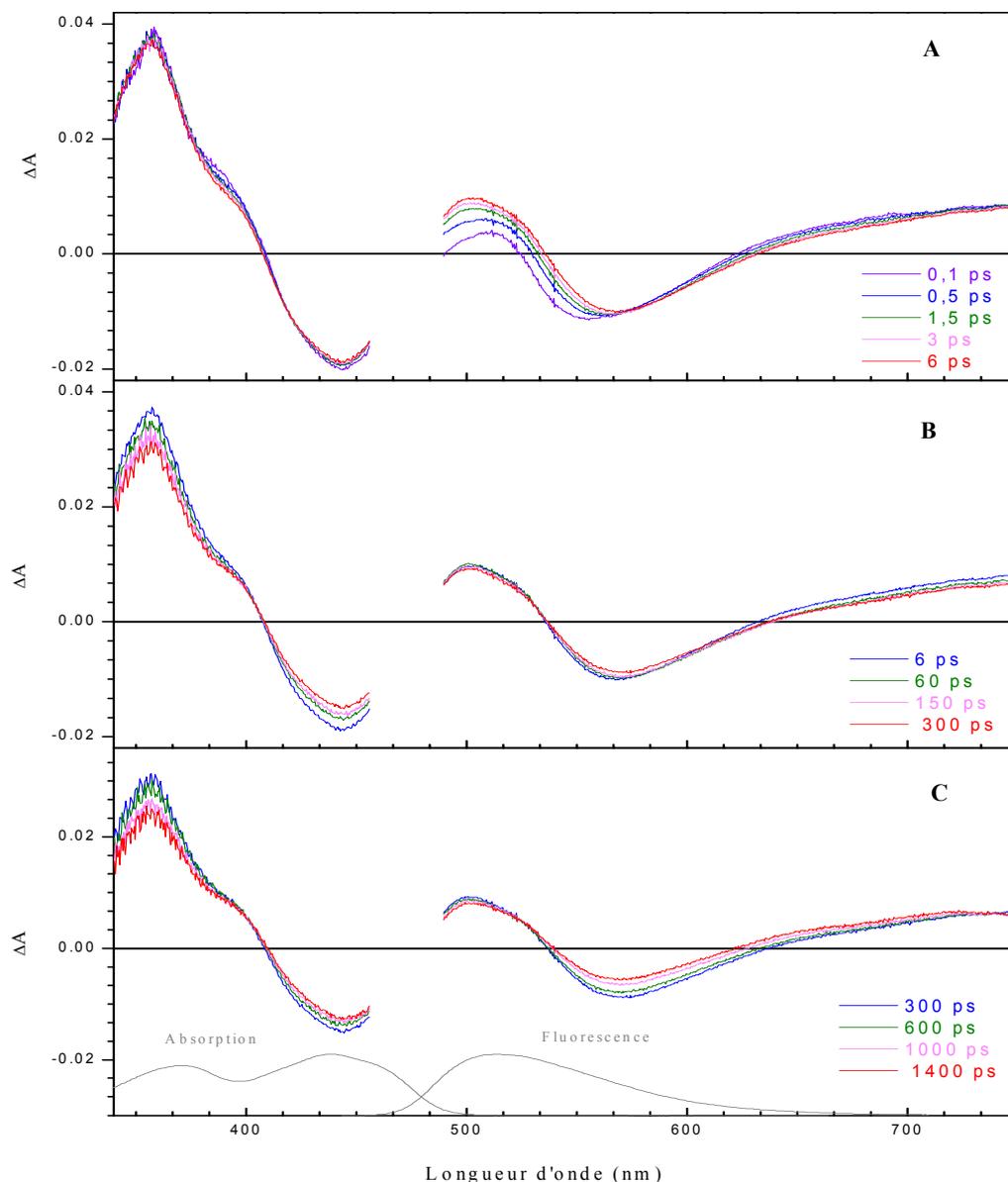


Figure 1.6 : Spectres d'absorption transitoire de FMN_{ox} concentrée ($A_{446} = 0,86$ pour 1 mm de trajet optique ; $C = 0,78 \text{ mmol L}^{-1}$) en solution tampon TRIS à pH 8,0, mesurés après excitation à 470 nm et après correction de la diminution d'absorbance de FMN_{ox} pour des retards pompe-sonde de 0,1 ps à 6 ps (A), de 6 ps à 300 ps (B) et de 300 ps à 1400 ps (C). Les spectres normalisés d'absorption et de fluorescence stationnaires de FMN_{ox} libre sont rappelés en gris.

1.1.2.2.2 Analyse cinétique

Afin de réaliser le meilleur ajustement paramétrique des données, nous avons dû ajouter une fonction exponentielle supplémentaire par rapport à l'ajustement décrit précédemment (cf. la partie 1.1.2.1.2). Les trois durées de vie suivantes sont ainsi obtenues :

$\tau_1 = 1,8 \pm 0,2$ ps, $\tau_2 = 61 \pm 18$ ps et $\tau_3 = 5,3 \pm 0,5$ ns, avec $\sigma = 4,1 \times 10^{-3}$. Ces durées de vie sont similaires à celles trouvées pour la solution plus diluée de FMN_{ox} vue précédemment, en excluant le temps intermédiaire. Les spectres de facteurs pré-exponentiels (DADS) associés à chaque déclin exponentiel sont présentés sur la Figure 1.7.

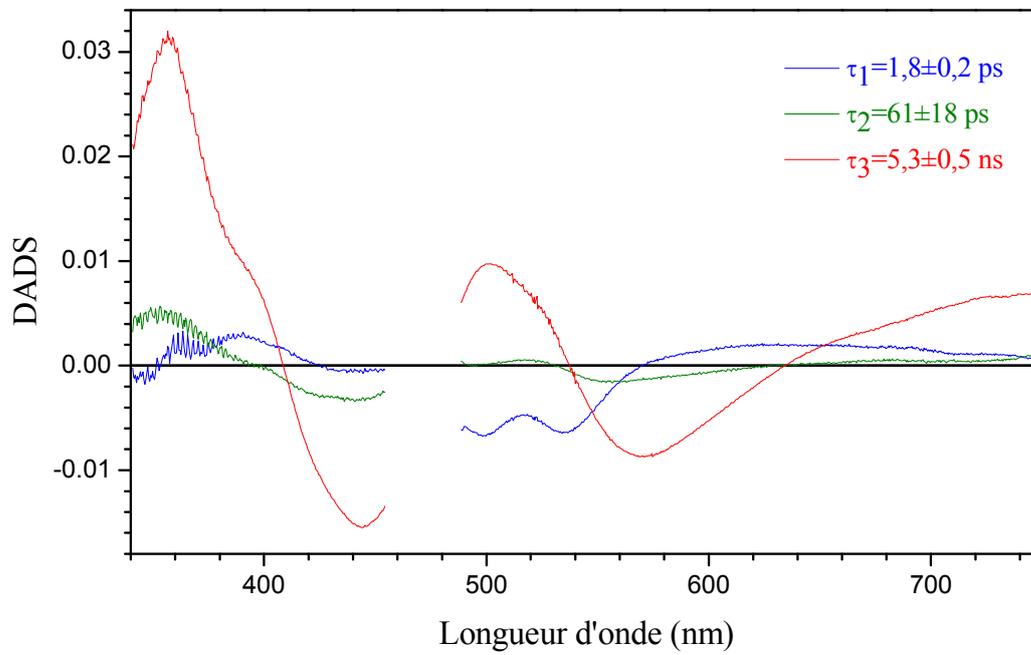


Figure 1.7 : Spectres de facteurs pré-exponentiels ou DADS associés aux durées de vie de 1,8 ps (bleu), 61 ps (vert) et 5,3 ns (rouge) pour FMN_{ox} concentrée en solution aqueuse (pH = 8,0 et $A_{446} = 0,86$ sur 1 mm).

1.1.2.2.3 *Dynamique intrinsèque des dimères*

Nous remarquons que l'amplitude du DADS2, associé à la durée de vie de 61 ps, est faible. Une durée de vie de cet ordre n'a pas encore été rapportée explicitement pour FMN_{ox} dans la littérature mais on peut citer une valeur d'environ 100 ps, de très faible amplitude, évoquée par Weigel et al. [34] pour le déclin de la riboflavine excitée en solution aqueuse. Les auteurs l'attribuent à une augmentation des sections efficaces d'émission stimulée et d'absorption transitoire autour de 450 nm, sans retour à l'état fondamental. La forme de notre DADS2 ne correspond cependant pas à la description de Weigel et al. [34]. Nous observons en particulier une diminution d'émission stimulée pendant cette phase et non une augmentation.

Nous avons vérifié que les DADS obtenus pour FMN_{ox} concentrée et diluée ont un à un (en excluant le DADS2 de FMN_{ox} concentrée) des allures similaires. Nous avons remarqué la nécessité d'ajouter un déclin de durée de vie intermédiaire après augmentation de la concentration de l'échantillon. Comme la seule modification entre ces deux expériences est la

fraction de FMN_{ox} monomère et dimère, l'effet observé semble attribuable à l'augmentation de la fraction de dimères.

Nous pouvons finalement résumer, sur la Figure 1.8, les propriétés photophysiques de FMN_{ox} en solution concentrée, après la phase attribuée au solvatochromisme dynamique de solvation et à la relaxation structurale, par l'évolution de deux populations indépendantes : FMN_{ox} monomère (4,6-5,3 ns) et FMN_{ox} dimère (61 ps).

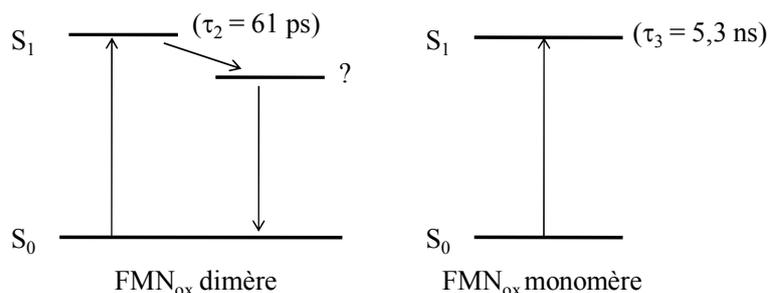


Figure 1.8 : Modèle cinétique décrivant FMN_{ox} concentrée en solution tampon à pH 8,0. Un état intermédiaire inconnu (représenté par ?) a été ajouté pour FMN_{ox} dimère afin de symboliser un putatif nouveau canal d'inhibition.

1.2 FAD_{ox}

Kao et al. proposent que la recombinaison d'un état à transfert de charge intramoléculaire photoinduit dans la conformation fermée de FAD_{ox} en solution a lieu selon une composante temporelle de 30-40 ps [44]. Nous venons de voir que les dimères de FMN_{ox} en solution concentrée présentent une photophysique intrinsèque selon une durée de vie de 61 ps. Ces deux durées de vie sont du même ordre de grandeur, cependant aucune recombinaison de charge intramoléculaire ne peut avoir lieu dans FMN_{ox} puisque cette molécule n'a pas d'adénine. Nous pouvons nous interroger sur l'effet de la présence d'éventuels dimères de FAD_{ox} sur la mise en évidence de l'étape de recombinaison de charge intramoléculaire. Avant de procéder à de nouvelles mesures par absorption transitoire femtoseconde, nous avons examiné la question des dimères de FAD_{ox} en solution aqueuse, par spectroscopie d'absorption stationnaire.

1.2.1 Spectroscopie d'absorption UV-vis stationnaire : Effet de concentration

Comme il a été vu dans la partie 1.1.1 du chapitre I, FAD_{ox} en solution neutre, peut exister sous deux conformations : une conformation fermée, repliée, dans laquelle l'isoalloxazine et l'adénine forment un complexe intramoléculaire et une conformation

ouverte où elles n'ont pas d'interaction directe. Ces deux conformations n'existent pas pour FMN_{ox}, puisque cette molécule n'a pas d'adénine. En solution aqueuse, pour un pH compris entre 4 et 9, les pourcentages relatifs des deux conformations de FAD_{ox} à l'état fondamental ont été déterminés à partir d'expériences de fluorescence stationnaire [40]. Ils sont de 80% pour la conformation fermée et 20% pour la conformation ouverte. Ces deux formes ne sont pas discernables par spectroscopie d'absorption stationnaire puisque leurs spectres sont identiques [39, 40].

Les spectres d'absorption de FAD_{ox} en solution à différentes concentrations, à 5°C, sont représentés sur la Figure 1.9-A. Ces spectres d'absorption caractéristiques du noyau isoalloxazine sont voisins de ceux de FMN_{ox} avec des maxima à 450 nm et 377 nm, c'est-à-dire un léger décalage vers le rouge. Sur la Figure 1.9-A, nous observons, comme pour FMN_{ox}, un effet d'hypochromisme. Nous voyons donc qualitativement que dans une solution concentrée de FAD_{ox}, à pH 8,0, FAD_{ox} peut exister en conformation ouverte, en conformation fermée et sous forme de dimères.

Une analyse globale des spectres d'extinction molaire pour des concentrations comprises entre 9,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ et 2,27 mmol L^{-1} , par le modèle cinétique développé précédemment (cf. la partie 1.1.1) permet de déterminer la constante d'équilibre $K_{\text{dim},5^\circ\text{C}}^{\text{FAD}_{\text{ox}}} = 640 \pm 30$. Les coefficients d'extinction molaire du monomère et du dimère sont donnés sur la Figure 1.9-B.

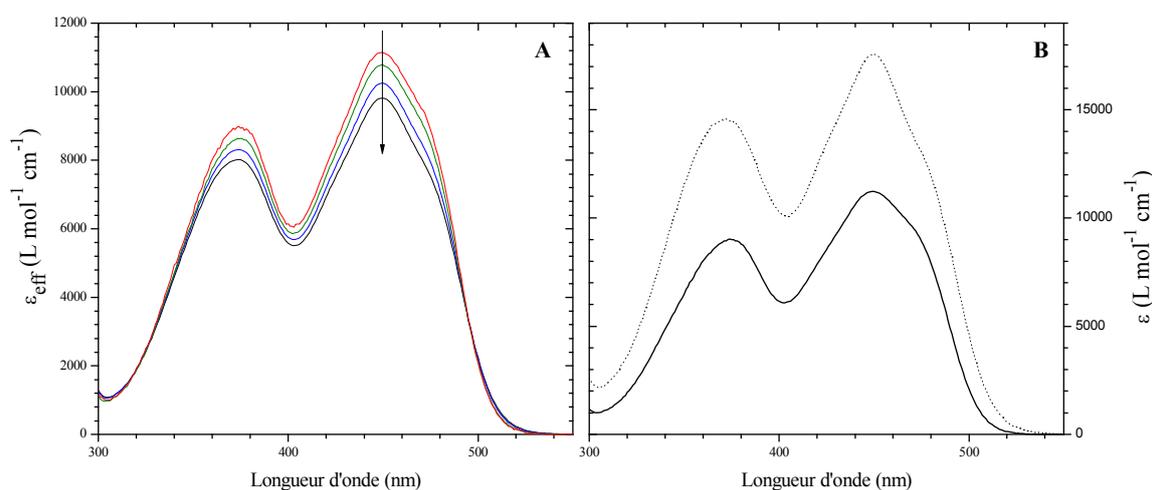


Figure 1.9 : A : Spectres de coefficient d'extinction molaire effectif de FAD_{ox} à différentes concentrations dans une solution tampon de TRIS à pH 8,0 et à 5°C. Les concentrations de FAD_{ox} sont de 9,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (rouge), 152 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (vert), 1,14 mmol L^{-1} (bleu) et 2,27 mmol L^{-1} (noir). La flèche indique l'augmentation de la concentration des solutions de FAD_{ox}. B : Spectres de coefficient d'extinction molaire de FAD_{ox} monomère (trait plein) et dimère (en pointillés) à 5°C.

1.2.2 Spectroscopie d'absorption transitoire

1.2.2.1 Solution diluée

Nous commencerons l'exposé par le cas de la solution diluée afin de minimiser la contribution de dimères et ainsi pouvoir mieux mettre en évidence l'éventuelle recombinaison d'un état à transfert de charge intramoléculaire photoinduit dans la conformation fermée de FAD_{ox} .

1.2.2.1.1 Analyse spectrale

La Figure 1.10 montre les spectres d'absorption transitoire de FAD_{ox} en solution diluée ($A_{450} = 0,25$ pour 1 mm de trajet optique ; $C = 0,23 \text{ mmol L}^{-1}$) pour des retards pompe-sonde allant de 0,1 ps à 1400 ps. La fraction de FAD_{ox} sous forme de dimères est de 19%. Les impulsions de la pompe ont une énergie de 0,28 μJ , focalisées sur une section de l'échantillon de l'ordre de 4800 μm^2 .

Ces spectres sont similaires à ceux rapportés pour FMN_{ox} . Deux bandes négatives sont attribuées au blanchiment entre 410 nm et 454 nm et à l'émission stimulée entre 540 nm et 628 nm, et trois bandes larges positives dominées par un signal d'absorption transitoire, situées dans les plages spectrales 340-410 nm (AT-UV), 487-540 nm (AT) et 628-750 nm (AT-IR).

L'évolution des spectres est qualitativement voisine de celle observée pour FMN_{ox} mais sensiblement plus rapide. Nous distinguons clairement une première phase, entre 0,1 ps et 3 ps, de déplacement de la bande d'émission stimulée vers le rouge et croissance concomitante du signal vers 500 nm. Rappelons qu'une dynamique d'absorption transitoire similaire a été observée par Weigel et al. [34] pour la riboflavine en solution aqueuse et attribuée à la dynamique de solvatation ainsi qu'à la relaxation intramoléculaire le long de modes de basse fréquence. Nous observons ensuite un déclin quasi-homothétique des spectres différentiels. Les principales différences entre les évolutions temporelles des spectres différentiels de FMN_{ox} et FAD_{ox} se résument ainsi :

- la phase dite de solvatochromisme dynamique se raccourcit notamment de 6 ps pour FMN_{ox} à 3 ps pour FAD_{ox} ,
- un léger décalage spectral du maximum de la bande AT est observé vers le bleu pour FAD_{ox} pour des retards pompe-sonde allant de 5 ps à 25 ps,

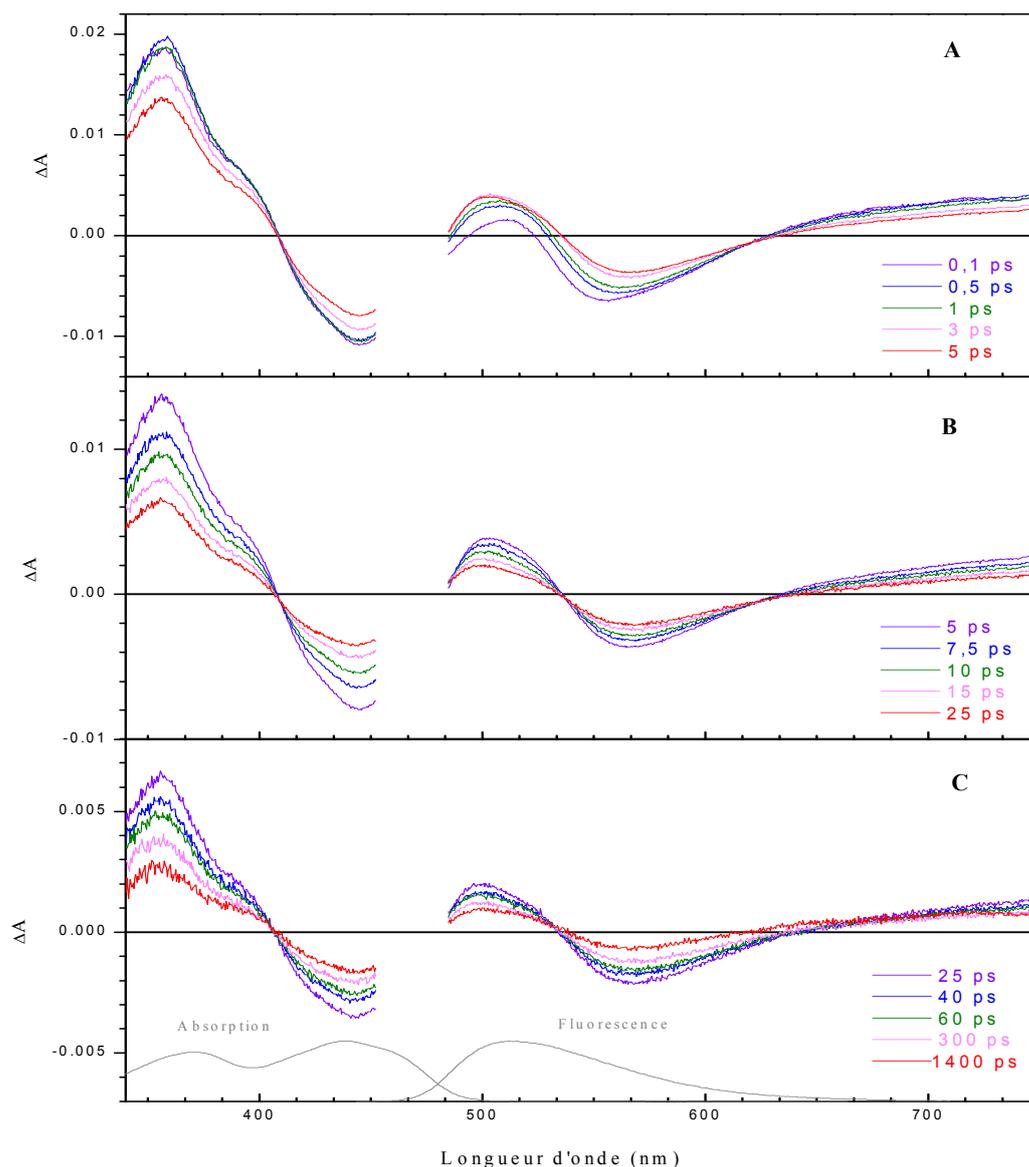


Figure 1.10 : Spectres d'absorption transitoire de FAD_{ox} diluée ($A_{450} = 0,25$ pour 1 mm de trajet optique ; $C = 0,23 \text{ mmol L}^{-1}$) en solution tampon TRIS à pH 8,0, mesurés après excitation à 470 nm pour des retards pompe-sonde de 0,1 ps à 5 ps (A), de 5 ps à 25 ps (B) et de 25 ps à 1400 ps (C). Les spectres normalisés d'absorption et de fluorescence stationnaires de FAD_{ox} libre sont rappelés en gris.

1.2.2.1.2 Analyse cinétique

Nous avons analysé les données (corrigées du chirp, temporellement tronquée pour $t < -100$ fs) par un ajustement paramétrique global des six premières cinétiques orthogonales pondérées issues de la décomposition SVD (cf. la partie 2.5.2 du chapitre VI). La meilleure fonction d'ajustement que nous avons trouvée est la somme de quatre fonctions exponentielles convoluées à une gaussienne représentant la fonction réponse expérimentale de notre dispositif. Cette analyse conduit aux durées de vie suivantes : $\tau_1 = 0,79 \pm 0,06$ ps, $\tau_2 = 6,0 \pm 0,3$ ps, $\tau_3 = 33 \pm 5$ ps et $\tau_4 = 3,0 \pm 0,4$ ns, avec $\sigma = 1,7 \times 10^{-3}$. Les spectres de

facteurs pré-exponentiels (DADS) associés à chaque déclin exponentiel sont présentés sur la Figure 1.11.

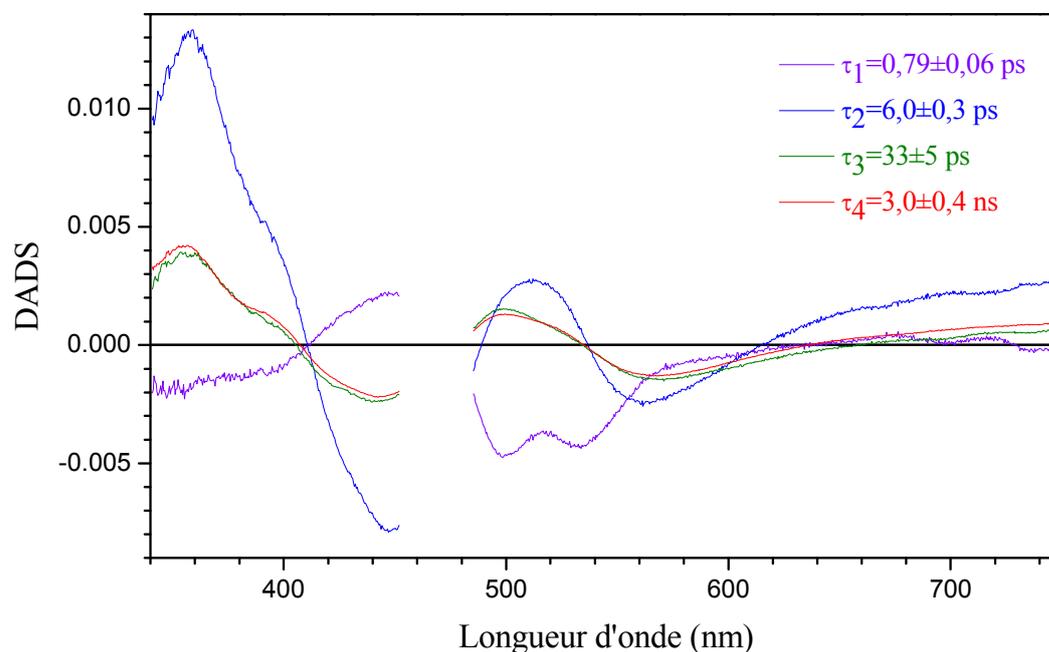


Figure 1.11 : Spectres de facteurs pré-exponentiels ou DADS associés aux durées de vie de 0,79 ps (violet), 6,0 ps (bleu), 33 ps (vert) et 3,0 ns (rouge) pour FAD_{ox} en solution aqueuse diluée (pH = 8,0 et $A_{450} = 0,25$ sur 1 mm).

Le DADS1, associé à la durée de vie de 0,79 ps, pourrait traduire, d'une manière approximative et globale, la dynamique de relaxation du solvant autour de l'état excité de FAD_{ox} produit par l'impulsion de la pompe, laquelle a déjà été rapportée dans l'étude de FAD_{ox} par fluorescence résolue en temps [42]. Notre durée de vie de 0,79 ps est compatible avec la plus longue composante temporelle caractéristique de la dynamique de solvation dans l'eau (880 fs) [150]. Elle pourrait aussi contenir des contributions de relaxation intramoléculaire de FAD_{ox} comme cela a déjà été observé pour la riboflavine par absorption transitoire [34]. Il faut noter que le DADS1 est positif dans la bande de blanchiment, ce qui pourrait traduire la montée d'espèces. Nous reviendrons sur ce point dans la partie 1.2.2.1.6.

Les trois autres DADS, associés aux durées de vie de 6,0 ps, 33 ps et 3,0 ns, sont positifs dans les régions spectrales correspondant aux bandes d'absorption transitoires des spectres différentiels et négatifs dans les régions des bandes de blanchiment et d'émission stimulée. Cela traduit un déclin des espèces excitées avec un retour à l'état fondamental sur ces trois gammes de temps. Toutefois, les DADS diffèrent entre 487 nm et 540 nm. Cela confirme l'observation, faite lors de l'analyse de l'évolution des spectres, d'un comportement homothétique entre 3 ps et 1400 ps sauf dans la bande AT.

Comme nous l'avons vu précédemment (cf. la partie 1.1.2 du chapitre I), des composantes temporelles similaires à deux ou trois de nos durées de vie ont déjà été observées par d'autres groupes [25, 44]. La durée de vie de 3,0 ns ne semble pas faire de doute ; elle a déjà été mesurée avec des valeurs assez proches (entre 2,5 ns et 2,7 ns) et est attribuée au déclin de l'état excité S_1 de la conformation ouverte de FAD_{ox} [25, 42, 44-46, 49]. Nous reviendrons sur cette interprétation dans la partie 1.2.2.1.3. Notre durée de vie de 6,0 ps est en très bon accord avec plusieurs valeurs publiées d'un déclin rapide, comprise entre 5 ps et 15 ps [42, 44, 46, 49]. Ce déclin rapide est associé à la désexcitation de FAD_{ox} en conformation fermée, laquelle a été attribuée à un transfert de charge photoinduit depuis l'adénine vers l'isoalloxazine excitée [25, 42, 44-46, 49]. En ce qui concerne notre déclin intermédiaire de 33 ps, il pourrait potentiellement correspondre à une composante temporelle de 30-40 ps rapportée par Kao et al. [44] et attribuée à la recombinaison de charge entre le radical cation de l'adénine et le radical anion de l'isoalloxazine avec retour à l'état fondamental, après transfert de charge intramoléculaire dans la conformation fermée de la molécule. Nous allons examiner cette possibilité dans la partie 1.2.2.1.4. Alternativement, notre déclin de 33 ps pourrait être mis en correspondance avec le déclin de 20 ps rapportée par Li et al. [25], attribué à la simple désexcitation de FAD_{ox} en conformation fermée (c'est la seule composante courte rapportée par ces auteurs). Nous verrons que les effets de concentration permettront d'émettre une troisième hypothèse.

1.2.2.1.3 *Dynamique intrinsèque de la conformation ouverte*

Nous pouvons revenir sur l'interprétation de la durée de vie longue obtenue pour FAD_{ox} et FMN_{ox} . Cette durée de vie a été interprétée comme la désexcitation de l'état excité de l'isoalloxazine sans interaction avec l'adénine. Sur la Figure 1.12, nous pouvons observer que la superposition du DADS2 (4,6 ns) de FMN_{ox} en solution diluée est pratiquement superposable au DADS4 (3,0 ns) de FAD_{ox} en solution diluée après normalisation dans la bande de blanchiment. Nous en concluons que le DADS4 est associé au déclin de la conformation ouverte excitée de FAD_{ox} .

En revanche nous remarquons que cette durée de vie est environ deux fois plus grande pour FMN_{ox} que pour FAD_{ox} . Afin de justifier la différence entre les durées de vie de l'état excité singulet de FMN_{ox} et FAD_{ox} , deux hypothèses peuvent être émises :

- dans la conformation ouverte étendue de FAD_{ox} le transfert de charge a lieu dans le régime nanoseconde,

- cette durée de vie correspondrait au temps nécessaire pour que la molécule de FAD_{ox} trouve une géométrie permettant de rapprocher suffisamment l'isoalloxazine et l'adénine pour que le transfert de charge inhibe l'état excité.

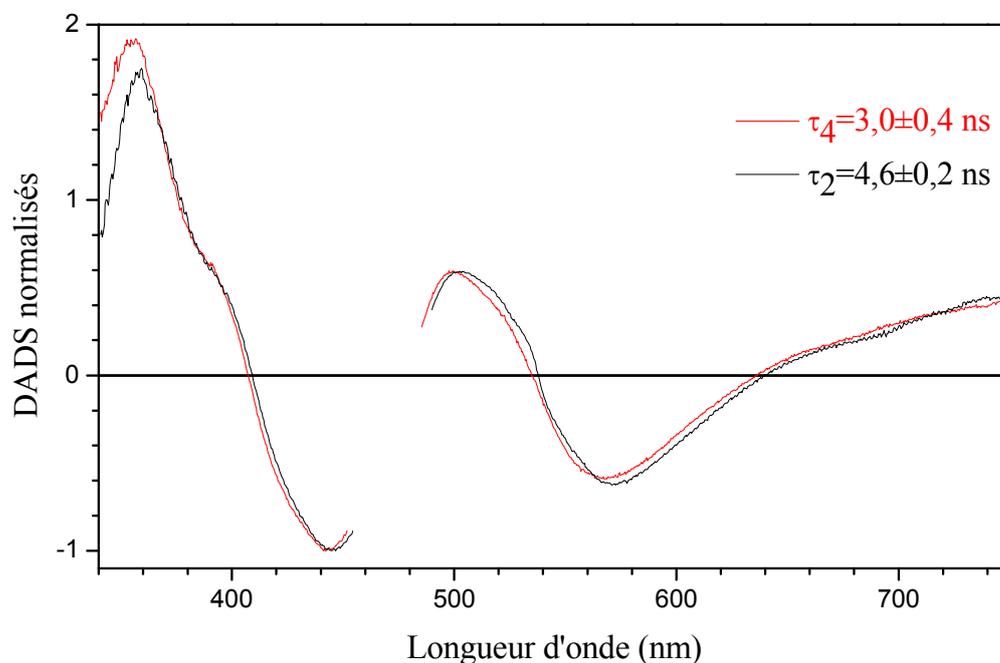


Figure 1.12 : DADS normalisés dans la bande de blanchiment, associés aux durées de vie de 3,0 ns (rouge) pour FAD_{ox} diluée et de 4,6 ns (noir) pour FMN_{ox} diluée.

1.2.2.1.4 État à transfert de charge intramoléculaire

Selon Kao et al. [44] l'excitation de FAD_{ox} en solution aqueuse à pH 7,4 conduit en 5-9 ps à la formation d'une espèce à transfert de charge intramoléculaire, constituée du radical cation de l'adénine et du radical anion de l'isoalloxazine. Cette espèce aurait une durée de vie de 30-40 ps et redonnerait l'état fondamental initial par recombinaison de charge. Si cette proposition était correcte et que notre durée de vie de 33 ps était l'équivalent de la composante de 30-40 ps de Kao et al., le spectre des facteurs pré-exponentiels associé à notre composante de 33 ps, c'est-à-dire le DADS3, devrait correspondre au spectre différentiel attendu des photoproduits. Cette correspondance est d'emblée douteuse car, les espèces radicalaires formées n'étant pas émissives, il semble très improbable qu'elles puissent rendre compte de la bande négative du DADS3 située entre 540 nm et 628 nm. Nous avons cependant effectué explicitement la comparaison du DADS3 au spectre différentiel des photoproduits, construit en prenant des spectres de coefficient d'extinction molaire du radical anion de la riboflavine pour modéliser le radical anion de l'isoalloxazine [151], du radical cation de l'adénine [152] et de FAD_{ox} en solution [40] (pour la contribution de blanchiment au spectre). La Figure 1.13 représente ces deux spectres, normalisés sur la bande de blanchiment

pour faciliter la comparaison. Nous pouvons constater que le DADS3 est loin d'être superposable au spectre différentiel reconstruit, ce qui permet d'écarter l'attribution de notre durée de vie intermédiaire de 33 ps à la désactivation d'un hypothétique état de transfert de charge. Nous reviendrons cependant sur la question du transfert de charge dans les deux parties suivantes.

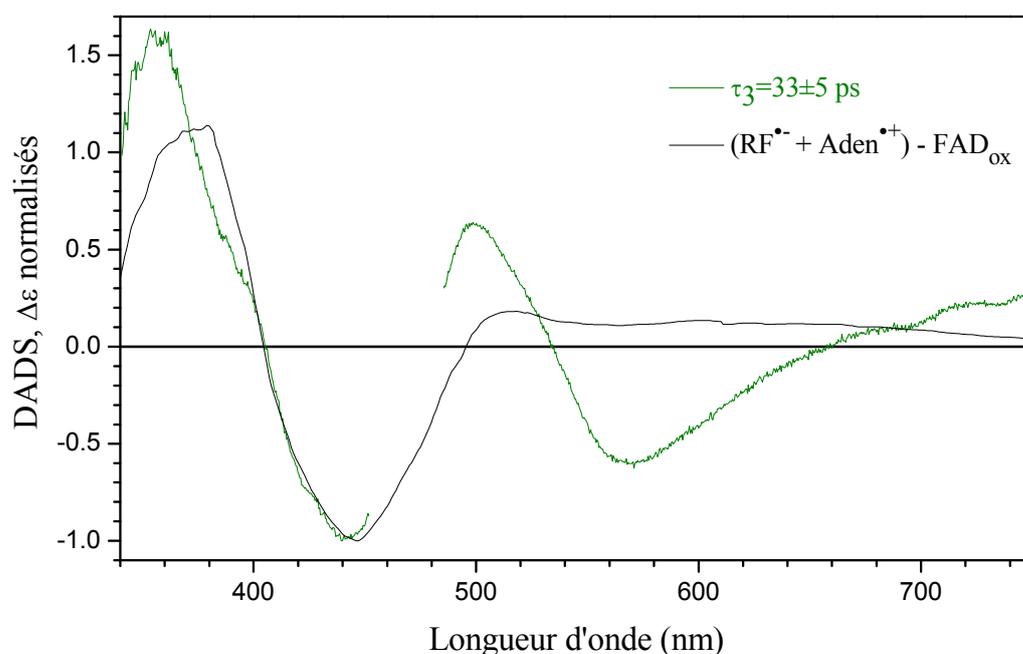


Figure 1.13 : DADS3 en vert pour FAD_{ox} en solution aqueuse (pH = 8,0 et A₄₅₀ = 0,25 sur 1 mm) normalisé à 440 nm et le spectre transitoire reconstruit en noir normalisé à 450 nm du radical anion de la riboflavine [151], du radical cation de l'adénine [152] et de FAD_{ox} en solution [40].

1.2.2.1.5 Désactivation d'un état à transfert de charge intramoléculaire

Nous venons de voir que l'état à transfert de charge intramoléculaire putativement produit à partir de l'état excité de la conformation fermée de FAD_{ox} n'est pas observé dans le DADS3. Nous proposons en premier lieu que, s'il existe, la désactivation de cet état par recombinaison de charge soit bien plus rapide que sa formation. Nous sommes sur ce point en accord avec le groupe Glusac [25]. Les travaux du groupe Meech vont également dans le même sens [45] (cf. la partie 1.1.2 du chapitre I).

Par ailleurs nous pouvons observer que les DADS2 et DADS4 associés aux déclinés des conformations respectivement fermée et ouverte de la molécule ne sont pas superposables après normalisation dans la bande de blanchiment (cf. la Figure 1.14). Nous remarquons notamment que le DADS2 présente un signal moins intense dans la bande d'émission stimulée. Ceci est une région spectrale où nous attendrions que le produit de transfert de charge intramoléculaire absorbe (cf. la Figure 1.13).

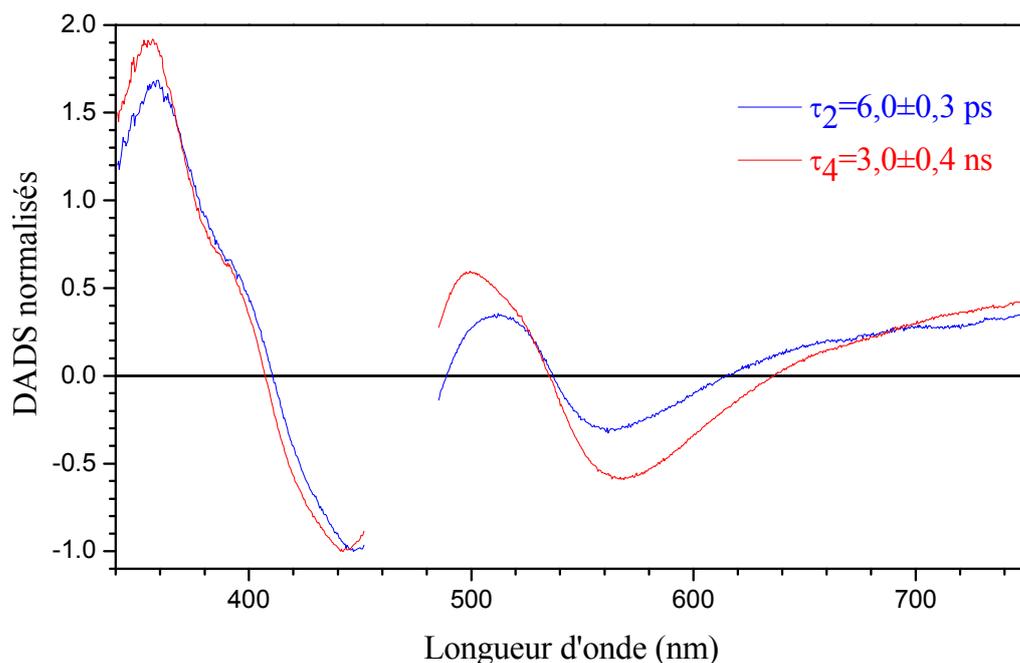


Figure 1.14 : DADS normalisés dans la bande de blanchiment associés aux durées de vie de 6,0 ps (bleu) et 3,0 ns (rouge) pour FAD_{ox} en solution aqueuse diluée (pH = 8,0 et $A_{450} = 0,25$ sur 1 mm).

Nous avons donc entrepris la décomposition spectrale du DADS2 en une somme de la contribution spectrale de l'état excité de FAD_{ox} et du produit à transfert de charge intramoléculaire. Pour ce faire, nous avons construit les spectres différentiels de coefficients d'extinction molaire de l'état excité de FAD_{ox} pur, c'est-à-dire en conformation ouverte et du produit à transfert de charge intramoléculaire (présenté dans la partie 1.2.2.1.4). Comme le DADS4 est assigné au déclin de la conformation ouverte de FAD_{ox} , il a servi de spectre de référence pour l'état excité de FAD_{ox} . Afin d'obtenir ce spectre en coefficient d'extinction molaire, une compensation du blanchiment a été opérée sur le DADS4 en utilisant le spectre de référence de FAD_{ox} en solution [153] (cf. la partie 2.5.3 du chapitre VI), ce qui a permis de déduire approximativement la population à l'état excité de FAD_{ox} en conformation ouverte ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$). L'ajustement paramétrique du DADS2 par ces deux spectres différentiels de base est représenté sur la Figure 1.15.

Nous constatons que cet ajustement est d'assez bonne qualité ($R^2 = 0,98$), compte tenu d'erreurs qui pourraient provenir d'une connaissance insuffisante des spectres des radicaux isoalloxazine, $Iso^{\bullet-}$, et adénine, $Ade^{\bullet+}$. Un point intéressant est que le signe du coefficient multiplicateur de chaque spectre de base est positif dans les deux cas. Dans une réaction précurseur-successeur simple, si le successeur disparaît avec une vitesse plus grande que celle de sa formation, il s'agit du cas dit de cinétique inversée où la concentration du produit semble apparaître avec sa vitesse de déclin avant de disparaître, en même temps que le

précurseur, avec sa vitesse de formation. L'amplitude de ces composantes inversées est d'autant plus faible que sa vitesse de disparition du produit est grande. Dans un tel cas, le DADS attendu pour le déclin du précurseur contient, affecté d'un signe positif (déclin), une contribution du spectre du produit.

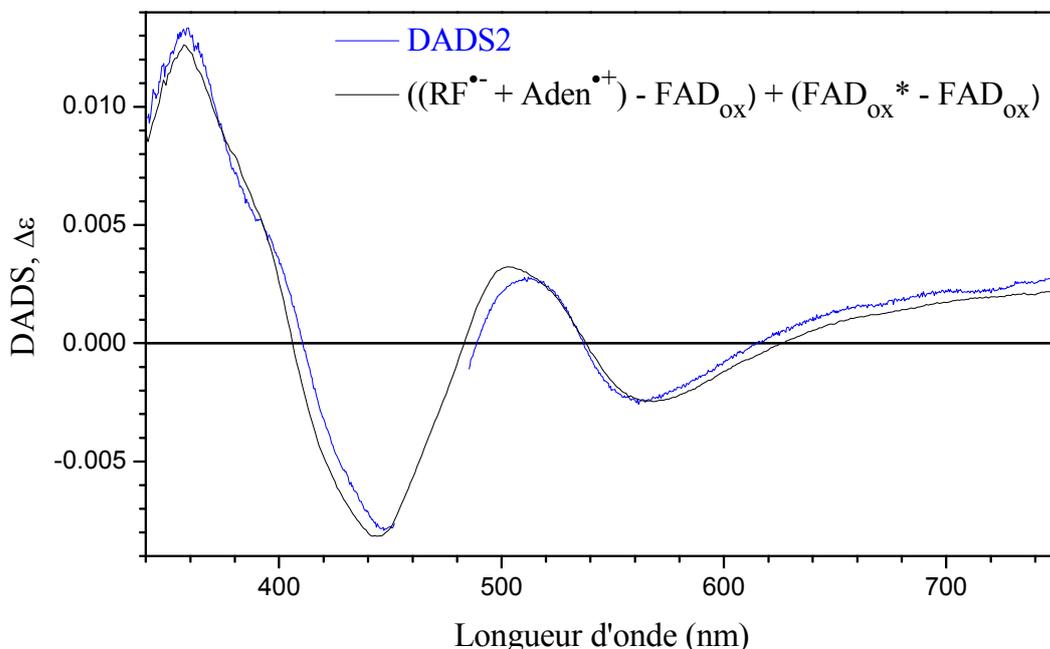


Figure 1.15 : DADS2 (6,0 ps, bleu) et son ajustement paramétrique par les spectres différentiels de coefficients d'extinction molaire de FAD_{ox} excitée en conformation ouverte et du produit de transfert de charge intramoléculaire pour FAD_{ox} en solution diluée.

Sur cette base nous proposons une version enrichie de l'interprétation de notre composante 6 ps (DADS2). Notre analyse est compatible avec une désactivation de l'état excité de FAD_{ox} par transfert de charge intramoléculaire suivie, comme cela avait été proposé [25, 42, 44-46, 49], par une recombinaison de charge certes plus rapide que la séparation de charge mais pas assez rapide pour devenir indétectable. Nous l'observons donc comme un déclin sur le DADS2.

1.2.2.1.6 Formation d'un état à transfert de charge intramoléculaire

Selon notre hypothèse établie précédemment, la vitesse de déclin du produit pourrait potentiellement être observable aux temps très courts de notre expérience. Nous pouvons alors penser que la formation apparente du produit avec sa vitesse de déclin pourrait avoir été amalgamée par notre analyse globale à la dynamique de solvation et incluse dans le DADS1.

Le DADS1 de FMN_{ox} , molécule sans adénine, ne peut pas contenir des contributions dues à la formation d'un état à transfert de charge intramoléculaire. Nous pouvons essayer de comparer les DADS1 obtenus lors de l'analyse cinétique de FMN_{ox} et FAD_{ox} en solution diluée (cf. la Figure 1.16). Nous constatons que ces deux DADS ne sont pas superposables après normalisation vers 540 nm. Notamment nous observons quatre différences majeures sur le DADS1 de FAD_{ox} par rapport au DADS1 de FMN_{ox} :

- il est négatif jusqu'à 410 nm,
- il présente une bande positive intense entre 410 nm et 454 nm,
- les intensités de ces deux minima à 500 nm et 540 nm ne sont pas identiques,
- il est pratiquement négatif sur la région spectrale 560-750 nm.

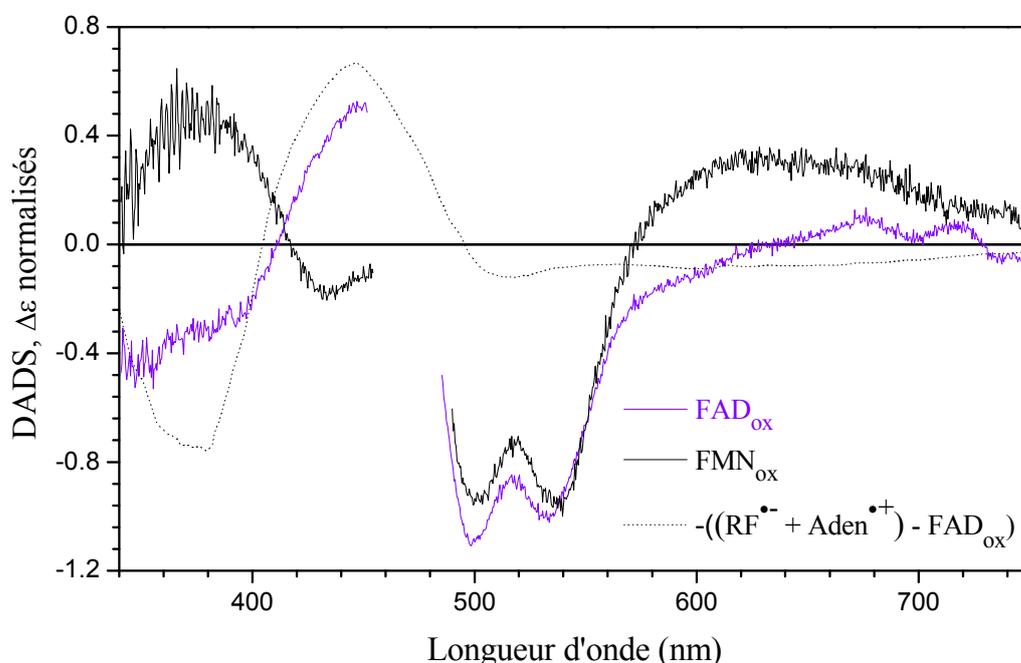


Figure 1.16 : DADS1 de FAD_{ox} (0,79 ps, violet), DADS1 de FMN_{ox} (2,5 ps, trait plein noir) et l'opposé du spectre différentiel de coefficients d'extinction molaire des produits de transfert de charge intramoléculaire pour FAD_{ox} en solution diluée (en pointillés noir), après normalisation.

Sur la Figure 1.16 est aussi représenté l'opposé du spectre des produits de transfert de charge intramoléculaire. Nous constatons que la superposition de ce spectre au DADS1 de FMN_{ox} pourrait expliquer les différences décrites ci-dessus. Nous avons réalisé un ajustement paramétrique (non représenté) du DADS1 de FAD_{ox} par celui du DADS1 de FMN_{ox} et du spectre reconstruit des produits de transfert de charge intramoléculaires. Le résultat est moyennement concluant avec un R^2 de 0,85. Ceci peut s'expliquer par une mauvaise signature spectrale de la dynamique de solvation ainsi que de la relaxation intramoléculaire de FAD_{ox} , que nous avons estimée par celle de FMN_{ox} , molécule de dimension réduite sans adénine.

Nous proposons que nous observons la pseudo apparition ou le déclin inversé de l'état à transfert de charge intramoléculaire dans FAD_{ox} en 790 fs.

Nous avons réussi à interpréter la majorité des composantes temporelles, mais il nous reste encore à assigner de façon précise la composante temporelle de 33 ps. Il ne s'agit pas d'une recombinaison d'un état à transfert de charge intramoléculaire, comme Kao et al. ont pu le proposer [44]. Cette durée de vie est du même ordre de grandeur que celle attribuée à la photophysique intrinsèque de dimère pour FMN_{ox} . Nous avons vu que la fraction de dimères dans les conditions expérimentales de la présente expérience est de 19%. Cette fraction étant relativement faible, nous avons réalisé de nouvelles expériences sur un échantillon de FAD_{ox} plus concentrée.

1.2.2.2 Solution concentrée

1.2.2.2.1 Analyse spectrale

La Figure 1.17 présente les spectres d'absorption transitoire de FAD_{ox} en solution tampon à pH 8,0 concentrée d'un facteur 2,75 ($A_{446} = 0,69$ pour 1 mm de trajet optique ; $C = 0,63 \text{ mmol L}^{-1}$), après excitation par des impulsions de 55 fs à 470 nm pour des retards pompe-sonde allant de 0 ps à 1300 ps. Avec une telle concentration, la fraction de dimères de FAD_{ox} passe de 19% à 34%.

Les spectres transitoires présentent les mêmes caractéristiques et la même évolution que celles décrites pour FAD_{ox} en solution diluée (cf. la Figure 1.10), avec toutefois quelques différences :

- le déplacement du maximum de la bande d'émission stimulée vers le rouge entre 0 ps et 1 ps vaut 7 nm, ce qui est plus petit que les 12 nm observés pour la solution diluée,
- pour des retards pompe-sonde de 25 ps à 60 ps, les bandes déclinent de façon quasi-homothétique avec un affinement du bord rouge de la bande AT.

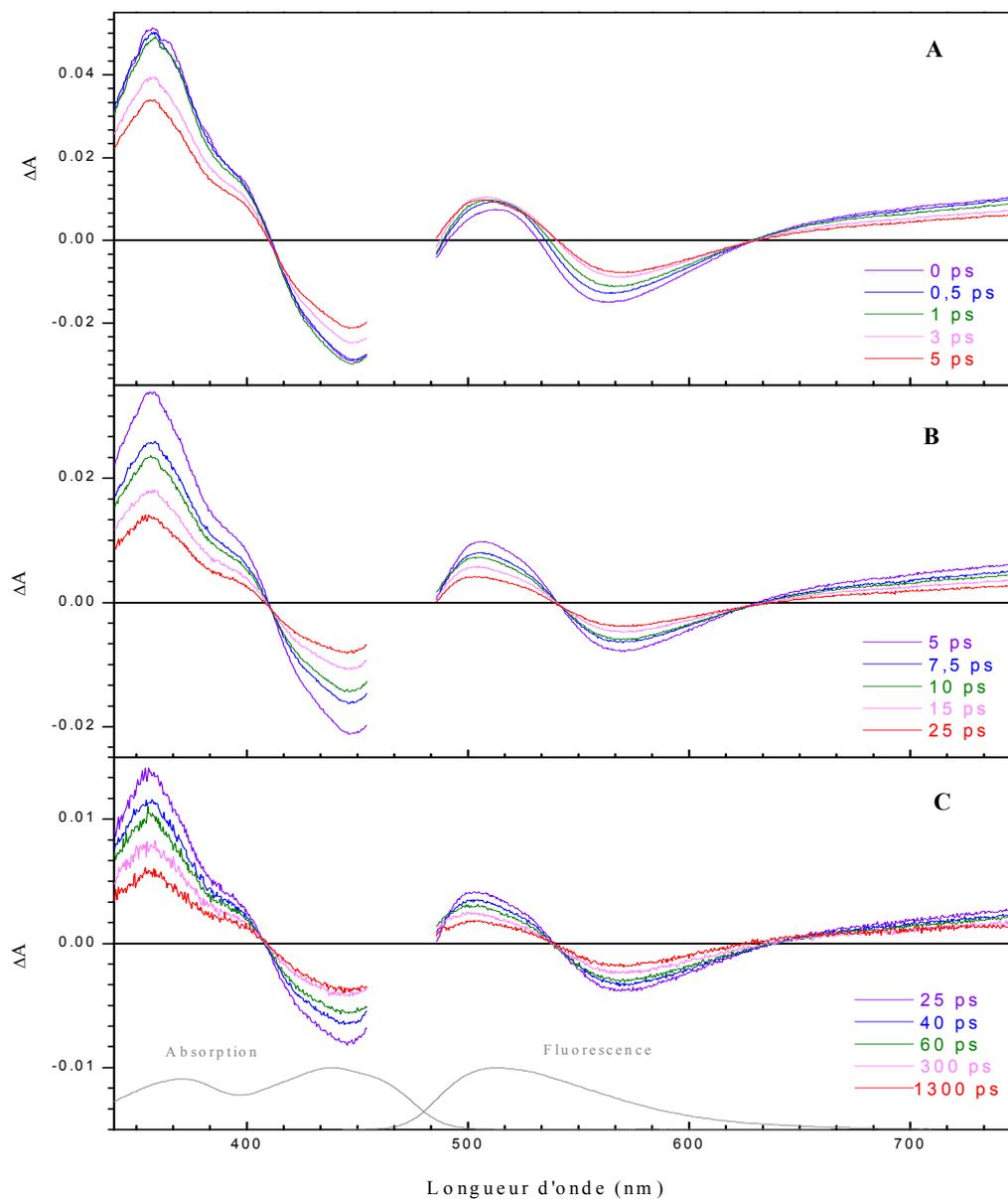


Figure 1.17 : Spectres d'absorption transitoire de FAD_{ox} concentrée ($C = 0,63 \text{ mmol L}^{-1}$, $A_{450} = 0,69$ pour 1 mm de trajet optique) en solution tampon TRIS à pH 8,0, mesurés après excitation à 470 nm pour des retards pompe-sonde de 0 ps à 5 ps (A), de 5 ps à 25 ps (B) et de 25 ps à 1300 ps (C). Les spectres normalisés d'absorption et de fluorescence stationnaires de FAD_{ox} libre sont rappelés en gris.

1.2.2.2.2 Analyse cinétique

Nous avons analysé les données par le même ajustement paramétrique que celui décrit pour la solution diluée de FAD_{ox} . Les quatre durées de vie suivantes sont ainsi obtenues : $\tau_1 = 0,90 \pm 0,05 \text{ ps}$, $\tau_2 = 5,2 \pm 0,2 \text{ ps}$, $\tau_3 = 22 \pm 2 \text{ ps}$ et $\tau_4 = 2,6 \pm 0,2 \text{ ns}$, avec un écart quadratique moyen : $\sigma = 5,3 \times 10^{-3}$. Ces durées de vie sont similaires à celles trouvées précédemment pour la solution plus diluée de FAD_{ox} (cf. la section 1.2.2.1.2). Les DADS sont présentés sur la Figure 1.18. Nous avons observé que, après normalisation à 450 nm, les

DADS2 et DADS4 des deux solutions de FAD_{ox} étudiées (concentrée et diluée) ont des formes superposables et que les DADS3 ont également des formes similaires. Nous proposons donc que l'identification des DADS des deux expériences soit identique et nous nous ramenons entre les deux mesures à une question d'amplitudes relatives des DADS.

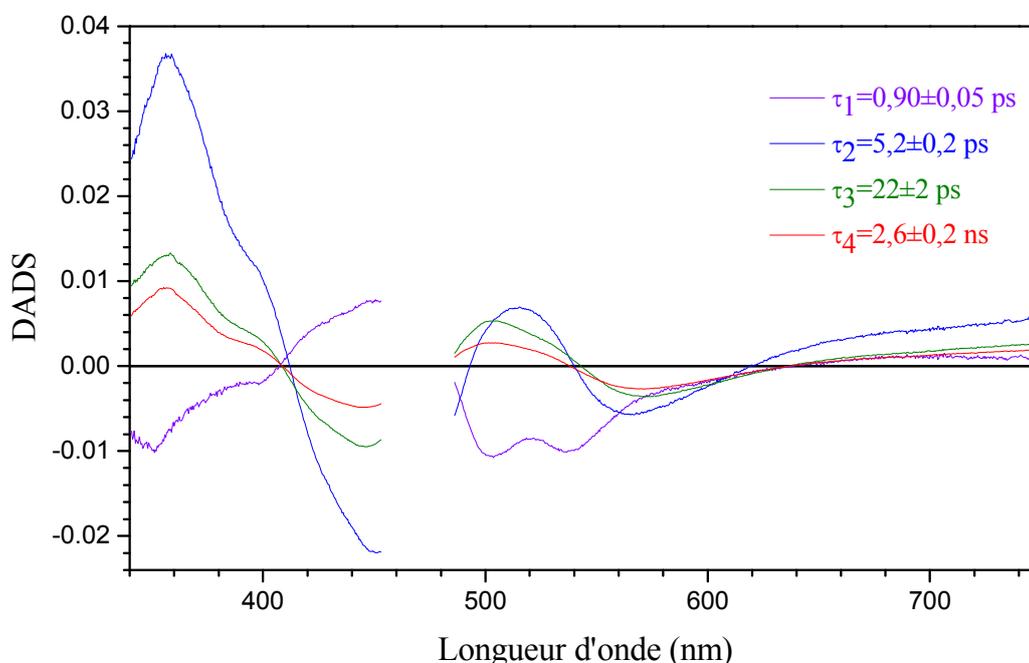


Figure 1.18 : Spectres de facteurs pré-exponentiels ou DADS associés aux durées de vie de 0,90 ps (violet), 5,2 ps (bleu), 22 ps (vert) et 2,6 ns (rouge) pour FAD_{ox} en solution aqueuse (pH = 8,0 et $A_{450} = 0,69$ sur 1 mm).

1.2.2.2.3 Dynamique intrinsèque des dimères

Il est important de remarquer que, ici, le DADS3 est beaucoup plus important que le DADS4, contrairement à ce qui a été observé pour la solution diluée (cf. la Figure 1.11). L'augmentation de la contribution relative du DADS3 (22 ps) s'accompagne de la diminution des contributions des DADS2 et DADS4 (5,2 ps et 2,6 ns respectivement). Nous proposons que l'augmentation de la contribution du DADS3 résulte de l'augmentation de la concentration en dimère et par conséquent que cette composante temporelle soit due aux dimères. De même la diminution des contributions des DADS2 et DADS4 résulte de la diminution de concentration de FAD_{ox} monomérique en conformation ouverte et fermée.

Par ailleurs, nous avons pu réaliser un ajustement du DADS3 par la somme de la contribution spectrale de l'état excité de FAD_{ox} et du produit à transfert de charge intramoléculaire (cf. la partie 1.2.2.1.5), ce qui suggère qu'il y aurait aussi une inhibition de l'état excité par transfert de charge intramoléculaire au sein des dimères.

En comparant les solutions diluées de FMN_{ox} ([D]=0,018 mmol L⁻¹) et FAD_{ox} ([D]=0,022 mmol L⁻¹), il reste remarquable que la présence de dimères pour FMN_{ox} ne soit pas détectée alors qu'elle est observée pour FAD_{ox}. Il est de même étonnant que le DADS2 de la solution concentrée de FMN_{ox} ([D]=0,13 mmol L⁻¹) soit substantiellement moins intense que le DADS3 de la solution concentrée de FAD_{ox} ([D]=0,11 mmol L⁻¹) alors que les concentrations de dimères sont voisines. Une première explication serait que le spectre différentiel molaire des dimères de FMN_{ox} soit, du fait de compensations entre des bandes d'absorption transitoire, de blanchiment et de gain, intrinsèquement de moins grande amplitude que celui des dimères de FAD_{ox}. Alternativement, nous pouvons penser que notre détermination de la constante d'équilibre de dimérisation est trop imprécise et induit une surestimation de la concentration de dimères de FMN_{ox} relativement aux dimères de FAD_{ox}.

Nous proposons finalement que chacun des déclins observés après la phase de solvatochromisme dynamique soit associé à la désexcitation d'une entité excitée distincte : 5-6 ps pour FAD_{ox} monomère en conformation fermée, 22-33 ps pour le dimère, 2,6-3 ns pour le monomère en conformation ouverte. Le déclin de 22-33 ps de FAD_{ox} sous forme de dimères est plus long que celui de FAD_{ox} en conformation fermée. La vitesse de transfert de charge diminue. Ceci pourrait s'interpréter soit par l'affaiblissement de l'interaction de l'isoalloxazine avec l'adénine du fait de l'interaction de deux unités isoalloxazine, soit par la création d'un nouveau canal d'inhibition dans les dimères. Nous pouvons résumer nos attributions par le modèle cinétique représenté sur la Figure 1.19.

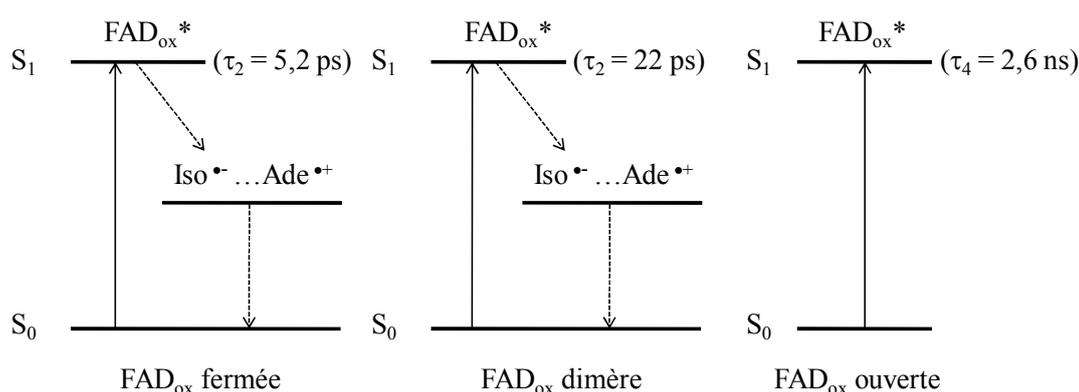


Figure 1.19 : Modèle cinétique décrivant les solutions de FAD_{ox} en solution tampon à pH 8,0 après une phase de solvatochromisme dynamique ayant une durée de vie apparente de 0,79 ps. Trois populations indépendantes sont mises en jeu : FAD_{ox} en conformation fermée, FAD_{ox} sous forme de dimère et FAD_{ox} en conformation ouverte. L'état à transfert de charge Iso^{•-}...Ade^{•+} est indiqué par des flèches en pointillées pour FAD_{ox} en conformation fermée et sous forme de dimère.

2 Flavines réduites

Comme nous l'avons vu dans la partie 1.2.2 du chapitre I, la photophysique intrinsèque des flavines réduites en solution aqueuse n'est pas encore totalement comprise. Les deux études les plus récentes par spectroscopies d'absorption et de fluorescence résolues en temps, divergent encore quant à l'interprétation des déclin multiexponentiels observés.

Li et al. [56] attribuent les déclin sub-ns à deux conformères impliquant le mouvement de pliage dit «papillon» de la molécule et, pour les flavines réduites protonées, à la présence du tautomère iminol (4a,5-dihydro, cf. la Figure 1.8 du chapitre I) dans la solution. Ils observent une ou deux composantes de durée de vie longue, selon le type de flavine réduite (neutre ou déprotonée). Ils les associent :

- au radical semi-quinone de la flavine, résultant d'un transfert d'électron au solvant à partir du conformère de plus longue durée de vie de la molécule, conduisant aussi à la formation d'électron solvaté,
- au produit d'un transfert d'électron intramoléculaire de l'isoalloxazine vers l'adénine pour la seule espèce pouvant adopter une conformation fermée, c'est-à-dire FADH₂.

En revanche Kao et al. [44] attribuent les déclin multiexponentiels au mouvement de pliage papillon de la molécule qui conduit à de multiples processus de désactivation par des intersections coniques. Nous comprenons cette interprétation comme l'évolution de la population excitée le long d'une surface de potentiel, possiblement sans barrière de potentiel, impliquant le mouvement de pliage papillon et aboutissant à la désactivation du système par croisement avec une intersection conique atteinte à divers instants selon la trajectoire. Ces auteurs écartent l'hypothèse de la désactivation de FADH^{-*} par transfert d'électron intramoléculaire parce qu'ils observèrent le même type de dynamique pour FADH^{-*} et FMNH^{-*}. Nous pouvons ajouter à cet argument le fait que, ainsi que le discutent Li et al. [25], la charge négative de l'isoalloxazine de FADH⁻ est probablement entourée d'une sphère de solvation locale en solution aqueuse, qui empêche la molécule d'adopter la conformation fermée favorisant le transfert d'électron intramoléculaire.

Par ailleurs Enescu et al. [55] envisagent la contribution aux signaux d'absorption transitoire d'une possible ionisation biphotonique de la molécule mais rejettent finalement l'hypothèse car la bande dominée par de l'absorption transitoire dans le proche IR n'a pas l'allure d'une bande associée à l'électron solvaté et est trouvée directement proportionnelle à l'énergie du laser.

Nous avons tenté d'apporter ici quelques éléments de réponse à certaines de ces questions, notamment le rôle de l'ionisation biphotonique pour la formation d'électron solvaté, au moyen d'expériences d'absorption transitoire femtoseconde. Dans ce but, nous avons effectué des mesures à des fluences d'excitation (nombre de photons reçus par unité de surface) différentes.

2.1 Flavine réduite déprotonée : FADH^-

2.1.1 Spectroscopie UV-vis stationnaire

Les flavines réduites ont été obtenues dans une solution tampon de TRIS à pH 8,0 par photoréduction de FAD_{ox} en présence d'un réducteur : EDTA, en condition anaérobie. Le spectre de coefficient d'extinction molaire de FADH^- est représenté sur la Figure 2.1. Il se présente sous la forme de bandes peu structurées entre 280 nm et 500 nm [23]. Les bandes correspondent à des transitions $\pi\pi^*$ [24].

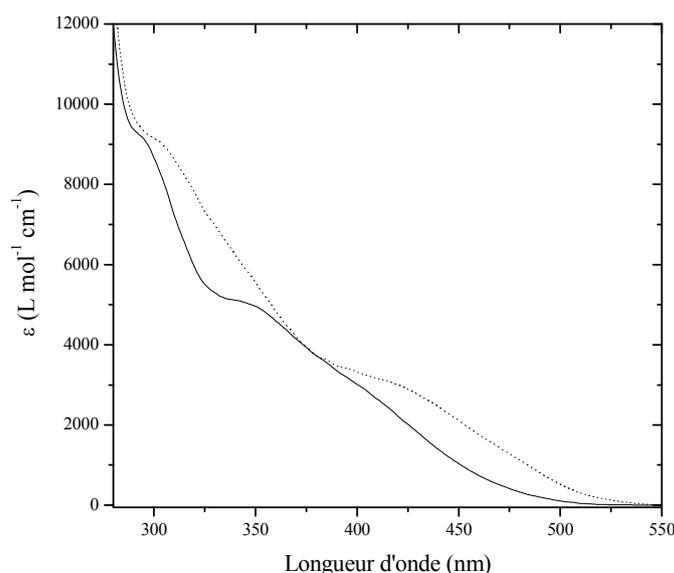


Figure 2.1 : Spectres de coefficient d'extinction molaire de FADH^- (trait plein) et FADH_2 (en pointillés).

Des tests de stabilité temporelle et sous irradiation continue de FADH^- montrent que le produit reste stable après 45 min d'irradiation à 388 nm et quelques heures de conservation sans irradiation, ce qui nous a permis de réaliser des expériences d'absorption transitoire.

La présence de dimères n'a pas été testée pour la flavine réduite déprotonée. Étant donné que FADH^- est une espèce chargée, nous pouvons supposer que la molécule est bien solvatée en milieu polaire et qu'il existe une répulsion électrostatique entre deux molécules de FADH^- . Il semble donc peu probable que des dimères de FADH^- soient présents en solution.

2.1.2 Spectroscopie d'absorption transitoire

Dans cette partie, nous rapporterons une étude par spectroscopie d'absorption transitoire de FADH^- en solution tampon à pH 8,0. Nous avons réalisé l'étude à basse et haute fluence d'excitation afin de tester la formation d'électron hydraté par ionisation biphotonique. Les expériences d'absorption transitoire décrites ici ont été effectuées sur un échantillon photoréduit, saturé en argon, contenu dans une cuve en silice fondue (~300 μL) et montée sur une platine en translation. Cette dernière permet d'éviter une photodégradation de l'échantillon par renouvellement du volume entre deux tirs de la pompe. Les mesures ont été réalisées à 5°C pour se ramener aux conditions expérimentales des échantillons biologiques (cf. les chapitres III et IV). La configuration de polarisation des faisceaux pompe et sonde est réglée à l'angle magique.

2.1.2.1 Basse fluence

La Figure 2.2 montre les spectres d'absorption transitoire de FADH^- ($A_{375} = 0,39$ pour 1 mm de trajet optique ; $C = 0,99 \text{ mmol L}^{-1}$), après excitation par des impulsions de 50 fs à 387,5 nm, pour des retards pompe-sonde allant de 0,1 ps à 1400 ps. Les impulsions d'excitation ont une énergie de 0,10 μJ et sont focalisées sur une section de l'échantillon de l'ordre de 4800 μm^2 . La fluence d'excitation est mesurée par un nombre sans dimension, la fluence réduite j . Cette dernière est le rapport de la fluence d'excitation sur la fluence dite de saturation qui se définit comme la fluence pour laquelle, dans un modèle balistique simple, chaque cible absorbante (caractérisée par une surface égale à la section efficace d'absorption σ_a) d'un échantillon optiquement mince (aucune cible n'en cache une autre) reçoit un photon :

$$F_s = \frac{1}{\sigma_a} = \frac{1}{3,82 \times 10^{-21} \epsilon_a} \quad (2.5)$$

où ϵ_a (en $\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$) est le coefficient d'extinction molaire de l'échantillon à la longueur d'onde d'excitation. Pour FADH^- dans l'eau la fluence de saturation à 387,5 nm vaut $7,9 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$. Dans ces conditions de pompage, j vaut 0,05, ce qui assure que les expériences sont menées bien en dessous du seuil de saturation ($j = 1$).

2.1.2.1.1 Analyse spectrale

Les spectres d'absorption transitoire ne présentent qu'une seule large bande positive dominée par de l'absorption transitoire. Un creux vers 438 nm est observé et correspond à des contributions d'émission stimulée (cf. le spectre de fluorescence, extrait de l'article de Kao et al. [44], en gris sur la Figure 2.2). La plage spectrale 340-436 nm est notée AT-UV et celle

entre 440-750 nm AT. Le bord bleu de la bande AT-UV est probablement dû à une contribution (négative) de blanchiment.

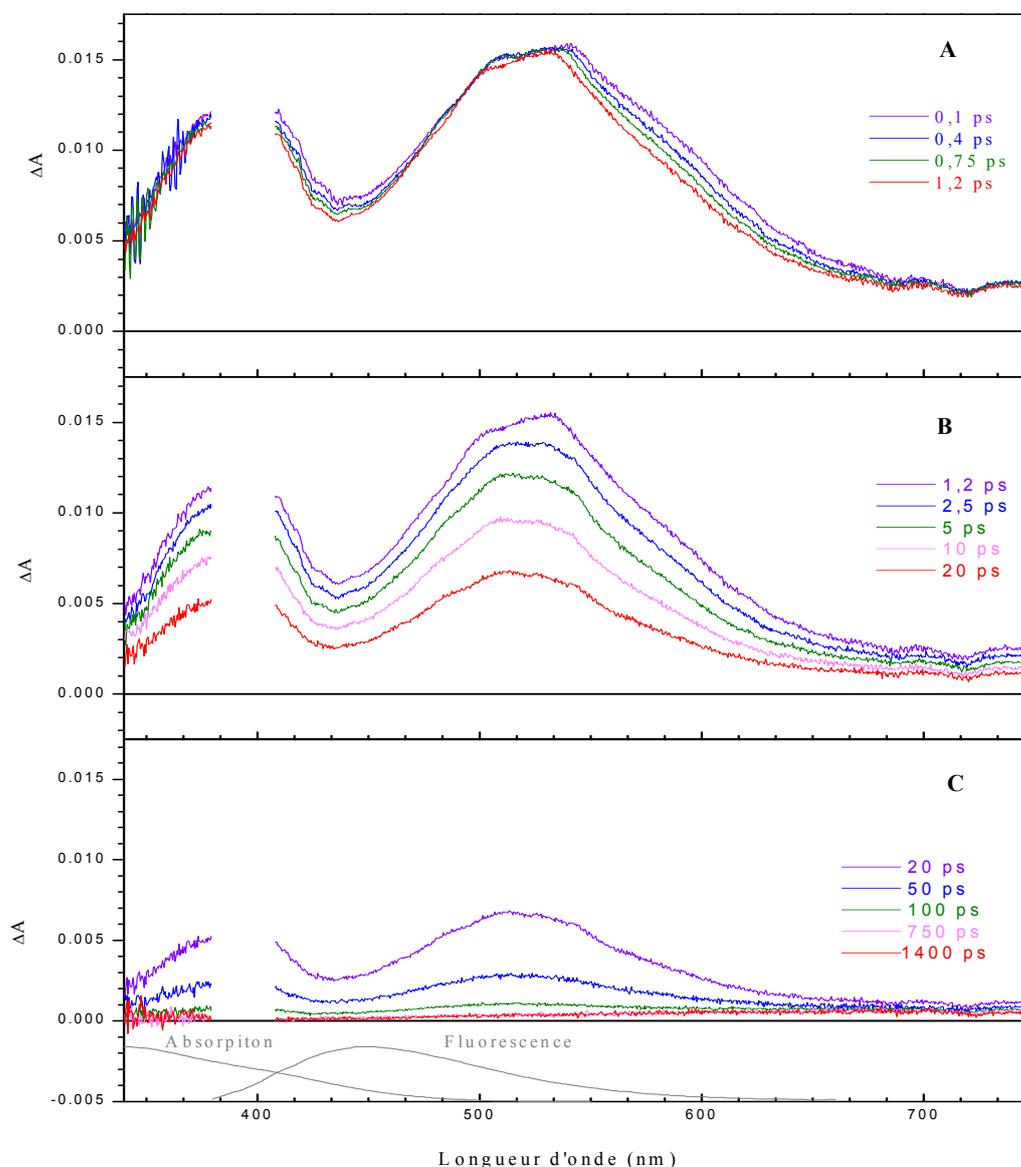


Figure 2.2 : Spectres d'absorption transitoire de FADH^- à basse fluence ($j = 0,05$) en solution tampon TRIS à pH 8,0, mesurés après excitation à 387,5 nm pour des retards pompe-sonde de 0,1 ps à 1,2 ps (A), de 1,2 ps à 20 ps (B) et de 20 ps à 1400 ps (C). Les spectres normalisés d'absorption (présentés dans la partie 2.1.1) et de fluorescence (extrait de l'article de Kao et al. [44]) stationnaires de FADH^- sont indiqués en gris.

L'évolution des spectres se divise en trois phases :

- phase 1 (Figure 2.2-A) : les bandes AT-UV et AT déclinent peu entre 0,1 ps et 1,2 ps, mais s'affinent notamment sur le bord rouge.
- phase 2 (Figure 2.2-B) : pour des retards pompe-sonde de 1,2 ps à 20 ps, les bandes déclinent fortement. Nous pouvons remarquer une déformation (un arrondissement) du maximum de la bande AT.

- phase 3 (Figure 2.2-C) : pour des retards pompe-sonde de 20 ps à 1400 ps, les bandes déclinent de façon quasi-homothétique. À 1400 ps, une bande large positive pour les grandes longueurs d'onde est observée.

2.1.2.1.2 Analyse cinétique

Une analyse cinétique globale des données est réalisée avec la somme de quatre exponentielles convoluées à une gaussienne représentant la réponse expérimentale de notre dispositif (cf. le chapitre VI). Cette analyse conduit aux durées de vie suivantes : $\tau_1 = 1,0 \pm 0,2$ ps, $\tau_2 = 5,2 \pm 0,8$ ps, $\tau_3 = 31 \pm 1$ ps et $\tau_4 = 5 \pm 2$ ns, avec $\sigma = 1,6 \times 10^{-3}$. Les DADS obtenus pour FADH^- sont présentés sur la Figure 2.3.

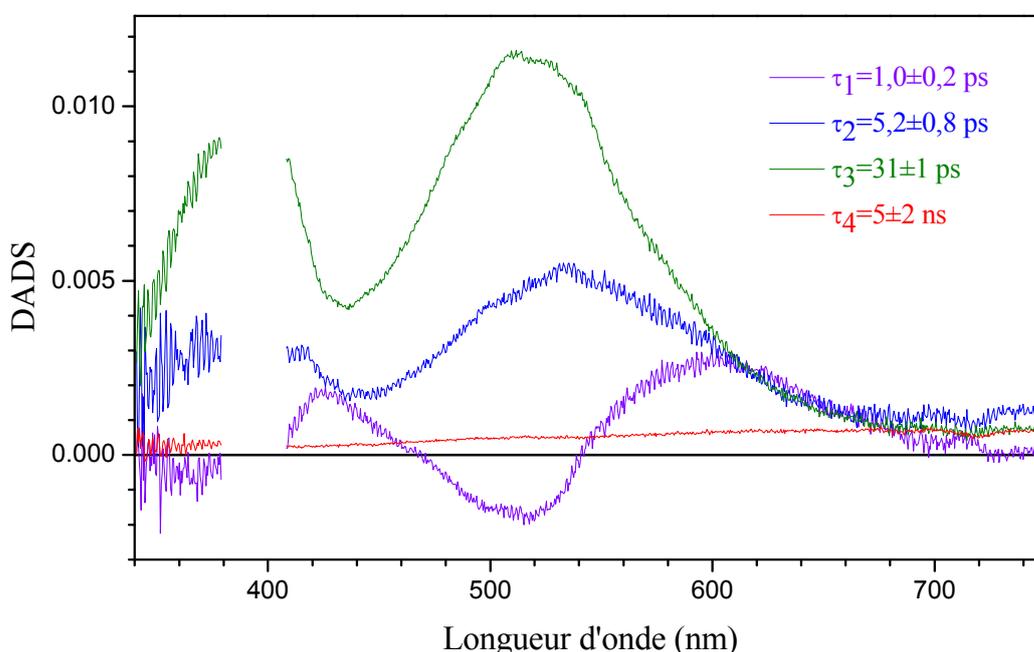


Figure 2.3 : Spectres de facteurs pré-exponentiels ou DADS associés aux durées de vie de 1,0 ps (violet), 5,2 ps (bleu), 31 ps (vert) et 5 ns (rouge) pour FADH^- à basse fluence ($j=0,05$) en solution aqueuse (pH=8,0).

Comme pour FAD_{ox} et FMN_{ox} , le solvant utilisé est de l'eau, dont les temps caractéristiques de la dynamique de solvation sont un temps plus court que 100 fs, 126 fs et 880 fs [150]. Nous observons un affinement du bord rouge des bandes AT-UV et AT entre 0,1 ps et 1,2 ps. Le DADS1, associé à la durée de vie de 1,0 ps, pourrait donc traduire la dynamique de relaxation du solvant, autour de l'état excité de FADH^- , possiblement accompagnée de relaxation structurale (même si une analyse globale n'est pas appropriée pour décrire des déplacements de bande). Ce temps n'a pas encore été rapporté dans la littérature.

Les trois dernières composantes temporelles sont en bon accord avec celles trouvées par Kao et al. [44] mais différent de celles de Li et al. [56]. Ces derniers auteurs n'observent pas de composante courte de 5,2 ps mais deux composantes de 23 ps et 401 ps suivies d'une composante longue [56]. Ils n'observent une composante courte (4 ps) que pour FADH₂ (et FMNH₂, 3 ps) et l'assignent au déclin du tautomère iminol.

Le DADS2 (5,2 ps) présente une forme asymétrique de la bande AT avec un décalage vers le rouge par rapport au DADS3 (31 ps), lequel est plus intense que le DADS2 quelle que soit la zone spectrale. Il est difficile de comparer nos résultats à ceux de Li et al. [56] en raison de la différence entre les durées de vies. Les DADS de leurs composantes de 23 ps et 401 ps (notons les respectivement DADS^{Li}-23ps et DADS^{Li}-401ps) présentent une certaine ressemblance avec nos DADS2 et DADS3, cependant la bande AT du DADS2 est plus rouge que celle du DADS^{Li}-23ps et la bande AT du DADS3 est plus large que celle du DADS^{Li}-401ps. L'interprétation de Li et al., en termes de conformères « papillon », pourrait s'appliquer à nos mesures mais il faut souligner qu'elle n'explique pas la raison fondamentale de la brièveté de nos (et leurs) durées de vie, c'est-à-dire la nature du processus de désactivation de chaque conformère. L'interprétation de Kao et al. [44], que nous comprenons en termes d'évolution sur une surface de potentiel sans barrière amenant à une intersection conique, nous semble plus convaincante quant au mécanisme de désactivation. Nos DADS2 et DADS3, outre le fait qu'ils correspondent à des durées de vie semblables à celles de Kao et al., pourraient constituer une raisonnable approximation de ce type d'évolution continue (simplifiée par l'approche globale de notre analyse cinétique). La bande AT du DADS2 assez large et rouge pourrait représenter la désactivation de la fraction de population de l'état excité qui rencontre l'intersection conique (possiblement une couture multidimensionnelle) en premier. La bande AT du DADS3 plus étroite et bleue représenterait la désactivation d'une population qui séjourne plus longtemps sur la surface excitée avant de rencontrer l'intersection conique.

Le DADS4 (5 ns) présente une très large bande positive vers le rouge, qui pourrait correspondre au spectre de l'électron hydraté. La durée de vie de l'électron hydraté étant longue (jusqu'à la microseconde [154]), il est possible que nous détectons sa présence sur une composante temporelle longue, très mal déterminée en raison de l'extension de notre fenêtre d'observation, limitée à 1,4 ns. L'intensité de cette bande étant faible ici, et faisant l'hypothèse que cet hypothétique électron hydraté aurait une origine multiphotonique, nous avons réalisé une autre expérience en augmentant la fluence d'excitation.

2.1.2.2 Haute fluence

2.1.2.2.1 Analyse spectrale

Les spectres d'absorption transitoire de FADH^- ($A_{375} = 0,37$ pour 1 mm de trajet optique, $C = 0,94 \text{ mmol L}^{-1}$), après excitation par des impulsions de la pompe de $0,33 \mu\text{J}$, focalisées sur une section de l'échantillon de l'ordre de $4800 \mu\text{m}^2$ sont représentés sur la Figure 2.4. La fluence réduite j vaut 0,2 et est donc environ quatre fois plus grande (compte tenu des arrondissements supérieurs) que celle des expériences à basse fluence.

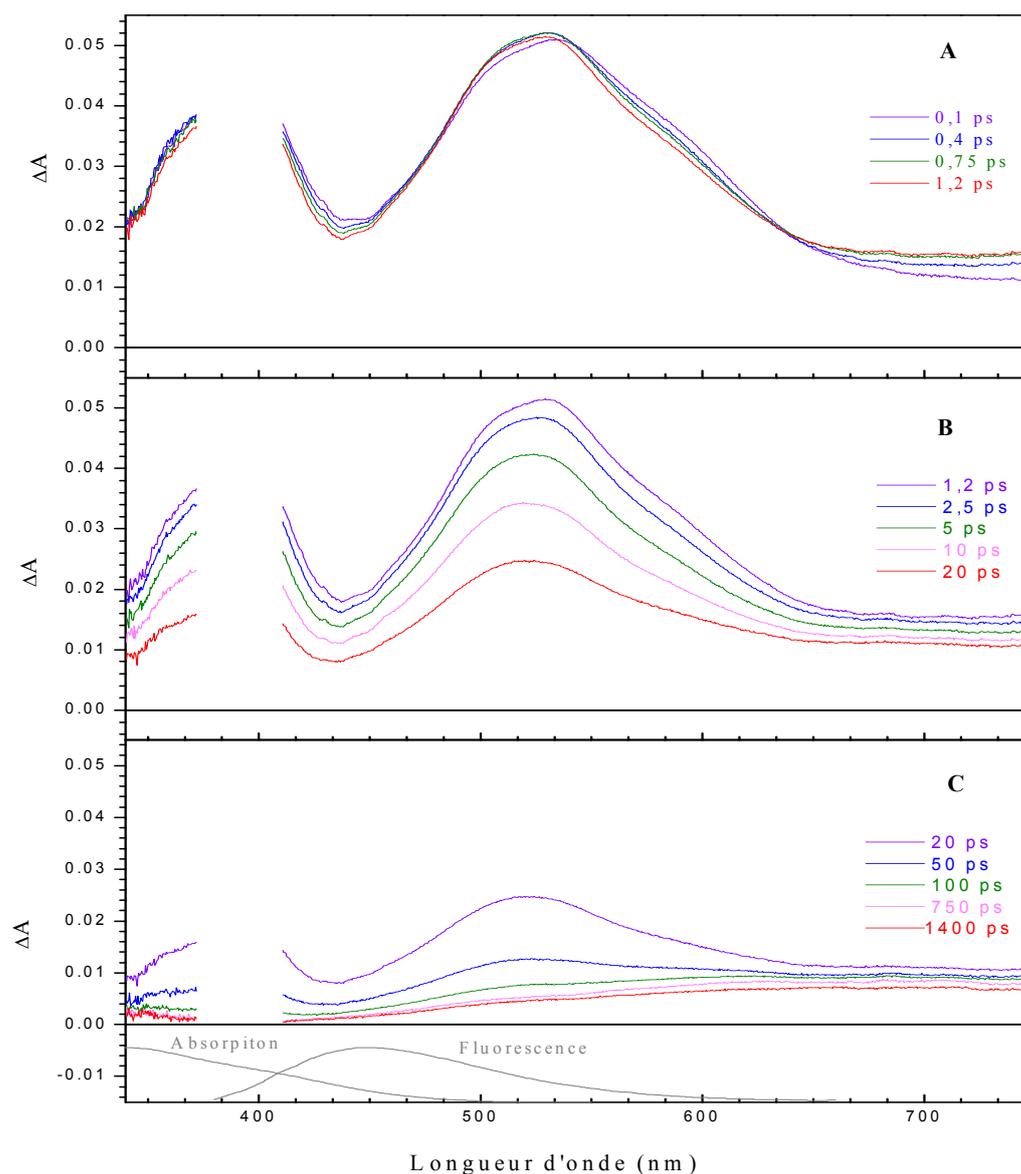


Figure 2.4 : Spectres d'absorption transitoire de FADH^- à haute fluence ($j = 0,2$) en solution tampon TRIS à pH 8,0, mesurés après excitation à 387,5 nm pour des retards pompe-sonde de 0,1 ps à 1,2 ps (A), de 1,2 ps à 20 ps (B) et de 20 ps à 1400 ps (C). Les spectres normalisés d'absorption (présenté dans la partie 2.1) et de fluorescence (extrait de l'article de Kao et al. [44]) stationnaires de FADH^- sont indiqués en gris.

Les spectres d'absorption transitoire ne présentent qu'une seule large bande positive avec un creux vers 438 nm séparant deux bandes : une bande dite AT-UV (340-436 nm) et une autre notée AT (440-750 nm). L'évolution des spectres différentiels est similaire à celle observée à basse fluence, hormis :

- l'apparition d'un point isosbestique temporaire à 638 nm sur les spectres différentiels pour des retards pompe-sonde de 0,1 ps à 1,2 ps.
- la bande large positive pour les grandes longueurs d'onde, observée à 1400 ps, est plus intense.

2.1.2.2.2 Analyse cinétique

La même procédure d'analyse cinétique est réalisée sur ces données et donne les quatre durées de vie suivantes : $\tau_1 = 0,50 \pm 0,03$ ps, $\tau_2 = 4,7 \pm 0,2$ ps, $\tau_3 = 27,7 \pm 0,4$ ps et $\tau_4 = 5,4 \pm 0,3$ ns, avec $\sigma = 2,5 \times 10^{-3}$. Ces temps sont similaires à ceux trouvés à basse fluence et les DADS (cf. la Figure 2.5) ressemblent à ceux obtenus à basse fluence. Nous remarquons cependant que le DADS4 (5,4 ns) est beaucoup plus important à haute qu'à basse fluence. Une autre différence notable est que le DADS1 (0,50 ps) présente un signal négatif pour des longueurs d'onde supérieures à 623 nm.

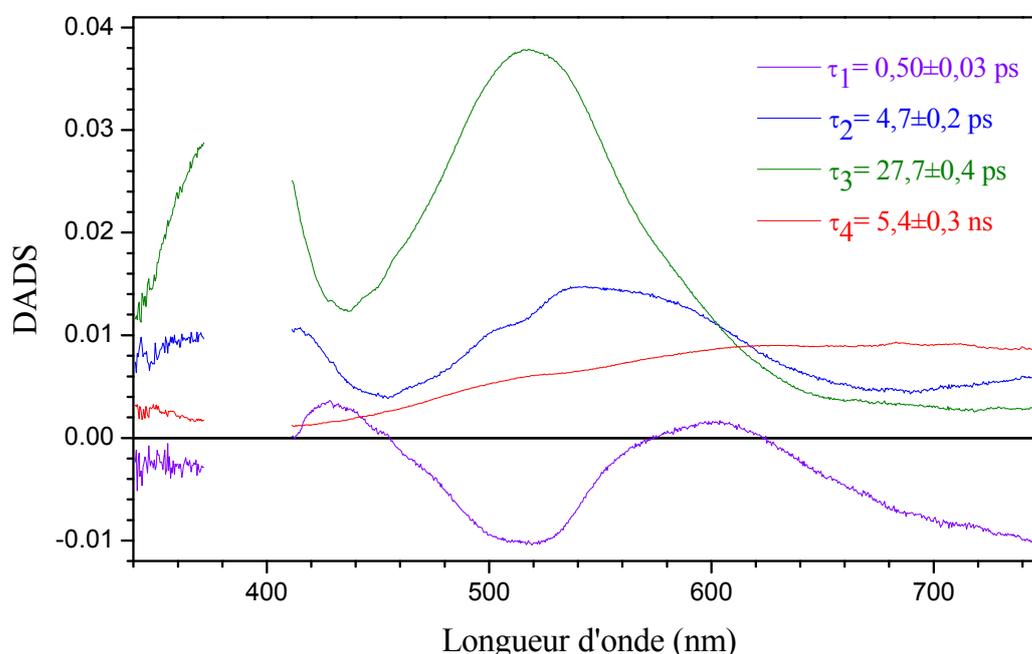


Figure 2.5 : Spectres de facteurs pré-exponentiels ou DADS associés aux durées de vie de 0,50 ps (violet), 4,7 ps (bleu), 27,7 ps (vert foncé) et 5,4 ns (rouge) pour FADH⁻ à haute fluence ($j = 0,2$) en solution aqueuse (pH = 8,0).

2.1.2.2.3 Présence de l'électron hydraté

L'augmentation d'amplitude du DADS4 à haute fluence va nous permettre de parfaire l'identification de cette bande. Elle est large dans le rouge avec quelques structures positives à 512 nm et 543 nm. Comme nous le suggérons dans la section précédente la forme de ce spectre dans le rouge évoque fortement la signature spectrale de l'électron solvate en solution aqueuse [155-158]. La formation d'électron solvate par ionisation de l'eau est exclue car aucun signal n'est observé dans les mêmes conditions pour le solvant pur. Il faut noter que les flavines réduites sont connues pour être de bons donneurs d'électrons. L'ionisation de FADH^- pourrait donc conduire à la flavine semi-réduite FADH^\bullet et à l'électron hydraté. Nous avons donc reconstruit un spectre différentiel de l'espèce correspondante. Le spectre de coefficient d'extinction molaire de FADH^\bullet n'est rapporté que dans les protéines [153, 159]. Nous avons choisi d'utiliser celui de la riboflavine radical (RFH^\bullet) en solution aqueuse [151]. Le spectre de l'électron hydraté a été extrait de l'article de Jou et al. [155] et, afin de l'obtenir en coefficient d'extinction molaire, nous avons ajusté sa valeur au maximum à $18\,400\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, d'après la valeur donnée dans l'article de Michael et al. [156]. La Figure 2.6 montre une superposition du présent DADS4 à ce spectre reconstruit ; nous avons en fait ajusté la concentration du couple RFH^\bullet /électron hydraté de manière à minimiser l'écart quadratique au DADS4.

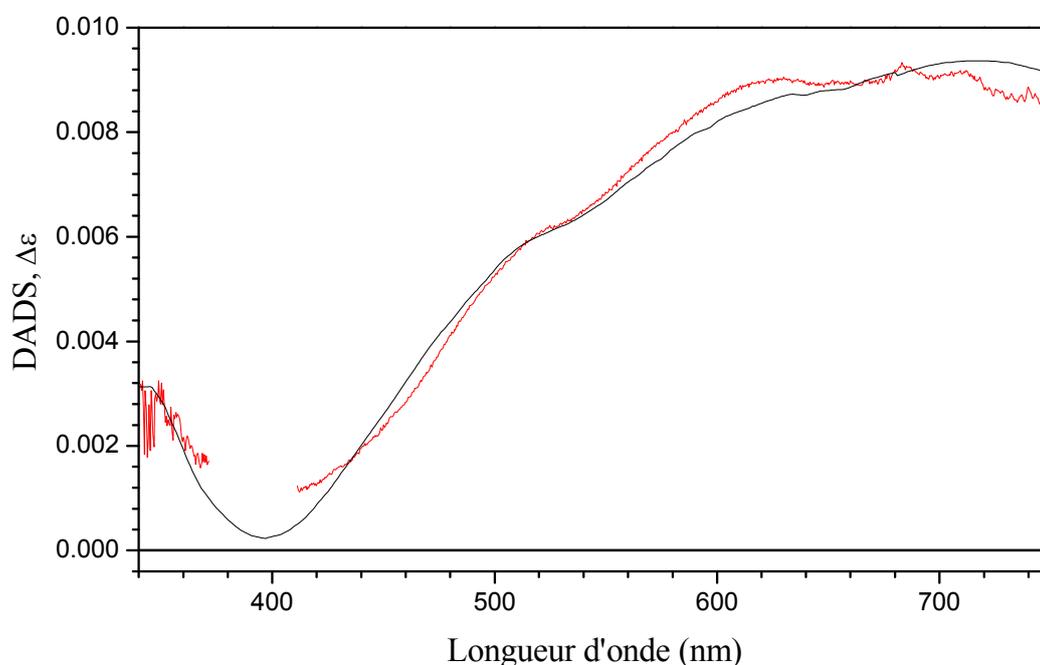


Figure 2.6 : DADS4 associé à la durée de vie de 5,4 ns (rouge) et son ajustement paramétrique (noir) par les spectres de coefficients d'extinction molaires de l'électron hydraté (extrait de l'article de Jou et al. [155]) et ajusté sur la valeur du coefficient d'extinction molaire au maximum donnée dans l'article de Michael et al. [156]) et de celui de $\text{RFH}^\bullet - \text{FADH}^-$ [151].

Nous constatons que l'ajustement est de bonne qualité ($R^2 = 0,995$), ce qui permet de conclure que le DADS4 est bien la signature spectrale de l'électron hydraté et de FADH^\bullet . Nous avons ainsi pu quantifier la concentration d'électron hydraté produit à basse et haute fluence : $0,391 \pm 0,007 \mu\text{mol L}^{-1}$ et $5,09 \pm 0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivement.

La particularité du DADS1 entre l'expérience réalisée à forte fluence, c'est-à-dire le signal négatif observé pour des longueurs d'onde supérieures à 623 nm, pourrait être interprétée comme la signature de l'apparition retardée de la bande d'absorption de l'électron solvaté, faisant suite à l'ionisation multiphotonique de la molécule. Il est en effet connu que l'électron solvaté se forme rapidement en solution aqueuse [160] : son spectre se déplace du proche IR vers le rouge en 0,4 ps [161]. Le changement de durée de vie du DADS1, raccourci de 1,0 ps à 0,5 ps à forte fluence, pourrait s'expliquer par le fait qu'à faible fluence nous n'observons que la partie lente de la solvataion dynamique (plus relaxation structurale) de la molécule excitée dans l'eau alors qu'à haute fluence le phénomène dominant serait la formation de l'électron hydraté, plus rapide.

2.1.2.2.4 *Origine de la formation de l'électron hydraté*

Nous allons revenir maintenant sur la question de l'origine de l'ionisation de FADH^- avec formation d'électron hydraté. La Figure 2.7 montre la dépendance de l'absorbance différentielle de FADH^- dans la bande AT, pour un retard pompe-sonde fixe de 100 ps, en fonction de l'énergie d'excitation pour des valeurs d'énergie se situant soit à basse fluence (j variant autour de 0,05, Figure 2.7-A) soit à haute fluence (j autour de 0,2, Figure 2.7-B). Pour ce retard pompe-sonde, le signal observé est essentiellement dû au signal déclinant en 5,4 ns, c'est-à-dire au produit de l'ionisation de FADH^- .

À haute fluence, quelle que soit la longueur d'onde, la pente de la droite obtenue en présentation log-log vaut environ 1,7. En revanche à basse fluence, cette pente augmente vers le rouge et se situe entre 1,2 et 1,4. Ceci prouve que l'électron hydraté est formé par ionisation biphotonique de FADH^- à haute fluence. Nous pouvons également remarquer que la concentration d'électron hydraté que nous avons calculée dans la section précédente augmente d'un facteur 13 quand la fluence d'excitation augmente d'un facteur 4, ce qui est également compatible avec l'hypothèse de l'ionisation biphotonique ($13 = 4^{1,85} \approx 4^2$).

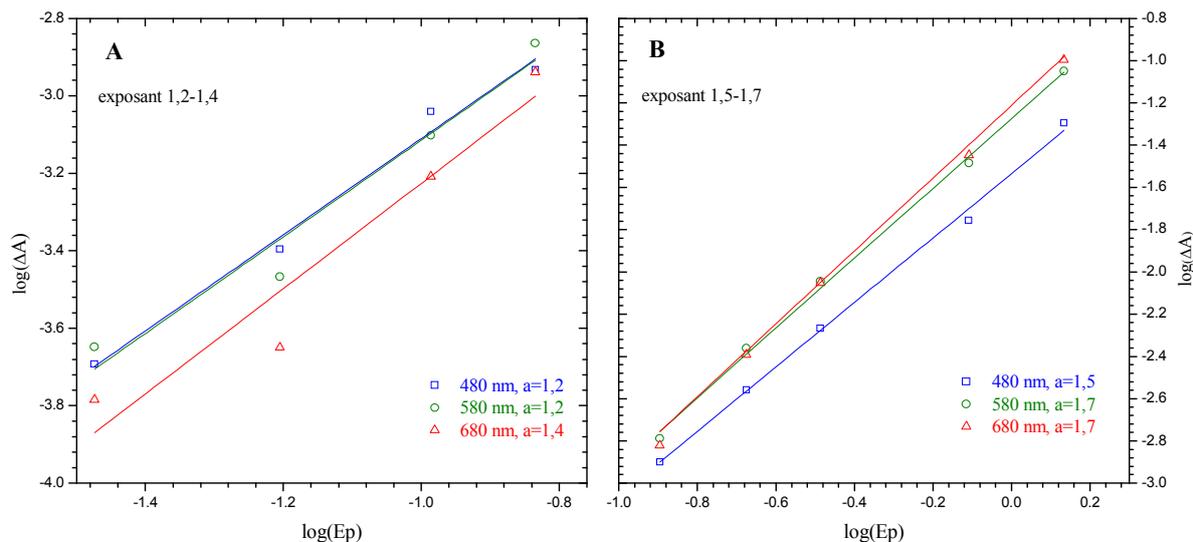


Figure 2.7 : Dépendance en énergie d'excitation de l'absorbance différentielle à 480 nm (carrés bleu), 580 nm (ronds vert foncé) et 680 nm (triangles rouge) de FADH⁻ représentée sur une double échelle logarithmique à basse fluence ($j = 0,05$, A) et haute fluence ($j = 0,2$, B) pour un retard pompe-sonde de 100 ps. Les droites correspondent aux ajustements linéaires dont les coefficients directeurs figurent en légende et sont notés a.

Pour expliquer nos observations, nous proposons donc d'enrichir le modèle cinétique de Kao et al. [44] avec le modèle représenté sur la Figure 2.8. L'étape de solvation dynamique et de relaxation structurale de l'état excité à un photon de FADH⁻ en ~ 1 ps n'est pas représentée. Cet état excité décline ensuite en 5 ps et 30 ps, possiblement au cours d'une évolution le long d'une surface de potentiel impliquant le pliage papillon et conduisant à une intersection conique avec l'état fondamental. L'excitation à deux photons de la molécule conduit à son ionisation qui produit le radical FADH[•] et l'électron hydraté, dont nous observons la relaxation en 0,5 ps. La disparition en 5 ns de la signature de FADH[•] et d'électron hydraté s'expliquerait par une recombinaison de charge intermoléculaire. Si nous faisons confiance à l'ordre de grandeur de cette durée de vie, il est probable que la recombinaison soit géminée, la diffusion ne permettant pas d'atteindre des vitesses aussi grandes pour des concentrations de FADH[•] et d'électron hydraté aussi faibles (micromolaires).

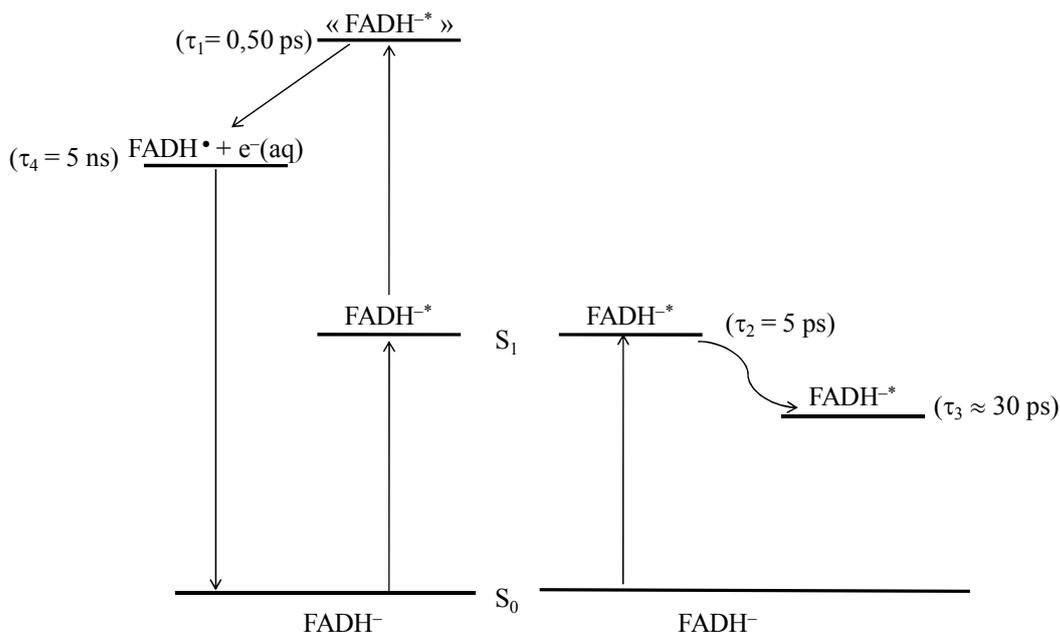


Figure 2.8 : Modèle cinétique proposé pour décrire la photophysique intrinsèque de FADH^- en solution aqueuse. La flèche incurvée symbolise un déplacement sur la surface de potentiel du premier état électronique excité. L'état d'arrivée de la formation d'électron hydraté biphotonique est symbolisé par « ».

2.2 Flavine réduite protonée : FADH_2

Les mêmes études que précédemment ont été menées sur la flavine adénine dinucléotide réduite protonée, soit FADH_2 .

2.2.1 Spectroscopie UV-vis stationnaire

FADH_2 est obtenue aussi par photoréduction de FAD_{ox} en présence d'EDTA et après dégazage, mais le tampon utilisé est un tampon aux phosphates à pH 5,6. Ainsi la flavine réduite est protonée à environ 93% puisque le pKa du couple $\text{FADH}^-/\text{FADH}_2$ vaut 6,7 [24]. Le spectre de coefficients d'extinction molaire de FADH_2 est représenté sur la Figure 2.1. Il se présente sous la forme de bandes peu structurées entre 280 nm et 500 nm [23]. Des tests de stabilité chimique et sous irradiation montrent que cet échantillon est suffisamment stable pour être étudié par spectroscopie d'absorption transitoire.

La présence de dimères n'a pas été testée pour la flavine réduite protonée bien que, la molécule n'étant pas chargée pourrait contenir des dimères. Il est connu que FADH_2 n'est pas une molécule plane mais pliée selon l'axe N5-N10 (cf. la Figure 1.8-B du chapitre I) [44]. Cette géométrie pourrait avoir pour conséquence que des dimères de FADH_2 ne se forment pas aussi bien que ceux de FAD_{ox} . Nous présentons nos résultats à titre préliminaire, sous réserve d'une vérification de l'éventuel rôle des dimères.

2.2.2 Spectroscopie d'absorption transitoire

2.2.2.1 Basse fluence

La Figure 2.9 montre les spectres d'absorption transitoire de FADH₂ en solution tampon à pH 5,6 ($A_{375} = 0,36$ pour 1 mm de trajet optique, $C = 0,92 \text{ mmol L}^{-1}$), après excitation par des impulsions de 50 fs à 387,5 nm pour des retards pompe-sonde allant de 0,3 ps à 1400 ps. Les impulsions de la pompe ont ici une énergie de 0,11 μJ , focalisées sur une section de l'échantillon de l'ordre de $4800 \mu\text{m}^2$. Avec une fluence de saturation est de $7,6 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ et avec de telles conditions de pompage, la fluence réduite j vaut 0,13. Les expériences ont été menées en dessous du seuil de saturation.

2.2.2.1.1 Analyse spectrale

Les spectres sont similaires à ceux observés pour FADH⁻ : une seule bande large positive avec un creux vers 428 nm. Nous les séparons en deux parties que nous appelons, respectivement, AT-UV (340-428 nm) et AT (428-750 nm).

Les spectres différentiels déclinent de façon quasi-homothétique pour des retards pompe-sonde de 0,3 ps à 1400 ps. Nous remarquons une diminution plus importante sur le bord rouge du maximum de la bande AT pour des retards pompe-sonde de 0,3 ps à 1,75 ps (cf. la Figure 2.9-A). Le spectre différentiel à 1400 ps présente une bande dans le rouge d'amplitude faible.

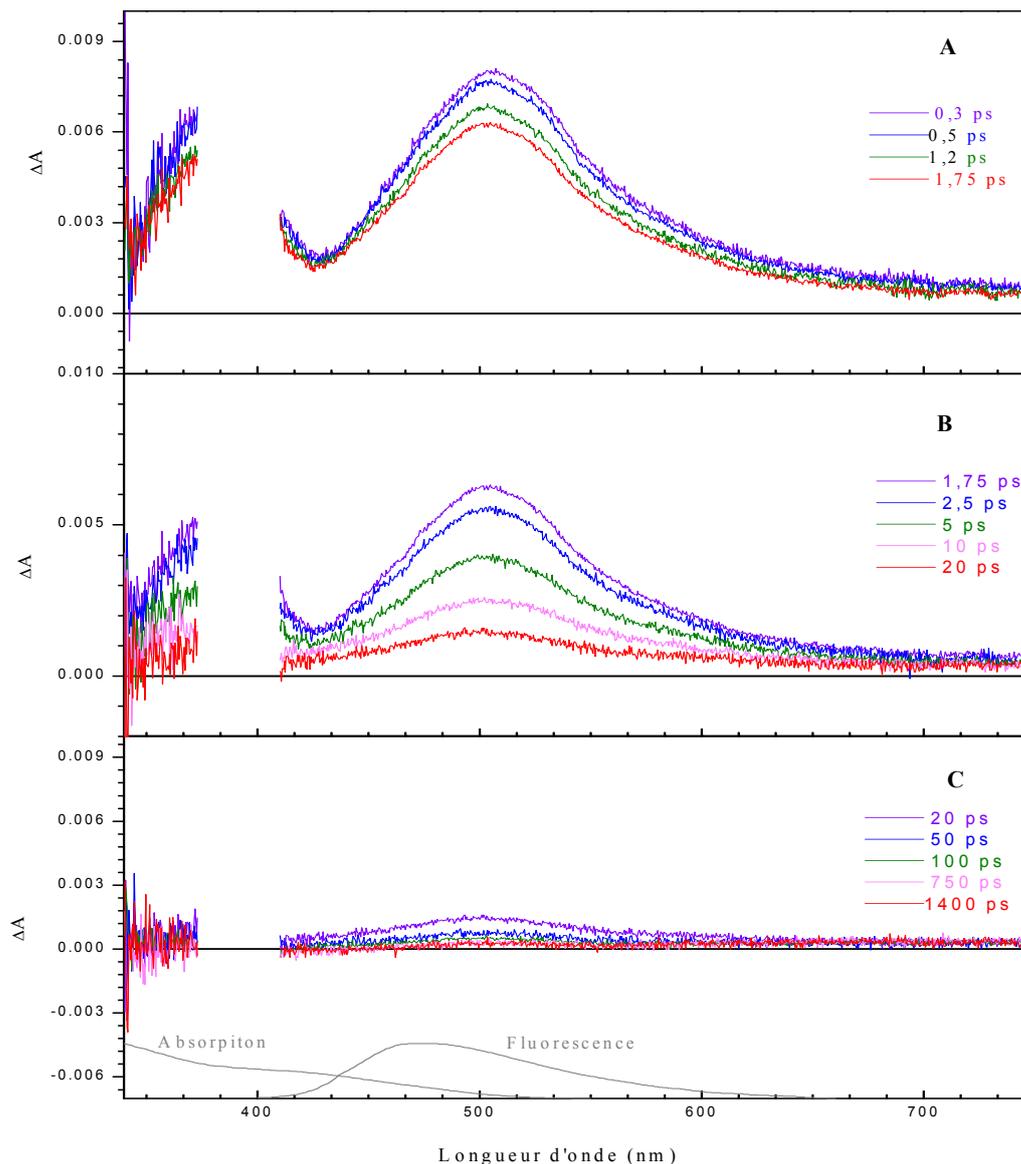


Figure 2.9 : Spectres d'absorption transitoire de FADH₂ à basse fluence ($j = 0,13$) en solution tampon aux phosphates à pH 5,6, mesurés après excitation à 387,5 nm pour des retards pompe-sonde de 0,3 ps à 1,75 ps (A), de 1,75 ps à 20 ps (B) et de 20 ps à 1400 ps (C). Les spectres normalisés d'absorption et de fluorescence (extrait de la référence de Kao et al. [44]) stationnaires de FADH₂ sont indiqués en gris.

2.2.2.1.2 Analyse cinétique

L'analyse cinétique globale des données donne les quatre durées de vie suivantes : $\tau_1 = 0,18 \pm 0,07$ ps, $\tau_2 = 4,5 \pm 0,4$ ps, $\tau_3 = 31 \pm 6$ ps et $\tau_4 = 5 \pm 2$ ns, avec $\sigma = 1,7 \times 10^{-3}$. La Figure 2.10 présente les spectres différentiels associés aux déclin (DADS).

Le DADS1, associé à la durée de vie de 0,18 ps, pourrait traduire la dynamique de relaxation du solvant autour de l'état excité de FADH₂, même si l'analyse globale décrit mal le déplacement continue des bandes transitoires et que pour les autres échantillons le temps

observé se situe plutôt entre 0,5 ps et 1 ps. La contribution de relaxation structurale pourrait être moins grande pour FADH₂.

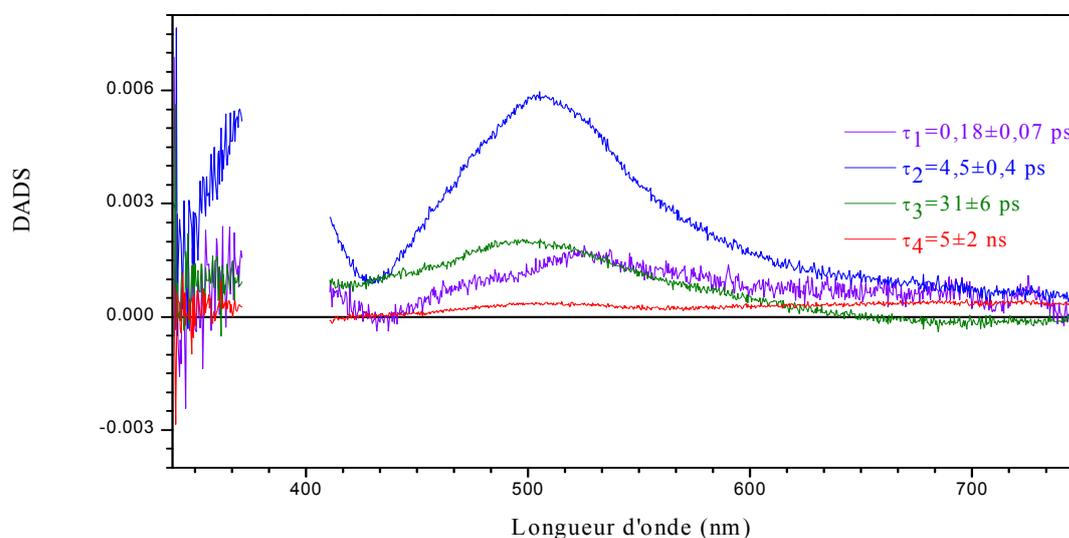


Figure 2.10 : Spectres de facteurs pré-exponentiels ou DADS associés aux durées de vie de 0,4 ps, 4,0 ps, 32 ps et 3,0 ns, FADH₂ à basse fluence ($j = 0,13$) en solution aqueuse (pH = 5,6).

Les trois dernières composantes temporelles sont du même ordre de grandeur que celles trouvées pour FADH⁻. Le DADS2 (4,5 ps) est plus intense que le DADS3 (31 ps), contrairement à ce qui a été observé pour FADH⁻.

Le déclin de durée de vie de 5 ns a une amplitude faible. De par sa ressemblance au DADS4 de FADH⁻, nous l'assignons provisoirement au déclin de l'électron hydraté formé par ionisation biphotonique de FADH₂. Nous essayerons de prouver cette attribution dans la section suivante, en répétant l'expérience à une fluence d'excitation plus élevée.

2.2.2.2 Haute fluence

2.2.2.2.1 Analyse spectrale

La Figure 2.11 montre les spectres d'absorption transitoire de FADH₂ en solution ($A_{375} = 0,29$ pour 1 mm de trajet optique, $C = 0,74$ mmol L⁻¹), après excitation par des impulsions de 50 fs à 387,5 nm, et de 0,3 μJ, focalisées sur une section de l'échantillon de l'ordre de 4800 μm². La fluence réduite j vaut 0,30 et est donc 2,3 fois plus grande que celle de l'expérience précédente. Les expériences ont été menées en dessous du seuil de saturation même si nous nous en rapprochons.

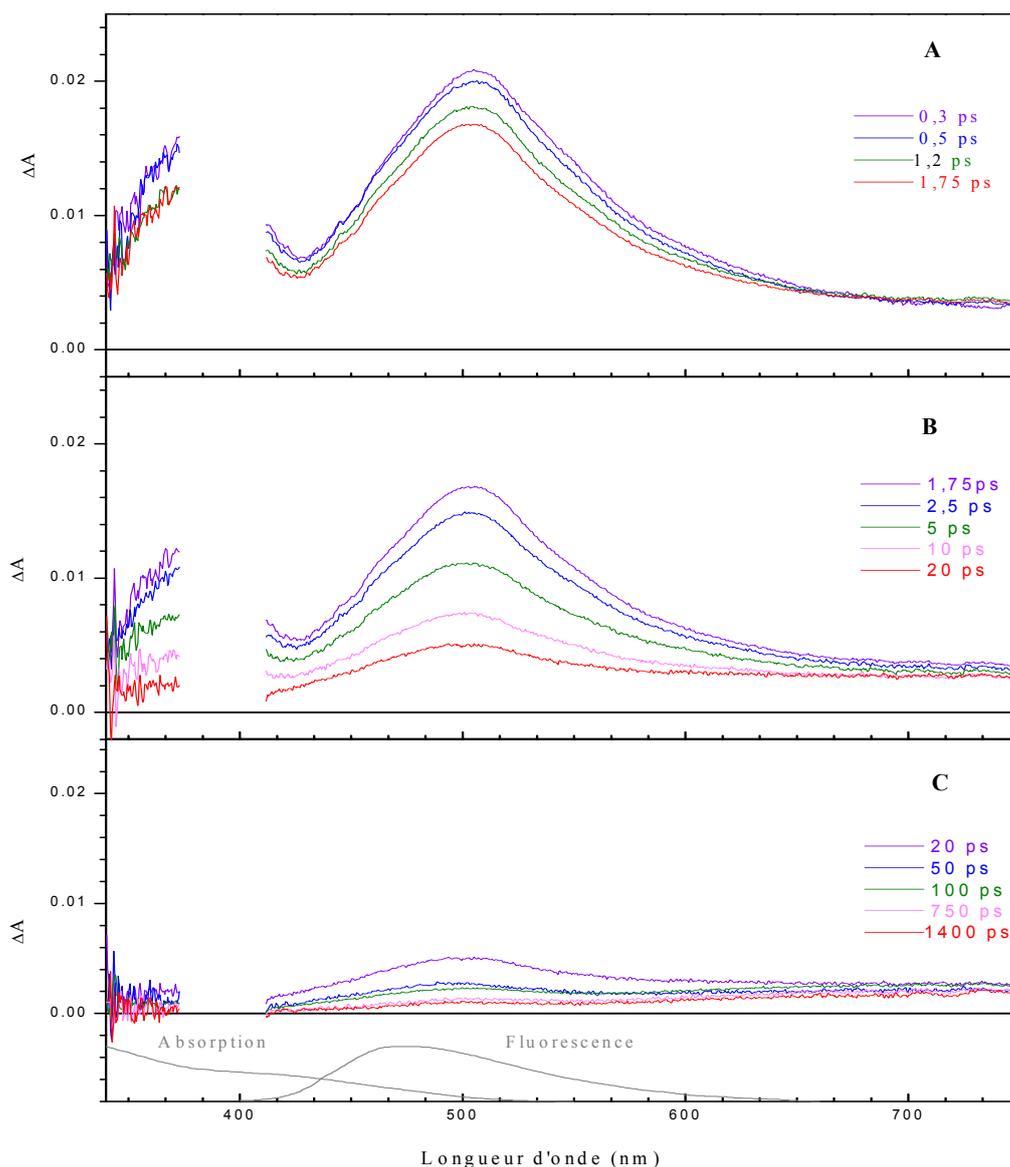


Figure 2.11 : Spectres d'absorption transitoire de FADH₂ à haute fluence ($j = 0,3$) en solution tampon aux phosphates à pH 5,6, mesurés après excitation à 387,5 nm pour des retards pompe-sonde de 0,3 ps à 1,75 ps (A), de 1,75 ps à 20 ps (B) et de 20 ps à 1400 ps (C). Les spectres normalisés d'absorption et de fluorescence (extrait de la référence de Kao et al. [44]) stationnaires de FADH₂ sont indiqués en gris.

Les spectres différentiels sont identiques à ceux obtenus à basse fluence sauf que nous relevons un point isobestique temporaire à 681 nm pour des retards pompe-sonde de 0,3 ps à 1,75 ps. Une autre différence importante est la présence d'une bande large positive plus intense à 1400 ps.

2.2.2.2.2 Analyse cinétique

La même procédure est suivie pour réaliser l'analyse cinétique des données. Cette analyse conduit aux durées de vie suivantes : $\tau_1 = 0,4 \pm 0,2$ ps, $\tau_2 = 4,0 \pm 0,2$ ps, $\tau_3 = 32 \pm 2$ ps

et $\tau_4 = 3,0 \pm 0,3$ ns, avec $\sigma = 2,2 \times 10^{-3}$. Ces temps sont similaires à ceux trouvés à basse fluence. Les DADS pour FADH₂ à haute fluence sont représentés sur la Figure 2.12.

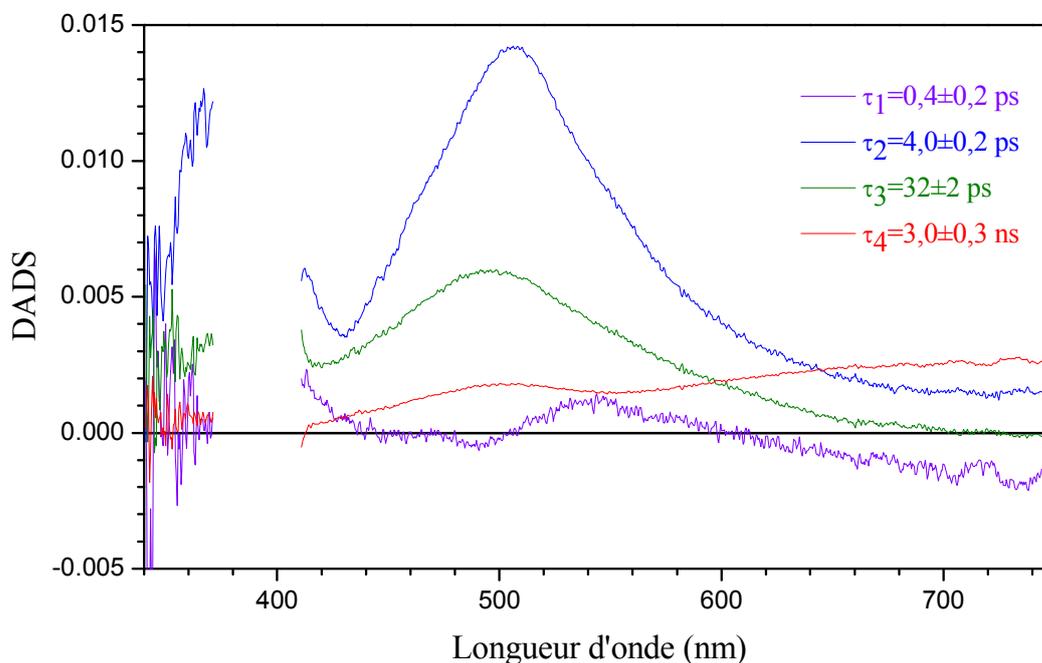


Figure 2.12 : Spectres de facteurs pré-exponentiels ou DADS associés aux durées de vie de 0,4 ps (violet), 4,0 ps (bleu), 32 ps (vert foncé) et 3,0 ns (rouge) pour FADH₂ à haute fluence ($j = 0,3$) en solution aqueuse (pH = 5,6).

Ces DADS ressemblent à ceux obtenus à basse fluence, sauf que le DADS4 (déclin de 3,0 ns) est beaucoup plus important à haute fluence. Une autre différence importante est que le DADS1, associé au temps de 0,4 ps, présente un signal négatif pour des longueurs d'onde supérieures à 598 nm, ainsi qu'une structure négative à 494 nm. Nous avons rapporté des différences similaires de DADS en fonction de la fluence d'excitation pour FADH⁻.

Comme pour FADH⁻, nous proposons que les DADS2 (4,0 ps) et DADS3 (32 ps) s'expliquent selon l'interprétation de Kao et al. [44], à savoir qu'ils représenteraient la désactivation de la population de l'état excité qui évolue, plus ou moins longtemps suivant les trajectoires, sur une surface de potentiel jusqu'à rencontrer une intersection conique avec l'état fondamental. Il faut noter que contrairement à FADH⁻, pour FADH₂, nous observons que le DADS2 est plus intense et plus fin que le DADS3. Ceci pourrait être dû au fait que l'intersection conique n'est pas rencontrée de façon identique pour ces deux molécules, ce qui est cohérent avec le fait que le pliage de type papillon est plus intense dans FADH₂ que dans FADH⁻.

2.2.2.2.3 Présence de l'électron hydraté

L'augmentation de l'amplitude du DADS4 avec la fluence va nous permettre de vérifier si cette signature provient de l'électron hydraté comme nous le supposons. La formation d'électron hydraté par ionisation de l'eau est exclue car aucun signal n'est observé dans les mêmes conditions pour le solvant pur. L'ionisation de FADH_2 conduirait à l'électron hydraté et à la flavine semi-réduite $\text{FADH}_2^{\bullet+}$ ou, après déprotonation de ce radical, à FADH^\bullet (le pKa de ce couple vaut 2, ce qui signifie que la déprotonation est thermodynamique favorable à pH 8). Nous avons examiné ces deux possibilités en reconstruisant le spectre d'absorption différentiel attendu dans un cas comme dans l'autre. Nous possédions déjà le spectre de l'électron hydraté et du radical RFH^\bullet (pour jouer le rôle du radical FADH^\bullet) en solution aqueuse (cf. la partie 2.1.2.2.3). Nous avons utilisé le spectre de $\text{RFH}_2^{\bullet+}$, rapporté uniquement en solution aqueuse [151], pour remplacer celui de $\text{FADH}_2^{\bullet+}$. La comparaison du DADS4 au spectre différentiel de RFH^\bullet et de l'électron hydraté n'est pas de bonne qualité. En revanche le DADS4 se compare très bien au spectre différentiel de $\text{RFH}_2^{\bullet+}$ et de l'électron hydraté. La Figure 2.13 donne un ajustement du DADS4 avec la concentration optimale du couple $\text{RFH}_2^{\bullet+}$ /électron hydraté. Cet ajustement est de bonne qualité ($R^2 = 0,98$) et confirme l'attribution du DADS4 au couple $\text{FADH}_2^{\bullet+}$ et électron hydraté.

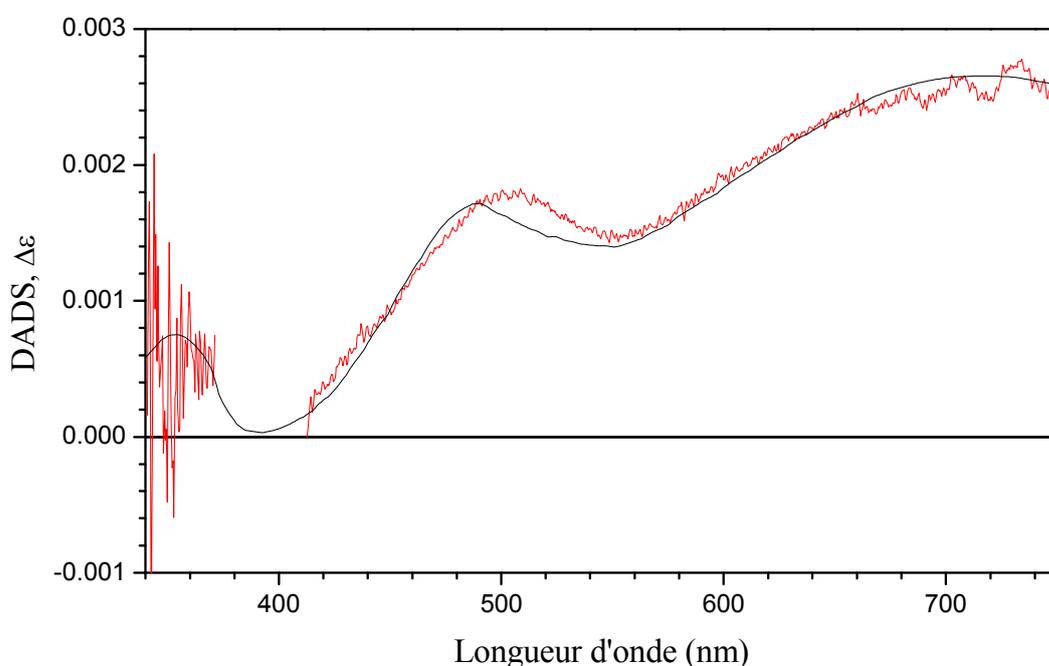


Figure 2.13 : DADS normalisé associé à la durée de vie de 3,0 ns (rouge) et spectre reconstruit normalisé de $\text{RFH}_2^{\bullet+}$ - FADH_2 [151] et de l'électron hydraté [155, 156] (noir).

Le DADS1 (0,4 ps) présentant à haute fluence des valeurs négatives pour des longueurs d'onde supérieures à 600 nm, comme pour FADH⁻ à haute fluence, pourrait ici aussi traduire en partie (en plus de la contribution de dynamique de solvation et de relaxation structurale de la molécule) la formation rapide de l'électron hydraté en solution aqueuse [160].

2.2.2.2.4 Origine de la formation de l'électron hydraté

La Figure 2.14 montre la dépendance de l'absorbance différentielle de FADH₂ dans la bande AT, pour un retard pompe-sonde fixe de 2 ps, en fonction de l'énergie d'excitation pour des valeurs d'énergie se situant soit à basse fluence (j autour de 0,1, Figure 2.14-A) soit à haute fluence (j autour de 0,3, Figure 2.14-B). À 2 ps nous observons à la fois les contributions dues à l'état excité à un photon de FADH₂ et celles des espèces résultant de l'ionisation de la molécule. Cependant, dans la région spectrale de 700 nm, la contribution de l'électron hydraté est majoritaire.

À basse comme à haute fluence, nous voyons qu'autour de 700 nm la pente de la droite obtenue en présentation log-log se situe entre 1,6 et 1,8. Ceci prouve que l'électron hydraté est bien formé par ionisation biphotonique de FADH₂. Comme pour FADH⁻, le rapport des concentrations d'électron hydraté obtenues à haute et basse fluence vaut 7, alors que celui des fluences vaut 2,3, ce qui est également compatible avec l'hypothèse de l'ionisation biphotonique ($7 = 2,3^{2,3} \approx 2,3^2$).

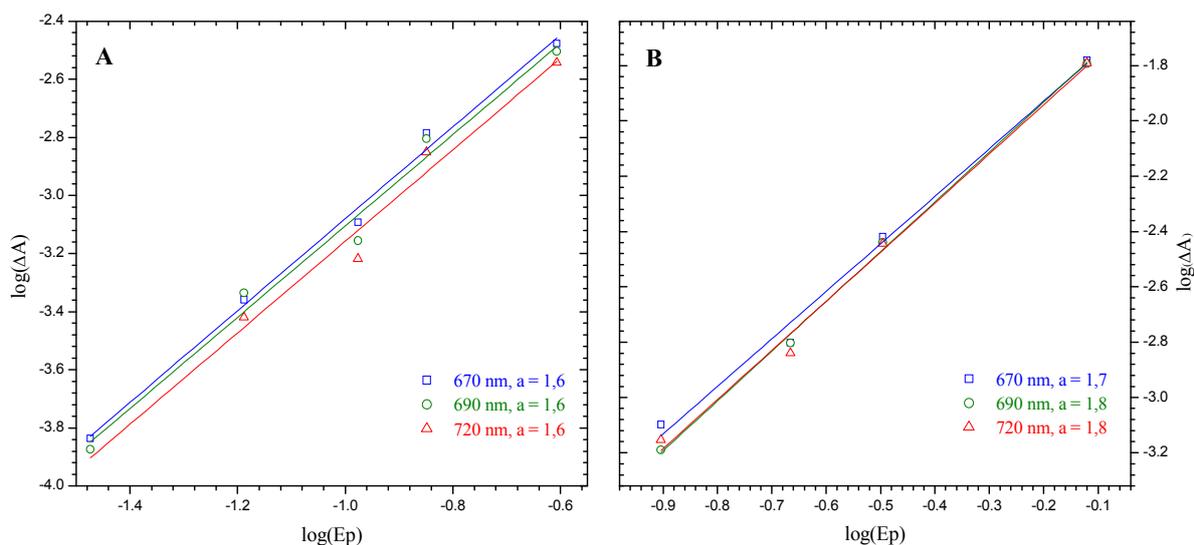


Figure 2.14 : Dépendance en énergie d'excitation de l'absorbance différentielle à 670 nm (carrés bleu), 690 nm (ronds vert foncé) et 720 nm (triangles rouge) de FADH₂ représentée sur une double échelle logarithmique à basse fluence ($j = 0,1$, A) et haute fluence ($j = 0,3$, B) pour un retard pompe-sonde de 2 ps. Les droites correspondent aux ajustements linéaires dont les coefficients directeurs figurent en légende et sont notés a.

Nous proposons finalement un modèle cinétique assez voisin de celui de FADH^- , représenté sur la Figure 2.14. Le premier déclin sub-ps est un mélange de deux contributions : formation d'électron hydraté produit par ionisation biphotonique et solvation de l'état excité à un photon de FADH_2 . L'excitation à un photon de FADH_2 entraîne un mécanisme différent de désactivation en 4 ps et 32 ps, qui pourrait correspondre à une évolution de la population excitée le long d'une surface de potentiel impliquant la coordonnée de pliage papillon et conduisant à une intersection conique. La durée de vie de 3 ns est attribuée à la disparition de la paire radical cation $\text{FADH}_2^{\bullet+}$ / électron hydraté, possiblement par recombinaison de charge géminée étant donnée la vitesse assez élevée (non contrôlée par la diffusion) du processus.

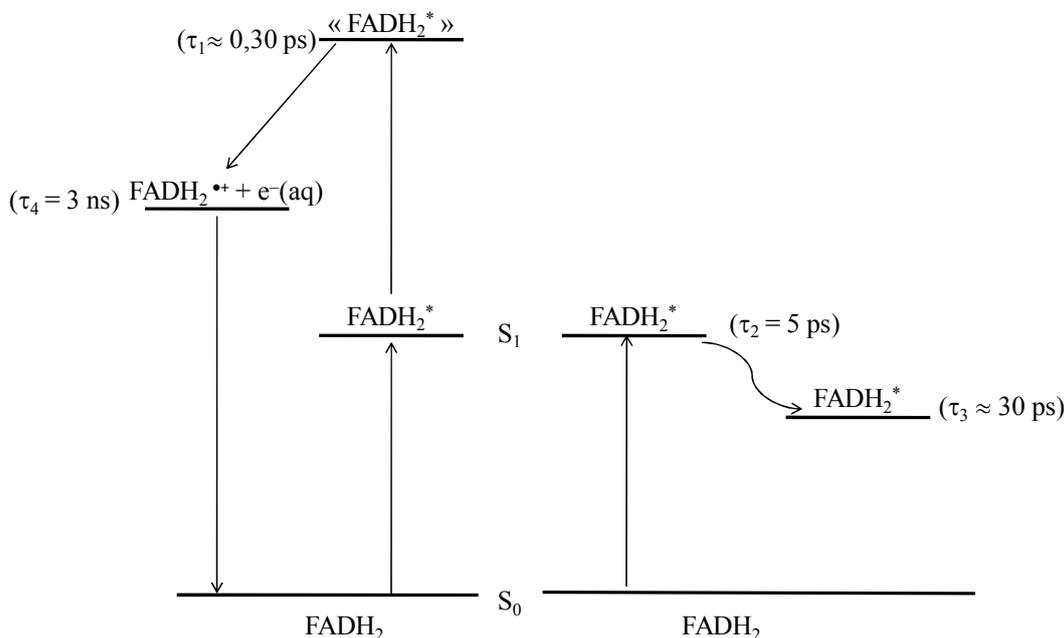


Figure 2.15 : Modèle cinétique proposé pour décrire la photophysique intrinsèque de FADH_2 en solution aqueuse. La flèche incurvée symbolise un déplacement sur la surface de potentiel du premier état électronique excité. L'état d'arrivée de la formation d'électron hydraté biphotonique est symbolisé par « ».

3 Photoantenne : MTHF

Comme il a été vu au chapitre I, le 5,10-méthényl-tétrahydrofolate, noté MTHF, est la photoantenne la plus souvent présente chez les photolyases et les cryptochromes.

À notre connaissance, le MTHF en solution aqueuse n'a été étudiée que par spectroscopie de fluorescence résolue en temps. Kim et al. [98] trouvèrent que le MTHF libre présente un déclin unique du premier état excité avec une durée de vie inférieure à 30 ps dans l'eau, la résolution temporelle de leur expérience étant trop faible pour déterminer précisément cette durée. En augmentant la viscosité ou en diminuant la polarité du solvant, le déclin de MTHF excité augmente. Ils trouvèrent une durée de 105 ps dans le pentan-1-ol. Par spectroscopie d'absorption transitoire avec une résolution sub-100 fs, nous décrirons succinctement la photophysique intrinsèque de MTHF dans l'eau. Cette étude nous servira aussi de référence pour l'étude des chromophores au sein de la protéine OtCPF2 (cf. le chapitre IV).

3.1 Analyse spectrale

Les spectres d'absorption transitoire de MTHF en solution acide à pH 2,0 (afin d'éviter une hydrolyse de MTHF en 10-formyl-tétrahydrofolate, noté 10-FTHF [162]), après excitation par des impulsions de 50 fs à 387,5 nm pour des retards pompe-sonde allant de 0,1 ps à 300 ps sont représentés sur la Figure 3.1. Les impulsions de la pompe ont ici une énergie de 0,11 μJ , focalisées sur une section de l'échantillon de l'ordre de 4800 μm^2 . Les expériences sont menées en régime linéaire.

Ces spectres présentent : deux bandes positives dominées par de l'absorption transitoire (AT : 405-502 nm et AT-IR : 655-750 nm), une bande négative résultant du blanchiment entre 340 nm et 370 nm et une deuxième bande négative entre 502 nm et 655 nm correspondant à des contributions d'émission stimulée.

L'évolution des spectres différentiels de MTHF est assez simple : entre 0,1 ps et 1 ps, un affinement de faible amplitude est observé sur le bord rouge de la bande AT ; entre 1 ps et 300 ps, l'évolution est un déclin homothétique rapide de toutes les bandes ; enfin au-delà de 300 ps, aucun signal significatif n'est observé.

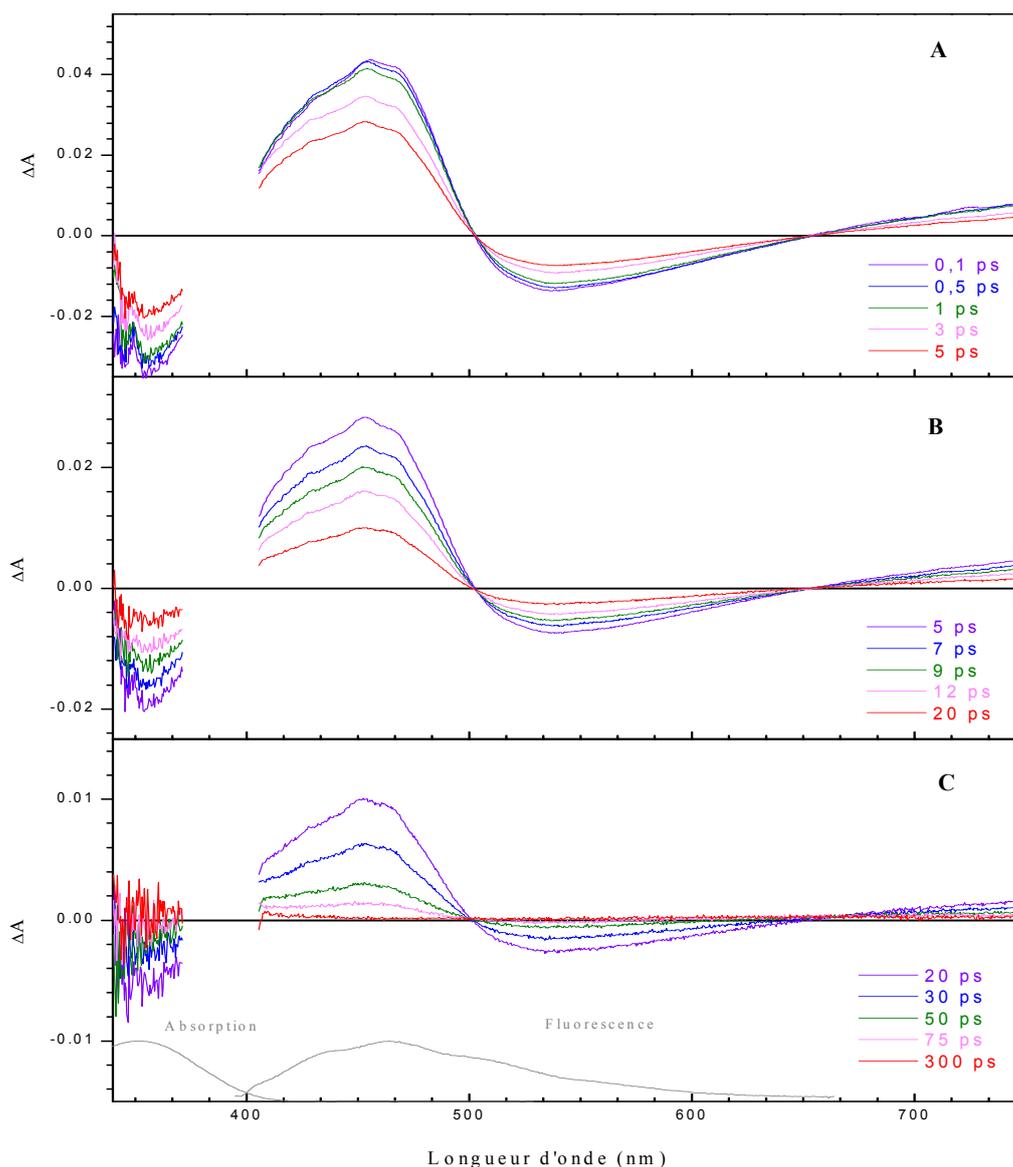


Figure 3.1 : Spectres d'absorption transitoire de MTHF en solution acide à pH 2,0, mesurés après excitation à 387,5 nm pour des retards pompe-sonde de 0,1 ps à 5 ps (A), de 5 ps à 20 ps (B) et de 20 ps à 300 ps (C). Les spectres d'absorption et de fluorescence de MTHF en solution acide à pH 2,0 sont donnés en gris.

3.2 Analyse cinétique

Les cinétiques correspondantes aux spectres différentiels de MTHF sont ajustées globalement par la somme de trois fonctions exponentielles convoluées à une gaussienne. Les durées de vie ainsi obtenues sont les suivantes: $\tau_1 = 0,70 \pm 0,06$ ps, $\tau_2 = 6,6 \pm 0,2$ ps et $\tau_3 = 31 \pm 2$ ps, avec $\sigma = 3,5 \times 10^{-3}$. Les DADS correspondants sont représentés sur la Figure 3.2.

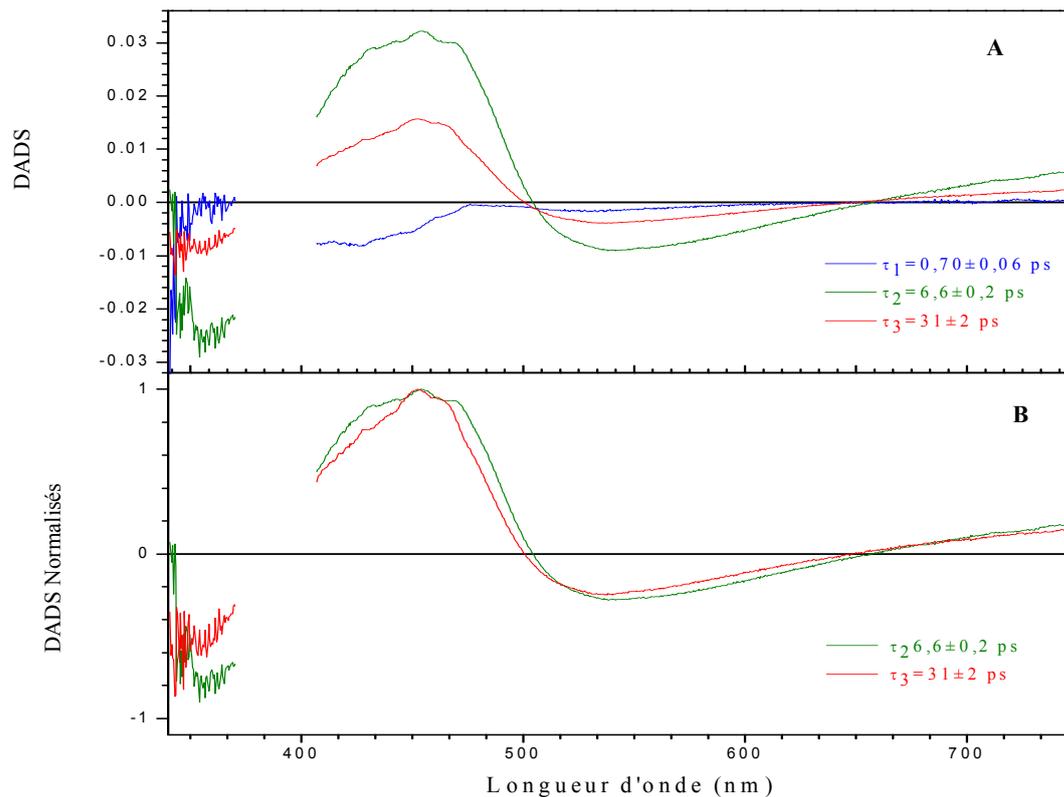


Figure 3.2 : A : Spectres de facteurs pré-exponentiels ou DADS associés aux durées de vie de 0,70 ps (bleu), 6,6 ps (vert) et 31 ps (rouge) pour MTHF en solution aqueuse acide (pH=2,0). B : DADS2 et DADS3 normalisés vers 470 nm.

Le temps de 0,70 ps est voisin du temps long de la dynamique de solvation dans l'eau (880 fs) [150]. Un faible affinement de la bande AT est observé sur le bord rouge pour des retards pompe-sonde de 0,1 ps à 1 ps. Cette première étape est par conséquent assignée à la relaxation du solvant autour de l'état excité de MTHF.

Le DADS2 (assigné à la durée de vie de 6,6 ps) est plus intense que le DADS3 (31 ps). Après normalisation au maximum de la bande AT, les DADS2 et DADS3 ne sont pas totalement superposables. Le DADS3 présente un signal plus étroit dans les bandes AT et d'émission stimulée. Nous n'observons pas la formation de l'état triplet du MTHF, puisqu'aucun signal n'est enregistré pour des retards pompe-sonde supérieurs à 300 ps. La disparition rapide de l'état excité de MTHF est possiblement liée à une conversion interne efficace. Le déclin bimodal pourrait s'expliquer par l'existence possible de conformères.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les résultats de notre étude sur la photophysique intrinsèque des flavines oxydées FMN_{ox} et FAD_{ox}. Cette étude nous a permis de montrer qu'en solution concentrée les flavines oxydées monomériques et dimériques coexistent. Nous les avons caractérisées par leurs spectres de coefficient d'extinction molaire. Nous attribuons aux dimères la composante temporelle de ~30 ps, observée pour ces flavines oxydées dans les expériences de spectroscopie d'absorption transitoire de Kao et al. [44] et attribuées au déclin de l'état à transfert de charge intramoléculaire formé par transfert d'un électron de l'adénine à l'isoalloxazine excitée dans la conformation fermée de la molécule. Nous observons en revanche une trace spectrale de cet état à transfert de charge accompagnant le déclin de l'état excité de FAD_{ox} en conformation fermée. Nous interprétons cette trace comme une preuve du fait que la désactivation de l'état à transfert de charge par recombinaison est plus rapide que sa formation, sans toutefois être si rapide qu'elle devienne indétectable.

L'étude spectroscopique des flavines adénines dinucléotides réduites nous a permis de prouver l'existence d'une voie d'ionisation biphotonique de FADH⁻ et FADH₂ conduisant à la formation de radicaux FADH[•] et FADH₂^{•+}, respectivement, et d'électron hydraté.

Les expériences menées sur la photoantenne MTHF nous ont permis de mesurer, pour la première fois, la cinétique de désactivation de son premier état excité singulet, en solution aqueuse, avec une résolution femtoseconde. Le déclin bimodal (6 et 30 ps) de l'état excité pourrait être lié à la présence de deux conformères. La durée de vie picoseconde de l'état excité et l'absence de formation de l'état triplet pourrait traduire une conversion interne efficace.

Nous avons déjà vu que le chromophore présent dans les protéines CPF est FAD et parfois la photoantenne MTHF est aussi présente. Les spectres différentiels décrits dans ce chapitre, nous serviront de spectres de référence lors de la présentation de nos travaux sur les chromoprotéines OtCPF1 (une (6-4) photolyase) et OtCPF2 (un cryptochrome DASH) dans les chapitres suivants.

**CHAPITRE III : Étude spectroscopique de la
photolyase (6-4) de *Ostreococcus tauri***

Introduction

Dans la partie 3 du chapitre I, il a été vu que l'analyse phylogénétique de OtCPF1 indique que cette chromoprotéine appartiendrait à la fois aux groupes des photolyases (6-4) et des cryptochromes animaux. Le groupe Bowler a, par ailleurs, montré que OtCPF1 présente une probable double fonctionnalité [2] :

- réparation de l'ADN endommagé présentant des défauts (6-4) ;
- répression de l'expression de gènes impliqués dans le rythme circadien.

Il faut souligner que OtCPF1 n'a fait l'objet d'aucune étude spectroscopique antérieure.

Comme nous ne connaissions initialement pas la nature des chromophores présents dans OtCPF1, nous les avons dans un premier temps précisément identifiés par spectroscopies d'absorption et de fluorescence stationnaires (première partie de ce chapitre). Nous avons travaillé sur des échantillons purifiés par chromatographie d'affinité après surexpression de OtCPF1 dans *E. coli* en fusion avec une autre protéine, servant de marqueur pour la purification, la glutathion-S-transférase (GST, cf. la partie 3 du chapitre VI).

Nous avons vu au chapitre I que si la photoréduction de la photolyase CPD de *E. coli* (EcCPD) portant FADH[•] a fait l'objet de plusieurs études approfondies par spectroscopies résolues en temps [5-7, 9, 10], très peu d'expériences de cette nature ont été menées sur la photoréduction des protéines CPF en général et des photolyases (6-4) en particulier [20, 135]. La contribution la plus intéressante de Kao et al. [20] est en fait très récente et était encore inconnue lorsque nous avons commencé ce travail. Le mécanisme de photoréduction de FADH[•] dans EcCPD proposé par les groupes Brettel et Vos [5-7, 9, 10] met en jeu des sauts d'électron successifs le long d'une chaîne de trois résidus tryptophanes (cf. la partie 2.4 du chapitre I), chaîne qui est conservée dans toutes les protéines CPF. Ainsi qu'il a déjà été décrit dans l'introduction générale, nous avons voulu vérifier si le même mécanisme de photoréduction était à l'œuvre dans OtCPF1, laquelle contient également cette chaîne de tryptophanes (cf. la partie 1.2.2 du chapitre V). Nous allons voir que la protéine OtCPF1 purifiée est essentiellement oxydée et contient donc une forte proportion de FAD_{ox}. Nous avons donc décidé de mettre à profit cette situation pour étudier la photoréduction de FAD_{ox} ce qui n'avait pas été fait précédemment pour des protéines CPF. Il était en effet connu que la photoréduction de FAD_{ox} par des résidus aromatiques voisins dans d'autres flavoprotéines

pouvait être extrêmement rapide (régime sub-picoseconde) [16, 17, 136, 163-165]. Cette propriété est particulièrement intéressante puisque les groupes Brettel et Vos avaient montré que l'étape cinétiquement déterminante du mécanisme de photoréduction de FADH[•] dans EcCPD est la réduction primaire de la flavine qui a lieu en 30 ps. Si ce même mécanisme se retrouve dans OtCPF1, nous pouvons alors espérer que d'autres étapes pourraient être temporellement résolues, en observant la photoréduction de FAD_{ox}. Ceci a donc constitué notre objectif en utilisant la spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde comme outil d'investigation. Avant toute expérience de ce type, il est nécessaire de s'assurer que l'échantillon est stable chimiquement, temporellement et sous irradiation. La deuxième partie du chapitre sera donc consacrée à ces études préliminaires aboutissant à l'optimisation des conditions expérimentales pour réaliser des expériences d'absorption transitoire sur OtCPF1.

Notons que les résultats des deux premières parties ont déjà été publiés [166].

Nous présenterons dans la dernière partie du chapitre, l'étude par spectroscopie d'absorption transitoire de la photoréduction de FAD_{ox} chez OtCPF1.

1 Caractérisation spectrale de OtCPF1

1.1 Nature du cofacteur flavine

Comme nous l'avons vu au chapitre I, après purification des protéines CPF, le cofacteur flavine existe sous différentes formes d'oxydo-réduction dans la protéine. Afin de nous assurer que le cofacteur présent dans OtCPF1 est une flavine, nous avons récupéré, par dénaturation, les chromophores et non liés par liaison covalente à OtCPF1.

La dénaturation d'une protéine correspond à la rupture des interactions covalentes et non covalentes qui la maintiennent dans sa conformation tridimensionnelle native. La dénaturation d'une protéine peut s'effectuer en la chauffant à 65°C. Après dénaturation par chauffage de OtCPF1, le surnageant est séparé des protéines précipitées par centrifugation. Le surnageant, contenant les chromophores libres non liés par liaison covalente à la protéine, est étudié par spectroscopies électroniques stationnaires. La Figure 1.1 montre le spectre d'absorption du surnageant de OtCPF1 dénaturée. Ce spectre d'absorption présente deux bandes larges centrées à 450 nm et 373 nm, qui correspondent, respectivement, aux transitions de l'état fondamental S_0 aux états électroniques excités singulet S_1 et S_2 d'une flavine en solution polaire [3, 24] (cf. le chapitre II). Le rapport des absorbances à 450 nm et à 373 nm vaut 1,2, ce qui est caractéristique d'une flavine oxydée en milieu polaire [24].

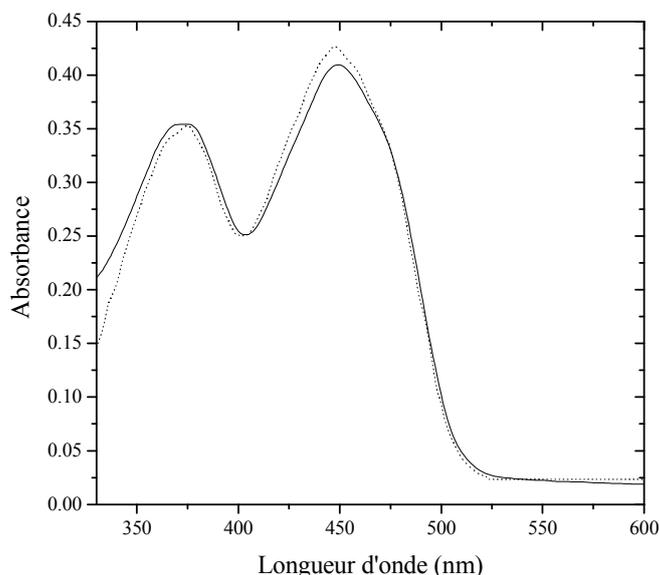


Figure 1.1 : Spectre d'absorption stationnaire de OtCPF1 après dénaturation par chauffage (trait plein). Les pointillés montrent un ajustement paramétrique de ce spectre par celui de FAD_{ox} en solution (extrait de l'article de Song et al. [153]).

Afin de pouvoir déterminer si la flavine présente dans OtCPF1 est une flavine adénine dinucléotide ou une autre flavine (flavine mononucléotide, riboflavine, ...) indiscernable par spectroscopie d'absorption, la fluorescence de la flavine présente dans le surnageant de OtCPF1 dénaturée est mesurée à différents pH.

En milieu neutre, l'adénine et l'isoalloxazine de FAD forment un complexe intramoléculaire par interaction π , entraînant une inhibition de fluorescence par transfert d'électron depuis l'adénine vers l'isoalloxazine excitée [42, 47]. Lors de l'acidification du milieu, l'adénine de FAD est protonée en N1' (pKa de 4,2, cf. la Figure 1.1 du chapitre I) et l'inhibition de fluorescence est ainsi perdue par ouverture du complexe intramoléculaire [39].

La fluorescence du surnageant d'un échantillon dénaturé de OtCPF1, excitée à 450 nm, est mesurée à pH 8,0 et à pH 3,0 (cf. la Figure 1.2).

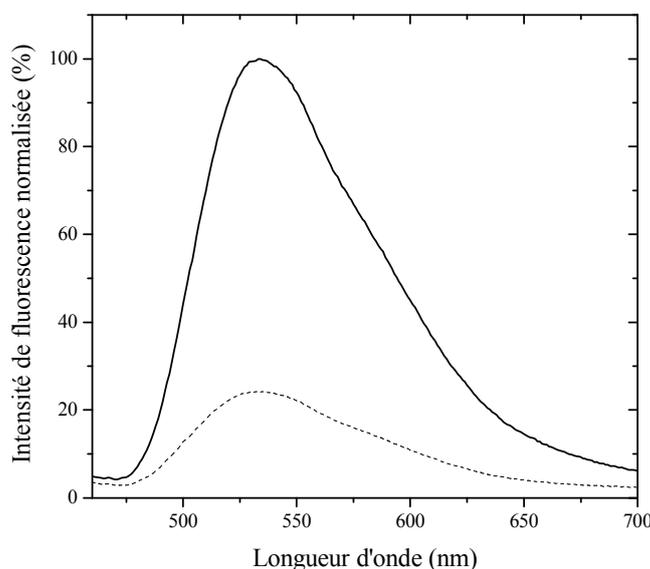


Figure 1.2 : Spectres de fluorescence ($\lambda_{exc} = 450$ nm) du surnageant de OtCPF1 dénaturée, dans une solution tampon de TRIS à pH 8,0 (en pointillés) et dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à pH 3,0 (trait plein).

Nous constatons que l'intensité maximale de la fluorescence du surnageant dénaturé est cinq fois plus grande après acidification. Il y a perte de l'inhibition de fluorescence de FAD_{ox} lors de son acidification. La flavine présente dans OtCPF1 est donc identifiée comme étant une flavine adénine dinucléotide (FAD) [167].

Afin de connaître le pourcentage relatif de chromophore par protéine, nous avons déterminé la concentration totale en FAD, ainsi que celle en apoprotéine (cf. la partie 1.4). La concentration totale en FAD est donnée par un ajustement paramétrique du spectre d'absorption stationnaire du surnageant de OtCPF1 par le spectre d'absorption de FAD sous

forme oxydée en solution aqueuse à pH 7 [153]. Nous aurions pu envisager de déterminer la concentration en FAD_{ox} à partir de l'absorbance à 450 nm du surnageant de OtCPF1 dénaturé et sachant que le coefficient d'extinction molaire à 450 nm est égal à $11200 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, mais l'ajustement paramétrique global permet de prendre en compte toutes les longueurs d'onde et de diminuer les erreurs. Nous avons vu au chapitre I que l'absorbance de FAD_{ox} dépend beaucoup de son environnement. La concentration vaut, finalement, $36,3 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (cf. la Figure 1.1).

1.2 Existence d'une photoantenne

Les protéines CPF possèdent, en général, *in vivo* un second chromophore jouant le rôle de photoantenne [19]. MTHF et 8-HDF sont les deux photoantennes les plus souvent rencontrées dans les protéines CPF [85-89]. La présence du MTHF est révélée par une bande d'absorption intense entre 375 nm et 400 nm [168, 169] et celle du 8-HDF par un pic intense et fin à 440 nm [170]. Les caractéristiques spectrales du second chromophore ne sont pas observables sur le spectre d'absorption stationnaire de OtCPF1 (cf. la Figure 1.3).

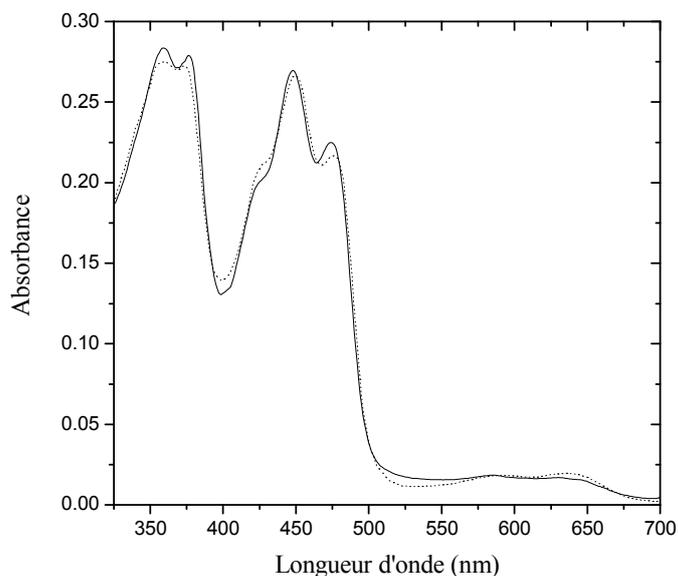


Figure 1.3 : Spectre d'absorption stationnaire de OtCPF1 (trait plein) dans une solution tampon de TRIS à pH 8,0 et à 5°C. Les pointillés montrent l'ajustement de ce spectre par une somme pondérée des spectres de coefficient d'extinction molaire des différentes formes d'oxydo-réduction de FAD dans la photolyase (6-4) de *Xenopus laevis* (extraits de l'article de Schleicher et al. [159]).

Nous verrons dans la partie 1.3 que nous pouvons reproduire assez fidèlement le spectre d'absorption de OtCPF1 par une somme pondérée des spectres des différents états d'oxydo-réduction de FAD (cf. l'ajustement en pointillés sur la Figure 1.3) sans nécessairement ajouter une espèce supplémentaire absorbant entre 320 nm et 700 nm. Cet

argument permet de conclure que ni MTHF, ni 8-HDF ne sont présents dans OtCPF1 après purification.

L'absence de second chromophore, après purification, a déjà été rapportée pour d'autres photolyases (6-4) appartenant à divers organismes (*A. thaliana*, *X. laevis* et *D. melanogaster* [68, 90, 171]). Il a même été montré qu'une photoantenne peut être présente *in vivo* et absente *in vitro*. MTHF a, par exemple, été identifié dans un échantillon purifié portant encore l'extension GST de la photolyase (6-4) de *X. laevis* et ensuite perdu après élimination de cette extension [113]. Nous ne pouvons donc pas écarter la présence d'une photoantenne, MTHF ou 8-HDF, dans OtCPF1 *in vivo*.

1.3 Distribution des différents états d'oxydo-réduction de FAD

Afin d'identifier les différentes formes oxydo-réductrices de FAD possiblement présentes dans OtCPF1, après purification, nous nous sommes servis des spectres de référence des différents états d'oxydo-réduction de FAD dans la photolyase (6-4) de *X. laevis* (Xl64). Ces spectres sont représentés sur la Figure 1.4.

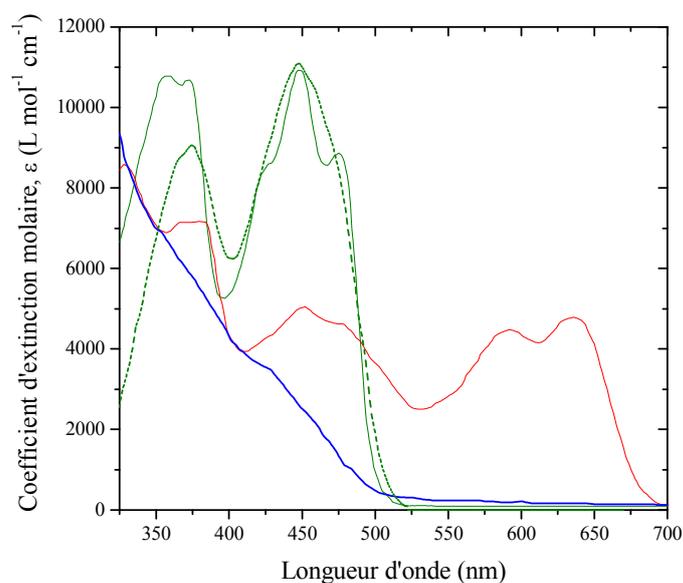


Figure 1.4 : Spectres de coefficient d'extinction molaire des différents états d'oxydo-réduction de FAD : FAD_{ox} (trait plein, vert), FADH[•] (trait plein, rouge), FADH⁻ (trait plein, bleu) dans la photolyase (6-4) de *Xenopus laevis* (extraits de l'article de Schleicher et al. [159]). Le spectre de FAD_{ox} en solution aqueuse à pH 7 (extraît de l'article de Song et al. [153]) est rappelé en pointillés verts.

La Figure 1.3 présente le spectre d'absorption de OtCPF1 en solution tampon de TRIS à pH 8,0 et à 5°C. Ce spectre d'absorption est constitué de deux bandes larges centrées à 448 nm et 360 nm, qui correspondent aux transitions de l'état fondamental S₀ aux états électroniques excités singulet S₁ et S₂. Ces bandes larges ont des sous-structures à 474 nm,

448 nm et 425 nm pour la première bande et à 376 nm et 360 nm pour la seconde. Les sous-structures, non visibles pour FAD_{ox} en solution, correspondent à une même progression vibrationnelle d'environ 1200 cm^{-1} , indiquant la présence d'un environnement restreint de FAD_{ox} au sein de la protéine (en milieu plus rigide les niveaux vibrationnels sont plus visibles) [172]. La présence de ces deux bandes signifie donc que FAD sous forme oxydée est présente dans OtCPF1.

Par ailleurs nous pouvons observer une bande additionnelle, peu intense, avec des maxima à 586 nm et 635 nm, caractéristiques de FADH^{\bullet} [159]. La présence de la forme déprotonée et semi-réduite de FAD, soit $\text{FAD}^{\bullet-}$, peut être écartée parce que ses caractéristiques spectrales ne sont pas présentes sur le spectre d'absorption de OtCPF1 : pic fin centré à 403 nm, une bande structurée entre 430 nm et 560 nm et une bande peu intense et non structurée entre 560 et 650 nm [3, 173, 174].

Comme il a été vu au chapitre II, les spectres d'absorption des deux états de protonation de la forme réduite de FAD : FADH_2 et FADH^- sont de faible intensité [23], voisins [153] et non structurés entre 320 nm et 500 nm. Il est difficile de déterminer laquelle de ces deux formes est présente dans OtCPF1. Nous rappelons que le pKa du couple $\text{FADH}_2/\text{FADH}^-$ en solution vaut 6,7 [25]. Comme nous travaillons à pH 8,0, l'espèce majoritaire devrait être FADH^- mais il demeure que nous ne connaissons ni le pH réel au sein de la cavité contenant la flavine ni le pKa local du couple $\text{FADH}_2/\text{FADH}^-$. Étant donné que l'espèce photoactive des photolyases est FADH^- [19] et que FADH^- et FADH_2 sont difficilement séparables spectroscopiquement, nous avons choisi de n'utiliser que le spectre de FADH^- pour étudier la distribution des chromophores au sein de OtCPF1.

Afin de quantifier la distribution des différents états d'oxydo-réduction de FAD dans OtCPF1, nous avons réalisé un ajustement du spectre d'absorption de OtCPF1 avec des spectres publiés de FAD porté par une protéine CPF. Les spectres des différents états d'oxydo-réduction de FAD dépendent de la protéine, photolyase CPD ou (6-4), à laquelle le chromophore est en interaction. Le spectre d'absorption de OtCPF1 présente une bande d'absorption centrée à 366 nm qui correspond à la transition S_0S_2 de FAD_{ox} dans les photolyases (6-4) de *A. thaliana* [171] et *X. laevis* [159]. Cette bande est décalée de 6 nm vers le bleu dans EcCPD [175]. De plus la bande de FADH^{\bullet} est décalée de 13 nm vers le rouge dans OtCPF1 par rapport à celle observée chez EcCPD. Le spectre d'absorption de OtCPF1 est donc mieux décrit par les spectres de FAD dans les photolyases (6-4). Afin d'avoir un ensemble de spectres de base des différentes espèces oxydo-réductrices de FAD dans la même

photolyase (6-4), nous avons choisi de travailler avec ceux correspondant à la photolyase (6-4) de *X. laevis* (notée Xl64) publiés par Schleicher et al. [159]. Nous avons exprimé ces spectres en coefficients d'extinction molaires (cf. la Figure 1.4) en normalisant le spectre de FAD_{ox} à 450 nm à la valeur de 11000 L mol⁻¹ cm⁻¹, sachant que les valeurs données dans la littérature pour FAD_{ox} en solution sont comprises entre 11000 L mol⁻¹ cm⁻¹ [176] et 14000 L mol⁻¹ cm⁻¹ [3] et dans EcCPD vaut 11200 L mol⁻¹ cm⁻¹ au maximum (440 nm) [175]. Nous pouvons noter que Schleicher et al. [159] rapportent une contribution résiduelle de FAD_{ox} dans les spectres des formes réduites, ce qui est susceptible d'induire des erreurs dans les déterminations de concentrations que nous avons déterminées.

Les concentrations de chaque état d'oxydo-réduction de FAD sont quantifiées par un ajustement global du spectre d'absorption de OtCPF1 entre 320 nm et 700 nm avec la somme pondérée des spectres de référence issus de la Xl64, selon l'équation (6.33) de la partie 4.4 du chapitre VI. Le bon accord entre l'ajustement et le spectre mesuré, représentés sur la Figure 1.3, permet d'exclure la présence d'une espèce additionnelle absorbant entre 320 nm et 700 nm. Pour un échantillon de OtCPF1 fraîchement décongelé (les échantillons purifiés et concentrés sont conservés à -80°C), l'ajustement donne la répartition des différentes espèces oxydo-réductrices suivante : 82 % FAD_{ox} ([FAD_{ox}] = 32,0 ± 0,1 μmol L⁻¹), 14% FADH[•] ([FADH[•]] = 5,3 ± 0,3 μmol L⁻¹) et 4% FADH⁻ ([FADH⁻] = 1,9 ± 0,3 μmol L⁻¹). Comme les spectres de base des espèces réduites ne sont pas entièrement purs, ces nombres sont entachés d'erreurs certainement supérieures à celles que notre algorithme d'ajustement propose. En sommant les trois concentrations, nous obtenons cependant une valeur de la concentration totale en FAD de 39,0 ± 0,7 μmol L⁻¹, proche de la valeur que nous avons obtenue à partir de FAD_{ox} libérée par dénaturation (36,3 ± 0,2 μmol L⁻¹). Ce bon accord indique que les erreurs liées à l'impureté des spectres de base sont assez limitées. En moyennant les deux valeurs de la concentration totale en FAD, nous trouvons une concentration moyenne de FAD dans OtCPF1 de 37,8 ± 0,9 μmol L⁻¹.

L'hétérogénéité des formes d'oxydo-réduction de FAD a déjà été observée pour Xl64 après purification. Il a été vu au chapitre I que l'espèce dominante supposée, *in vivo*, est FADH⁻ pour les photolyases (6-4) [177]. S'il en est de même pour OtCPF1, il est alors probable que FADH⁻ soit partiellement oxydée par le dioxygène durant la purification. Le mélange des états d'oxydo-réduction de FAD après purification n'a donc pas de signification physiologique.

1.4 Rapport molaire FAD/apoprotéine

Dans la partie précédente, nous avons déterminé la concentration totale en FAD. Afin de déterminer le rapport molaire FAD/apoprotéine, la concentration en apoprotéine est calculée par deux méthodes différentes.

La masse molaire de OtCPF1 fusionnée avec la GST est calculée à partir de la structure primaire et vaut 89 kDa. À partir de la masse d'apoprotéine précipitée après dénaturation par chauffage, nous avons pu calculer une première concentration d'apoprotéine : $58 \pm 3 \mu\text{mol L}^{-1}$.

La Figure 1.5-A montre le spectre d'absorption de OtCPF1 entre 220 nm et 320 nm après dilution de l'échantillon, puisque le coefficient d'extinction molaire théorique de l'apoprotéine est très élevé et vaut à 280 nm $162\,535 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ce coefficient est calculé en appliquant le modèle de Pace [178] à partir de la séquence d'acides aminés primaires connue de OtCPF1 et de la GST. Afin de s'affranchir de l'absorption de toute autre espèce en interaction non covalente avec la protéine, comme les flavines et les acides nucléiques (ARN, présent après purification de OtCPF1 et considéré comme un artefact expérimental, cf. la partie 3 du chapitre VI), le spectre d'absorption du surnageant après dénaturation de OtCPF1 est soustrait au spectre de OtCPF1 (cf. la Figure 1.5-B). À partir de ce dernier spectre d'absorption, nous mesurons l'absorbance à 280 nm. Par simple application de la loi de Beer Lambert, nous obtenons une seconde détermination de la concentration en apoprotéine : $55 \pm 2 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Les deux concentrations trouvées dans cette partie sont en bon accord. Cela nous permet d'utiliser par la suite la concentration moyenne en apoprotéine de OtCPF1 : $57 \pm 5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Le rapport molaire FAD/apoprotéine est donc de 66% pour OtCPF1 après purification. Ce rapport n'est pas surprenant étant donné que de nombreuses protéines CPF présentent des rapports sous-stoechiométriques [19]. Ceci est interprété comme une perte de chromophore lors de la purification.

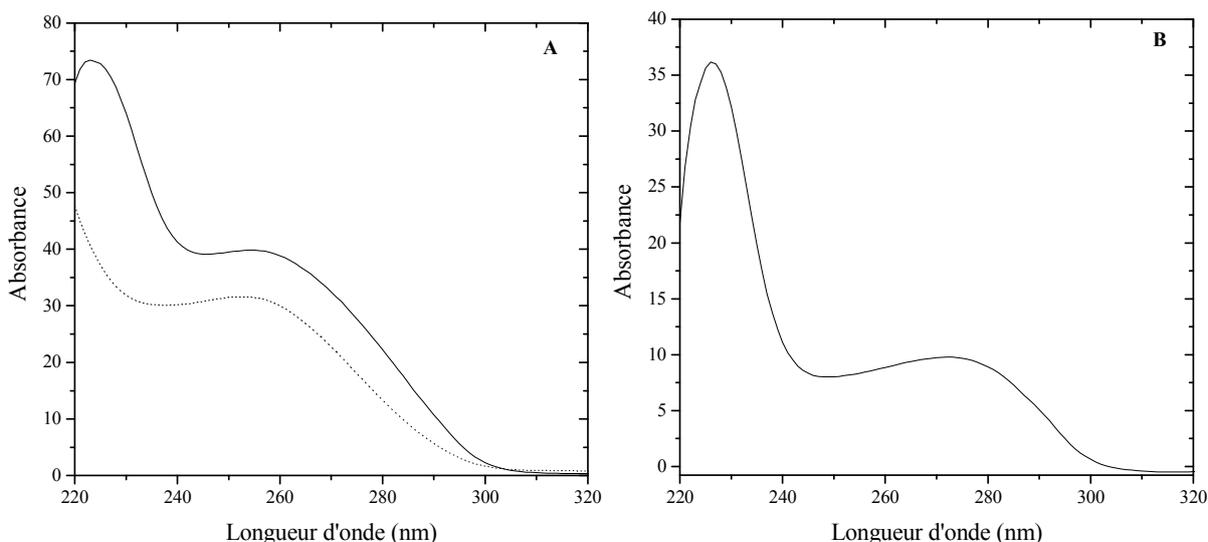


Figure 1.5 : A : spectres d'absorption stationnaires de OtCPF1 corrigés du facteur de dilution avant (trait plein) et après (pointillé) dénaturation entre 220 nm et 320 nm. B : spectre d'absorption obtenu après différence des spectres avant et après dénaturation de OtCPF1.

1.5 Présence de flavine libre

1.5.1 Spectre de fluorescence

Nous avons mesuré le spectre de fluorescence de OtCPF1 pour une excitation à 450 nm (au maximum de la première bande électronique du spectre d'absorption). Le spectre est représenté sur la Figure 1.6. Nous remarquons que le spectre de fluorescence de OtCPF1 n'est pas strictement l'image miroir attendue de la première bande électronique d'absorption qui, comme nous l'avons vu, est nettement structurée. Le spectre de fluorescence est une bande large centrée à 530 nm et sans structures. Ce spectre est en revanche similaire à celui de FAD_{ox} libre (cf. le chapitre II), tant en forme qu'en position spectrale. Le spectre de fluorescence présente un déplacement de Stokes de 3450 cm^{-1} , valeur proche de celle obtenue pour FAD_{ox} libre. Ce déplacement étant en partie dû à une réorganisation du solvant autour de l'état excité de FAD_{ox} conduisant ainsi à un état excité relaxé [24], nous pouvons douter qu'une telle valeur puisse être atteinte par FAD_{ox} portée par OtCPF1. Ces considérations suggèrent que nous observons ici la fluorescence de FAD_{ox} libre en solution et non celle de FAD_{ox} portée par la protéine.

Le fait que la fluorescence observée d'une protéine CPF soit celle d'une fraction de FAD_{ox} libre a déjà été rapporté pour le cryptochrome 3 de *A. thaliana* [153].

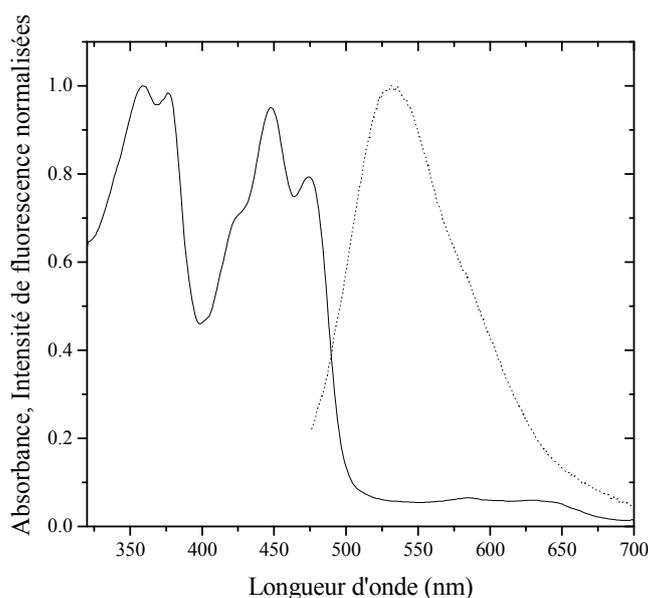


Figure 1.6 : Spectres normalisés d'absorption (trait plein) et de fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$, en pointillés) de OtCPF1 dans une solution tampon de TRIS à pH 8,0 et à 5°C.

1.5.2 Rendement quantique de fluorescence

Nous verrons dans la partie 3.2 de ce chapitre que la désexcitation de l'état excité de FAD_{ox} a lieu avec une constante de temps de 390 fs. Ce déclin ultrarapide rend le rendement quantique de fluorescence de FAD_{ox} portée par la protéine extrêmement faible. Nous pouvons en donner une estimation en employant, par exemple, une valeur de la constante radiative de la riboflavine en solution aqueuse ($\sim 5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ [34]). Le rendement ainsi calculé est de l'ordre de 2×10^{-5} , très inférieur à celui de FAD_{ox} libre en solution (0,033 pour un pH compris entre 4 et 9 [40], essentiellement dû à la conformation ouverte de la molécule).

Afin de quantifier la proportion de FAD_{ox} libre, nous avons calculé le rendement quantique de fluorescence de OtCPF1 relatif à celui de FAD_{ox} libre. Les spectres de fluorescence de OtCPF1 et FAD_{ox} libre sont enregistrés dans des conditions expérimentales strictement identiques (longueur d'onde d'excitation, largeur de fente des monochromateurs, temps d'intégration, absorbance à la longueur d'onde d'excitation). Comme le solvant est identique ici, nous pouvons nous affranchir de l'indice de réfraction du solvant. Nous mesurons l'aire (S) des bandes de fluorescence et nous corrigeons des différences éventuelles de l'absorbance (A) à la longueur d'onde d'excitation, soit 450 nm. Nous obtenons alors [179, 180] :

$$\frac{\Phi_{\text{F}}(\text{OtCPF1})}{\Phi_{\text{F}}(\text{FAD}_{\text{ox}})} = \frac{S_{\text{OtCPF1}}}{S_{\text{FAD}_{\text{ox}}}} \times \frac{1 - 10^{-A_{\text{FAD}_{\text{ox}}}}}{1 - 10^{-A_{\text{OtCPF1}}}} \quad (3.1)$$

Nous trouvons ainsi que le rapport des rendements quantiques vaut 0,08. En négligeant le rendement de fluorescence de FAD_{ox} portée par la protéine, nous en déduisons que 8% des molécules de FAD sous forme oxydée sont en solution et non pas portées par OtCPF1. Étant donné que 82% des molécules FAD sont sous forme oxydée, cela ferait 7% des molécules FAD sous forme oxydée et libre.

2 Stabilité de OtCPF1

2.1 Stabilité thermique

Il est connu que les protéines CPF peuvent se dénaturer à température ambiante [153]. La diffusion est observée quand les dimensions des particules rencontrées sont du même ordre de grandeur que la longueur d'onde de la lumière. Les protéines ont bien sûr des dimensions inférieures aux longueurs d'onde de l'UV proche et du visible. Quand elles se dénaturent, elles peuvent alors former des agrégats de taille suffisante pour diffuser la lumière et faire apparaître un fond (dit de diffusion) sur les spectres d'absorption stationnaire. Ce phénomène est très général et a par exemple été rapporté pour le cryptochrome DASH de *A. thaliana* (AtCry3) [153]. Une solution pour s'affranchir de la dénaturation des protéines est de travailler à une température inférieure à la température ambiante. Nous avons recherché à partir de quelle température la diffusion est observable après 47 minutes de conservation dans l'obscurité. Les spectres d'absorption de OtCPF1 enregistrés à différentes températures sont représentés sur la Figure 2.1. Aucune évolution spectrale n'est mise en évidence sur un échantillon de OtCPF1 conservé à 5°C pendant 47 min dans l'obscurité. En revanche un fond de diffusion massif est observable sur le spectre d'absorption de OtCPF1 à 15°C. Nous avons pour cette raison choisi de ne travailler qu'à 5°C.

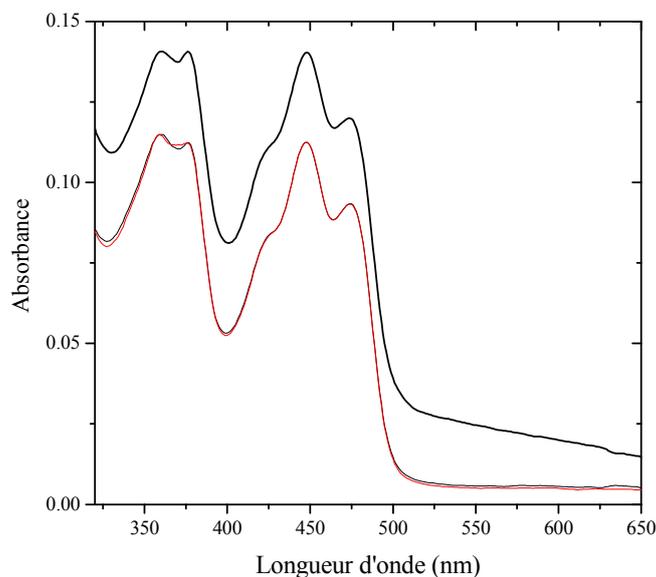


Figure 2.1 : Spectres d'absorption stationnaire de OtCPF1 à 5°C (trait plein noir), après un délai de 47 min dans l'obscurité, à 5°C (trait plein rouge) et à 15°C (trait épais noir).

2.2 Stabilité chimique

Dans cette partie, nous avons cherché à déterminer si l'échantillon de OtCPF1 est chimiquement stable, c'est-à-dire si sa composition change au cours du temps (plusieurs heures), dans l'obscurité et à 5°C. La Figure 2.2-A montre l'évolution temporelle des spectres d'absorption. Une diminution d'absorbance est observée au dessus de 500 nm et en dessous de 365 nm, en concomitance avec une augmentation de la bande centrée à 448 nm. Un point isobestique est relevé à 486 nm. Le suivi de l'évolution temporelle des concentrations en $FADH^-$, $FADH^\bullet$ et FAD_{ox} , obtenues par la décomposition spectrale décrite dans la partie 1.3, est représenté sur la Figure 2.2-B.

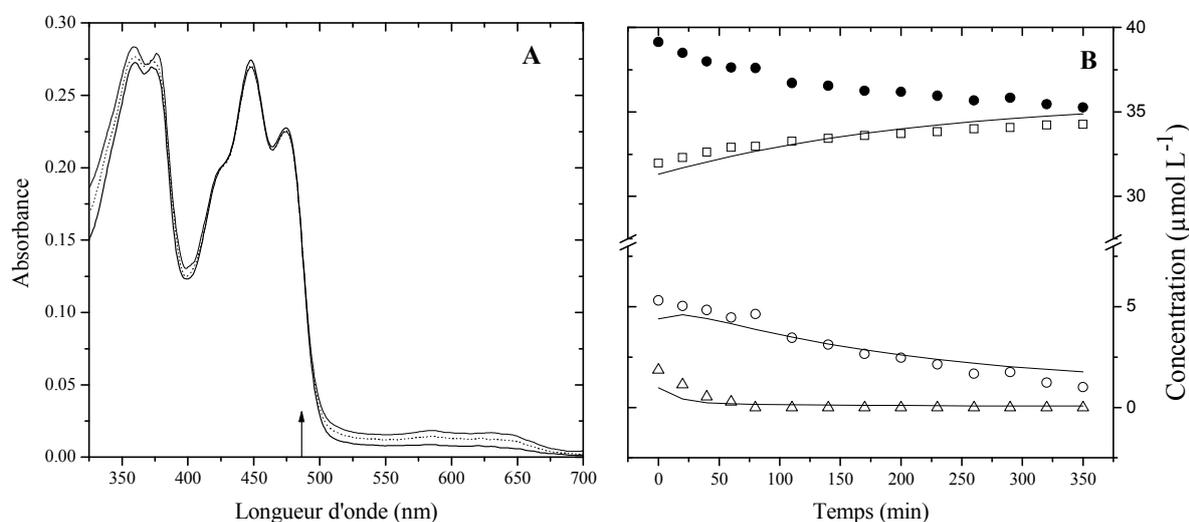


Figure 2.2 : A : spectres d'absorption de OtCPF1 en solution tampon à pH 8,0 et à 5°C, à 0 min (trait plein), 80 min (en pointillés) et 350 min (trait épais) après sa décongélation. La flèche indique un point isobestique à 486 nm. B : évolution temporelle des concentrations de FAD_{ox} (carrés vides), $FADH^\bullet$ (ronds vides), $FADH^-$ (triangles vides) et de la somme de ces trois concentrations (ronds pleins) entre 0 min et 350 min après décongélation de l'échantillon. Les traits pleins représentent un ajustement paramétrique global par le modèle cinétique décrit par le Schéma 1.

La diminution des concentrations en $FADH^-$ et $FADH^\bullet$ avec augmentation de la concentration en FAD_{ox} est assignée à une oxydation de $FADH^-$ et $FADH^\bullet$ en FAD_{ox} par du dioxygène, ce qui a déjà été observé pour d'autres photolyases [125]. Il est à noter que, pour des raisons de purification par chromatographie d'affinité (cf. la partie 3 du chapitre VI), la solution tampon de nos échantillons contient un agent réducteur externe : le glutathion réduit (GSH, dont la concentration vaut 20 mmol L⁻¹), capable de réduire FAD_{ox} et $FADH^\bullet$ en $FADH^\bullet$ et $FADH^-$, respectivement.

L'oxydation spontanée de FADH^- et FADH^\bullet par le dioxygène et la réduction spontanée de FAD_{ox} et FADH^\bullet par le GSH sont modélisées sur le Schéma 1 :



Schéma 1

Une diminution anormale et notable (10%) de la concentration totale en chromophore FAD peut être observée au cours de l'expérience (cf. la Figure 2.2-B, ronds pleins). Nous nous attendions en effet à ce que la concentration totale de FAD reste constante. Cette diminution apparente correspond en fait à une description insuffisante de l'évolution de l'échantillon par le Schéma 1. La diminution de la concentration totale en FAD peut s'expliquer par une dénaturation partielle des protéines avec libération de chromophore en solution (nous avons vu, dans la partie 1.5, la présence d'une faible concentration de flavine libre dans un échantillon fraîchement décongelé). En effet une fois en solution, la flavine est oxydée et présente un décalage de sa bande S_0S_2 de 7 nm vers le rouge et un coefficient d'extinction molaire plus faible que celui de FAD dans la photolyase (6-4) de *Arabidopsis thaliana* [171] et Xl64 [153]. La présence de chromophore libre entraîne donc des erreurs systématiques sur l'ajustement du spectre d'absorption de OtCPF1 par les trois spectres de référence des chromophores liés à la Xl64, ce qui se traduit par une sous-estimation de la concentration totale en FAD. L'hypothèse de la dénaturation est renforcée par l'observation d'un fond de diffusion important sur les spectres d'absorption stationnaire huit heures après décongélation de OtCPF1 et conservation à 5°C.

Par conséquent nous avons essayé d'introduire dans les paramètres d'ajustement le spectre du chromophore libre FAD_{ox} . Cependant le recouvrement entre les quatre spectres de référence (cf. la Figure 1.4) est trop grand pour permettre un ajustement fiable. Nous avons donc imposé que la concentration totale en FAD reste constante, et égale à la concentration totale en FAD initiale telle qu'elle est évaluée au moyen des trois spectres de référence de FAD porté par Xl64. L'évolution cinétique ainsi obtenue est représentée sur la Figure 2.3. Nous pouvons remarquer que la concentration en FAD_{ox} libre tend vers une limite très inférieure à la concentration totale en FAD. Cela prouve que la majorité des molécules de FAD ($\approx 85\%$) reste en interaction avec la protéine. Un second modèle cinétique (cf. le Schéma 2) est proposé pour décrire le système dans lequel une partie des protéines se dénature en libérant du FAD_{ox} en solution.

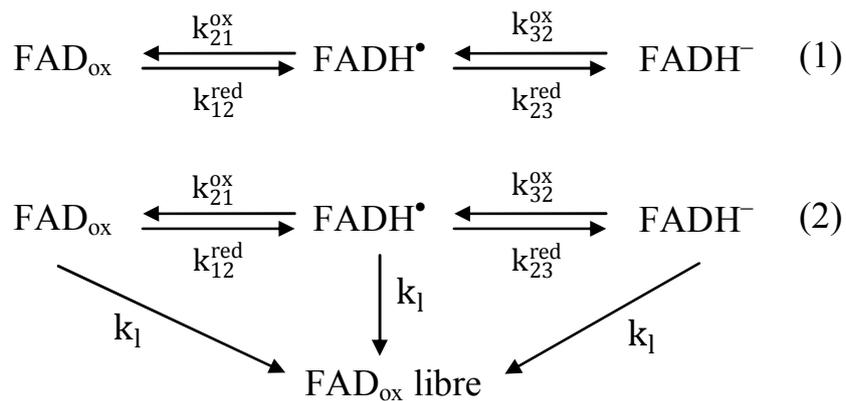


Schéma 2

Dans ce modèle, la population en FAD est divisée en deux fractions :

- une première fraction est en interaction avec la protéine et suit le modèle cinétique (1),
- une deuxième fraction (2) provient de la dénaturation partielle de la protéine : elle se trouve sous forme oxydée en solution.

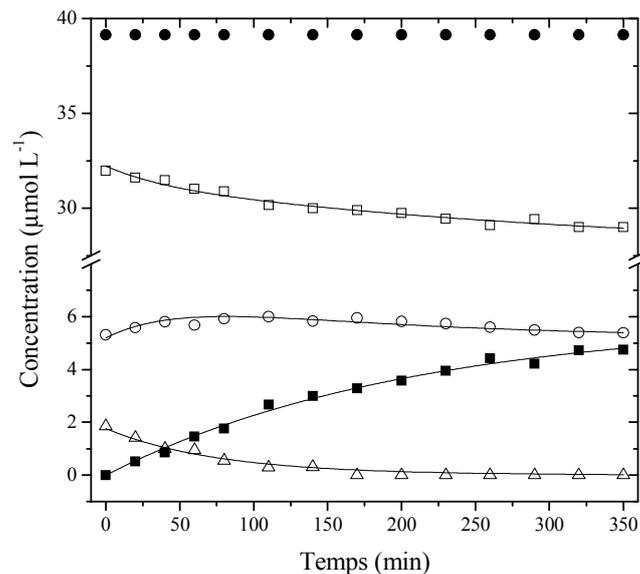


Figure 2.3 : Évolution temporelle des concentrations de FAD_{ox} (carrés vides), FADH^{\bullet} (ronds vides), FADH^{-} (triangles vides) en interaction avec la protéine et de FAD_{ox} en solution (carrés pleins), en tenant compte de la dénaturation partielle de la protéine entre 0 min et 350 min après décongélation de l'échantillon. Les traits pleins représentent un ajustement paramétrique global par le modèle cinétique décrit par le Schéma 2 en imposant une concentration totale en FAD constante (ronds pleins).

Afin de simplifier le modèle représenté sur le Schéma 2, et surtout de pouvoir mener l'ajustement jusqu'à son terme, les constantes de vitesse de réduction spontanée sont imposées : $k_{12}^{\text{red}} = 4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $k_{23}^{\text{red}} = 0 \text{ s}^{-1}$. Ces valeurs sont trouvées en ajustant

paramétriquement le premier modèle sans libération de FAD (cf. le Schéma 1) à un échantillon particulier (ayant subi une pré-irradiation ; cf. la Figure 2.4) pour lequel aucune dénaturation apparente n'est observée. Les constantes de vitesse des réactions d'oxydation sont les suivantes : $k_{21}^{ox} = 2,16 \pm 0,02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $k_{32}^{ox} = 2,1 \pm 0,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ et la constante de vitesse de libération de chromophore en solution : $k_1 = 8,1 \pm 0,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. La fraction de protéine suivant le deuxième modèle, c'est-à-dire subissant la dénaturation spontanée, est de $15,1 \pm 0,6\%$.

La Figure 2.4 représente l'évolution spontanée des concentrations en chromophore d'un échantillon de OtCPF1 ayant subi des pré-irradiations à 620 nm et 450 nm.

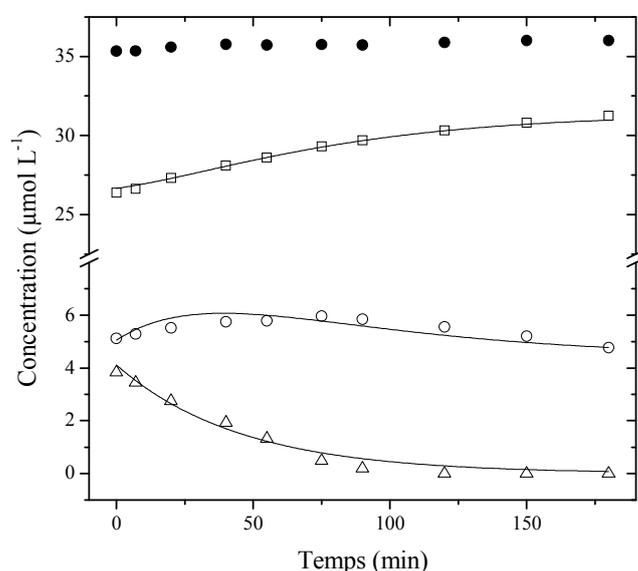


Figure 2.4 : Concentrations de FAD_{ox} (carrés vides), FADH• (ronds vides), FADH⁻ (triangles vides) et de la somme des FAD (ronds pleins) dans la protéine de référence après irradiations à 620 nm et 450 nm. Les traits pleins représentent un ajustement paramétrique global par le modèle cinétique décrit par le Schéma 1.

Ces pré-irradiations ont été réalisées afin de modifier la composition initiale de l'échantillon et de l'enrichir en chromophores photoréduits (cf. la partie 2.3). Nous avons constaté que, dans ces conditions, la libération importante de chromophore par dénaturation n'est plus observable. Il semblerait que la pré-irradiation permette de stabiliser les chromophores au sein de la protéine, possiblement par des changements de conformation renforçant le réseau de liaisons hydrogènes autour du chromophore. Les spectres d'absorption de cet échantillon pré-irradié ont été ajustés uniquement avec les trois spectres de référence concentrations de chaque état d'oxydo-réduction de FAD au sein de la XI64. Nous constatons que la somme des concentrations de FAD est quasiment constante. Par conséquent, les

cinétiques peuvent ici être ajustées sur le modèle cinétique du Schéma 1. Les constantes de vitesse d'oxydation et de réduction sont rassemblées dans le Tableau 2.1.

Paramètres	Sans pré-irradiation	Avec pré-irradiation
k_{12}^{red}	$4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	$4 \pm 1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
k_{23}^{red}	0 s^{-1}	0 s^{-1}
k_{21}^{ox}	$2,16 \pm 0,02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$3,1 \pm 0,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
k_{32}^{ox}	$2,1 \pm 0,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$3,7 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
k_1	$8,1 \pm 0,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	–
f	$15,1 \pm 0,6\%$	–

Tableau 2.1 : Constantes de vitesse obtenues lors de l'étude de la stabilité temporelle de OtCPF1 sans et avec pré-irradiation.

Nous pouvons remarquer que les constantes de vitesse d'oxydation (k_{21}^{ox} et k_{32}^{ox}) obtenues sans pré-irradiation sont plus petites que celles obtenues avec pré-irradiation. Cependant en tenant compte des incertitudes, les constantes de vitesse d'oxydation sont du même ordre de grandeur. Ce résultat indique que les réactions d'oxydations observées avec ou sans pré-irradiation pour cette protéine sont essentiellement identiques : il s'agit de l'oxydation lente de FADH^- et FADH^\bullet par le dioxygène.

2.3 Photostabilité

Il est connu que sous irradiation lumineuse, FADH^\bullet ou FAD_{ox} sont photoréduites rapidement au sein des photolyases (cf. le chapitre I). Dans le cas de FADH^\bullet dans EcCPD, les travaux des groupes Brettel et Vos ont montré que la photoréduction de FADH^\bullet dans EcCPD s'effectue par transfert d'électron par étapes ultrarapides et abouti à l'oxydation d'un résidu tryptophane éloigné de la flavine et exposé au solvant [4, 6, 7, 9-11, 181]. En l'absence de réducteur externe, cette réaction est suivie d'une recombinaison de charge qui se termine dans le régime milliseconde [4, 6, 11, 182] et restitue le système dans son état initial. Dans notre cas nous avons vu que les échantillons de OtCPF1 contiennent en fait un réducteur externe le glutathion (GSH). Nous avons quantifié dans quelle mesure cette présence de GSH affecte le processus de recombinaison de charge suivant la réduction photoinduite. Nous avons pour cela enregistré les spectres d'absorption de OtCPF1 et analysé la composition des échantillons après son irradiation continue à deux longueurs d'onde spécifiques : 450 nm (maximum d'absorption de FAD_{ox}) et 620 nm (longueur d'onde à laquelle seule FADH^\bullet absorbe).

2.3.1 Excitation à 450 nm

D'après les spectres de référence des flavines dans une protéine, nous savons que 450 nm est une longueur d'onde qui permet d'exciter essentiellement FAD_{ox} . La Figure 2.5-A montre l'effet d'irradiations successives de quatre minutes à 450 nm sur le spectre d'absorption stationnaire de OtCPF1. Après quatre minutes d'excitation (toutes les conditions expérimentales sont données dans la partie 4.5.3 du chapitre VI), une diminution de l'intensité des bandes significatives de FAD_{ox} à 366 nm et 448 nm est observée ainsi qu'une augmentation de la bande caractéristique de $FADH^{\bullet}$ entre 500 nm et 700 nm, avec deux points isobestiques à 337 nm et 492 nm. L'augmentation de l'absorbance en dessous de 337 nm suggère une accumulation de $FADH^{-}$.

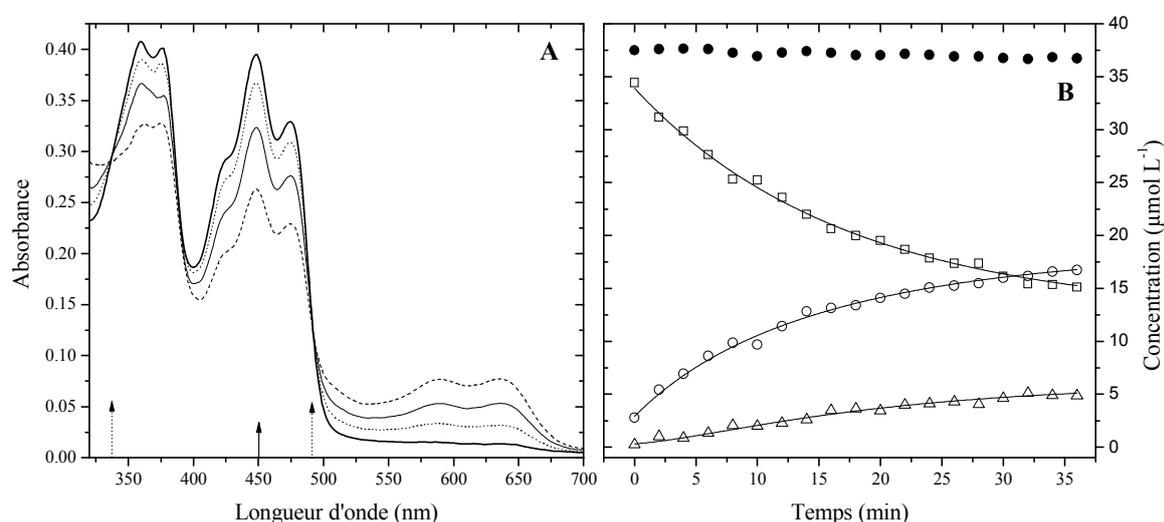


Figure 2.5 : A : spectres d'absorption stationnaire de OtCPF1 en solution tampon à pH 8,0 et à 5°C, après 0 min (trait épais), 4 min (en pointillés), 12 min (trait plein) et 36 min (tirets) d'irradiation à 450 nm (longueur d'onde signalée par une flèche en trait plein). Les flèches en pointillées indiquent les longueurs d'onde auxquelles un point isobestique est observé : 337 nm et 492 nm. B : évolution des concentrations de FAD_{ox} (carrés vides), $FADH^{\bullet}$ (ronds vides), $FADH^{-}$ (triangles vides) et de la somme des FAD (ronds pleins) dans la protéine après un temps d'irradiation à 450 nm de 0 min à 36 min. Les traits pleins représentent un ajustement paramétrique global par le modèle cinétique décrit au Schéma 3.

Ces changements sont assignés aux photoréductions de FAD_{ox} et $FADH^{\bullet}$ conduisant à $FADH^{\bullet}$ et $FADH^{-}$, respectivement, selon le Schéma 3 :



Schéma 3

Afin de réaliser une étude cinétique des photoréductions de OtCPF1 à 450 nm, nous avons réalisé une succession d'irradiations et mesuré les concentrations de chaque espèce après chaque irradiation. L'évolution des concentrations est représentée sur la Figure 2.5-B. Nous observons bien une diminution de la concentration en FAD_{ox} et une augmentation de celle en $FADH^\bullet$ et $FADH^-$. Il est à noter que la concentration totale en chromophores libres reste constante, ce qui est en bon accord avec l'hypothèse précédemment émise de stabilisation de la protéine après irradiation. Les cinétiques ont été ajustées sur le modèle cinétique représenté au Schéma 3 qui inclut des réactions de photoréduction ainsi que les réactions inverses. Les constantes de vitesse sont résumées dans le Tableau 2.2.

	$k_{12}^{450} (s^{-1})$	$k_{23}^{450} (s^{-1})$	$k_{21} (s^{-1})$	$k_{32} (s^{-1})$
$\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$	$6,6 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$7 \pm 1 \times 10^{-4}$	$4,4 \pm 0,3 \times 10^{-4}$	$2,3 \pm 0,5 \times 10^{-3}$

Tableau 2.2 : Constantes de vitesse obtenues lors de l'étude de la photoréduction de OtCPF1 sous excitation continue à 450 nm.

Il est important de noter que k_{12}^{450} et k_{23}^{450} sont des constantes de vitesse de réduction effectives dépendant de l'irradiation d'excitation et du coefficient d'extinction molaire des espèces irradiées à 450 nm (ϵ_{450}), soit FAD_{ox} et $FADH^\bullet$. Comme le coefficient d'extinction molaire de FAD_{ox} est deux fois plus grand que celui de $FADH^\bullet$, le fait que les deux constantes de vitesse soient comparables pourrait s'expliquer par un rendement de transfert d'électron à l'état excité plus grand pour générer $FADH^-$ à partir de $FADH^\bullet$ que pour générer $FADH^\bullet$ à partir de FAD_{ox} .

Par ailleurs si nous comparons les analyses cinétiques réalisées dans la parties 2.2 et ici, nous observons que k_{32} est beaucoup plus grande que k_{32}^{ox} . Le mécanisme d'oxydation de $FADH^-$ est plus efficace sous irradiation à 450 nm que dans l'obscurité. Une explication sera proposée dans la partie 2.3.2.

Des irradiations à 450 nm de OtCPF1 entraînent l'apparition de photoproduits réduits de durée de vie longue. Comme nous le rappelions plus haut, en l'absence de réducteur externe, la réaction de photoréduction de $FADH^\bullet$ dans EcCPD est suivie d'une recombinaison de charge dans le régime milliseconde [4, 6, 11, 182]. En supposant que le même mécanisme de photoréduction soit à l'œuvre dans OtCPF1, nous concluons que l'accumulation d'espèces réduites à durée de vie longue est due à la réduction d'un radical tryptophane ou tyrosine par le réducteur externe : le glutathion réduit (GSH).

Nous avons calculé un rendement de modification de FAD_{ox} (rapport du nombre de moles de FAD modifiée par irradiation sur le nombre de moles de photons absorbés) sous

irradiation à 450 nm, $\phi_{\text{mod}}^{\text{FAD}_{\text{ox}}} = 3 \times 10^{-3}$ grâce à l'équation (6.44) de la partie 4.5.3 du chapitre VI. Ce faible taux de modification de FAD_{ox} traduit un rendement de recombinaison d'électron important après l'état initial photoinduit à séparation de charge. Comme 99% des photons à 450 nm sont absorbés par FAD_{ox} , $\phi_{\text{mod}}^{\text{FAD}_{\text{ox}}}$ peut être vu comme le rendement de séparation de charge photoinduit multiplié par le rendement de réduction du radical tryptophanyl (ou tyrosyl) distant par GSH. Ce dernier rendement est essentiellement donné par le rapport de la constante de vitesse du réducteur externe (lente) sur la constante de vitesse de recombinaison de charge (rapide).

2.3.2 Excitation à 620 nm

Afin de suivre l'influence de l'irradiation de FADH^{\bullet} dans OtCPF1, il est nécessaire d'augmenter la concentration en FADH^{\bullet} . Pour ce faire, OtCPF1 est excitée pendant 36 min à 450 nm et est ensuite conservée pendant 30 min dans l'obscurité (pour stabiliser les espèces présentes après irradiation). Ainsi les concentrations relatives en FAD_{ox} , FADH^{\bullet} et FADH^{-} sont respectivement de : $17,5 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, $16,1 \pm 0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, $3,1 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$. L'évolution spectrale de OtCPF1 en excitant uniquement FADH^{\bullet} à 620 nm est représentée sur la Figure 2.6-A.

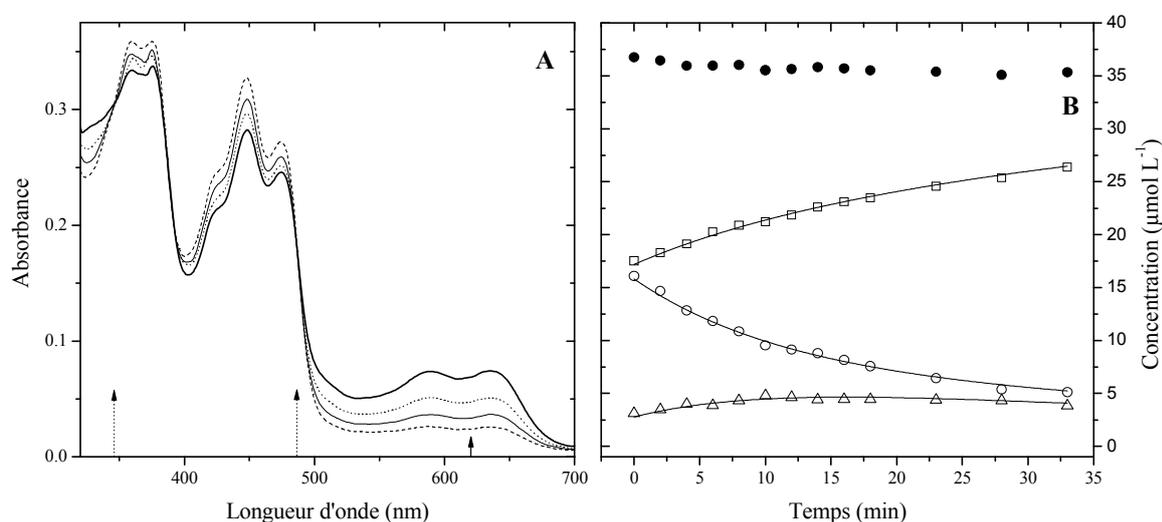


Figure 2.6 : A : spectres d'absorption stationnaire de OtCPF1 en solution tampon à pH 8,0 et à 5°C, après 0 min (trait épais), 8 min (en pointillés), 18 min (trait plein) et 33 min (tirets) d'irradiation à 620 nm (longueur d'onde signalée par une flèche en trait plein). Les flèches en pointillées indiquent les longueurs d'onde auxquelles un point isobestique est observé : 346 nm et 488 nm. B : évolution des concentrations de FAD_{ox} (carrés vides), FADH^{\bullet} (ronds vides), FADH^{-} (triangles vides) et de la somme des FAD (ronds pleins) dans la protéine après un temps d'irradiation à 620 nm de 0 min à 33 min. Les traits pleins représentent un ajustement paramétrique global par le modèle cinétique décrit par le schéma 4.

Nous pouvons remarquer une disparition de la bande caractéristique de FADH^\bullet , située entre 500 nm et 700 nm, ainsi qu'une augmentation simultanée des bandes caractéristiques de FAD_{ox} , centrées à 366 nm et 448 nm. Deux points isosbestiques sont relevés à 346 nm et 388 nm.

Sur la Figure 2.6-B, nous pouvons confirmer la diminution de la concentration en FADH^\bullet et l'augmentation simultanée de celle de FAD_{ox} et FADH^- . Cette observation suggère la photoréduction (k_{23}^{620}) et la photooxydation (k_{21}^{620}) simultanées de FADH^\bullet , selon le Schéma 4 :



Schéma 4

Un ajustement global de l'évolution des concentrations au cours du temps d'irradiation à 620 nm est représenté par les lignes pleines sur la Figure 2.6-B et conduit aux constantes de vitesse indiquées dans le Tableau 2.3.

	k_{21}^{620} (s^{-1})	k_{23}^{620} (s^{-1})	k'_{12} (s^{-1})	k'_{32} (s^{-1})
$\lambda_{\text{exc}}=620$ nm	$5,9 \pm 0,5 \times 10^{-4}$	$4,8 \pm 0,6 \times 10^{-4}$	$2 \pm 2 \times 10^{-5}$	$8 \pm 1 \times 10^{-4}$

Tableau 2.3 : Constantes de vitesse obtenues lors de l'étude de la photoréduction de OtCPF1, en excitant à 620 nm.

Le rendement de modification de FADH^\bullet sous irradiation à 620 nm est de $1,9 \times 10^{-2}$ selon l'équation (6.44) du chapitre VI partie 4.5.3. Ce résultat montre que la modification photoinduite de FADH^\bullet est bien plus efficace que celle de FAD_{ox} ($\phi_{\text{mod}}^{\text{FAD}_{\text{ox}}} = 3 \times 10^{-3}$). Cela pourrait s'interpréter par le fait que la photooxydation de FADH^\bullet soit suivie d'une réaction retour lente tandis que la photoréduction de FAD_{ox} aurait une réaction retour beaucoup plus rapide.

Si la photoréduction de FADH^\bullet (excitation à 620 nm) dans les protéines CPF est bien connue, la photooxydation simultanée a très rarement été décrite [6, 19]. Aubert et al. ont observé la photooxydation de FADH^\bullet chez la photolyase CPD de *A. nidulans* [183] et Gindt et al. chez EcCPD [125]. Gindt et al. ont proposé deux mécanismes possibles d'oxydation

photoinduite : la dismutation et l'abstraction d'électron depuis le tampon [125]. La réaction de dismutation est représentée sur le Schéma 5 :



Schéma 5

Lors de la dismutation, FADH^\bullet excitée doit être en contact avec FADH^\bullet dans son état fondamental, afin de permettre le transfert d'électron entre les deux molécules. C'est une voie de désactivation classique de FADH^\bullet en solution [53]. Comme les expériences sont réalisées sur une protéine possédant un chromophore a priori situé à l'intérieur d'une cavité, et sachant que le rapport FAD/apoprotéine est sous-stoechiométrique, il semble peu probable qu'une telle réaction ait lieu dans OtCPF1.

Le second mécanisme proposé par Gindt et al. est indiqué sur le Schéma 6 [125] :

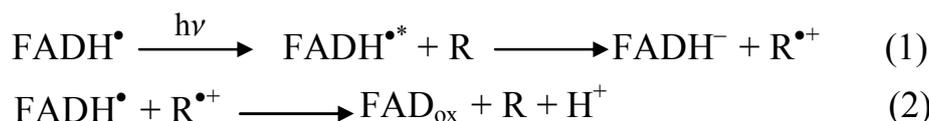


Schéma 6

Un réducteur externe R réduit la flavine excitée et produit les espèces FADH^- et $\text{R}^{\bullet+}$ (notation formelle qui ne veut pas dire que le produit soit à couche ouverte). $\text{R}^{\bullet+}$ est ensuite réduit par un autre radical FADH^\bullet pour donner FAD_{ox} et R. En fait la photoréduction de FADH^\bullet excitée est ultrarapide (30 ps dans EcCPD, selon les résultats des groupes Brettel et Vos) et conduit à FADH^- et un tryptophane ou tyrosine oxydé [4-7, 9, 10, 183]. Une telle vitesse laisse peu de temps pour que la flavine excitée interagisse avec R. Nous pensons que le schéma de Gindt et al. pourrait s'appliquer à OtCPF1, avec GSH jouant le rôle de R, si nous supposons que $\text{R}^{\bullet+}$ provient de la réduction de R par l'acide aminé radicalaire produit à l'issue de l'étape de séparation de charge rapide. Notons que les constantes de vitesse de réduction spontanée de FAD_{ox} sous excitation à 620 nm et dans l'obscurité sont comparables (k'_{12} et k_{12}^{red}). Cela confirme que le même mécanisme de réduction spontanée de FAD par GSH est à l'œuvre dans les deux expériences.

Par ailleurs il a été vu dans la partie 2.3.1 que la vitesse d'oxydation de FADH^- est beaucoup plus grande sous irradiations à 450 nm ($k_{32} = 2,3 \pm 0,5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$) que dans l'obscurité ($k_{32}^{\text{ox}} = 3,7 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ avec pré-irradiation). Une explication pourrait être

à nouveau trouvée dans le mécanisme de Gindt et al. : la photoréduction de la flavine induit une accumulation de l'espèce $R^{\bullet+}$, qui joue le rôle d'oxydant de $FADH^-$ et ainsi permet d'augmenter k_{32} .

2.4 Élimination du réducteur externe

Afin de tester si la présence du réducteur GSH est bien responsable de l'accumulation de photoproduits à durée de vie longue dans nos expériences d'irradiation continue, quelques expériences ont été conduites avec des concentrations réduites en GSH.

Une solution tampon de TRIS à pH 8,0 a été préparée sans GSH ; elle est notée TRIS. 200 μ L de OtCPF1 sont dilués en ajoutant 900 μ L de TRIS, puis sont concentrés sur un filtre à membrane coupant à 10 kDa (permettant de concentrer les molécules de masse moléculaire supérieure à 10 kDa, cf. la partie 3.2.2 du chapitre VI) jusqu'à l'obtention d'un volume final de 200 μ L. Une deuxième dilution est réalisée sur ce nouvel échantillon : 200 μ L de OtCPF1 diluée une première fois avec 900 μ L de TRIS et reconcentrée à 200 μ L. Cette nouvelle solution est concentrée jusqu'à un volume final de 300 μ L. Ainsi la concentration de GSH est divisée par 13,5. Le nouvel échantillon appauvri en GSH est excité à 450 nm pendant 36 min, dans les mêmes conditions qu'auparavant (cf. la partie 2.3.1). Sur le suivi cinétique de l'évolution des concentrations des différentes espèces représenté sur la Figure 2.7, nous voyons que l'accumulation d'espèces réduites est beaucoup moins grande qu'avec une forte concentration de GSH, ce qui valide notre hypothèse. Les constantes de vitesse sont résumées dans le Tableau 2.4.

	k_{12}^{450} (s^{-1})	k_{23}^{450} (s^{-1})	k_{21} (s^{-1})	k_{32} (s^{-1})
GSH	$6,6 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$7 \pm 1 \times 10^{-4}$	$4,4 \pm 0,3 \times 10^{-4}$	$2,3 \pm 0,5 \times 10^{-3}$
GSH dilué	$1,6 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$1,4 \pm 0,3 \times 10^{-3}$	$1,5 \pm 0,4 \times 10^{-3}$	$2,2 \pm 0,8 \times 10^{-3}$

Tableau 2.4 : Constantes de vitesses obtenues lors de l'étude de la photoréduction d'un échantillon de OtCPF1 appauvri en GSH, en l'excitant à 450 nm.

Comme nous l'avons vu dans la partie 2.3.1, les constantes de vitesse k_{12}^{450} et k_{23}^{450} sont des constantes de vitesse de photoréduction effectives qui dépendent de l'énergie lumineuse reçue et du coefficient d'extinction molaire de FAD_{ox} et $FADH^{\bullet}$ à 450 nm. Ces constantes dépendent notamment de deux paramètres : le rendement de séparation de charge primaire et le rendement de réduction du radical tryptophanyl ou tyrosyl distant. Le premier terme inclus les composantes dues aux réactions de recombinaison de charge rapides. Le second terme implique la constante de vitesse de réduction externe et, par conséquent, la concentration en GSH. Notre analyse montre que k_{12}^{450} diminue quand la concentration en GSH diminue. Cet

effet serait en accord avec une diminution du rendement de réduction externe lié à la dilution en GSH. En revanche nous ne proposons pas d'interprétation satisfaisante pour l'augmentation de k_{23}^{450} quand la concentration en GSH diminue. Il est aussi difficile d'expliquer que la constante k_{21} devienne également beaucoup plus grande.

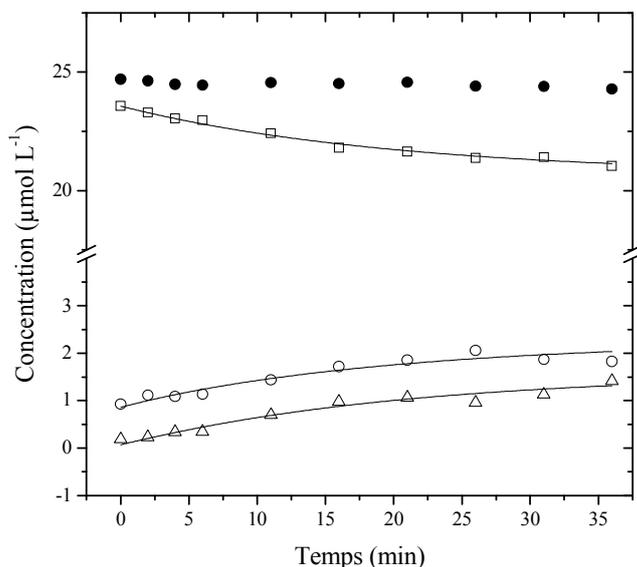


Figure 2.7 : Concentrations de FAD_{ox} (carrés vides), FADH[•] (ronds vides), FADH⁻ (triangles vides) et de la somme des FAD (ronds pleins) dans la protéine diluée en GSH après un temps d'irradiation à 450 nm de 0 min à 36 min. Les traits pleins représentent un ajustement paramétrique global par le modèle cinétique décrit par le Schéma 3.

Pour éliminer encore plus de réducteur externe, j'ai pu réaliser dans le groupe Bowler une dialyse de OtCPF1 après purification. Nous avons pu alors observer une beaucoup plus grande stabilité de cet échantillon sous irradiation continue à 470 nm. Les expériences d'absorption transitoire décrites dans la section suivante ont été faites sur des échantillons dialysés de OtCPF1 qui ont été stables pendant 10 heures.

3 Spectroscopie d'absorption transitoire de OtCPF1

Les expériences d'absorption transitoire décrites dans cette partie ont été effectuées sur un échantillon le plus concentré possible de OtCPF1 contenu dans une cuve en silice fondue de faible volume (~50 μL) animée d'un mouvement de va et vient afin de renouveler le volume irradié entre deux tirs de pompe et de réduire ainsi la photodégradation de l'échantillon. La configuration de polarisation des faisceaux pompe et sonde est à l'angle magique. OtCPF1 a été étudié en solution tampon à pH 8,0, à 5°C et après dialyse pour éliminer GSH.

3.1 Analyse spectrale

L'absorbance de l'échantillon à 448 nm (notée A_{448} ; au maximum de la transition S_0S_1 de FAD_{ox}) pour 1 mm de trajet optique était de 0,04 (ce qui est malheureusement très faible pour réaliser une expérience d'absorption transitoire). Dans ces conditions expérimentales, la distribution des différentes formes oxydo-réductrices de FAD au sein de l'échantillon, à l'état fondamental, était la suivante : 66% de FAD_{ox} ($[\text{FAD}_{\text{ox}}] = 25,7 \pm 0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$), 7% de FADH^\bullet ($[\text{FADH}^\bullet] = 3 \pm 1 \mu\text{mol L}^{-1}$) et 27% de FADH^- ($[\text{FADH}^-] = 11 \pm 2 \mu\text{mol L}^{-1}$). Après excitation de OtCPF1 par des impulsions de 55 fs à 470 nm, la distribution des fractions molaires prédites à l'état excité (avant toute évolution spontanée) est de : 88% de FAD_{ox}^* , 5% de $\text{FADH}^{\bullet*}$ et 7% de FADH^{-*} (les calculs sont détaillés dans la partie 4.4 du chapitre VI). La population excitée est donc hétérogène avec cependant FAD_{ox} comme espèce majoritaire. Les impulsions de la pompe ont ici une énergie de 0,22 μJ , focalisées sur une section de l'échantillon de l'ordre de 4800 μm^2 . Nous avons vérifié que l'expérience est réalisée en régime linéaire. Aucune accumulation photoinduite d'espèces réduites n'est observée pendant les dix heures que dure l'expérience. Cela montre que la dialyse de OtCPF1 a bien été efficace pour éliminer le GSH.

3.1.1 Spectre différentiel pour un retard pompe-sonde de 200 fs

Il faut noter que les spectres différentiels pour des retards pompe-sonde proches de zéro sont pollués par un artefact dit « temps zéro » constitué d'automodulation de phase croisée et d'effet Raman stimulé (cf. la partie 2.4.3 du chapitre VI). La Figure 3.1 représente le spectre d'absorption transitoire de OtCPF1, pour un retard pompe-sonde de 200 fs (il s'agit du retard le plus proche de zéro seconde exempt de pollution par l'artefact temps zéro). Ce spectre peut être décrit objectivement par zones de même signe ($\Delta A < 0$ ou $\Delta A > 0$). Il présente une bande négative entre 416 nm et ~490 nm (la diffusion de la pompe autour de 470 nm,

masquée sur la Figure 2.1, empêche de déterminer précisément la limite de ce domaine) dominée par le blanchiment de l'absorption de l'état fondamental, une bande négative entre 527 nm et 580 nm dominée par l'émission stimulée de l'état excité et trois bandes positives, dominées par de l'absorption transitoire, situées dans les plages spectrales 370-416 nm (AT-UV**), 493-527 nm (AT) et 580-750 nm (AT-IR). Par rapport à d'autres expériences réalisées avec le même dispositif expérimental (cf. le chapitre II), la fenêtre spectrale (370-750 nm) a été ici restreinte dans l'UV, le signal observé entre 340 nm et 370 nm étant trop bruité.

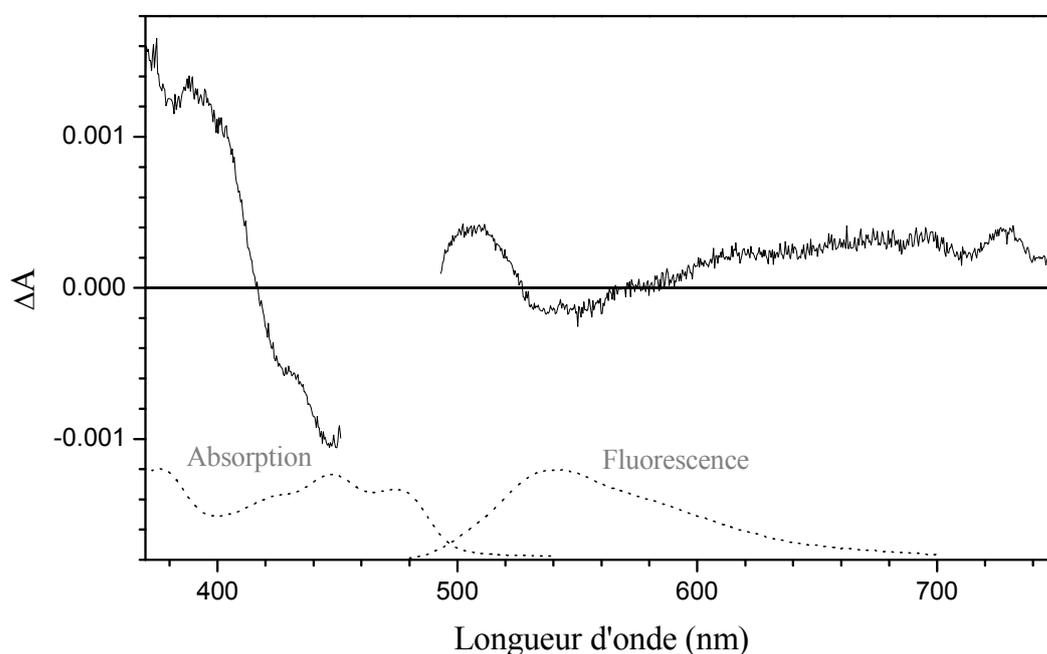


Figure 3.1 : Spectre d'absorption transitoire de OtCPF1 en solution tampon TRIS à pH 8,0 et à 5°C ($A_{448} = 0,04$ pour 1 mm de trajet optique), mesuré après excitation à 470 nm pour un retard pompe-sonde de 200 fs. Les spectres d'absorption et de fluorescence stationnaires de OtCPF1 sont rappelés en pointillés.

Comme l'espèce majoritaire à l'état excité est FAD_{ox} , nous avons comparé les spectres d'absorption transitoire normalisés de OtCPF1 et de FAD_{ox} (cf. le chapitre II) diluée en solution tampon TRIS à pH 8,0 et à 5°C, pour un retard pompe-sonde de 200 fs. La Figure 3.2 présente leur superposition. Nous remarquons une grande similarité de forme des deux

** Les notations AT-UV, AT et AT-IR sont de simples abréviations des termes : absorption transitoire située dans l'UV proche, dans le visible et dans l'IR proche, respectivement. Le sens n'est pas celui de nommer une transition précise d'une molécule précise (ex. : bande Q des porphyrines) mais de localiser spectralement une bande positive dominée par de l'absorption transitoire.

spectres différentiels. Le spectre de OtCPF1 présente cependant, par rapport à celui de FAD_{ox} libre, les différences suivantes :

- la bande de blanchiment est plus étroite et plus structurée, ce qui est attendu par observation des spectres d'absorption stationnaire correspondants,
- la bande AT-UV est plus structurée,
- la bande négative dominée par de l'émission stimulée est moins intense et est décalée de 20 nm vers le bleu (la bande d'émission stimulée de FAD_{ox} libre continue encore à se déplacer vers le rouge pendant ~ 1 ps, cf. la partie 1.2.2 du chapitre II).

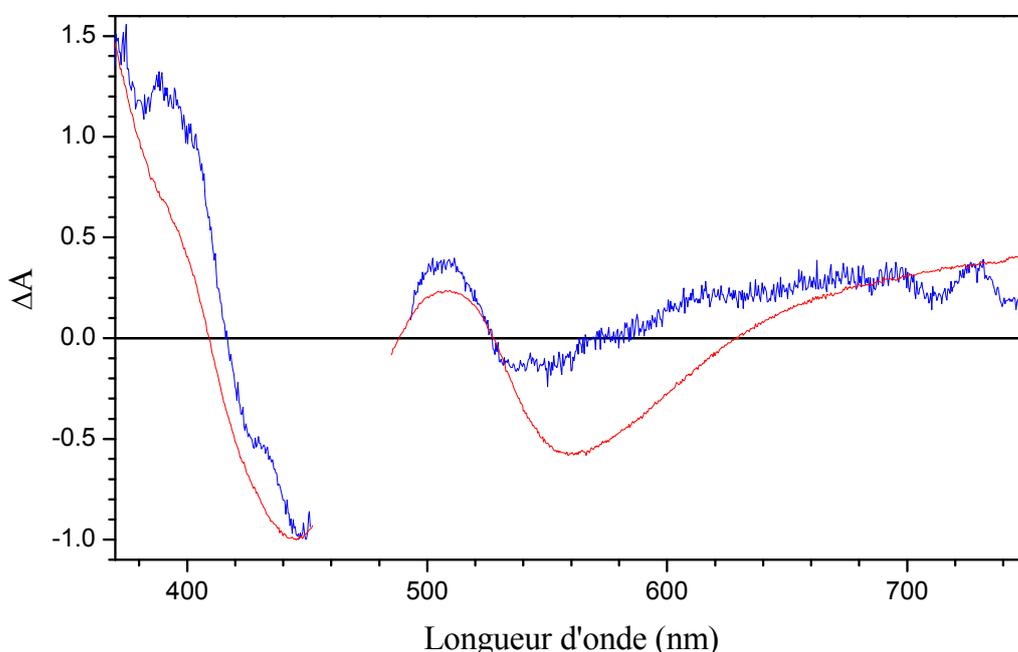


Figure 3.2 : Spectres d'absorption transitoire, normalisés dans la bande de blanchiment, de OtCPF1 (bleu) et FAD_{ox} diluée (rouge) en solution tampon TRIS à pH 8,0 et à 5°C, mesurés après excitation à 470 nm pour un retard pompe-sonde de 200 fs.

Comme il a été vu précédemment dans la partie 1.3, dans un milieu plus rigide et homogène comme une protéine, les sous-structures vibrationnelles des bandes électroniques de FAD_{ox} sont rendues visibles. Cela explique la présence de structures dans la bande de blanchiment sur le spectre différentiel de OtCPF1. La bande AT-UV pour OtCPF1 présente un creux à 380 nm, proche d'un maximum, situé à 373 nm, de la transition électronique S_0S_2 de FAD_{ox} dans Xl64. Cette structure est donc due à la superposition des contributions de blanchiment à celle d'absorption transitoire. Le décalage de 20 nm vers le bleu de la bande négative dominée par de l'émission stimulée de OtCPF1 pourrait avoir plusieurs causes : un

environnement très différent de la flavine au sein de la protéine (à la fois plus rigide, plus homogène et moins polaire qu'en solution aqueuse) et/ou des contributions des photoproduits issus de l'état excité qui, nous allons le voir, sont formés avec une constante de temps de 390 fs (cf. la partie 3.2).

3.1.2 Évolution temporelle

La Figure 3.3 présente les spectres d'absorption transitoire de OtCPF1 en solution tampon à pH 8,0 et à 5°C, pour des retards pompe-sonde allant de 0,2 ps à 1400 ps.

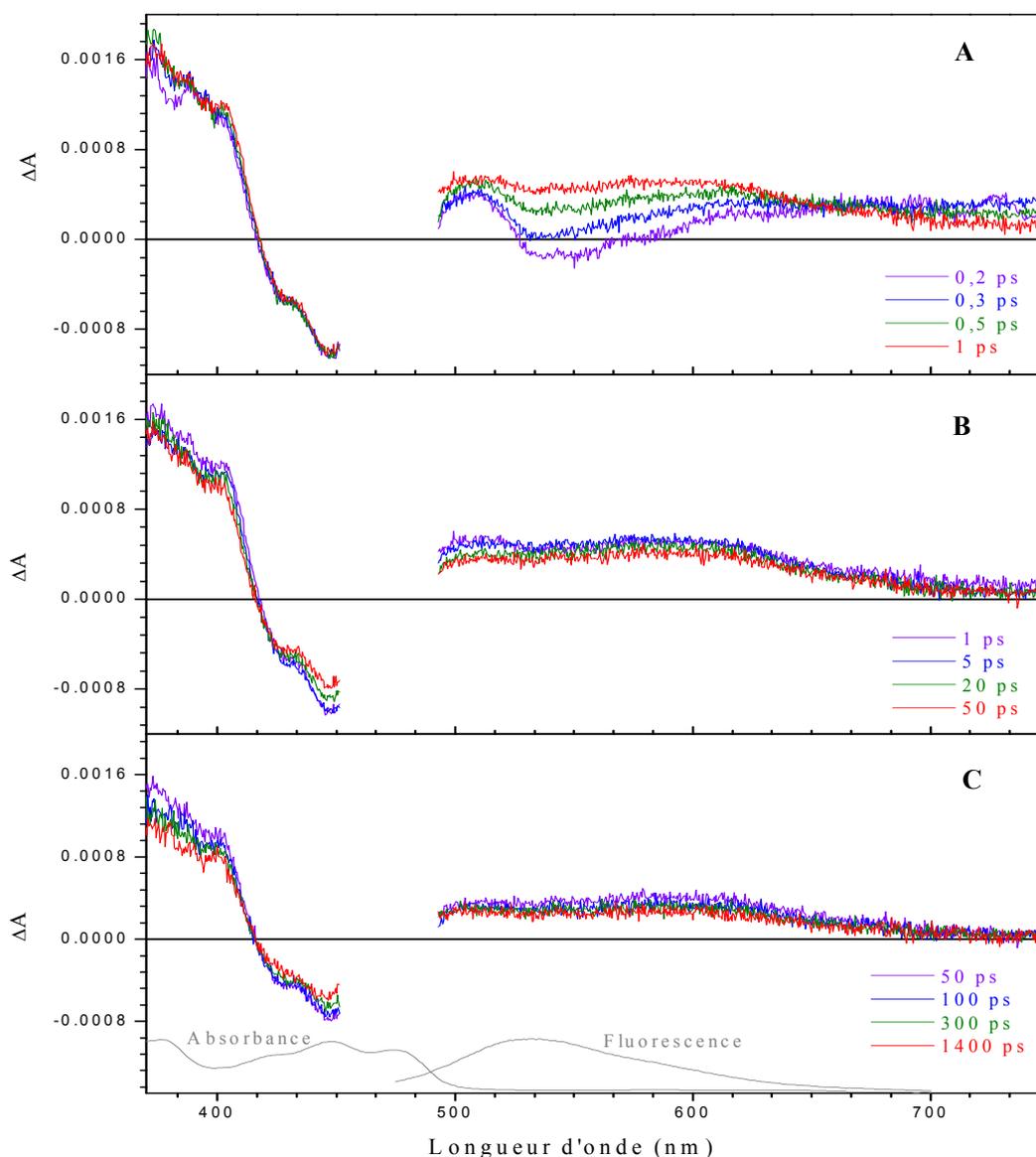


Figure 3.3 : Spectres d'absorption transitoire de OtCPF1 en solution tampon TRIS à pH 8,0 et à 5°C ($A_{448} = 0,04$ pour 1 mm de trajet optique), mesurés après excitation à 470 nm pour des retards pompe-sonde de 0,2 ps à 1 ps (A), 1 ps à 50 ps (B) et 50 ps à 1400 ps (C). Les spectres d'absorption et de fluorescence stationnaires de OtCPF1 sont rappelés en gris.

Leur évolution se divise en trois phases :

- phase 1 (Figure 3.3-A) : les bandes AT-UV et de blanchiment n'évoluent pas entre 0,2 ps et 1 ps. En revanche nous observons la disparition de la contribution d'émission stimulée et son remplacement par une bande large AT entre 525 nm et 590 nm. Un point isobestique temporaire est relevé à 655 nm.
- phase 2 (Figure 3.3-B) : pour des retards pompe-sonde de 1 ps à 20 ps, les bandes déclinent faiblement de façon quasi-homothétique sauf pour la bande AT entre 493 nm et 527 nm, qui décroît relativement plus que le reste du spectre.
- phase 3 (Figure 3.3-C) : pour des retards pompe-sonde de 50 ps à 1400 ps, les bandes déclinent peu et de façon quasi-homothétique.

Il est évident sur la Figure 3.3-A qu'une réaction photoinduite se produit entre 0,2 ps et 1 ps. La disparition, apparemment massive, de l'émission stimulée indique que l'état excité de FAD_{ox} se désexcite, possiblement complètement et donne naissance à une espèce produit responsable du spectre transitoire observé après cette phase. Cette représentation est confortée par la présence d'un point isobestique temporaire à 655 nm, pour des retards pompe-sonde allant de 0,2 ps à 1 ps. Le fait que la contribution de blanchiment ne décline visiblement pas pendant ce laps de temps indique que la réaction que nous observons s'effectue pratiquement sans restauration de l'état fondamental : la quasi totalité de la population initialement excitée semble donc faire place au produit de la réaction. Si nous nous référons aux différents travaux connus sur les protéines CPF et autres flavoprotéines [7, 9, 20, 136] (cf. le chapitre I), nous nous attendons à observer ici en temps réel la réduction de FAD_{ox} excité par un proche résidu aromatique, tryptophane ou tyrosine. En ce qui concerne l'évolution des spectres différentiels au-delà de 1 ps, nous pouvons dans un premier temps dire qu'elle révèle une restauration partielle de l'état fondamental ainsi qu'une assez faible modification de la signature spectrale des photoproduits au cours du temps. Le spectre que nous observons pour un délai de 1,4 ns conserve une intensité assez importante, ce qui signifie l'existence de produits à longue durée de vie.

3.2 Analyse cinétique

Afin d'étudier plus précisément l'évolution temporelle des spectres d'absorption transitoire de OtCPF1, nous avons procédé à l'analyse cinétique des données (corrigées du chirp, temporellement tronquée pour $t < 300$ fs) en effectuant un ajustement paramétrique global des quatre premières cinétiques orthogonales pondérées obtenues par la procédure

SVD décrite au chapitre VI. La meilleure fonction d'ajustement que nous avons trouvée est la somme de trois exponentielles et d'une fonction plateau, convoluées à une gaussienne représentant la réponse expérimentale de notre dispositif^{††}.

Nous avons trouvé les durées de vie suivante : $\tau_1 = 0,39 \pm 0,03$ ps, $\tau_2 = 9 \pm 2$ ps, $\tau_3 = 81 \pm 8$ ps et $\tau_4 = \infty$ (plateau imposé), avec l'écart quadratique moyen $\sigma = 2,7 \times 10^{-4}$. Pour chaque déclin exponentiel, nous avons calculé le spectre des facteurs pré-exponentiels (DADS). Les DADS sont présentés sur la Figure 3.4.

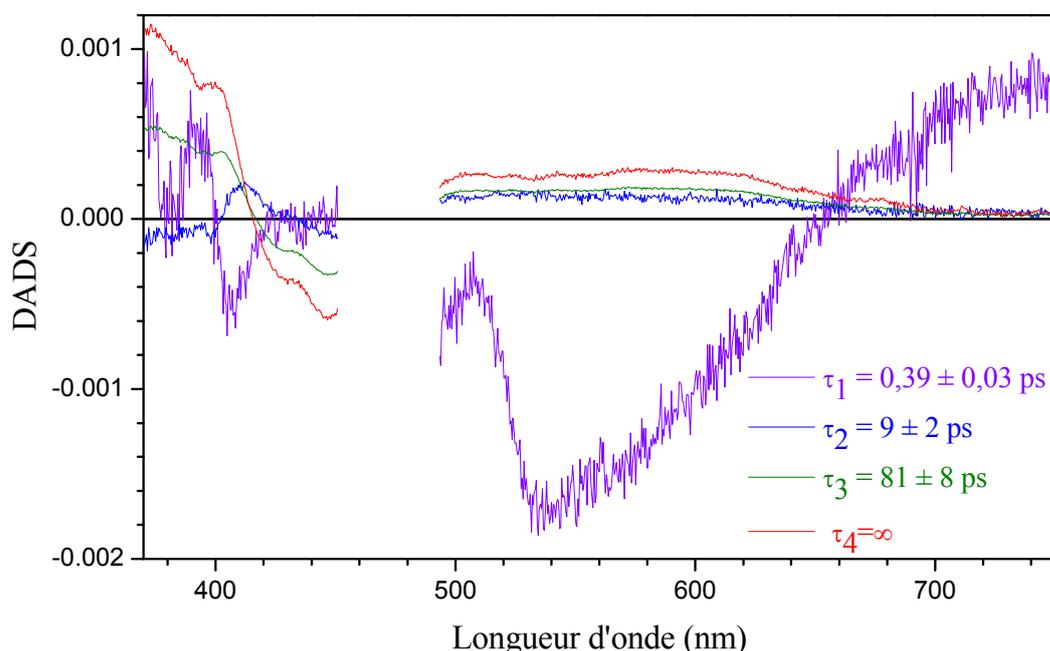


Figure 3.4 : Spectres des facteurs pré-exponentiels ou DADS associés aux durées de vie de 0,39 ps (violet), 9 ps (bleu), 81 ps (vert foncé) et au plateau (rouge) pour OtCPF1 en solution aqueuse (pH 8,0, 5°C et $A_{448} = 0,04$ sur 1 mm).

Le DADS₁, associé à la durée de vie de 0,39 ps, présente un signal négatif dans la bande d'émission stimulée. Cela signifie que l'émission stimulée de FAD_{ox} portée par OtCPF1 disparaît. De plus un signal nul est observé dans la bande de blanchiment ($422 \text{ nm} < \lambda < 447 \text{ nm}$), ce qui traduit une absence de retour de la population excitée à l'état fondamental. Ces observations permettent de confirmer que l'état excité de FAD_{ox} disparaît essentiellement sans retour à l'état fondamental, en donnant des photoproduits. La signature

^{††} La largeur de la gaussienne et la valeur du temps $t=0$ s (superposition maximale pompe-sonde) sont déterminées au moyen d'un ajustement préalable incluant une fonction empirique modélisant l'artéfact temps zéro, décrite au chapitre VI. Cet ajustement plus complet n'est cependant pas conservé car notre connaissance insuffisante de la forme artéfact temps zéro (fort) induit des erreurs sur l'analyse des signaux moléculaires (faibles).

spectrale des photoproduits contribue aussi au DADS1 (comme il s'agit d'une apparition cette contribution est affectée d'un signe négatif, cf. le chapitre VI), mais elle est difficilement séparable de celle de la disparition de FAD_{ox} excitée. Nous pouvons quand même noter la présence d'un pic négatif à 409 nm traduisant la montée d'une espèce absorbant à cette longueur d'onde.

Le DADS2, associé à la durée de vie de 9 ps, est quasi-nul entre 370 nm et 450 nm hormis un pic positif centré à 412 nm, traduisant la perte d'une espèce absorbant dans cette région spectrale. Cela pourrait correspondre à la disparition d'une des espèces créées précédemment (pic négatif à 409 nm) ainsi qu'à un retour à l'état fondamental très faible. Le DADS2 présente une bande large positive entre 493 nm et 750 nm.

Les DADS3 et DADS4, associés respectivement à la durée de vie de 81 ps et au plateau, montrent un signal négatif dans la bande de blanchiment, ce qui traduit un retour à l'état fondamental. Les autres contributions sont toutes positives et se divisent en deux parties : la partie UV et celle située entre 493 nm et 750 nm. Les DADS3 et DADS4 ont des formes voisines ainsi que l'illustre la Figure 3.5. Ceci pourrait s'interpréter par le fait que des espèces qui déclinent en 81 ps soient de même nature chimique que celles restant aux temps longs (par rapport à notre échelle temporelle d'observation limitée à 1,4 ns).

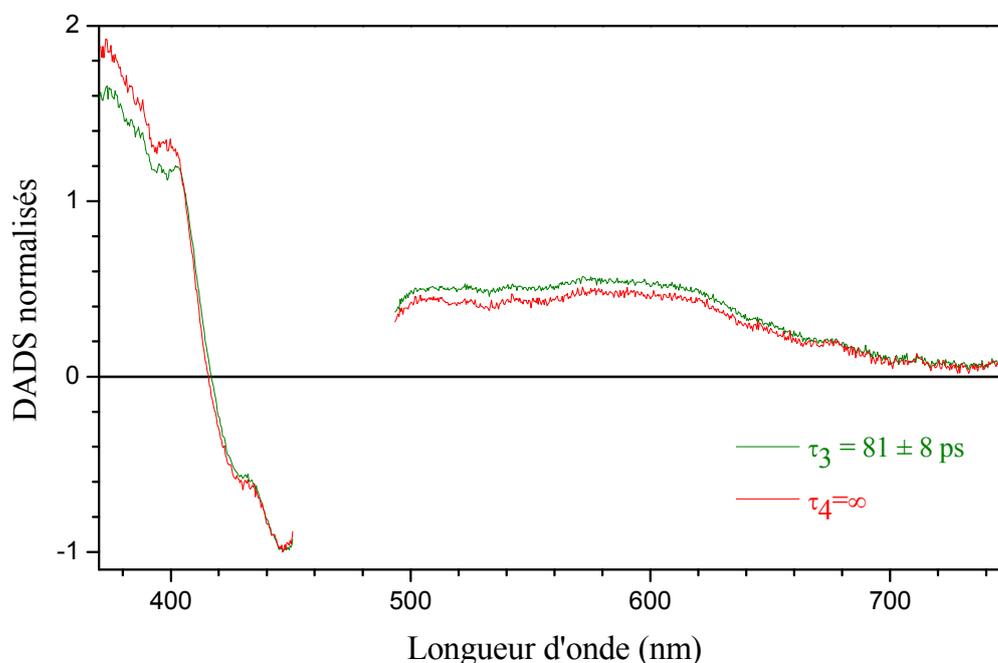


Figure 3.5 : DADS, normalisés à 447 nm, associés aux durées de vie de 81 ps (vert foncé) et au plateau (rouge) pour OtCPF1 en solution aqueuse.

3.3 Discussion

3.3.1 Identification des photoproduits

Il s'agit maintenant d'identifier la nature des photoproduits de la réduction ayant lieu en 0,39 ps. Comme nous l'avons vu plus haut, nous nous attendons ici à observer la réduction de FAD_{ox} excité par un proche résidu aromatique, tryptophane ou tyrosine. Cette réduction pourrait conduire de façon élémentaire à $\text{FAD}^{\bullet-}$, ou bien FADH^{\bullet} si un transfert de proton accompagne le transfert d'électron. Sachant que nous n'avons pas observé $\text{FAD}^{\bullet-}$ mais FADH^{\bullet} sous irradiation continue (cf. la partie 2.3.1), nous pouvons nous demander si la réduction de la flavine s'accompagne de sa protonation dans notre fenêtre temporelle d'observation, ou non. Selon le modèle de la photoréduction proposé par les groupes Brettel et Vos, le réducteur de FADH^{\bullet} est le tryptophane 382. En revanche dans la flavodoxine, par exemple, un tryptophane et une tyrosine situés de part et d'autre de FMN contribuent à sa photoréduction [16]. Sachant que nous ne disposons pas d'une structure tridimensionnelle indiscutable de OtCPF1 (voir cependant le modèle de OtCPF1 présenté au chapitre V^{**}), nous avons envisagé que le réducteur puisse être soit un tryptophane soit une tyrosine.

Nous avons également envisagé que le radical tryptophanyl ou tyrosyl formé puisse se déprotoner. Dans ce cas le proton ainsi libéré pourrait potentiellement servir à protoner le radical $\text{FAD}^{\bullet-}$, sachant qu'une toute autre molécule pourrait aussi l'accepter. Les spectres d'absorption du radical tryptophanyl protoné (noté $\text{WH}^{\bullet+}$) et déprotoné (W^{\bullet}) sont connus et représentés sur la Figure 3.6-A [184]. En revanche le pKa du radical tyrosyl étant inférieur à 0 [185], il se trouve généralement sous forme déprotonée (YO^{\bullet}). Seul le spectre d'absorption de la forme YO^{\bullet} nous est connu (cf. la Figure 3.6-A) [183].

Nous nous sommes fixés comme objectif de comparer qualitativement les spectres d'absorption transitoire suivant l'étape primaire en 0,39 ps à des spectres transitoires simulés de différents photoproduits possibles. Ces photoproduits correspondent à plusieurs combinaisons des spectres des radicaux $\text{FAD}^{\bullet-}$ ou FADH^{\bullet} , d'une part, et des spectres des radicaux $\text{WH}^{\bullet+}$, W^{\bullet} ou YO^{\bullet} , d'autre part.

En ce qui concerne FADH^{\bullet} nous avons naturellement utilisé le spectre issu de Xl64, dont nous nous servons lors de la détermination de la distribution des différents états

^{**} En collaboration avec l'équipe de Francine Acher au Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques de l'Université Paris Descartes, nous avons effectué une modélisation de la structure tridimensionnelle de OtCPF1 par homologie avec la structure cristallographique connue d'une autre photolyase (6-4).

d'oxydo-réduction de FAD au sein de OtCPF1 [159]. Le fait que ce spectre contienne, d'après les auteurs, une contribution résiduelle de FAD_{ox} est susceptible d'introduire certaines erreurs sur nos spectres simulés mais nous pensons qu'elles ne nuisent pas à une comparaison qualitative. À notre connaissance, il n'existe que deux spectres publiés de $\text{FAD}^{\bullet-}$ portée par une protéine CPF, le cryptochrome de *Drosophila melanogaster* [173, 174] (par exemple le spectre de $\text{FAD}^{\bullet-}$ dans la glucose oxydase est connu [3], mais il ne s'agit pas d'une protéine CPF, d'une part, et la conformation de la flavine est ouverte dans cette protéine [186], d'autre part). Nous nous servons de celui extrait de l'article de Berndt et al. [173] (cf. la Figure 3.6-B) parce qu'il est donné pour la plus grande gamme spectrale (300-700 nm). Ce spectre a été exprimé en coefficients d'extinction molaires en normalisant le spectre de FAD_{ox} , également donné en comparaison relative par Berndt et al., à 450 nm à la valeur de $11000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

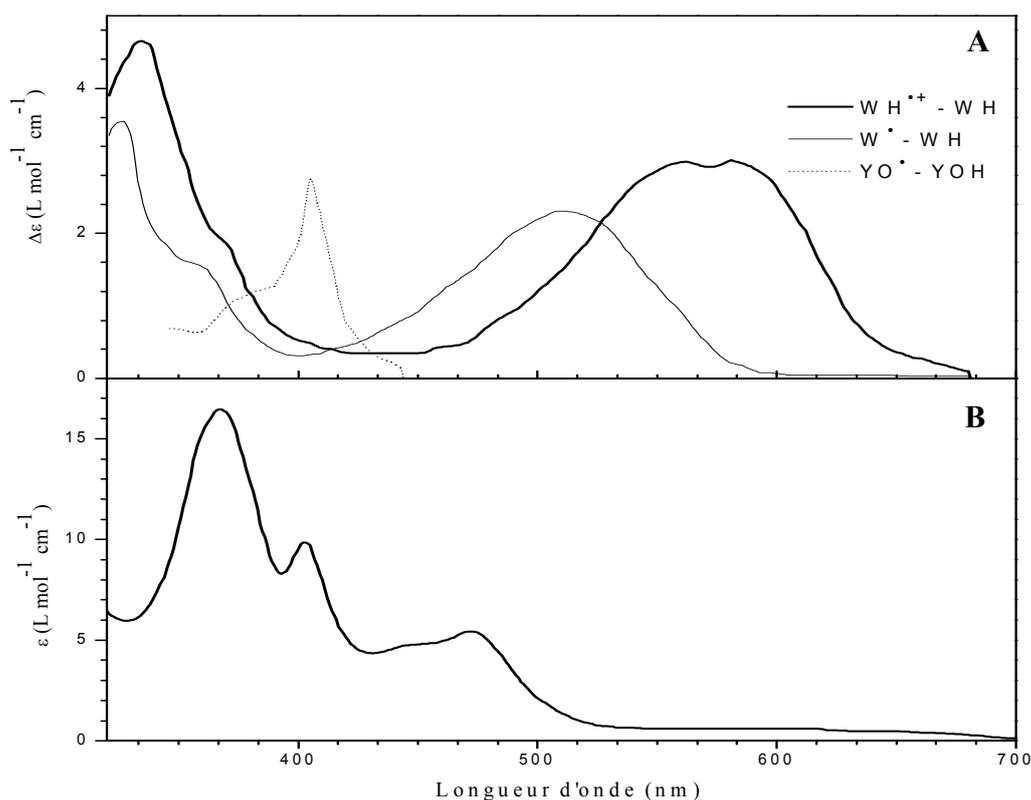


Figure 3.6: A : spectres différentiels des radicaux tryptophanyl protoné $\text{WH}^{\bullet+} - \text{WH}$ (trait épais), déprotoné $\text{W}^{\bullet-} - \text{WH}$ (trait plein) extraits de l'article de Solar et al. [184] et tyrosyl déprotoné $\text{YO}^{\bullet-} - \text{YOH}$ extrait de l'article de Aubert et al. (en pointillés) [183]. B : spectre de coefficients d'extinction molaire de $\text{FAD}^{\bullet-}$ extraits de l'article de Berndt et al. [173].

Comme nous mesurons des spectres différentiels, nous devons prendre en compte les contributions de blanchiment sur les spectres reconstruits. Il est donc nécessaire de retrancher

le spectre de FAD_{ox} . Nous avons bien sûr utilisé celui, extrait de l'article de Schleicher et al. [159], qui nous sert pour la détermination de la distribution des différents états d'oxydo-réduction de FAD dans OtCPF1. Les spectres reconstruits sont représentés sur les Figure 3.7-A et Figure 3.7-B. Nous n'avons pas inclus dans ces simulations les bandes à transfert de charge décrites par Miura [176] pour certaines flavoenzymes. Ces transitions correspondent à des complexes où l'orbitale moléculaire HO (HOMO, en anglais) du donneur d'électron (isoalloxazine réduite par exemple) recouvre l'orbitale moléculaire BV (LUMO, en anglais) d'un accepteur d'électron (substrat de l'enzyme). Dans le cas des protéines CPF (cf. la structure cristallographique de EcCPD [85] et le chapitre V), le système π de l'isoalloxazine ne semble pas être à la fois assez proche et parallèle de celui d'un partenaire de transfert de charge pour justifier de telles transitions.

Nous pouvons constater que dans la situation où le produit de la photoréduction de FAD_{ox} est $FADH^\bullet$ (cf. la Figure 3.7-B), la bande de blanchiment S_0S_1 est peu recouverte par la bande d'absorption de $FADH^\bullet$ et des différents radicaux possibles du tryptophane et de la tyrosine. Le spectre différentiel présente des valeurs négatives, dues à la bande de blanchiment S_0S_2 entre 370 nm et 390 nm. En revanche les spectres différentiels construits à partir de $FAD^{\bullet-}$ présentent une bande positive dans l'UV dominée par de l'absorption transitoire (bande AT-UV), masquant complètement la bande de blanchiment S_0S_2 , dans cette même région.

Tous les spectres d'absorption transitoire de OtCPF1, y compris ceux correspondant à un délai pompe-sonde de 1 ps, ont une bande AT-UV intense positive masquant complètement la bande de blanchiment S_0S_2 , nous écartons donc la formation de $FADH^\bullet$ dans notre gamme temporelle d'observation (jusqu'à 1,4 ns). Nous privilégions l'hypothèse de la formation de $FAD^{\bullet-}$, en meilleur accord avec l'allure des spectres transitoires en dessous de 420 nm. La présence d'une bande large positive entre 493 nm et 750 nm, avec une rupture de pente à partir de 640 nm (cf. la Figure 3.3-B,C), permet d'éliminer les radicaux neutres de la tyrosine ou du tryptophane comme photoproduits puisque leurs spectres différentiels reconstruits sont quasiment nuls à partir de 580 nm (cf. la Figure 3.7-A). Le seul spectre différentiel construit avec une bande positive dominée par de l'absorption transitoire dans l'UV et un signal jusqu'à 700 nm est donc finalement celui correspondant à la réduction de FAD_{ox} en $FAD^{\bullet-}$ et à l'oxydation d'un résidu tryptophane en radical cation tryptophanyl, protoné (en bleu sur la Figure 3.7-A).

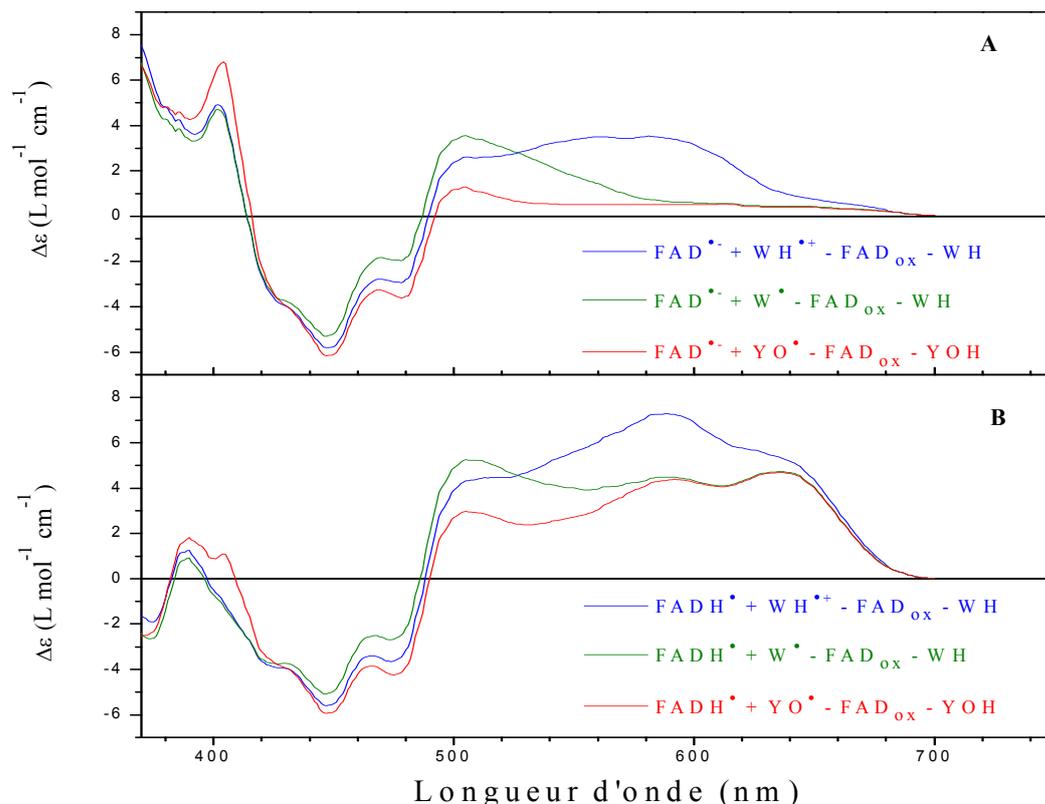


Figure 3.7 : Spectres différentiels construits des espèces obtenues après la photoréduction de FAD_{ox} en $FAD^{\bullet-}$ (A) et en $FADH^{\bullet}$ (B) par un tryptophane ou une tyrosine. Les spectres de coefficients d'extinction molaire de FAD_{ox} , $FADH^{\bullet}$ [159], $FAD^{\bullet-}$ [173], $WH^{\bullet+}$ -WH, W^{\bullet} -WH [184] et YO^{\bullet} -YOH [183] sont extraits d'articles publiés.

Pour illustrer cette attribution, nous allons superposer le spectre différentiel reconstruit du couple $FAD^{\bullet-}/WH^{\bullet+}$ (notation abrégée de $FAD^{\bullet-} + WH^{\bullet+} - FAD_{ox} - WH$) à un spectre transitoire caractéristique du produit de la réaction en 390 fs. Nous utiliserons pour cela les EADS (Evolution-Associated Difference Spectre, en anglais) qui sont obtenus en résolvant un modèle cinétique formel (voir le chapitre VI), purement séquentiel, comportant dans notre cas quatre états se transformant l'un en le suivant avec un rendement unité (cf. la Figure 3.11). La Figure 3.8-A montre ces EADS qui fournissent un résumé cinétiquement significatif de l'évolution des spectres transitoires bruts. Ils présentent cependant l'avantage par rapport aux spectres bruts d'avoir été partiellement filtrés du bruit par la procédure SVD et d'avoir été déconvolués de la réponse instrumentale temporelle. Le EADS1 est ainsi le spectre différentiel de l'état initialement excité, extrapolé à $t=0$ s et le EADS2 est le spectre différentiel de l'état qu'il produit en 0,39 ps, en supposant un rendement de réaction unité (ce qui semble raisonnable d'après ce que nous avons vu plus haut). La Figure 3.8-B montre le

EADS2 et le spectre transitoire reconstruit du couple $\text{FAD}^{\bullet-}/\text{WH}^{\bullet+}$, convenablement normalisés à 450 nm.

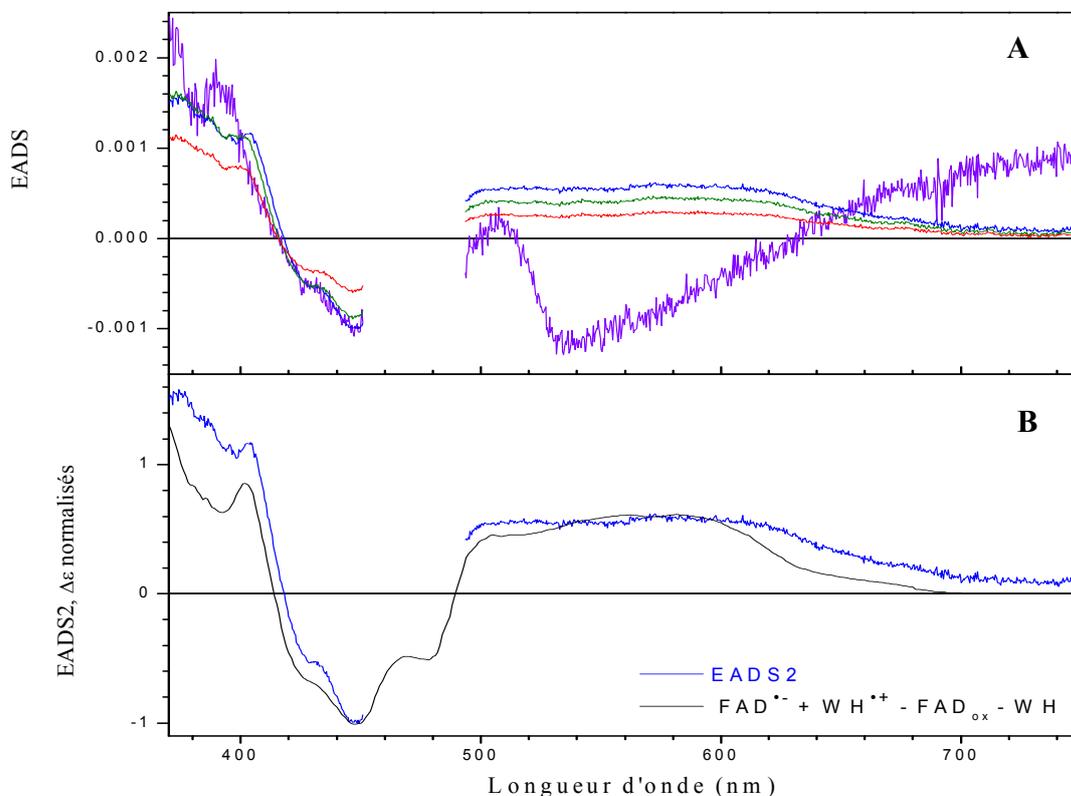


Figure 3.8 : A : Spectres différentiels associés à l'évolution pour un modèle cinétique séquentiel, EADS1 (violet), EADS2 (bleu), EADS3 (vert) et EADS4 (rouge). B : EADS2 et le spectre de la construction du couple $\text{FAD}^{\bullet-}/\text{WH}^{\bullet+}$ normalisés à 450 nm.

La superposition n'est pas parfaite mais la tendance générale est présente. Les écarts observés peuvent en partie provenir de notre méconnaissance des véritables spectres des états d'oxydo-réduction de FAD et du cation tryptophanyl, dans OtCPF1, approximés ici par des spectres (pour certains impurs) mesurés dans d'autres systèmes. D'autres écarts pourraient provenir des contributions spectrales des autres espèces excitées (12% de la population excitée totale).

La deuxième espèce excitée prédite est FADH^- , dont l'état excité a une durée de vie de 1,7 ns dans EcCPD en l'absence de l'ADN endommagé à réparer (cf. le chapitre I). Le spectre différentiel de cette espèce présente une bande large entre 450 nm et 900 nm [98, 106] (cf. la Figure 3.9). Cela pourrait expliquer que le signal soit non nul à partir de 580 nm.

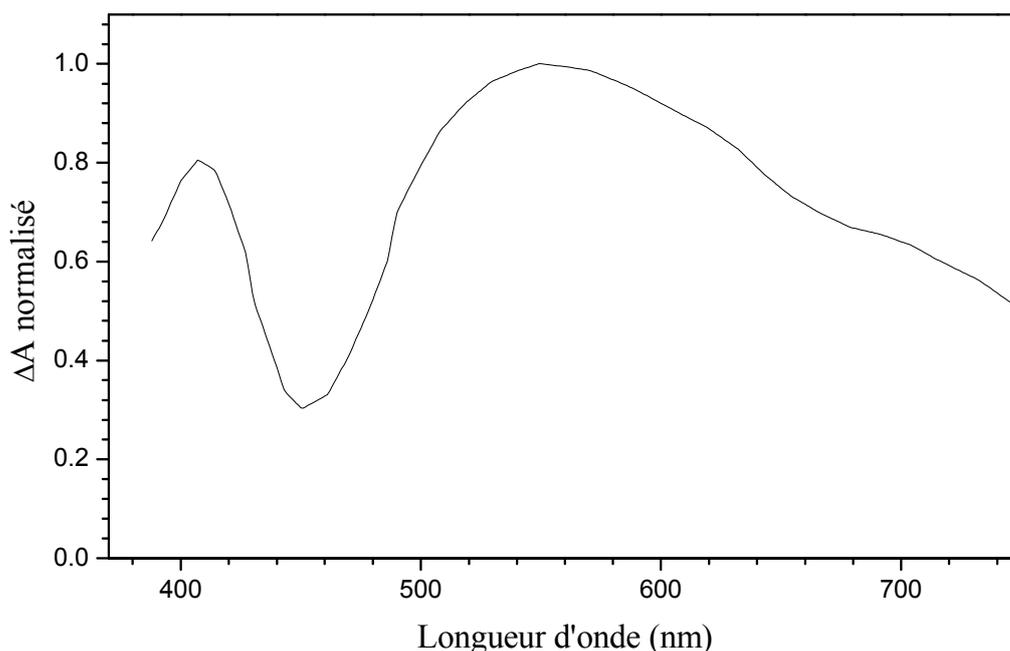


Figure 3.9 : Spectre d'absorption différentielle, normalisé à 550 nm, de FADH^- excité au sein de EcCPD, pour un retard pompe-sonde de 300 ps (extrait de l'article de Okamura et al. [106]).

La dernière espèce excitée est FADH^\bullet . Elle peut être réduite par un tryptophane, selon le mécanisme de photoréduction décrit par les groupes Brettel et Vos. Dans EcCPD cette photoréduction se produit avec une durée de vie de 30 ps. L'excitation de FADH^\bullet produit un spectre différentiel présentant notamment deux minima négatifs à 500 nm et 580 nm dus à des contributions de blanchiment de FADH^\bullet (cf. la Figure 3.10). La photoréduction de FADH^\bullet en FADH^- et $\text{WH}^{+\bullet}$ entraîne, quant à elle, des contributions de blanchiment de FADH^\bullet visibles par un signal différentiel négatif entre 435 nm et 640 nm (cf. la Figure 3.10). Nous ne reconnaissons manifestement pas de tels signaux sur nos EADS (cf. la Figure 3.8-A).

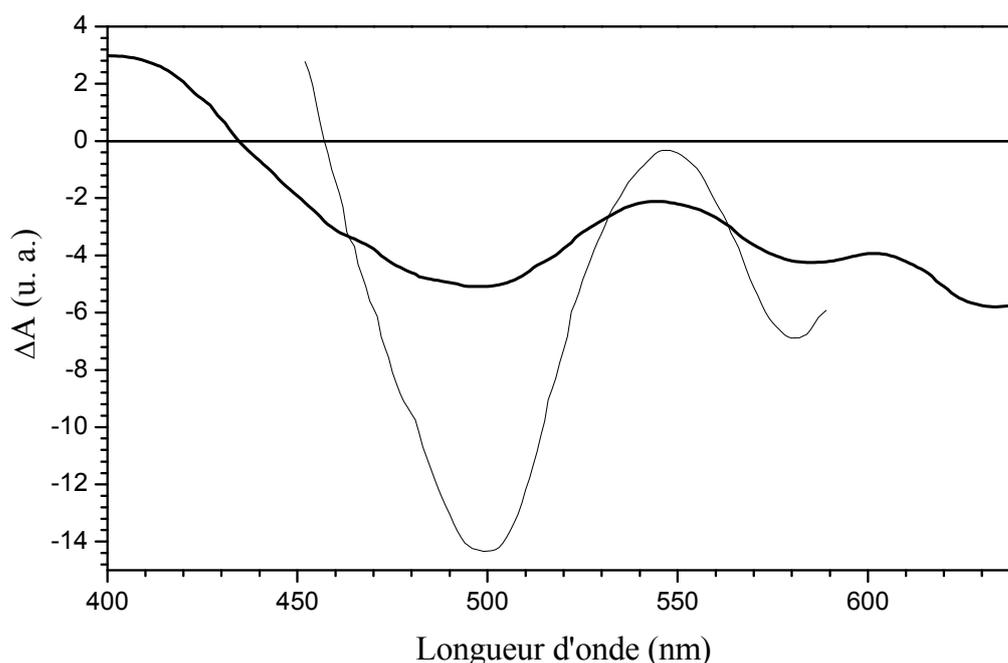


Figure 3.10 : Spectres transitoires en unités arbitraires de FADH^\bullet excité au sein de EcCPD pour un retard pompe-sonde de 0,5 ps (trait plein) et de 10 ns (trait épais). Ces spectres sont extraits de l'article de Byrdin et al. [6].

Dans un modèle cinétique avec un saut d'électron depuis un tryptophane vers un autre tryptophane, les spectres différentiels des photoproduits devraient en principe être tous identiques. Nous avons cependant remarqué que les EADS2 et EADS3 normalisés à 447 nm (dans la bande de blanchiment) ne sont pas totalement superposables. Nous avons essayé d'identifier les espèces responsables de la non superposition parfaite de ces deux EADS sans y parvenir de manière quantitative. Qualitativement nous pensons que la différence pourrait en partie provenir d'une contribution de l'état excité de FADH^- . Cette contribution semble aussi présente dans les EADS3 et EADS4.

Ces considérations nous amènent finalement à proposer que l'évolution conduisant du spectre EADS2 à EADS4 est dominée par le déclin, en deux étapes exponentielles (9 ps et 81 ps), d'un même spectre attribuable au produit $\text{FAD}^{\bullet-}$ et $\text{WH}^{\bullet+}$. Afin d'expliquer ce déclin, nous envisageons qu'à chacune de ces phases se produise une recombinaison de charge partielle. La raison pour laquelle cette recombinaison n'est que partielle est qu'elle s'effectuerait en compétition avec une autre réaction, séparant les charges sur une plus grande distance et rendant la recombinaison de charge plus lente. Il s'agit du mécanisme des groupes Brettel et Vos que nous allons détailler dans la partie suivante.

3.3.2 Modélisation cinétique

Nous allons maintenant proposer un modèle cinétique expliquant nos données expérimentales. Étant donné que la chaîne des trois résidus tryptophanes impliqués dans la photoréduction de FADH[•] dans EcCPD est conservée chez OtCPF1 (cf. le chapitre V), nous nous inspirons du mécanisme proposé par les groupes Brettel et Vos pour EcCPD portant FADH[•] [5-7, 9, 10, 183] (cf. la partie 2.4.2.2.1 du chapitre I).

Nous proposons qu'après excitation de FAD_{ox} dans OtCPF1 à 470 nm, la flavine soit photoréduite en sa forme semi-réduite déprotonée (FAD^{•-}) par un tryptophane proximal (noté W_p). Nous verrons dans le chapitre V qu'il s'agit de WH₄₅₀. Ce premier tryptophane oxydé, WH₄₅₀^{•+}, serait ensuite réduit par un deuxième résidu tryptophane, plus éloigné (dit moyen et noté W_m) de la flavine semi-réduite, WH₄₂₇. Dans le même temps se produirait une recombinaison de charge entre FAD^{•-} et WH₄₅₀^{•+}. Une troisième étape consisterait en un saut d'électron depuis un troisième tryptophane encore plus distant (noté W_d) de la flavine, WH₃₇₃, vers WH₄₂₇^{•+}, produisant le radical WH₃₇₃^{•+}. Dans le même temps se produirait une recombinaison de charge entre FAD^{•-} et WH₄₂₇^{•+}.

Nous avons modélisé ce mécanisme réactionnel au moyen d'un schéma cinétique séquentiel, à quatre états (compartiments) et comportant des retours vers l'état fondamental à chaque étape (voir la Figure 3.11).

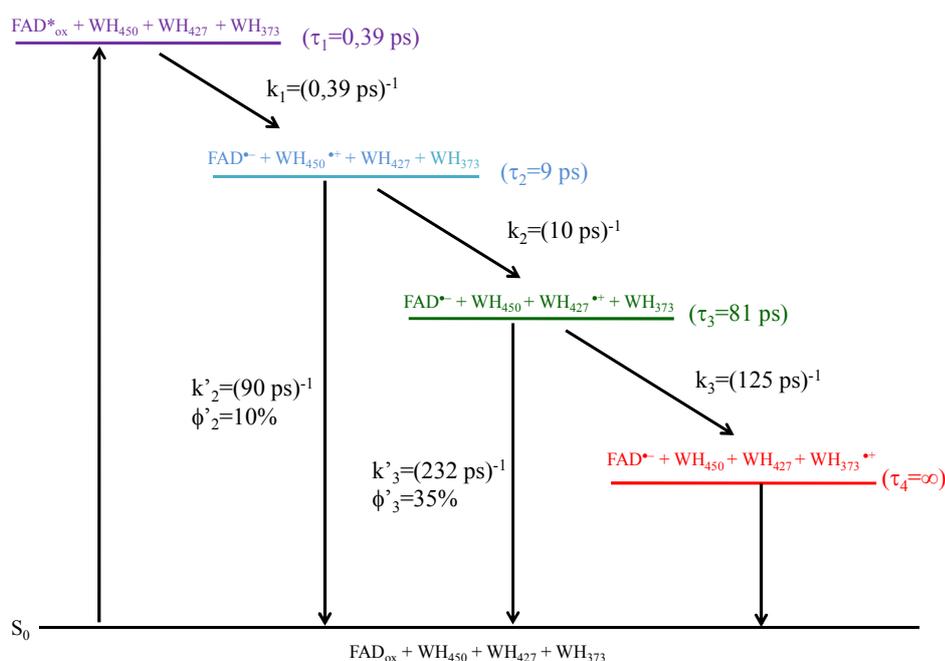


Figure 3.11 : Modèle cinétique de FAD_{ox} dans OtCPF1 après excitation à 470 nm.

D'après l'analyse des DADS réalisée dans la partie 3.2, aucun retour à l'état fondamental n'est observé dans la première étape. En revanche nous observons des contributions de blanchiment sur les DADS2 et DADS3. Nous avons donc introduit deux facteurs, ϕ'_2 et ϕ'_3 , traduisant le rendement de retour vers l'état fondamental à partir des états n°2 et 3. Ces paramètres ont été ajustés à l'aide d'une contrainte dite « des blanchiments » décrite dans la partie 2.5.3 du chapitre VI, qui impose que les spectres différentiels associés aux différents états présentent la même contribution de blanchiment. La bande centrée à 450 nm est utilisée pour déterminer ces facteurs. Nous avons trouvé $\phi'_2 = 10\%$ et $\phi'_3 = 35\%$. La Figure 3.12 présente les spectres différentiels associés aux espèces (SADS en anglais pour Species-Associated Difference Spectra).

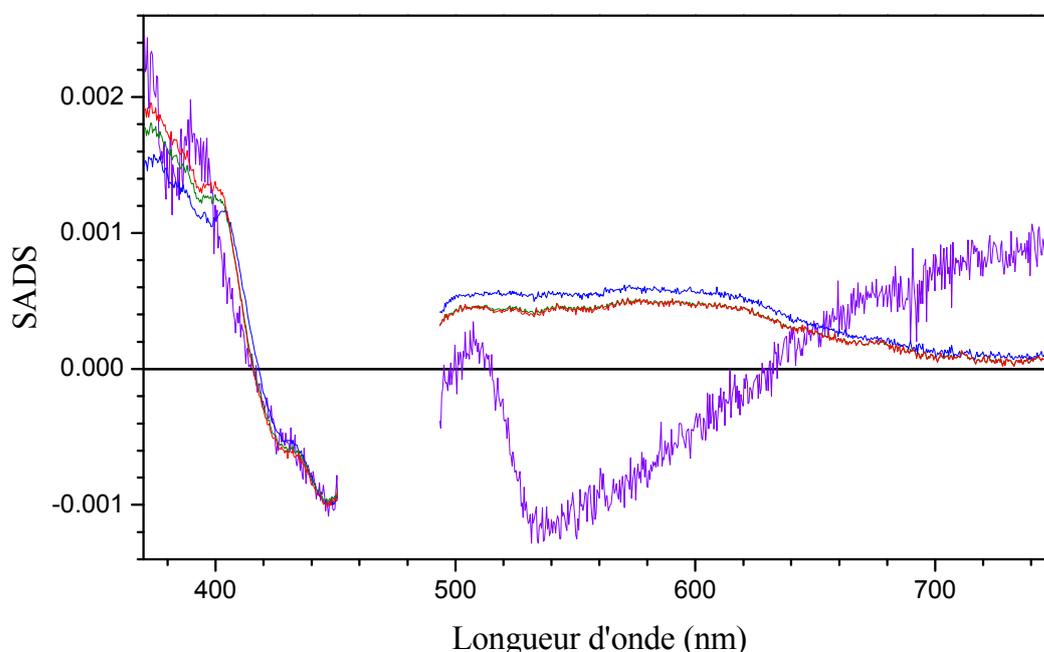


Figure 3.12 : Spectres différentiels associés aux espèces : SADS1 (violet), SADS2 (bleu), SADS3 (vert) et SADS4 (rouge) du modèle cinétique décrit sur la Figure 3.11.

Les SADS 2 à 4 trouvés (proportionnels aux EADS 2 à 4) sont assez voisins et de ce fait compatibles avec le modèle de la Figure 3.11 où le radical tryptophanyl se localise successivement sur les résidus WH₄₅₀, WH₄₂₇ et WH₃₇₃, sans qu'un changement notable de son spectre d'absorption soit attendu.

Les constantes de vitesse des étapes de transferts d'électron (k_{te} , notée k_i sur la Figure 3.11) et de recombinaison de charge (k_{rc} , notée k'_i sur la Figure 3.11) ont été calculées à partir de la durée de vie de chaque étape (notée τ) et du rendement de recombinaison de charge (ϕ'_{rc}) par les relations :

$$k_{RC} = \frac{\phi'_{RC}}{\tau} = \left(\frac{\tau}{\phi'_{RC}} \right)^{-1} \quad (3.2)$$

$$k_{te} = \frac{(1-\phi'_{RC})}{\tau} = \left(\frac{\tau}{(1-\phi'_{RC})} \right)^{-1} \quad (3.3)$$

Nous avons ainsi calculé pour l'étape de 9 ps, $k_{te} = (10 \text{ ps})^{-1}$ et $k_{rc} = (90 \text{ ps})^{-1}$, et pour l'étape de 81 ps, $k_{te} = (125 \text{ ps})^{-1}$ et $k_{rc} = (232 \text{ ps})^{-1}$.

Nous discuterons de manière détaillée les constantes cinétiques de notre modèle et les comparerons aux données de la littérature dans la partie 2.1.1.3.6 du chapitre IV, après avoir présenté nos résultats sur OtCPF2.

Conclusion

L'étude par spectroscopie stationnaire de OtCPF1 montre que cette protéine n'est stable qu'à basse température (5°C) et pendant une dizaine d'heures. Cette étude a mis en évidence qu'en présence d'un réducteur externe, comme le glutathion réduit, des espèces photoinduites de durée de vie longue sont accumulées au sein de OtCPF1. Sous irradiation continue à 470 nm, les espèces photoinduites accumulées sont FADH[•] et FADH⁻. En revanche en excitant OtCPF1 à 620 nm, l'espèce essentiellement excitée est FADH[•], qui est réduite en FADH⁻ mais aussi oxydée en FAD_{ox}. Ce phénomène a été expliqué par l'oxydation photoinduite du réducteur externe, l'accumulation d'espèces oxydantes et l'oxydation de FADH[•]. L'accumulation de ces espèces est gênante pour l'étude de la photoréduction de OtCPF1 puisque cela modifie la composition de l'échantillon sous irradiation. Le GSH a donc été éliminé par dialyse de OtCPF1 après purification avant de poursuivre les études par spectroscopie résolue en temps.

La spectroscopie d'absorption transitoire que nous avons menée sur OtCPF1 dialysée nous a permis d'obtenir la première signature spectrale complète des espèces photoinduites lors de la photoréduction de FAD_{ox} dans des protéines CPF. Malgré la présence d'autres espèces excitées (12%), nous expliquons essentiellement nos résultats par un mécanisme de transfert d'électron par étapes le long d'une chaîne de trois résidus tryptophane conservés, proposé par les groupes Brettel et Vos pour la photoréduction de FADH[•] portée par EcCPD. Cependant une différence importante est que la première étape du mécanisme réactionnel, la photoréduction de FAD_{ox} par un tryptophane voisin, est ici ultrarapide (390 fs) et cesse d'être l'étape cinétiquement déterminante du processus. Ceci permet donc d'observer les étapes suivantes (durée de vie de 9 ps et 81 ps) qui mettent en jeu, pour chacune d'elles, la réduction d'un radical tryptophanyl protoné par un autre tryptophane, plus éloigné de FAD, ainsi qu'une recombinaison de charge partielle (c'est-à-dire transfert d'électron de la flavine réduite vers le radical tryptophanyl et recouvrement de l'état fondamental initial). Nous observons aux temps les plus longs accessibles à notre expérience une espèce de durée de vie longue, attribuée à la paire radical cation tryptophanyl le plus distant W_dH^{•+} et radical FAD^{•-}.

Ces études seront complétées au chapitre V par des études de modélisation structurale par homologie de OtCPF1. Ces résultats permettront de décrire la photoréduction de FAD_{ox} au sein de OtCPF1 et d'en tirer des généralités sur les protéines CPF.

**CHAPITRE IV : Étude spectroscopique du
cryptochrome DASH de Ostreococcus tauri**

Introduction

Dans la partie 3 du chapitre I, nous avons vu que l'analyse phylogénétique de OtCPF2 montre que cette chromoprotéine appartiendrait au groupe des cryptochromes DASH (Cry-DASH). Le groupe Bowler a, par ailleurs, montré une possible double fonctionnalité de OtCPF2 [2] :

- Réparation de l'ADN double brin endommagé présentant des défauts CPD. Rappelons qu'il a été proposé que les Cry-DASH seraient des photolyases spécialisées dans la réparation de l'ADN monobrin [84]. Aucune expérience n'a cependant été réalisée sur de l'ADN monobrin pour OtCPF2 ;
- Répression, faible (OtCPF1 est beaucoup plus active), de l'expression d'un gène contrôlé par l'horloge circadienne.

Nous avons étudié des échantillons de OtCPF2 après leurs surexpression dans *E. coli* en fusion avec une autre protéine (GST, cf. la partie 3 du chapitre VI) et leurs purification par chromatographie d'affinité. Comme la nature des chromophores présents dans OtCPF2 était initialement inconnue, nous verrons dans la première partie que nous les avons identifiés, précisément, par spectroscopies d'absorption et de fluorescence stationnaires. Étant donné que nous voulions réaliser des expériences d'absorption transitoire sur OtCPF2, nous avons optimisé les conditions expérimentales pour les conduire. Comme pour OtCPF1, nous avons vérifié si les échantillons étaient stables chimiquement, temporellement et sous irradiation continue.

Nous avons présenté dans la partie 1 du chapitre I, la photoréduction de FADH^\bullet dans EcCPD, qui a fait l'objet de nombreux travaux par les groupes Brettel et Vos [5-10, 137]. Étant donné que OtCPF2 est une protéine proche des photolyases CPD, nous avons posé la question de savoir si le mécanisme établi pour la photoréduction de FADH^\bullet dans EcCPD est transposable à OtCPF2. Pour des raisons pratiques et aussi parce que cela n'avait été fait pour aucune protéine CPF au démarrage de ma thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à la photoréduction de FAD_{ox} . Comme nous l'avons vu au chapitre I, cette réaction est particulièrement intéressante car des résultats obtenus pour d'autres flavoprotéines (non CPF) montrent qu'elle est susceptible de se produire à très grande vitesse (en moins de 1 ps) [12-14, 17]. Si ce même mécanisme était à l'œuvre dans OtCPF2, la photoréduction

potentiellement plus rapide de FAD_{ox} laisse espérer que nous puissions observer à la fois cette étape et les étapes successives, à savoir une succession de sauts d'électron le long d'une chaîne de trois résidus tryptophane (conservés dans OtCPF2, cf. le chapitre V). Il faut noter qu'aucune étude de la photoréduction d'un Cry-DASH n'a été rapportée à ce jour. De plus il faut souligner qu'aucune étude spectroscopique n'a été précédemment conduite sur la chromoprotéine OtCPF2.

Nous avons étudié la photoréduction de FAD_{ox} dans OtCPF2 par spectroscopie d'absorption transitoire isotrope (à l'angle magique). Comme l'ont soulignée Byrdin et al. [8], cette méthode ne permet pas de différencier des intermédiaires réactionnels ayant une signature spectrale identique (couple flavine réduite / tryptophane oxydé). En revanche la spectroscopie d'absorption transitoire anisotrope peut permettre d'identifier les radicaux tryptophanyl ayant des orientations du moment de transition différentes. Nous avons réalisé une première expérience de ce type pour la photoréduction de FAD_{ox} dans OtCPF2, dont les résultats seront donnés dans cette partie.

Le transfert d'énergie depuis la photoantenne vers les flavines a déjà été étudié par spectroscopies résolues en temps sur des protéines CPF [96, 98, 187]. En particulier une étude par fluorescence résolue en temps a été réalisée sur VcDASH, le Cry-DASH de *Vibrio cholerae*. En revanche aucune étude du transfert d'énergie par spectroscopie d'absorption transitoire sur les Cry-DASH n'a été rapportée à ce jour. Comme OtCPF2 porte la photoantenne MTHF et FAD dans trois états d'oxydo-réduction différents, nous avons pu étudier les différents transferts d'énergie correspondant au sein de OtCPF2.

1 Spectroscopies électroniques UV-vis stationnaires de OtCPF2

1.1 Chromophores

Les protéines CPF possèdent un chromophore FAD pouvant exister sous différents états d'oxydo-réduction et souvent une photoantenne, MTHF ou 8-HDF. Nous allons identifier si OtCPF2 porte une photoantenne ainsi qu'un chromophore flavine et quelles sont leurs natures chimiques exactes.

1.1.1 Identification de la photoantenne

La Figure 1.1 présente le spectre d'absorption stationnaire de OtCPF2 dans un tampon TRIS à pH 8,0. Nous observons sur le spectre d'absorption une bande intense centrée à 386 nm, une bande moins intense à 470 nm et une bande très peu intense entre 500 nm et 675 nm. Nous reconnaissons clairement la signature spectrale du MTHF caractérisée par une bande d'absorption intense comprise entre 375 nm et 400 nm [168, 169]. En revanche, nous n'observons pas la signature spectrale du 8-HDF, qui présente un pic intense et fin centré à 440 nm [170].

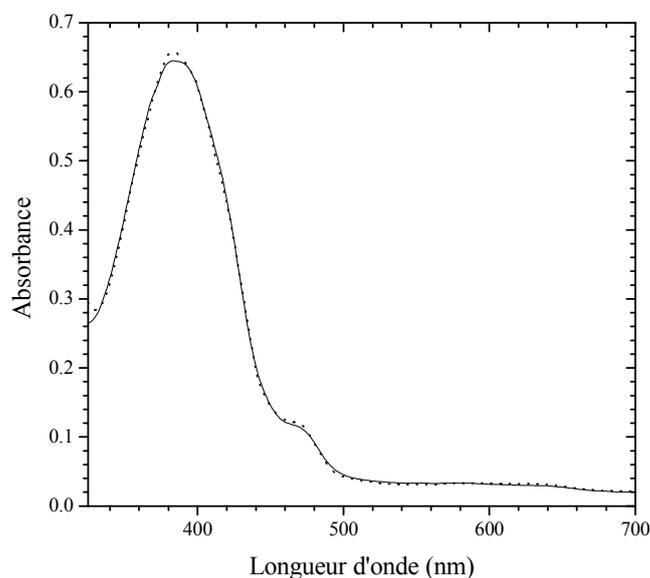


Figure 1.1: Spectre d'absorption stationnaire de OtCPF2 dans une solution tampon TRIS à pH 8,0 (trait plein) et à 5°C. En pointillés est représenté un ajustement paramétrique de ce spectre par une somme des spectres de coefficient d'extinction molaire des différentes formes oxydo-réductrices de FAD et de MTHF en interaction avec la photolyase CPD de *E. coli* (EcCPD). Ces spectres de référence sont extraits de l'article de Jorns et al. [175].

Afin de confirmer la présence de la photoantenne MTHF dans OtCPF2, l'échantillon a été soumis au traitement réducteur par le tétrahydroborate de sodium (NaBH_4). Le NaBH_4 réduit sélectivement MTHF en 5-FTHF (5-formyl-tétrahydrofolate), ce qui induit la perte de l'émission de fluorescence centrée à 490 nm du MTHF excité à 398 nm [162, 188, 189].

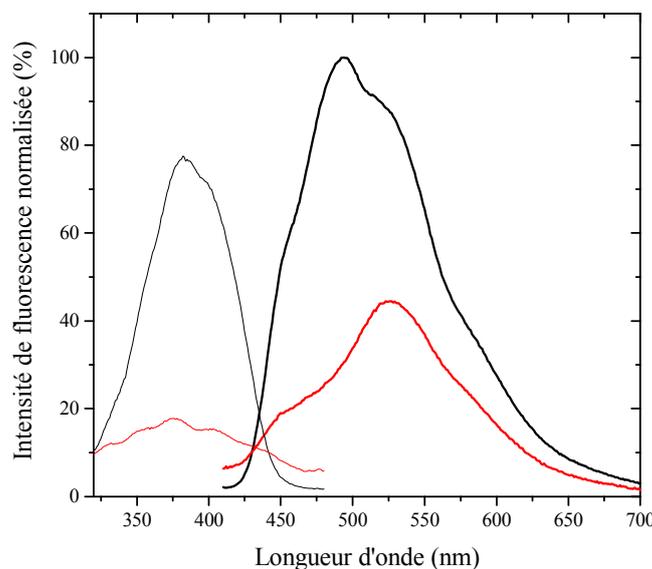


Figure 1.2: Spectres normalisés d'émission ($\lambda_{\text{exc}} = 400$ nm, trait plein) et d'excitation ($\lambda_{\text{em}} = 490$ nm, épais) de fluorescence de OtCPF2 avant (noir) et après (rouge) traitement par NaBH_4 (à 5°C).

L'émission de fluorescence de OtCPF2 avant réduction est une bande large de structure complexe, montrant un épaulement vers 460 nm, un maximum à 493 nm et un second épaulement à 530 nm. La fluorescence du MTHF peut à la fois contribuer à l'épaulement à 460 nm et au maximum à 493 nm. La fluorescence de FAD_{ox} est attendue à 530 nm et contribue probablement à l'épaulement vu à cette longueur d'onde. Une troisième contribution possible est celle de FADH^- . Le spectre de fluorescence publié par Kao et al. [20] pour cette espèce dans EcCPD présente deux maxima vers 515 nm et 545 nm (il est reproduit dans la partie 1.2.1 du chapitre I). Sachant que la dynamique de FADH^- excitée est complexe et fortement dépendante de l'environnement (cf. les chapitres I et II), le spectre de fluorescence de FADH^- dans OtCPF2 pourrait avoir une allure différente et contribuer également au maximum à 493 nm. Après traitement par NaBH_4 de OtCPF2, l'intensité de fluorescence diminue plus spécifiquement vers 490 nm qu'aux autres longueurs d'onde. Nous attribuons cet effet à la réduction du MTHF par NaBH_4 et, possiblement, à l'oxydation secondaire (indépendante du traitement par NaBH_4) de FADH^- par le dioxygène (car nous avons observé un fort dégagement gazeux de dihydrogène rendant potentiellement la protéine plus perméable au dioxygène).

Les spectres d'excitation de fluorescence ($\lambda_{em} = 490$ nm) de OtCPF2 avant et après traitement par NaBH_4 sont représentés sur la Figure 1.2. La bande intense centrée à 386 nm, caractéristique du MTHF, diminue fortement après traitement. Nous concluons finalement que MTHF est bien présent dans notre échantillon purifié de OtCPF2

1.1.2 Nature du cofacteur flavine

Après dénaturation par chauffage de OtCPF2, le surnageant est séparé des protéines précipitées par centrifugation. Le surnageant, contenant les chromophores libres non liés par liaison covalente à la protéine, est analysé par spectroscopies électroniques stationnaires. La Figure 1.3 montre le spectre d'absorption de ce surnageant. Il présente deux bandes larges centrées à 450 nm et 357 nm, qui correspondent, respectivement, aux transitions de l'état fondamental S_0 au premier et au deuxième état électronique excité singulet S_1 et S_2 d'une flavine oxydée en solution polaire [3, 24] (cf. le chapitre II, partie 1.1.1.1). Cependant le rapport des intensités de ces deux maxima est plus petit pour OtCPF2 dénaturée (1,0) que pour la flavine oxydée (1,3). Cette différence peut s'expliquer par la présence, dans le surnageant, de MTHF hydrolysé (10-formyl-tétrahydrofolate, noté 10-FTHF) dont le spectre d'absorption, fortement déplacé dans l'UV, est cependant non nul entre 320 nm et 400 nm [162, 190, 191].

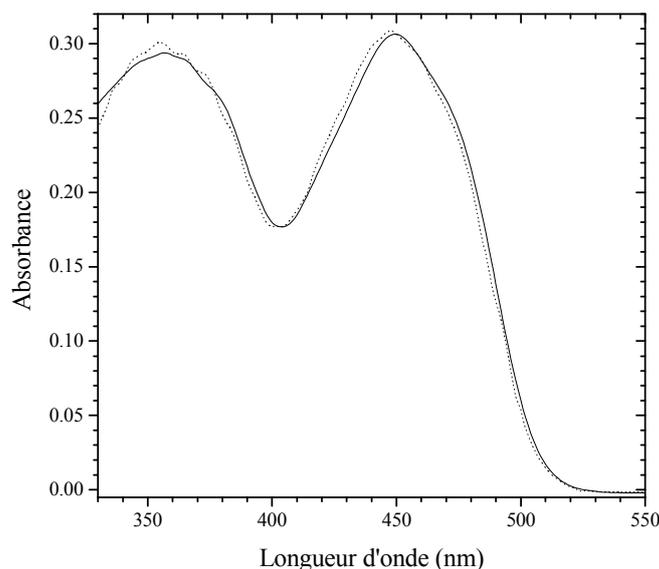


Figure 1.3 : Spectre d'absorption stationnaire de OtCPF2 après dénaturation par chauffage (trait plein) et son ajustement paramétrique par le spectre de FAD_{ox} [153] et du 10-FTHF après chauffage [190, 191] en solution (en pointillés).

Comme nous l'avons présenté dans le chapitre III, l'acidification d'une solution contenant FAD entraîne la perte d'inhibition de fluorescence par ouverture du complexe

intramoléculaire de la conformation fermée de FAD_{ox}. Afin de pouvoir déterminer si la flavine présente dans OtCPF2 est une flavine adénine dinucléotide ou une autre flavine (FMN, RF,...), la fluorescence du surnageant d'un échantillon dénaturé de OtCPF2 a été mesurée à pH 8,0 et à pH 3,0 en excitant à 450 nm (cf. la Figure 1.4). Nous trouvons que l'intensité maximale de fluorescence est cinq fois plus importante après acidification, ce qui démontre que la flavine présente dans OtCPF2 est une flavine adénine dinucléotide (FAD) [167].

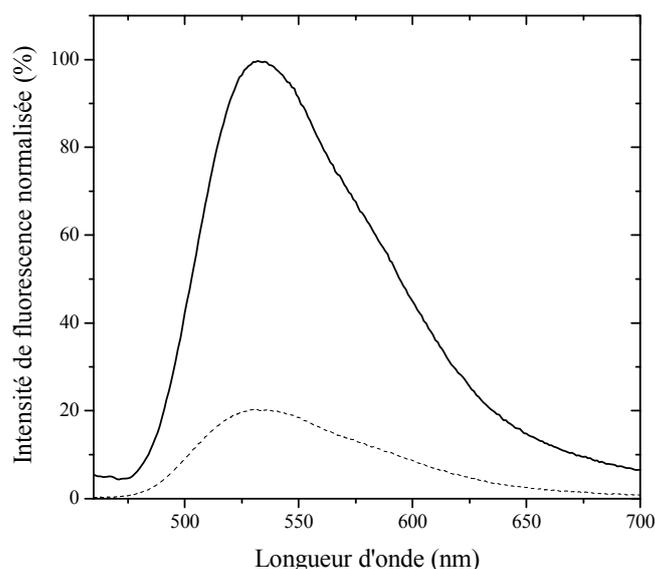


Figure 1.4 : Spectres de fluorescence normalisés ($\lambda_{exc} = 450$ nm) du surnageant de OtCPF2 dénaturée dans une solution tampon de TRIS à pH 8,0 (en pointillés) et dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à pH 3,0 (trait plein).

Afin de déterminer les rapports molaires entre les différents chromophores et l'apoprotéine de OtCPF2, nous avons calculé les concentrations en chromophores et en apoprotéine. Une première mesure de la concentration totale en FAD et MTHF est obtenue par un ajustement paramétrique du spectre d'absorption stationnaire du surnageant de OtCPF2 avec les spectres d'absorption de FAD sous forme oxydée en solution aqueuse à pH 7 [153] et du 10-FTHF [162, 190, 191]. Au sein de OtCPF2, la concentration de FAD vaut $27,92 \pm 0,07 \mu\text{mol L}^{-1}$ et celle du MTHF $20,5 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (cf. la Figure 1.3). Nous trouvons que le rapport molaire MTHF/FAD est égal à 73%. Ce résultat est en bon accord avec les données de la littérature pour lesquelles un rapport sous-stœchiométrique du MTHF par rapport à FAD est toujours observé pour les protéines purifiées [19, 169]. Ceci s'explique par le fait que MTHF est plus labile que FAD puisqu'il est lié plus en surface des protéines CPF [19]. Le rapport molaire de MTHF par rapport à FAD est plus grand pour les Cry-DASH

que pour les photolyases CPD (20-30 %) [19], ce qui indique sans doute une interaction plus forte de MTHF avec la protéine pour les Cry-DASH.

1.1.3 Distribution des différents états d'oxydo-réduction de FAD et de MTHF

La distribution des différents états d'oxydo-réduction de FAD et de MTHF dans OtCPF2 a été déterminée par ajustement paramétrique global (cf. la partie 4.4 du chapitre VI) du spectre d'absorption stationnaire de OtCPF2 au moyen d'une base de spectres de référence que nous allons détailler.

Comme nous l'avons vu sur la Figure 1.1, la signature spectrale de la photoantenne MTHF, avec une bande intense centrée à 386 nm, est reconnue sur le spectre d'absorption de OtCPF2. La bande moins intense à 470 nm correspond bien à la transition S_0S_1 de FAD_{ox} . Par ailleurs, la bande additionnelle peu intense située entre 500 nm et 675 nm est caractéristique de $FADH^\bullet$ [175]. La présence de la forme déprotonée de la semi-quinone de FAD, soit $FAD^{\bullet-}$, peut être écartée parce que ses caractéristiques spectrales (pic fin centré à 403 nm, bande structurée entre 430 nm et 560 nm, bande peu intense et non structurée entre 560 nm et 650 nm [3, 173, 174]) ne sont pas reconnues sur le spectre d'absorption de OtCPF2. Enfin la présence de FAD sous forme réduite (protonée $FADH_2$, ou déprotonée $FADH^-$) est plus difficile à mettre en évidence sur le spectre d'absorption stationnaire. En effet ces espèces présentent des spectres de coefficients d'extinction molaire faibles, non structurés entre 320 nm et 450 nm [23], dans une région où MTHF absorbe très fortement. Nous allons cependant voir qu'il est indispensable de prendre en compte une contribution de FAD réduite pour reproduire correctement le spectre d'absorption. Étant donné que les spectres de $FADH^-$ et $FADH_2$ sont très voisins [153] et que l'espèce photoactive des photolyases est $FADH^-$ [19], nous nous sommes servis ensuite uniquement du spectre de $FADH^-$ pour étudier la distribution des chromophores au sein de OtCPF2.

Au chapitre III, nous avons vu que les spectres de coefficient d'extinction molaire des différentes formes oxydo-réductrices de FAD diffèrent selon l'environnement protéique avec lequel elles interagissent [159, 175]. Il est important de noter qu'aucune base spectrale des différents états d'oxydo-réduction de FAD portée par un Cry-DASH n'a encore été publiée. Nous n'avons pas choisi la base spectrale utilisée pour décrire les spectres d'absorption de OtCPF1 parce que les caractéristiques spectrales des photolyases CPD et (6-4) sont différentes (cf. le chapitre III). Comme OtCPF2 est un Cry-DASH, plus proche des

photolyases CPD que des photolyases (6-4), il a semblé judicieux d'utiliser une base spectrale issue d'une photolyase CPD. Par ailleurs nous avons cherché une espèce pour laquelle tous les spectres de coefficients d'extinction molaire de FAD et de MTHF étaient donnés. Nous avons opté pour les spectres d'absorption, exprimés par les auteurs en coefficients d'extinction molaire, des différents états d'oxydo-réduction de FAD et du MTHF en interaction avec EcCPD [175] (cf. la Figure 1.5).

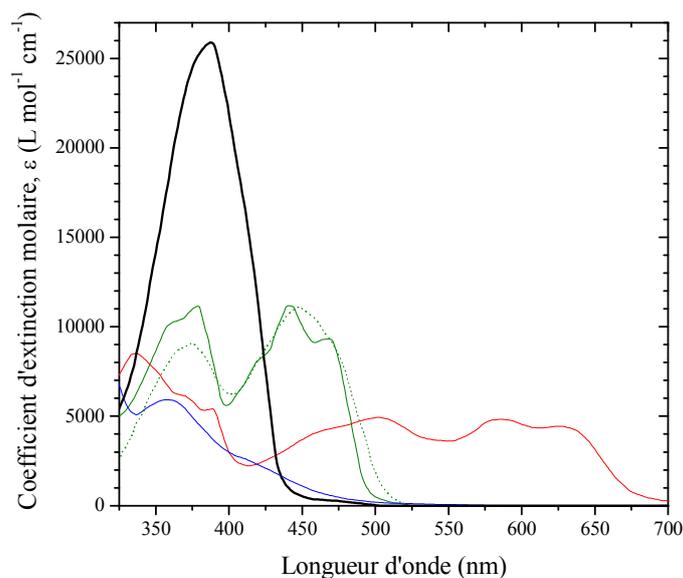


Figure 1.5 : Spectres de coefficient d'extinction molaire de FAD_{ox} (vert, trait plein), FADH• (rouge), FADH⁻ (bleu) et MTHF (noir, épais) en interaction avec EcCPD (extraits de l'article de Jorns et al. [175]) et FAD_{ox} en solution aqueuse à pH 7 (vert, pointillés, extrait de l'article de Song [153]).

Les concentrations de chaque chromophore ont été quantifiées par ajustement global du spectre d'absorption de OtCPF2 entre 325 nm et 700 nm. La répartition des différentes formes oxydo-réductrices de FAD en présence dans l'échantillon est la suivante : 26% FAD_{ox} ($[FAD_{ox}] = 7,7 \pm 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$), 9% FADH• ($[FADH^{\bullet}] = 2,6 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) et 65% FADH⁻ ($[FADH^{-}] = 18,7 \pm 0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$). La concentration en MTHF vaut $19,05 \pm 0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$, concentration peu différente de celle trouvée dans la partie 1.1.2. Le bon accord entre l'ajustement et le spectre initial, représentés sur la Figure 1.1 permet de conclure que le système est correctement décrit. Nous avons vérifié qu'en omettant FADH⁻, l'ajustement était de bien moins bonne qualité (résultat non montré). Une nouvelle valeur de la concentration totale en FAD est ainsi obtenue, $29,0 \pm 0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, peu différente de celle trouvée dans la partie 1.1.2. Ceci est un argument supplémentaire en faveur de la validité d'un ajustement incluant FADH⁻. Nous en déduisons une valeur moyenne des concentrations en FAD et

MTHF : $28,5 \pm 0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ et $19,8 \pm 0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivement. Le rapport molaire des concentrations du MTHF et de FAD est de 69%.

Les espèces majoritaires sont la photoantenne MTHF et FAD sous forme réduite anionique FADH^- . Une hétérogénéité des formes d'oxydo-réduction de FAD avec comme espèces majoritaires MTHF et FADH^- a déjà été observée pour d'autres Cry-DASH purifiés, notamment AtCry3 [153]. Ceci est différent de OtCPF1 pour laquelle l'espèce majoritaire après purification est FAD_{ox} sans photoantenne (cf. la partie 1.4 du chapitre III). Comme les espèces supposées majoritaires *in vivo* de ces deux photolyases sont FADH^- et une photoantenne, OtCPF2 semble à la fois pouvoir mieux retenir sa photoantenne et être moins perméable que OtCPF1 au dioxygène.

1.1.4 Rapport molaire chromophores/apoprotéine

La concentration en apoprotéine a été calculée, par deux méthodes différentes, afin de déterminer le rapport molaire chromophores/apoprotéine.

La masse d'apoprotéine précipitée après dénaturation par chauffage de OtCPF2 permet de calculer une première concentration d'apoprotéine, sachant que sa masse molaire (incluant celle de la GST) vaut 86 kDa. Nous obtenons : $42 \pm 6 \mu\text{mol L}^{-1}$.

La Figure 1.6-A montre le spectre d'absorption d'un échantillon dilué 50 fois de OtCPF2 entre 220 nm et 320 nm, afin de pouvoir observer la bande d'absorption caractéristique des acides aminés aromatiques centrée à 280 nm. Le coefficient d'extinction molaire théorique de l'apoprotéine ($\epsilon_{280} = 131\,305 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) est calculé en appliquant le modèle de Pace [178] à la séquence d'acides aminés primaires connue de OtCPF2 et de la GST (cf. le chapitre VI). Afin d'éliminer la contribution d'autres espèces absorbant à 280 nm (chromophores et éventuels acides nucléiques présents sur OtCPF2 purifiée), le spectre d'absorption du surnageant après dénaturation de OtCPF2 est soustrait du spectre de OtCPF2 (cf. la Figure 1.6-B). La seconde détermination de la concentration en apoprotéine est ainsi obtenue : $35 \pm 2 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Compte tenu des incertitudes absolues de ces mesures, il y a un bon accord des deux valeurs. La concentration en apoprotéine utilisée par la suite est la moyenne : $39 \pm 8 \mu\text{mol L}^{-1}$. Cette valeur nous permet de calculer les rapports molaires FAD/apoprotéine et MTHF/apoprotéine, qui sont, respectivement, de 73% et 51%. Ces rapports ne sont pas surprenants étant donné que de nombreuses protéines CPF présentent de tels rapports sous-stoechiométriques après purification [19].

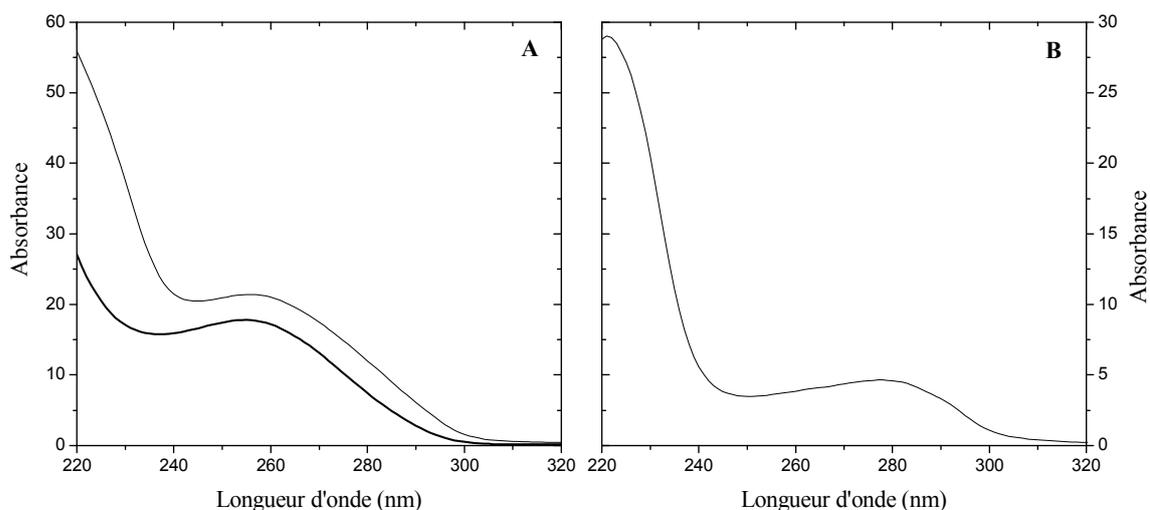


Figure 1.6 : A : Spectres d'absorption stationnaire de OtCPF2 corrigés du facteur de dilution avant (trait plein) et après (trait épais) dénaturation par chauffage de OtCPF2 entre 220 nm et 320 nm. B : Spectre d'absorption obtenu par différence des spectres avant et après dénaturation de OtCPF2.

1.2 Présence de flavine libre

1.2.1 Spectre de fluorescence

OtCPF2 porte MTHF et les différents états d'oxydo-réduction de FAD. Comme il a été vu dans la partie 1.1.1, le spectre de fluorescence de OtCPF2 pour une excitation à 400 nm est complexe, avec des contributions de MTHF, FAD_{ox} et possiblement de FADH⁻. En excitant l'échantillon à 450 nm, nous avons voulu augmenter fortement la contribution de la flavine oxydée, afin d'en déterminer l'origine moléculaire. Le spectre de fluorescence de OtCPF2 pour une excitation à 450 nm est représenté sur la Figure 1.7. Nous remarquons comme pour OtCPF1 que ce spectre n'est pas strictement l'image miroir de la bande structurée S₀S₁ de FAD_{ox} en interaction avec une protéine CPF (cf. la Figure 1.5). Nous observons une bande large centrée à 530 nm assez similaire au spectre de fluorescence de FAD_{ox} libre (cf. le chapitre II). Cette observation suggère que le spectre de fluorescence de OtCPF2 pourrait être en partie dû à une population de FAD_{ox} libre en solution et non au FAD_{ox} portée par OtCPF2. Il a en effet été rapporté que la fluorescence du cryptochrome 3 de *A. thaliana* est celle d'une fraction de FAD_{ox} libre et non celle de FAD_{ox} dans la protéine [153]. Par ailleurs, nous avons calculé un déplacement de Stokes de 3350 cm⁻¹, identique à celui obtenu pour FAD_{ox} en solution. Le déplacement de Stokes étant en partie dû à la relaxation de l'état excité de FAD_{ox} par réorganisation du solvant autour de cet état excité, nous doutons qu'une telle valeur puisse

être atteinte par FAD_{ox} portée par OtCPF2 et isolée du solvant. Ceci renforce l'hypothèse que la fluorescence observée ici soit liée à une population de FAD_{ox} libre en solution.

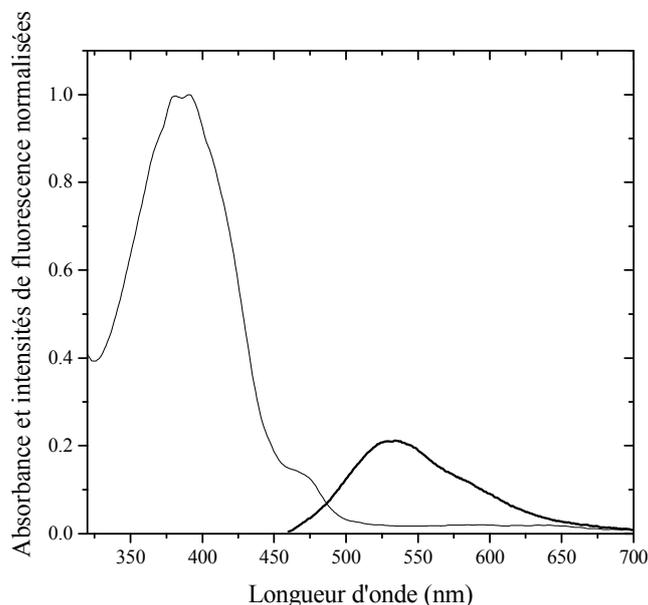


Figure 1.7 : Spectres d'absorption (trait plein) et de fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$, trait épais) de OtCPF2 dans une solution tampon TRIS à pH 8,0 et à 5°C.

1.2.2 Rendement quantique de fluorescence

Nous verrons dans la partie 2.1 que la désexcitation de l'état excité de FAD_{ox} a lieu avec une constante de temps de 590 fs. Ce déclin ultrarapide rend le rendement quantique de fluorescence de FAD_{ox} portée par la protéine extrêmement faible. En utilisant la constante radiative de la RF en solution aqueuse ($\sim 5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ [34]), le rendement de OtCPF2 est de $\sim 10^{-5}$, très inférieur à celui de FAD_{ox} libre en solution (0,033 pour $4 < \text{pH} < 9$ [40]). Nous avons trouvé, à partir de l'équation 3.1 du chapitre III, le rendement de fluorescence de notre échantillon de OtCPF2, relatif à celui de FAD_{ox} en solution : 0,11 (soit un rendement absolu de l'ordre de 0,004). Cette valeur suggère que la contribution de FAD_{ox} liée à la protéine à la fluorescence excitée à 450 nm est très minoritaire (négligeable).

Le rendement de fluorescence relatif que nous avons mesuré nous indique que la fraction, maximale, de FAD_{ox} libre en solution capable de rendre compte de tout le rendement de fluorescence de OtCPF2 serait de 11%. Étant donné que 26% des molécules de FAD sont sous forme oxydée, cela ferait 3% des molécules FAD sous forme oxydée et libre. Ce pourcentage est bien sûr une valeur supérieure car, comme nous le verrons dans la partie 2.1.3, la durée de vie de l'état excité de FADH⁻ portée par OtCPF2 est assez longue ($\sim 500 \text{ ps}$)

et autoriserait la possibilité qu'une partie du rendement de fluorescence de OtCPF2 excitée à 450 nm provienne aussi de FADH^- (sa concentration est élevée dans l'échantillon et son absorbance à 450 nm est non nulle).

Les expériences de spectroscopie électronique stationnaire ont été réalisées sur des échantillons non concentrés. En revanche toutes les expériences d'absorption transitoire ont été conduites sur des échantillons fraîchement préparés et concentrés d'un facteur ~ 3 sur un filtre ayant un seuil de coupure de 10 kDa (cf. le chapitre VI). La concentration relative en FAD_{ox} libre en solution est ainsi diminuée d'un facteur 3 par rapport à celle de l'échantillon OtCPF2. Avec seulement 1% des molécules FAD sous forme oxydée et libre, nous pourrions donc négliger ce type de chromophores dans l'interprétation des données d'absorption transitoire.

1.3 Stabilité de OtCPF2

1.3.1 Stabilité thermique

Nous avons effectué un test de stabilité de notre échantillon de OtCPF2, en le conservant pendant 30 min dans l'obscurité à deux températures différentes : 5°C et 15°C. Les éventuelles modifications ont été suivies par spectroscopie d'absorption stationnaire.

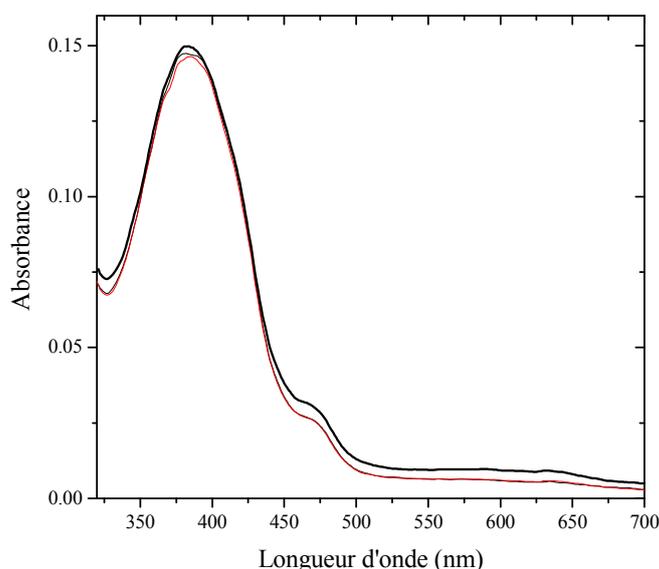


Figure 1.8 : Spectres d'absorption stationnaire de OtCPF2 à 5°C (trait plein, noir), après un délai de 30 min dans l'obscurité à 5°C (trait plein, rouge) et à 15°C (trait épais, noir).

La Figure 1.8 montre qu'une élévation de température de 5°C à 15°C entraîne des modifications spectrales immédiates, notamment entre 425 nm et 700 nm. Celles-ci sont

essentiellement dues à une augmentation du fond de diffusion de l'échantillon, lui-même probablement dû à la formation d'agrégats protéiques. Ce phénomène a déjà été rapporté pour AtCry3 [153] : Song et al. ont noté un début de diffusion à partir d'une durée de conservation de six heures de AtCry3 à 20°C. En ce qui concerne OtCPF2, ce phénomène est observé immédiatement à 15°C. En revanche à 5°C, l'échantillon est stable. Par conséquent, les expériences sur OtCPF2 ont toujours été menées à 5°C.

1.3.2 Stabilité chimique

La Figure 1.9-A montre l'évolution du spectre d'absorption d'un échantillon de OtCPF2 conservé pendant un peu plus de quatre heures dans l'obscurité à 5°C. Une augmentation d'absorbance est observée au dessus de 427 nm et un point isosbestique relevé à 427 nm. Une décomposition spectrale permet de mettre en évidence une diminution de la concentration en FADH⁻ et une augmentation de celle de FADH[•]. Les concentrations en FAD_{ox}, FAD total (concentration totale des différents états d'oxydo-réduction de FAD) et MTHF restent à peu près constantes (cf. la Figure 1.9-B).

Ce comportement est assigné à une oxydation de FADH⁻ en FADH[•] par le dioxygène, ce que nous avons déjà observé pour OtCPF1 dans la partie 2.2 du chapitre III. Notons que dans ces échantillons la solution tampon contient aussi un réducteur externe, le glutathion réduit (GSH), qui est susceptible de réduire spontanément FAD_{ox} et FADH[•]. Nous avons ajusté les cinétiques mesurées par le modèle du Schéma 7.



Schéma 7

La constante de vitesse de réduction spontanée de FAD_{ox} en FADH[•] a été imposée à $k_{12}^{\text{red}} = 0 \text{ s}^{-1}$, car sinon l'ajustement paramétrique converge trop lentement tout en faisant tendre la valeur de k_{12}^{red} vers zéro. Les constantes de vitesses d'oxydation et de réduction sont les suivantes : $k_{21}^{\text{ox}} = 1,9 \pm 0,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $k_{23}^{\text{red}} = 5 \pm 3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $k_{32}^{\text{ox}} = 3,2 \pm 0,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

Les constantes de vitesse d'oxydation sont dix fois plus petites que celles trouvées pour OtCPF1. Les flavines sont donc moins facilement oxydées dans OtCPF2 que dans OtCPF1, ce qui légitime l'idée précédemment émise que FAD est mieux protégée du dioxygène au sein de OtCPF2 que dans OtCPF1. L'oxydation des flavines étant lente dans

OtCPF2, les expériences d'absorption transitoires décrites dans la partie 2 peuvent être menées sur plusieurs heures (jusqu'à dix-huit heures) sans altération spontanée de la composition de l'échantillon. Le facteur limitant est l'apparition de diffusion due à la dénaturation de la protéine. Nous allons voir que l'accumulation de photoproduits de photoréduction, telle que nous l'avons observée pour OtCPF1 (cf. la partie 2 du chapitre III), n'est pas un problème pour OtCPF2.

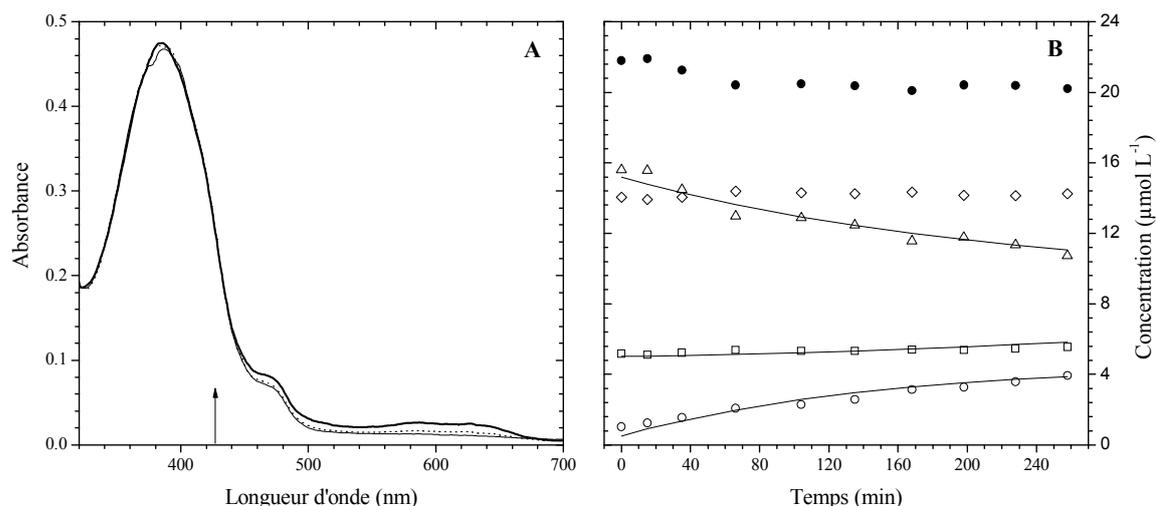


Figure 1.9 : A : Spectres d'absorption de OtCPF2 en solution tampon à pH 8,0 et à 5°C, à 0 min (trait plein), 66 min (en pointillés) et 258 min (trait épais) après sa décongélation. La flèche indique un point isosbestique à 427 nm. B : Évolution des concentrations de FAD_{ox} (carrés vides), FADH[•] (ronds vides), FADH⁻ (triangles vides), MTHF (losanges vides) et FAD total (ronds pleins) entre 0 min et 258 min après décongélation de l'échantillon. Les traits pleins colorés, en B, représentent un ajustement paramétrique global par le modèle cinétique décrit par le Schéma 7.

1.3.3 Photostabilité

Dans cette partie nous présenterons l'influence de l'irradiation continue de OtCPF2 à deux longueurs d'onde spécifiques : 400 nm et 470 nm. À 400 nm, nous excitions préférentiellement la photoantenne MTHF et à 470 nm la forme oxydée de FAD.

La Figure 1.10 montre que les irradiations à 400 nm et 470 nm ont peu d'effet sur les concentrations des chromophores présents dans OtCPF2. Dans le cadre du modèle de la photoréduction de FAD par un donneur d'électron interne (résidu tryptophane, tyrosine) à la protéine (cf. le chapitre I), ceci traduit le fait que la vitesse de recombinaison de charge suivant la photoséparation initiale est bien plus rapide que la réduction du donneur interne par le donneur externe (GSH) – contrairement à ce que nous avons vu pour OtCPF1 (cf. la partie 2.3 du chapitre III). Ceci peut soit s'interpréter par une exposition plus faible du donneur

interne au milieu extérieur, soit par une accessibilité moindre de GSH à ce donneur. Alternativement la vitesse de recombinaison de charge pourrait être plus grande pour OtCPF2 que pour OtCPF1.

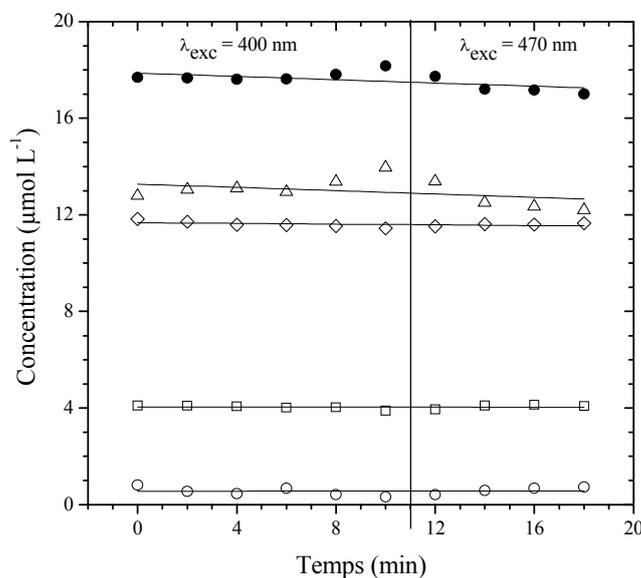


Figure 1.10 : Concentrations de FAD_{ox} (carrés vides), FADH[•] (ronds vides), FADH⁻ (triangles vides), MTHF (losanges vides) et FAD total (ronds pleins) dans la protéine après un temps d'irradiation à 400 nm de 0 min à 10 min, suivi d'un temps d'irradiation à 470 nm de 0 min à 8 min. Les traits pleins représentent un ajustement paramétrique avec une fonction affine.

Nous remarquons que notre irradiation de OtCPF2 à 400 nm n'a pas photodégradé MTHF. Il s'agit, pourtant, d'une technique efficace d'élimination de la photoantenne en interaction avec les photolyases CPD [182]. Il est possible que l'énergie d'irradiation de la présente expérience (10 min d'exposition dans des conditions d'irradiation rapportées au chapitre VI) ait simplement été insuffisante pour observer ce phénomène. La distribution des différents chromophores au sein de OtCPF2 est donc stable sous irradiation (400 nm et 470 nm), ce qui nous a permis de réaliser des expériences d'absorption transitoire sur OtCPF2 sans traitement supplémentaire des échantillons.

2 Spectroscopie d'absorption transitoire de OtCPF2

2.1 Photoréduction de FAD_{ox} au sein de OtCPF2

Les expériences d'absorption transitoire réalisées pour l'étude de la photoréduction de FAD_{ox} au sein de OtCPF2 ont été effectuées sur deux échantillons concentrés de OtCPF2 en solution tampon à pH 8,0, à 5°C (notés OtCPF2-Iso et OtCPF2-Aniso) contenus dans une cuve en silice fondue de faible volume (~50µL) en translation dans un mouvement de va et vient afin que le volume irradié soit renouvelé entre deux tirs de pompe et qu'ainsi la photodégradation de l'échantillon soit réduite. Les expériences menées sur OtCPF2-Iso dans une configuration de polarisation des faisceaux pompe et sonde à l'angle magique sont présentées dans la partie 2.1.1 et celles sur OtCPF2-Aniso dans les configurations de polarisation parallèle et perpendiculaire (cf. le chapitre VI) sont décrites dans la partie 2.1.2.

2.1.1 Absorption transitoire isotrope

L'absorbance de l'échantillon OtCPF2-Iso à 470 nm (notée A_{470} ; à la longueur d'onde d'excitation de l'échantillon) pour 1 mm de trajet optique était de 0,03 et à 386 nm de 0,18 (notée A_{386} ; au maximum de la transition S_0S_1 de MTHF). Dans ces conditions expérimentales, la distribution des différentes formes oxydo-réductrices au sein de OtCPF2-Iso, à l'état fondamental, était la suivante : 30% de FAD_{ox} ($[FAD_{ox}] = 20,0 \pm 0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$), 4% de FADH[•] ($[FADH^{\bullet}] = 2,6 \pm 0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$) et 66% de FADH⁻ ($[FADH^-] = 44,3 \pm 0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$). Le rapport de la concentration de MTHF ($[MTHF] = 55,9 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) à la concentration totale des différentes formes oxydo-réductrices de FAD ($[FAD_{tot}] = 67 \pm 2 \mu\text{mol L}^{-1}$) est de 84%. MTHF est présent en plus grande quantité ici que dans l'échantillon utilisé en spectroscopie stationnaire parce que cette expérience a été menée sur un échantillon que nous avons fraîchement préparé en améliorant le protocole de purification (en 12 heures au lieu de 24 heures et à 5°C au lieu de la température ambiante pour certaines étapes). Il semblerait que ces conditions évitent que la photoantenne se détache de OtCPF2. Les fractions molaires rapportées à l'ensemble des chromophores en présence (photoantenne comprise) est la suivante : 16% de FAD_{ox}, 2% de FADH[•], 36% de FADH⁻ et 46% de MTHF. Après excitation de OtCPF2-Iso par des impulsions de 55 fs à 470 nm, la distribution des fractions molaires prédites à l'état excité (avant toute évolution spontanée) est de : 78% de FAD_{ox}^{*}, 5% de FADH^{•*}, 10% de FADH^{*-} et 7% de MTHF^{*} (les calculs sont détaillés dans la partie 4.4 du chapitre VI). La population à

l'état excité est donc hétérogène mais est dominée par FAD_{ox} . Les impulsions de la pompe ont ici une énergie de $0,31 \mu J$, focalisées sur une section de l'échantillon de l'ordre de $4800 \mu m^2$. L'expérience est réalisée en régime linéaire (cf. la partie 2.4.1 du chapitre VI).

2.1.1.1 Analyse spectrale

2.1.1.1.1 Spectre différentiel pour un retard pompe-sonde de 250 fs

Étant donné que les spectres différentiels pour des retards pompe-sonde proches de zéro seconde sont superposés à l'artéfact dit « temps zéro » constitué d'automodulation de phase croisée et d'effet Raman stimulé (cf. la partie 2.4.3 du chapitre VI), nous ne représentons le spectre d'absorption transitoire de OtCPF2-Iso qu'à partir du plus petit retard pompe-sonde exempt de pollution par l'artefact temps zéro : 250 fs (cf. la Figure 2.1).

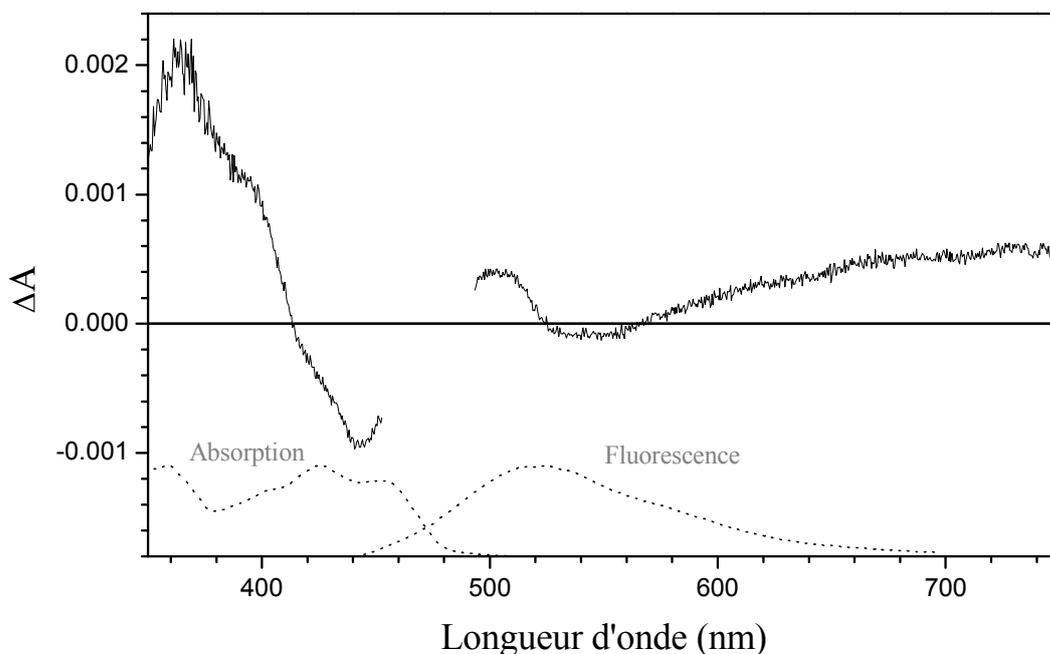


Figure 2.1 : Spectre d'absorption transitoire de OtCPF2-Iso en solution tampon TRIS à pH 8,0 et à $5^{\circ}C$ ($A_{386} = 0,18$ pour 1 mm de trajet optique), mesuré après excitation à 470 nm pour un retard pompe-sonde de 250 fs. Le spectre d'absorption stationnaire de FAD_{ox} portée par EcCPD [175] et le spectre de fluorescence ($\lambda_{exc} = 450$ nm) de OtCPF2 sont donnés en pointillés.

Ce spectre différentiel présente deux régions négatives entre 415 nm et ~ 490 nm (la diffusion de la pompe autour de 470 nm, masquée sur la Figure 2.1, empêche de déterminer précisément la limite de ce domaine) et entre 525 nm et 566 nm, qui sont, respectivement, dominées par les contributions du blanchiment et de l'émission stimulée de l'état excité. Les contributions sous-jacentes du blanchiment et de l'émission stimulée vont bien entendu au-delà de ces régions ; elles sont attendues avec un signe négatif sur toute l'extension des spectres d'absorption et de fluorescence de FAD_{ox} , respectivement. Par ailleurs trois bandes

positives, dominées par de l'absorption transitoire, sont observées dans les plages spectrales 350-415 nm (AT-UV), 494-525 nm (AT) et 566-750 nm (AT-IR⁸).

Comme l'espèce majoritaire de l'échantillon OtCPF2-Iso à l'état excité est FAD_{ox}, nous avons représenté sur la Figure 2.2 les spectres d'absorption transitoire normalisés de OtCPF2-Iso et de FAD_{ox} (cf. le chapitre II) diluée en solution tampon TRIS à pH 8,0 et à 5°C, pour un même retard pompe-sonde de 250 fs. Une grande similarité de forme des deux spectres différentiels est observée. Cependant quelques différences peuvent être relevées :

- la bande négative dominée par le blanchiment est plus étroite et structurée pour OtCPF2-Iso,
- la bande AT-UV de l'échantillon OtCPF2-Iso est plus structurée,
- la région négative dominée par de l'émission stimulée est moins intense pour OtCPF2-Iso et est décalée de 20 nm vers le bleu.

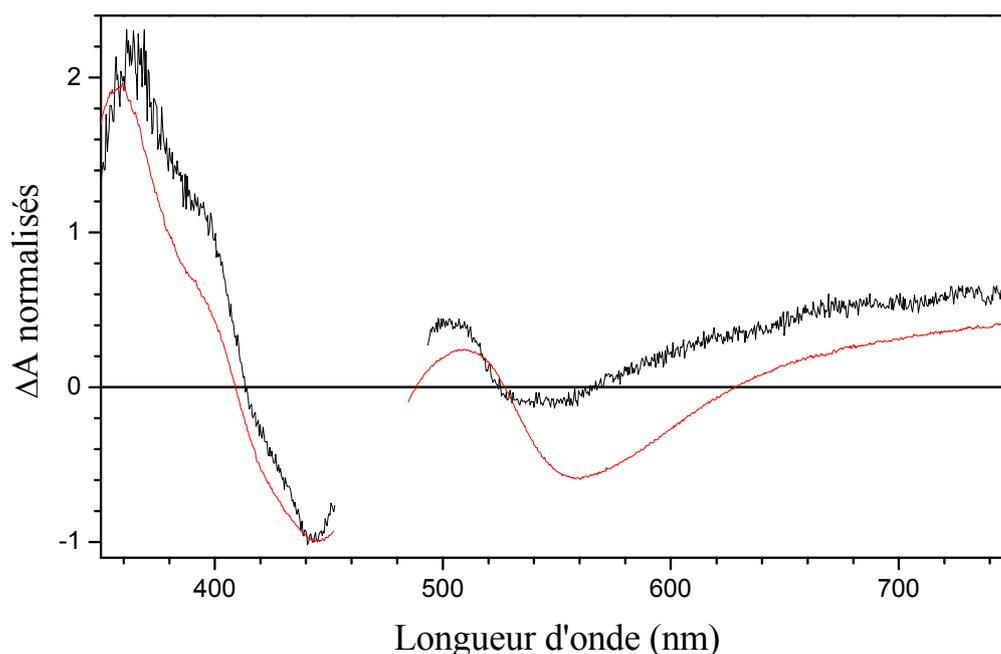


Figure 2.2 : Spectres d'absorption transitoire, normalisés à 445 nm, de OtCPF2-Iso (noir) et FAD_{ox} dilué (rouge) en solution tampon TRIS à pH 8,0 et à 5°C, mesurés après excitation à 470 nm pour un même retard pompe-sonde de 250 fs.

Comme il a été vu dans la partie 1.1.3 et dans le chapitre III, dans un milieu plus rigide et homogène comme une protéine, les sous-structures vibrationnelles des bandes électroniques de FAD_{ox} sont visibles. Cela explique la présence de structures dans la bande de blanchiment

⁸ Les notations AT-UV, AT et AT-IR sont des abréviations des termes : absorption transitoire située dans l'UV proche, dans le visible et dans l'IR proche, respectivement.

de l'échantillon OtCPF2-Iso. La bande AT-UV présente, par ailleurs, un creux à 390 nm correspondant au maximum de la transition électronique S_0S_2 de FAD_{ox} dans EcCPD. Cette structure est donc due à la superposition de la contribution de blanchiment (négative) à celle d'absorption transitoire (positive, dominante).

Les causes du décalage de 20 nm vers le bleu de la bande négative dominée par de l'émission stimulée de OtCPF2-Iso pourraient être multiples :

- une contribution sous-jacente d'émission stimulée de FAD_{ox} plus bleue au sein de la protéine qu'en solution aqueuse, due à un environnement de la flavine moins polaire,
- une altération, au sein de la protéine, de la position et de l'intensité des bandes d'absorption transitoire de FAD_{ox} superposées à l'émission stimulée,
- des contributions de photoproduits issus du déclin de l'état excité de FAD_{ox} qui, nous allons le voir dans la partie 2.1.1.2, se produit très rapidement (en 590 fs).

2.1.1.1.2 Évolution temporelle

La Figure 2.3 présente les spectres d'absorption transitoire de l'échantillon OtCPF2-Iso pour des retards pompe-sonde allant de 0,25 ps à 1400 ps. L'évolution des spectres différentiels de OtCPF2-Iso se divise en trois phases :

- phase 1 (Figure 2.3-A) : les bandes AT-UV et de blanchiment n'évoluent pas entre 0,25 ps et 1,5 ps. En revanche nous observons la disparition de la bande d'émission stimulée, remplacée par une bande large AT située entre 500 nm et 700 nm. Un point isosbestique temporaire est relevé à 654 nm.
- phase 2 (Figure 2.3-B) : pour des retards pompe-sonde allant de 1,5 ps à 50 ps, les bandes déclinent faiblement de façon quasi-homothétique. Une diminution importante est cependant observée dans la bande de blanchiment. Un aplatissement de la bande AT se devine aussi dans cette phase. Entre 50 ps et 200 ps, seules les bandes AT-UV et AT diminuent.
- phase 3 (Figure 2.3-C) : pour des retards pompe-sonde allant de 200 ps à 1400 ps, les bandes évoluent peu. Nous pouvons relever une diminution plus importante vers 600 nm dans la bande AT.

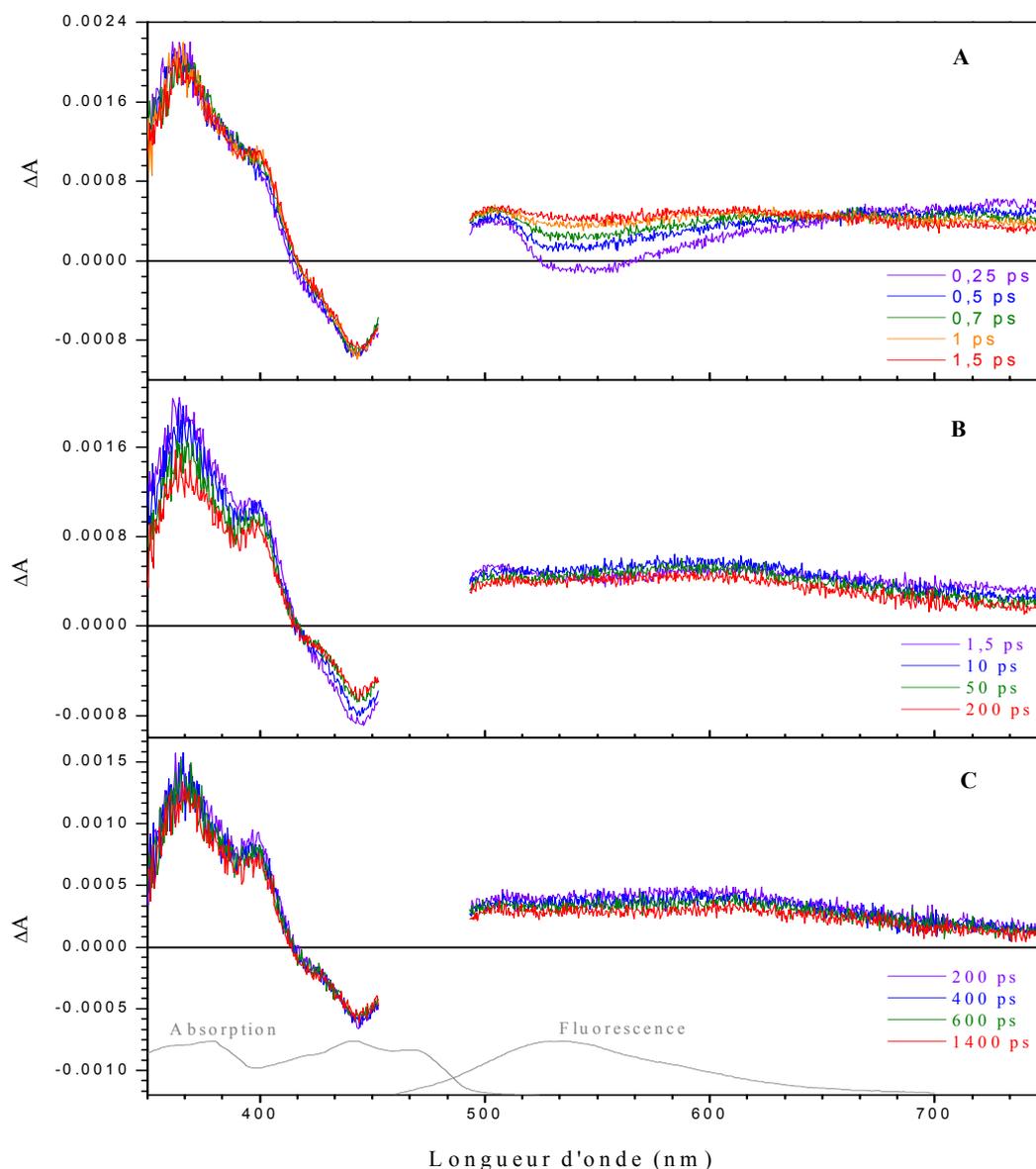


Figure 2.3 : Spectres d'absorption transitoire de OtCPF2-Iso en solution tampon TRIS à pH 8,0 et à 5°C ($A_{386} = 0,18$ pour 1 mm de trajet optique), mesurés après excitation à 470 nm pour des retards pompe-sonde de 0,25 ps à 1,5 ps (A), 1,5 ps à 200 ps (B) et 200 ps à 1400 ps (C). Le spectre d'absorption stationnaire de FAD_{ox} portée par EcCPD [175] et le spectre de fluorescence ($\lambda_{exc} = 450$ nm) de OtCPF2 sont rappelés en gris.

De la Figure 2.3-A, nous en déduisons qu'une réaction photoinduite se produit entre 0,25 ps et 1,5 ps. L'émission stimulée disparaît apparemment de façon massive, indiquant que l'état excité de FAD_{ox} se désexcite rapidement en donnant naissance à une espèce produit responsable du spectre transitoire observé après cette phase. Cette observation est renforcée par la présence d'un point isosbétique temporaire à 654 nm, pour des retards pompe-sonde allant de 0,25 ps à 1,5 ps. Étant donné que la contribution de blanchiment reste presque constante sur cette gamme temporelle, la réaction que nous observons s'effectue pratiquement

sans restauration de l'état fondamental : la quasi totalité de la population initialement excitée fait place au photoproduit de la réaction. En nous référant aux différents travaux connus sur les protéines CPF et autres flavoprotéines [7, 9, 20, 136] (cf. le chapitre I), nous nous attendons à observer ici en temps réel la photoréduction de FAD_{ox} excitée par un proche résidu aromatique, tryptophane ou tyrosine. En ce qui concerne les spectres d'absorption transitoire entre 1,5 ps et 50 ps, nous constatons une restauration partielle de l'état fondamental ainsi qu'une modification de la bande AT. Pour des délais supérieurs à 50 ps, nous pouvons dire que l'état fondamental est partiellement restauré et que la signature spectrale des photoproduits évolue peu. Pour un retard pompe-sonde de 1,4 ns, le spectre conserve une intensité assez importante, ce qui signifie l'existence de produits de longue durée de vie.

2.1.1.2 Analyse cinétique

Afin d'étudier plus précisément l'évolution temporelle des spectres différentiels de OtCPF2-Iso, nous avons procédé à l'analyse cinétique des données (corrigées du chirp, temporellement tronquée pour $t < 250$ fs) en effectuant un ajustement paramétrique global des quatre premières cinétiques orthogonales pondérées obtenues par la procédure SVD (cf. le chapitre VI). La meilleure fonction d'ajustement est la somme de trois exponentielles et d'une fonction plateau, convoluées à une gaussienne représentant la réponse expérimentale de notre dispositif⁹.

Nous avons trouvé les durées de vie suivante : $\tau_1 = 0,59 \pm 0,03$ ps, $\tau_2 = 13 \pm 3$ ps, $\tau_3 = 340 \pm 43$ ps et $\tau_4 = \infty$ (plateau imposé) et l'ajustement paramétrique est de bonne qualité ($\sigma = 2,9 \times 10^{-4}$). Les spectres des facteurs pré-exponentiels (DADS) de chaque déclin exponentiel sont présentés sur la Figure 2.4.

Le DADS₁, associé à la durée de vie de 0,59 ps, est négatif dans la bande d'émission stimulée, ce qui signifie que l'émission stimulée de FAD_{ox} au sein de OtCPF1 disparaît. La signature spectrale des photoproduits contribue aussi au DADS₁ et, comme il s'agit d'une apparition, cette contribution est affectée d'un signe négatif (cf. le chapitre VI). Cette signature est cependant difficilement séparable de celle de la disparition de FAD_{ox} excitée. Nous remarquons en particulier que le spectre pour des longueurs d'onde inférieures à 393 nm est quasiment nul et que les valeurs négatives sont observées entre 393 nm et 450 nm. Ces

⁹ La largeur de la gaussienne et la valeur du temps $t = 0$ s (superposition maximale pompe-sonde) sont déterminées au moyen d'un ajustement préalable incluant une fonction empirique modélisant l'artéfact temps zéro, décrite au chapitre VI.

signaux sont probablement l'expression de la perte de FAD_{ox} excitée et de son remplacement par un état absorbant dans cette région. Une faible contribution de retour à l'état fondamental (contribution négative ayant la forme du spectre d'absorption de FAD_{ox}) n'est pas exclue.

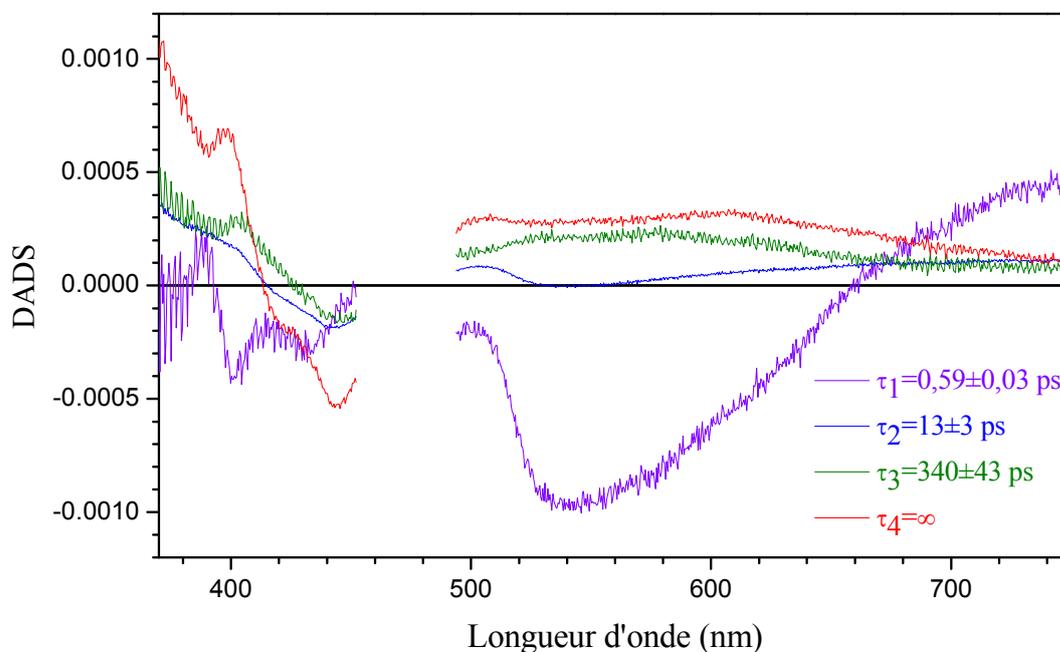


Figure 2.4 : Spectres de facteurs pré-exponentiels ou DADS associés aux durées de vie de 0,59 ps (violet), 13 ps (bleu), 340 ps (vert) et au plateau (rouge) pour OtCPF2-Iso en solution aqueuse (pH = 8,0, 5°C et $A_{386} = 0,18$ sur 1 mm).

L'amplitude du DADS2, associé à la durée de vie de 13 ps, est faible. Le signal est négatif dans la bande de blanchiment et positif pour le reste de la fenêtre spectrale. Cependant nous observons un creux entre 530 nm et 560 nm évocateur d'une contribution d'émission stimulée, c'est-à-dire de la perte d'une espèce émissive. Nous verrons qu'il pourrait s'agir d'une forme particulière de FAD_{ox} .

Le DADS3, associé à la durée de vie de 340 ps, montre un signal négatif vers 445 nm, dans la région attendue du blanchiment de l'absorption fondamentale de FAD_{ox} , ce qui traduit un retour partiel à l'état fondamental. Les autres contributions sont toutes positives et se divisent en deux parties : la partie UV et celle comprise entre 493 nm et 750 nm. Dans la partie AT, le DADS présente une bosse entre 524 nm et 608 nm. Ceci pourrait être la signature spectrale des photoproduits formés en 590 fs.

Le DADS4, associé au plateau, présente un signal négatif dans la bande de blanchiment, ce qui traduit un retour à l'état fondamental. Dans la bande AT, le DADS4 présente un léger creux entre 524 nm et 608 nm et s'étend jusqu'à 750 nm dans une

décroissance presque linéaire. Les DADS3 et DADS4 ne sont pas homothétiques (cf. la Figure 2.5).

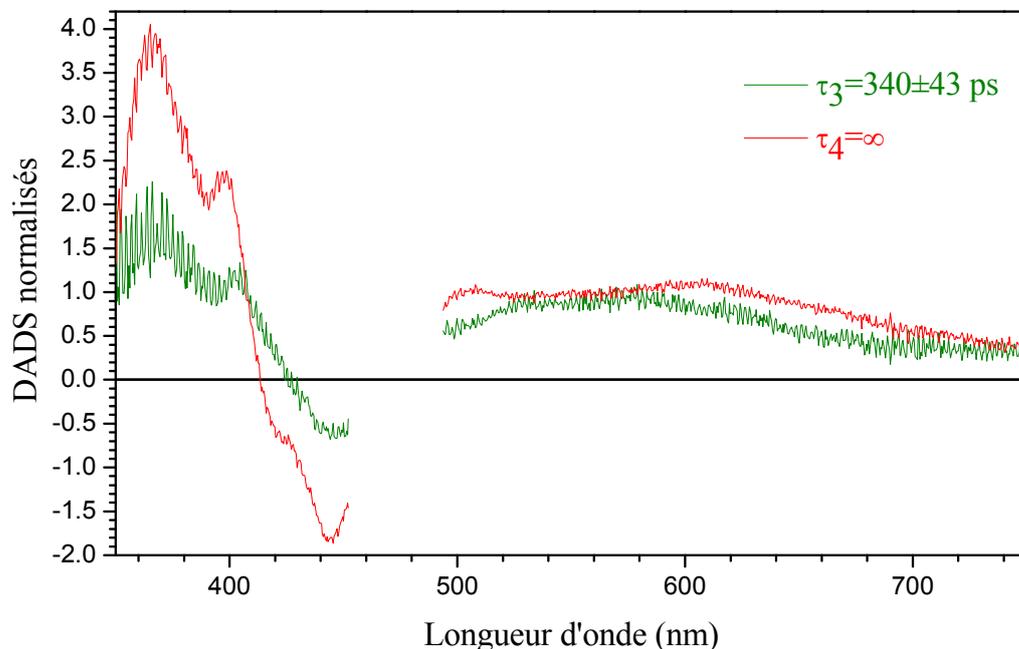


Figure 2.5 : DADS3 (340 ps, vert) et DADS4 (plateau, rouge) normalisés à 540 nm pour OtCPF2-Iso en solution aqueuse (pH = 8,0, 5°C et $A_{386} = 0,18$ sur 1 mm).

2.1.1.3 Discussion

2.1.1.3.1 Hétérogénéité à l'état fondamental

Nous venons de voir que le DADS1 traduit le déclin rapide d'une population de FAD_{ox} excitée et la formation de photoproduits. Étant donné la similarité de ce DADS1 avec celui du DADS1 de OtCPF1 (cf. la partie 3.2 du chapitre III), nous pouvons supposer que cette étape traduit essentiellement une réaction de réduction de FAD_{ox} excitée. Le DADS2 présente aussi une signature de déclin d'état excité et ressemble en fait partiellement au spectre différentiel de l'état excité de FAD_{ox} en solution (cf. la partie 1.2.2 du chapitre II). La Figure 2.6, qui montre la superposition du DADS2 de l'échantillon OtCPF2-Iso (en bleu) et de la signature spectrale de FAD_{ox} en conformation fermée en solution (en noir), illustre cette ressemblance.

Nous avons envisagé plusieurs scénarios pour tenter d'expliquer la rémanence d'un état émissif après la photoréduction supposée de FAD_{ox} :

- hypothèse 1 : pendant l'étape n°1 en 0,59 ps deux processus seraient en compétition. L'un d'eux serait la photoréduction de FAD_{ox} excitée et l'autre une sorte de photoéjection de FAD qui sortirait, partiellement, de son site de complexation et se soustrairait ainsi au processus de photoréduction. Le DADS2

représenterait la dynamique ultérieure de la population « décomplexée » alors que les DADS3 et DADS4 représenteraient la dynamique ultérieure des photoproduits de la réduction de FAD_{ox} .

- hypothèse 2 : il existerait un équilibre entre l'état excité de FAD_{ox} (état n°1) et un produit de réaction (état n°2). L'état n°2 donnerait ensuite d'autres photoproduits.
- hypothèse 3 : l'échantillon OtCPF2-Iso serait hétérogène. Il existerait une population (notée FAD_{ox} réactive) donnant lieu à la photoréduction de FAD_{ox} en 0,59 ps et une autre population (notée FAD_{ox} non réactive) ne conduisant pas à la photoréduction et essentiellement caractérisée par le DADS2. Cette population aurait de ce fait des caractéristiques spectrales proches de celles de FAD_{ox} libre en solution et une durée de vie (13 ps) voisine du déclin de la conformation fermée de FAD_{ox} en solution (6 ps).

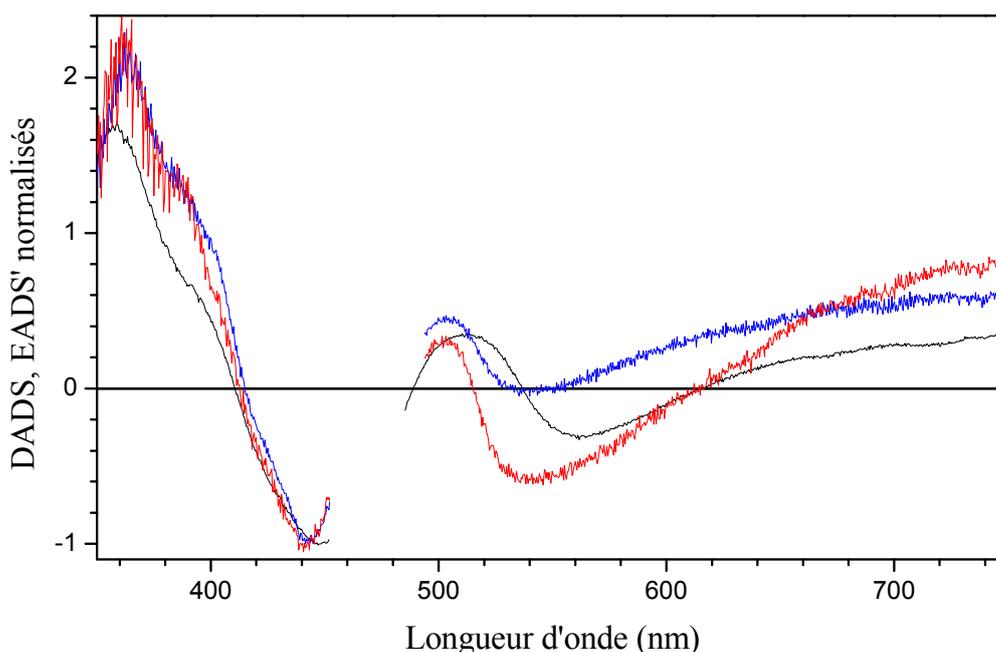


Figure 2.6 : DADS normalisés à 445 nm associés au déclin de 13 ps pour l'échantillon OtCPF2-Iso (bleu), au déclin de 6,0 ps pour FAD_{ox} libre en solution diluée (noir, cf. le chapitre II) et au EADS1' obtenue en sommant les DADS1, DADS3 et DADS4 de OtCPF2-Iso (rouge).

L'hypothèse 1 se heurte au fait que FAD est fermement maintenu dans son site de complexation par de multiples contacts (cf. le chapitre V) et il semble très difficile qu'il puisse s'en échapper en 0,59 ps.

Dans le cadre de l'hypothèse 2, l'état n°1 déclinerait en 0,59 ps et 13 ps alors que l'état n°2 se formerait en 0,59 ps et déclinerait en 13 ps. Nous attendrions donc que le DADS2

reçoive deux contributions positives (déclins) des signatures des états n°1 et 2 ainsi qu'une contribution négative (apparition) d'un état successeur produit à partir de l'état n°2. Il s'agit ici d'un modèle cinétique assez complexe que nous n'avons malheureusement pas eu le temps d'examiner assez en détail pour évaluer sa validité.

L'hypothèse 3 nous semble à la fois simple et plausible même s'il ne nous est pas encore possible de démontrer que ce serait la seule solution ; nous en ferons notre hypothèse de travail. Il reste toutefois à déterminer l'origine de cette population non réactive et à lui assigner un spectre transitoire.

2.1.1.3.2 Nature de la population non réactive

Nous supposerons pour commencer et pour simplifier que la dynamique de la population non réactive est décrite par tout le DADS2, et seulement lui. La question qui se pose est de connaître la nature de cette population.

Nous avons vu dans la partie 1.2 que FAD_{ox} en solution est présent dans des échantillons dilués de OtCPF2. Étant donné que OtCPF2-Iso a été concentré par un facteur trois au moyen d'un filtre à membrane laissant passer les objets de concentration massique inférieure à 10 kDa, nous nous attendons à ce que la fraction de flavine libre y soit très faible. Même si ce n'était pas le cas, nous nous attendrions à ce que le DADS2 de l'échantillon OtCPF2-Iso soit presque superposable au DADS2 de FAD_{ox} libre (associé au déclin de la conformation fermée en 6 ps). Nous remarquons, sur la Figure 2.6, que même si l'allure générale est similaire, la superposition n'est pas possible. La contribution d'émission stimulée du DADS2 de OtCPF2-Iso a un maximum apparent plus bleu que celle du DADS2 de FAD_{ox} libre. La bande de blanchiment entre 408-414 nm et 450 nm est par ailleurs plus étroite et structurée sur le DADS2 de OtCPF2-Iso que sur le DADS2 de FAD_{ox} libre. Étant donné que ces structures sont significatives d'un environnement homogène et rigide, il semblerait que la population responsable du DADS2 de OtCPF2-Iso ne soit pas constituée de FAD_{ox} libre mais plutôt de molécules de FAD_{ox} liées à une protéine.

Il est intéressant à ce titre de comparer le DADS2 au spectre différentiel initial de FAD_{ox} excitée de la population réactive, liée à la protéine. Nous supposerons pour cela que la dynamique de la population réactive est constituée des composantes temporelles de 0,59 ps, 340 ps et du plateau. Le spectre recherché est donc la somme DADS1+DADS3+DADS4, que nous appellerons EADS1' (cf. la définition des EADS dans la partie 2.5.3 du chapitre VI ; le prime indique ici que le DADS2 a été retiré). Nous avons superposé sur la Figure 2.6, le EADS1' et le DADS2, après normalisation à 445 nm. Les deux spectres sont très proches

dans les bandes AT-UV et de blanchiment et présentent des bandes d'émission stimulée aux mêmes longueurs d'onde. Ceci confirme que la population FAD_{ox} non réactive serait bien en interaction avec la protéine.

Nous pouvons émettre deux hypothèses :

- soit FAD_{ox} non réactive est portée par une configuration particulière de la protéine OtCPF2 dans laquelle la flavine ne pourrait pas subir de photoréduction ultrarapide (pas de réducteur à proximité),
- soit il s'agit d'une population de FAD_{ox} liée à un autre site de complexation de la protéine, par exemple le site liant normalement MTHF mais qui est, nous l'avons vu, vacant pour une grande partie des protéines.

Étant donné que la population non réactive serait associée à une durée de vie (13 ps) voisine de celle de la conformation fermée de FAD_{ox} en solution (6 ps), nous pourrions hypothétiquement supposer que, comme pour FAD_{ox} en solution, l'état excité de la population non réactive serait inhibé par un transfert de charge intramoléculaire, de l'adénine vers l'isoalloxazine, au sein d'une conformation fermée de la molécule.

2.1.1.3.3 Composantes temporelles des populations non réactive et réactive

Dans un second temps, nous pouvons nous demander si le DADS2 doit véritablement n'être associé qu'à la population non réactive ou si la population réactive ne pourrait pas y contribuer également. Nous portons à votre attention que la seconde étape de la photoréduction de FAD_{ox} dans OtCPF1 se fait avec une durée de vie de 9 ps (cf. la partie 2.1.1.3.4), proche de celle du DADS2 de OtCPF2-Iso (13 ps). L'idée consisterait donc à essayer de décomposer le DADS2 en une somme $rD2 + nrD2$, où $rD2$ est associé à la population réactive et $nrD2$ à la population non réactive.

D'une manière tout à fait qualitative, nous avons considéré que le EADS1', que nous avons vu plus haut (spectre à $t = 0$ s de la population réactive FAD_{ox} , en supposant que le DADS2 ne fait pas partie de sa dynamique) pourrait fournir une approximation grossière de la forme du $nrD2$. L'essentiel est d'utiliser un spectre plausible pour une espèce FAD_{ox} excitée, liée à la protéine (nous aurions pu aussi utiliser la construction suivante : $EADS1 = DADS1 + DADS2 + DADS3 + DADS4$). Nous avons ensuite soustrait du DADS2 une fraction variable (α) de ce EADS1'. Nous trouvons que la différence $rD2 = DADS2 - \alpha \times EADS1'$ peut, pour un certain choix du coefficient $\alpha = 0,135$, ressembler

assez fortement au DADS3 de OtCPF2-Iso (cf. la Figure 2.7). Cette opération est réalisée à titre indicatif et montre que le DADS2 pourrait aussi contenir une signature similaire à l'une des composantes temporelles de la population réactive, DADS3.

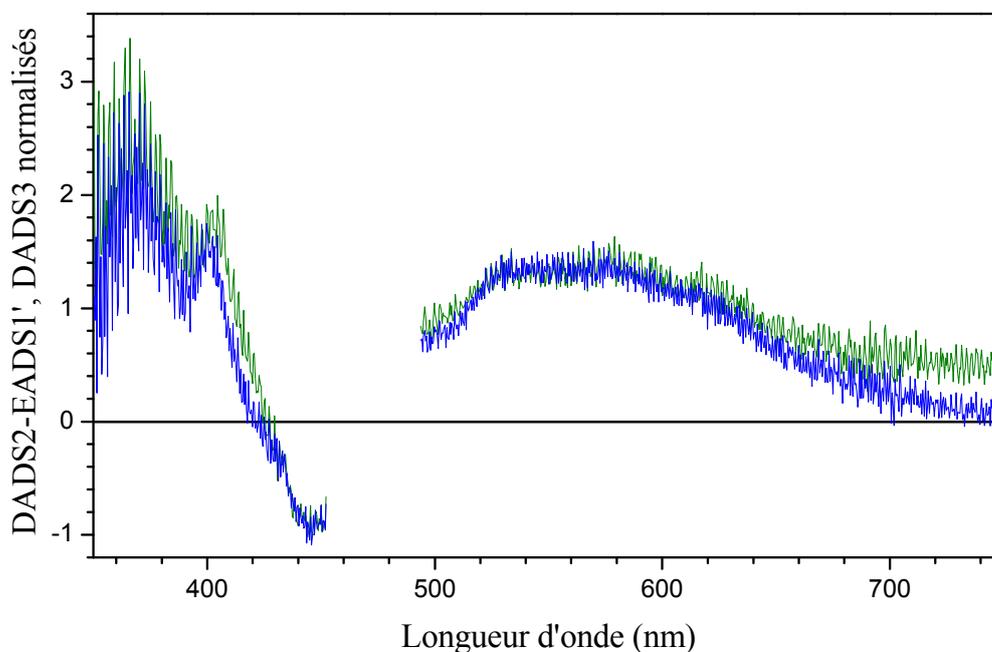


Figure 2.7 : DADS3 de l'échantillon OtCPF2-Iso (vert) et la construction DADS2 - $0,135 \times \text{EADS1}'$ (bleu) après normalisation à 447 nm.

2.1.1.3.4 Identification des photoproduits

Dans la partie 2.1.1.2, nous avons vu qu'une réaction photoinduite a lieu depuis l'état excité de FAD_{ox} avec une durée de vie de 590 fs. Comme l'attribution du DADS2 n'est pas indiscutable (population non réactive, réactive, ou les deux), les photoproduits doivent être recherchés dans les spectres associés à la composante temporelle de 340 ps (DADS3) et au plateau (DADS4). Comme pour la photoréduction de FAD_{ox} dans OtCPF1, que nous avons vue dans la partie 3.3.1 du chapitre III, et, pour les mêmes raisons, nous avons envisagé que FAD_{ox} excitée puisse être réduite en la forme semi-réduite déprotonée $\text{FAD}^{\bullet-}$ ou protonée FADH^{\bullet} . De même nous avons proposé que le réducteur puisse être un résidu tryptophane WH ou tyrosine YOH et que l'espèce oxydée soit le radical tryptophanyl protoné $\text{WH}^{\bullet+}$ ou déprotoné W^{\bullet} ou encore le radical tyrosyl déprotoné YO^{\bullet} . Par le même jeu de construction décrit au chapitre III, les spectres différentiels de différents photoproduits possibles de la photoréduction de FAD_{ox} portée par OtCPF2 ont été calculés et sont représentés sur la Figure 2.8. Les spectres des radicaux $\text{FAD}^{\bullet-}$ [173], $\text{WH}^{\bullet+}$, W^{\bullet} [184] et YO^{\bullet} [183] sont les mêmes

qu'au chapitre III. Les spectres de FADH^\bullet et FAD_{ox} (blanchiment) sont ceux de Jorns et al. [175] dont nous nous sommes servis lors de la détermination de la distribution des différents états d'oxydo-réduction de FAD au sein de la protéine.

Dans la situation où le produit de la photoréduction de FAD_{ox} est FADH^\bullet (cf. la Figure 2.8-B), la bande de blanchiment S_0S_2 est peu recouverte par la bande d'absorption de FADH^\bullet et des différents radicaux possibles du tryptophane et de la tyrosine. Le spectre différentiel présente donc des valeurs négatives. En revanche les spectres construits à partir de $\text{FAD}^{\bullet-}$ présentent une bande positive dans l'UV dominée par de l'absorption transitoire, masquant complètement la bande de blanchiment S_0S_2 , dans cette même région (cf. la Figure 2.8-A).

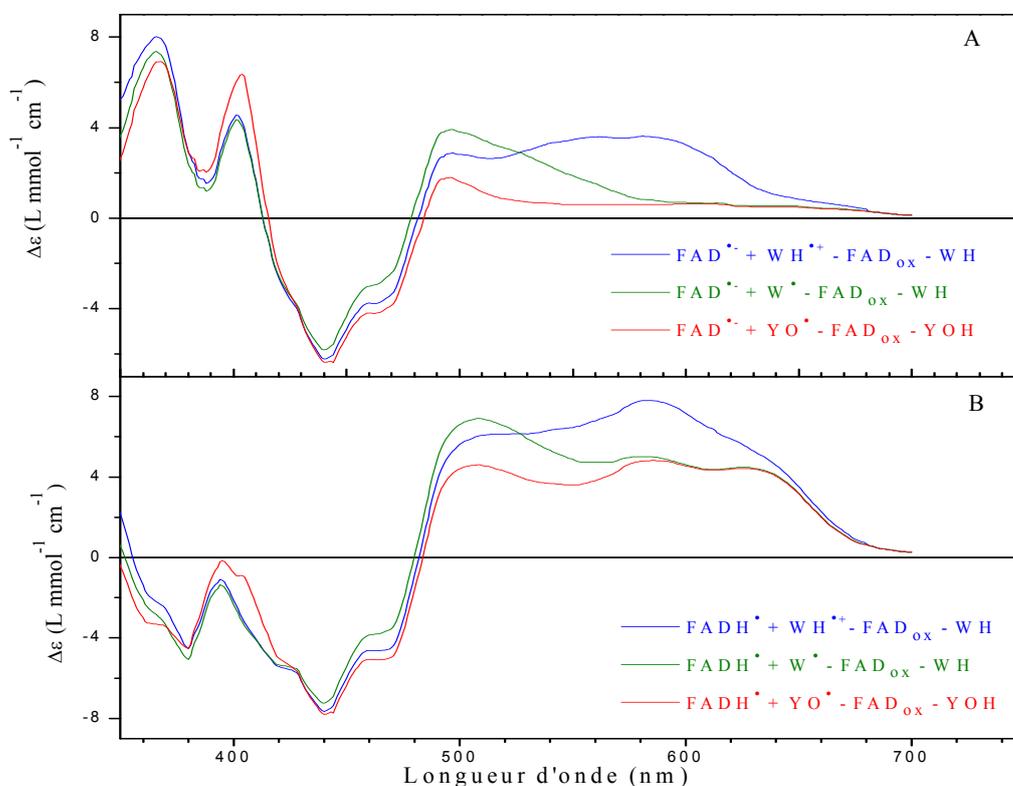


Figure 2.8 : Spectres différentiels reconstruits de la réduction de FAD_{ox} en $\text{FAD}^{\bullet-}$ (A) et en FADH^\bullet (B) par un tryptophane ou une tyrosine. Les spectres de coefficients d'extinction molaire sont extraits de la littérature pour FAD_{ox} et FADH^\bullet [175], $\text{FAD}^{\bullet-}$ [173], les tryptophanes [184] et la tyrosine [183].

Comme tous les spectres différentiels de OtCPF2-Iso présentent une bande positive dans l'UV (bande AT-UV), nous écartons la situation où la photoréduction de FAD_{ox} conduit à FADH^\bullet dans la fenêtre temporelle de notre observation (limitée à 1,4 ns). La formation de $\text{FAD}^{\bullet-}$ est en meilleure accord avec l'allure des spectres transitoires en dessous de 420 nm. Par ailleurs sur les spectres différentiels de OtCPF2-Iso pour un retard pompe-sonde supérieur

à 1,5 ps, nous remarquons la présence d'une bande large positive entre 493 nm et 750 nm, avec une rupture de pente à partir de 640 nm (cf. la Figure 2.3-B,C). Comme les spectres différentiels construits des radicaux neutres de la tyrosine ou du tryptophane sont nuls à partir de 580 nm (cf. la Figure 2.8-A), nous écartons ces deux espèces comme photoproduits. Le seul spectre différentiel construit ayant une bande positive dominée par de l'absorption transitoire dans l'UV et un signal s'étendant jusqu'à 700 nm est donc finalement celui correspondant à la réduction de FAD_{ox} en $FAD^{\bullet-}$ et à l'oxydation d'un résidu WH en radical cation $WH^{\bullet+}$ (en bleu sur la Figure 2.8-A).

Afin de confirmer cette attribution, nous avons superposé le spectre différentiel reconstruit du couple $FAD^{\bullet-}/WH^{\bullet+}$ à un spectre transitoire caractéristique des produits issus de la photoréduction de FAD_{ox} en 590 fs. Comme nous ne pouvons pas utiliser le DADS2 avec certitude, nous nous sommes intéressés aux espèces déclinant en 340 ps. Afin d'obtenir le spectre correspondant il suffit de construire les spectres associés à l'évolution de la population réactive et ne conserver que celui qui décline en 340 ps. Que nous choisissons d'inclure le DADS2 dans la dynamique réactive (EADS) ou de l'exclure (EADS') on obtient un résultat presque identique : $EADS3 = 0,96 \times DADS3 + DADS4$ et $EADS3' = 0,998 \times DADS3 + DADS4$. Le spectre de longue durée de vie vers lequel EADS3 ou EADS3' évolue en 340 ps est le même dans les deux cas : $EADS4 = EADS4' = DADS4$. Les EADS3' et EADS4' sont représentés sur la Figure 2.9.

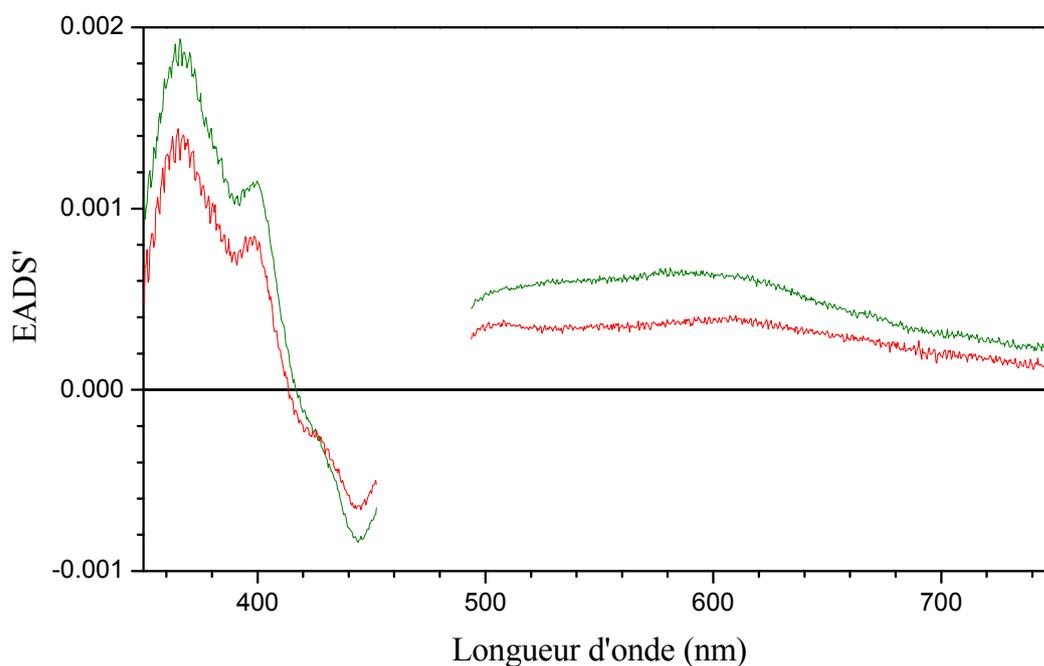


Figure 2.9 : Spectres différentiels associés à l'évolution de la population réactive de l'échantillon OtCPF2-Iso. Sont représentés en vert le spectre évoluant en 340 ps (EADS3') et en rouge le spectre associé au plateau (EADS4').

La Figure 2.10 montre le EADS3' et le spectre transitoire reconstruit du couple $FAD^{\bullet-}/WH^{+}$, normalisés à 580 nm. La superposition n'est pas parfaite mais la tendance générale est présente. Les écarts observés pourraient provenir de notre méconnaissance du véritable spectre de $FAD^{\bullet-}$ dans OtCPF2 ainsi que de contributions spectrales provenant d'autres espèces excitées (22% de la population excitée totale dont 10% de $FADH^{-*}$).

Nous verrons dans la partie 2.1.4.2 que nous avons pu déterminer la signature spectrale de l'état excité de $FADH^{\bullet-}$ dans OtCPF2 ainsi que sa durée de vie, qui vaut 548 ps. Le DADS correspondant est représenté sur la Figure 2.10 et présente une bande large entre 450 nm et 750 nm. La présence de cette signature pourrait expliquer que le signal soit non nul à partir de 580 nm. Une autre espèce excitée dans notre expérience est $FADH^{\bullet}$ (5% de la population excitée totale) qui pourrait être photoréduite selon le mécanisme décrit par les groupes Brettel et Vos. Comme il a été vu au chapitre III sur la Figure 3.10 extraite de l'article de Byrdin et al. [6], la photoréduction de $FADH^{\bullet}$ par un tryptophane entraîne une contribution de blanchiment de $FADH^{\bullet}$ visible par un signal différentiel négatif entre 435 nm et 635 nm. Nous n'observons manifestement pas cette contribution sur les EADS', possiblement en raison de sa faiblesse.

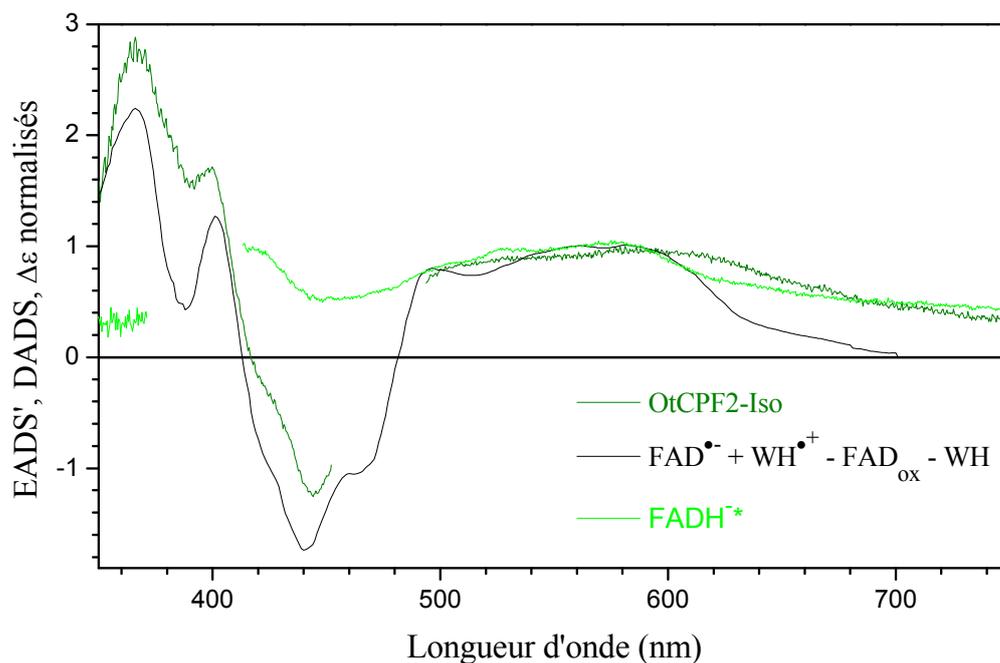


Figure 2.10 : EADS3' normalisé à 580 nm pour OtCPF2-Iso (vert foncé), spectre différentiel reconstruit normalisé à 580 nm du couple FAD^{•-}/WH^{•+} (noir) et DADS3 associé au déclin de l'état excité de FADH^{-*} dans OtCPF2 (vert clair, $\tau_3 = 548$ ps pour OtCPF2-TE1 excité à 387,5 nm et obtenu dans la partie 2.1.4.2).

Si nous reprenons le cas du modèle cinétique avec un saut d'électron depuis un tryptophane vers un autre tryptophane, nous avons vu que les spectres différentiels des photoproduits devraient en principe être tous à peu près identiques. Nous avons cependant remarqué que les DADS3 (340 ps) et DADS4 (plateau) normalisés ne sont pas totalement superposables (cf. la Figure 2.5), ce qui signifie que les EADS3' et EADS4' ne sont pas homothétiques comme nous pouvons nous en rendre compte sur la Figure 2.9. Le EADS4' (plateau) de OtCPF2-Iso et le spectre transitoire reconstruit du couple FAD^{•-}/WH^{•+}, normalisés à 580 nm, sont représentés sur la Figure 2.11.

Nous constatons que la superposition est un peu meilleure que pour le EADS3' (cf. la Figure 2.10), ce qui pourrait être compatible avec la disparition de FADH^{-*} excité aux temps longs étant donné que sa durée de vie dans OtCPF2 est de 548 ps.

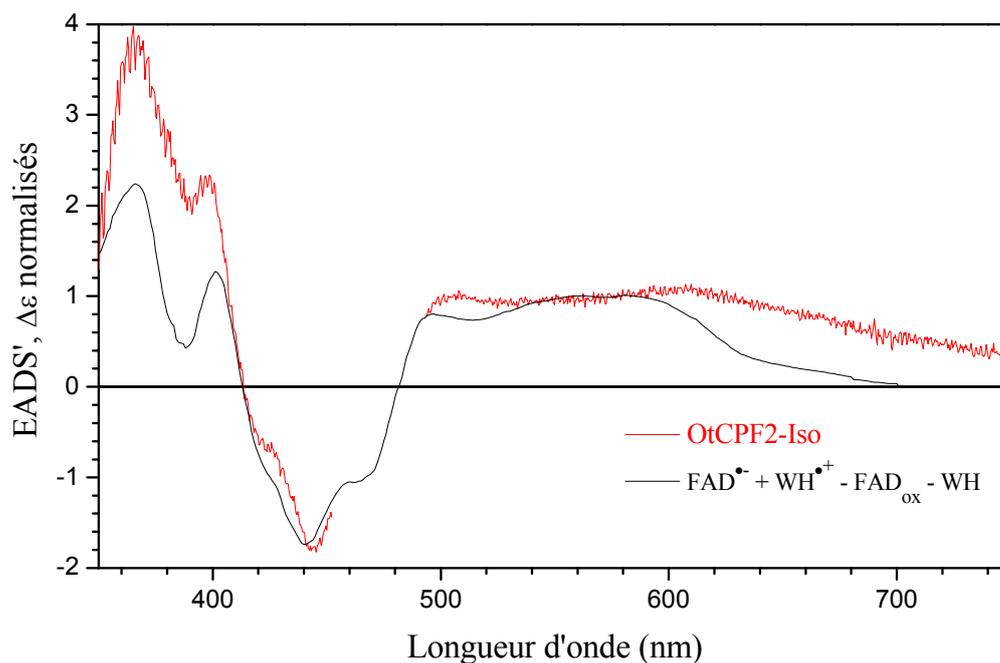


Figure 2.11 : EADS4' pour OtCPF2-Iso (rouge) et spectre différentiel reconstruit du couple $FAD^{\bullet-}/WH^{\bullet+}$ (noir) normalisés à 580 nm.

2.1.1.3.5 Modèle cinétique

Nous avons postulé l'existence d'une hétérogénéité au sein de l'échantillon OtCPF2-Iso à l'état fondamental : une population dite réactive et une autre non réactive. Nous avons aussi identifié la nature des photoproduits issus de la réduction de l'état excité de FAD_{ox} de la population réactive. Nous allons proposer un modèle cinétique expliquant nos données expérimentales.

Après excitation à 470 nm de OtCPF2, la population non réactive décline avec une durée de vie de 13 ps. FAD_{ox} se désexcite par transfert de charge intramoléculaire entre l'adénine et l'isoalloxazine.

Étant donné que la chaîne de trois tryptophanes impliquée dans la photoréduction de $FADH^{\bullet}$ dans EcCPD est conservée chez OtCPF2 (cf. le chapitre V), nous nous sommes inspirés du mécanisme proposé par les groupes Brettel et Vos pour EcCPD portant $FADH^{\bullet}$ [5-7, 9, 10, 183] (cf. la partie 2.4.2.2.4 du chapitre I) pour interpréter la dynamique de la population réactive. Nous avons vu que la flavine est photoréduite en 0,59 ps en sa forme semi-réduite déprotonée ($FAD^{\bullet-}$) par un résidu tryptophane. Étant donné la grande vitesse de la réaction, nous supposons qu'il s'agit de WH_{427} (homologue de WH_{382} pour EcCPD, cf. le

chapitre V¹⁰ ; aussi noté génériquement WH_p pour proximal). Ce premier tryptophane oxydé, WH₄₂₇^{•+}, serait ensuite réduit par un deuxième résidu tryptophane, plus éloigné de la flavine semi-réduite, probablement WH₄₀₄ (homologue de WH₃₅₉ pour EcCPD, aussi noté génériquement WH_m pour moyen). Dans le même temps une recombinaison de charge entre FAD^{•-} et WH₄₂₇^{•+} pourrait se produire. Une troisième étape consisterait en un saut d'électron depuis un troisième tryptophane encore plus éloigné de la flavine, WH₃₅₁ (homologue de WH₃₀₆ pour EcCPD, aussi noté génériquement WH_d pour distant), vers WH₄₀₄^{•+}, produisant le radical WH₃₅₉^{•+}. Dans le même temps pourrait également se produire une recombinaison de charge entre FAD^{•-} et WH₄₀₄^{•+}. Dans une version sans réactions retour (transferts d'électron dans le sens inverse le long de la chaîne de tryptophanes), ce mécanisme réactionnel se modélise par une cascade séquentielle comportant des retours à l'état fondamental à chaque étape. En fonction des paramètres du modèle (grandeur des vitesses de réaction, rendements des transferts d'électron) trois étapes cinétiques pourraient être potentiellement observées.

Lors de notre étude de OtCPF1, nous avons identifié trois composantes cinétiques et les avons associées aux trois étapes du modèle Brettel-Vos. La situation de OtCPF2 est un peu plus complexe car, selon l'interprétation faite sur le DADS2 (cf. la partie 2.1.1.3.1), nous pouvons considérer que la durée de vie de 13 ps fait partie de la dynamique de la population réactive ou non. Étant donné que i) nous avons observé une composante de 9 ps pour OtCPF1 et que nous l'avons attribuée à la réduction du radical WH_p^{•+} par WH_m, ii) et que l'étude de Kao et al. [20] rapporte une réduction de WH_p^{•+} par WH_m dans la gamme de 20-54 ps pour plusieurs photolyases et cryptochromes, notre préférence va à l'inclusion d'une part de la composante de 13 ps à la dynamique réactive de l'échantillon OtCPF2-Iso. Sur cette base, nous pourrions alors considérer que nous observons toutes les étapes du mécanisme Brettel-Vos. Suite à la réduction de FAD_{ox} excitée par WH_p en 0,59 ps, la réduction de WH_p^{•+} par WH_m aurait lieu avec une durée de vie de 13 ps et la réduction de WH_m^{•+} par WH_d se ferait en 340 ps. Les espèces ayant une durée de vie longue seraient alors les radicaux WH_d^{•+}=WH₃₅₁^{•+} et FAD^{•-}. Ce modèle cinétique est représenté sur la Figure 2.12.

¹⁰ En collaboration avec l'équipe dirigée par Francine Acher dans le Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques de l'Université Paris Descartes, nous avons effectué une simulation de la structure tridimensionnelle de OtCPF2 en utilisant la structure cristallographique connue d'un cryptochrome DASH homologue.

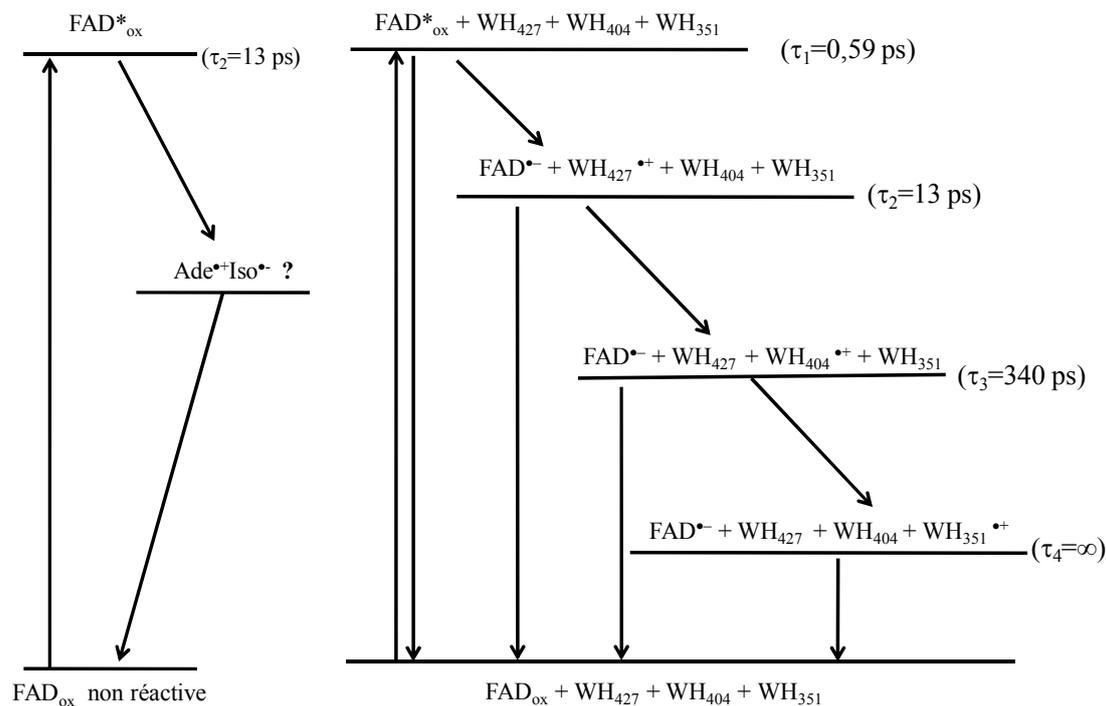


Figure 2.12 : Modèle cinétique de FAD_{ox} dans OtCPF2 après excitation à 470 nm.

Contrairement au cas de OtCPF1 nous ne montrons pas ici de calcul des spectres associés aux espèces (SADS) de notre modèle cinétique en raison de l'indétermination sur la partie du DADS2 à affecter à la dynamique réactive. Mentionnons seulement que si nous appliquons la contrainte dite « des blanchiments » décrite au chapitre VI à la dernière étape seulement de la cinétique on peut calculer un rendement de recombinaison de charge, en compétition avec la réduction de WH_m^{*+} par WH_d , de l'ordre de 23%. Par ailleurs, si on construit un modèle cinétique où le DADS2 est exclu de la dynamique réactive, la perte de blanchiment entre EADS1' et EADS3' serait de l'ordre de 16%. Comme le DADS2 est de petite amplitude, nous obtiendrions une valeur similaire de perte de blanchiment pendant la phase ultrarapide même si nous savions inclure la sous-partie rD2 du DADS2 qui appartient véritablement à la dynamique réactive. Ceci est en soi un résultat intéressant car, dans le cas de OtCPF1, aucune perte de blanchiment n'était sensible pendant la phase ultrarapide. Nous pouvons donc en conclure que dans OtCPF2 existe un processus de relaxation en compétition avec la photoréduction primaire de FAD_{ox} , alors qu'il n'est pas appréciable pour OtCPF1.

2.1.1.3.6 Comparaison avec d'autres protéines CPF

Nous allons dans cette partie comparer les durées de vie associées aux trois étapes de transfert d'électron (de WH_p vers FAD_{ox}^* , de WH_m vers WH_p^{*+} et de WH_d vers WH_m^{*+}) et

recombinaisons de charge en compétition, du mécanisme de photoréduction des groupes Brettel et Vos, telles qu'elles ont été assignées dans notre présente étude sur OtCPF1 et OtCPF2 et telles qu'elles ont été publiées pour d'autres protéines CPF. Le Tableau 2.1 présente un récapitulatif de ces valeurs.

Auteurs	Chromoprotéine	WH _p vers FAD*	WH _m vers WH _p **	WH _d vers WH _m **
Brettel-Vos [4-10]	EcCPD-FADH*	30 ps	< 4 ps	< 30 ps
Zhong-Sancar [20]	EcCPD-FAD _{ox}	<i>0,8 ps-1,2 ps</i>	54 ps	~ns
Zhong-Sancar [20]	At64-FAD _{ox}	<i>0,5 ps</i>	-	-
Zhong-Sancar [20]	ApCry1-FAD _{ox}	<i>0,97 ps-1,8 ps</i>	20 ps	~ns
Zhong-Sancar [20]	AgCry1-FAD _{ox}	<i>1,3 ps</i>	28 ps	-
Zhong-Sancar [20]	DpCry1-FAD _{ox}	<i>1,3 ps</i>	32 ps	-
cette étude (chapitre III)	OtCPF1-FAD _{ox}	0,39 ps	9 ps	81 ps
cette étude (le présent chapitre)	OtCPF2-FAD _{ox}	0,59 ps	13 ps	340 ps

Tableau 2.1 : Comparaison de différentes valeurs de durées de vie déjà assignées aux trois étapes du mécanisme de photoréduction des groupes Brettel et Vos. Les protéines étudiées sont la photolyase CPD de *E. coli* (EcCPD), la photolyase (6-4) de *A. thaliana* (At64), le cryptochrome de *Antheraea pernyi* (ApCry1), le cryptochrome de *Anopheles gambiae* (AgCry1) et le cryptochrome de *Danaus plexippus* (DpCry1) et celles présentées ici OtCPF1 et OtCPF2. Les nombres en italiques se réfèrent à des mesures par up-conversion de fluorescence et les autres par absorption transitoire.

Nous constatons pour commencer que la photoréduction primaire de la flavine par WH_p est, dans tous les cas répertoriés, beaucoup plus rapide pour FAD_{ox} que pour FADH*, ce qui est lié au fait que FAD_{ox} excitée est un meilleur oxydant (potentiel standard d'oxydo-réduction plus élevé) que FADH* excitée. Pour OtCPF1 et OtCPF2, la photoréduction de FAD_{ox} en FAD^{•-} se produit en 390 fs et 590 fs respectivement. Ces valeurs sont notamment plus petites que celles rapportées pour la photoréduction de FAD_{ox} dans EcCPD (0,8 -1,2 ps) par Kao et al. [20]¹¹. Comme il sera vu dans le chapitre V, la distance entre l'isoalloxazine et le résidu tryptophane WH_p est du même ordre de grandeur dans ces

¹¹ Nous tenons à rappeler que ces travaux du groupe de Zhong n'étaient pas connus au commencement de nos propres travaux.

trois protéines (0,42 nm). Nous proposons que la variation des durées de vie soit un effet d'orientation relative entre l'isoalloxazine et le tryptophane proximal essentiellement.

Par ailleurs la distance isoalloxazine-adénine diminue dans OtCPF2 (0,56 nm) par rapport à EcCPD (0,60 nm) et OtCPF1 (0,69 nm). Comme nous avons vu que l'inhibition de l'état excité de FAD_{ox} en conformation fermée passe vraisemblablement par un transfert de charge intramoléculaire depuis l'adénine vers l'isoalloxazine (cf. le chapitre II), plus la distance entre ces deux cycles est petite plus l'inhibition est importante. Ceci permettrait d'expliquer pourquoi le retour à l'état fondamental depuis l'état excité de FAD_{ox} (en concurrence avec la réduction par le tryptophane proximal) est plus efficace pour OtCPF2 que pour OtCPF1.

Les deux étapes suivant la photoréduction primaire de FAD_{ox} combinent deux réactions en compétition : un saut d'électron d'un tryptophane distant vers un tryptophane oxydé et une recombinaison de charge entre FAD^{•-} et le tryptophane oxydé.

Des constantes de vitesse pour ces réactions ont été données dans la littérature. Lukacs et al. proposèrent que dans la protéine native le premier saut d'électron se fasse avec une constante de vitesse supérieure à (4 ps)⁻¹ [10]. Enfin lors d'une étude récente, les groupes Brettel et Vos attribuèrent le second transfert d'électron entre les tryptophanes selon une durée de vie inférieure à 30 ps [9]. Par ailleurs Kao et al., lors de l'étude de la photoréduction de FAD_{ox} dans ApCry1, déterminèrent des constantes de vitesse de recombinaison de charge et de saut d'électron à (29 ps)⁻¹ et (62 ps)⁻¹ respectivement pour une étape d'une durée de vie de 20 ps [110].

Nous avons obtenu deux durées de vie pour OtCPF2-Iso que nous assignons partiellement (13 ps) ou totalement (340 ps) à un saut d'électron entre deux tryptophanes (WH_p^{•+} et WH_m, WH_m^{•+} et WH_d) de la chaîne de trois tryptophanes et à la recombinaison de charge entre l'isoalloxazine semi-réduite et le tryptophane oxydé. La première durée de vie est bien supérieure à celle observée par les groupes Brettel et Vos [9] et de l'ordre de grandeur de celle observée par Kao et al. [20]. La seconde est bien supérieure à celles rapportées par les groupes Brettel et Vos, cités précédemment. Ces différences pourraient s'expliquer par un environnement des tryptophanes différent dans ces protéines, ce qui modifierait le ΔrG° de ces réactions.

2.1.2 Absorption transitoire anisotrope

Nous avons vu qu'à la suite de la photoréduction primaire de FAD_{ox} excitée (dans la population réactive de l'échantillon OtCPF2-Iso) un couple de radicaux $\text{FAD}^{\bullet-}/\text{WH}^{\bullet+}$ apparaît. Nous avons pu observer par spectroscopie d'absorption transitoire isotrope une, voire deux, étapes cinétiques potentiellement attribuables aux transferts d'électron le long de la chaîne de tryptophanes. Cependant la spectroscopie d'absorption transitoire isotrope ne permet pas de discerner quel tryptophane est oxydé à chaque étape puisqu'ils ont a priori tous la même signature spectrale. Les groupes Brettel et Vos ont utilisé la spectroscopie d'anisotropie d'absorption transitoire (dichroïsme linéaire transitoire) afin de discerner chaque tryptophane oxydé [8, 9]. Les tryptophanes impliqués dans la photoréduction n'ont en effet pas la même orientation au sein des protéines CPF et ainsi le signal d'anisotropie qu'ils engendrent est différent (cf. le chapitre VI). Nous avons tenté d'employer cette même méthode dans le but d'identifier, par l'orientation de leurs moments de transition les tryptophanes oxydés résultant de la photoréduction de FAD_{ox} .

Nous avons étudié un échantillon de OtCPF2, noté OtCPF2-Aniso, en solution tampon à pH 8,0, présentant une absorbance de 0,07 à 386 nm et de 0,01 à 470 nm pour 1 mm de trajet optique. Il faut noter que cette absorbance est malheureusement trois fois plus faible que celle de l'échantillon OtCPF2-Iso (cf. la partie 2.1.1), ce qui est très défavorable pour une expérience d'anisotropie d'absorption transitoire, particulièrement sensible au bruit. Dans ces conditions expérimentales, la distribution des différentes formes oxydo-réductrices au sein de l'échantillon OtCPF2-Aniso était la suivante : 18% de FAD_{ox} ($[\text{FAD}_{\text{ox}}] = 5,8 \pm 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$), 8% de FADH^{\bullet} ($[\text{FADH}^{\bullet}] = 2,4 \pm 0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) et 74% de FADH^- ($[\text{FADH}^-] = 23,4 \pm 0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$). Le rapport de la concentration de MTHF ($[\text{MTHF}] = 22,8 \pm 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$) à la concentration totale des différentes formes oxydo-réductrices de FAD ($[\text{FAD}_{\text{tot}}] = 31,6 \pm 0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$) était de 72%. Après excitation de OtCPF2-Aniso par des impulsions de 55 fs à 470 nm, la distribution des fractions molaires prédites à l'état excité (avant toute évolution spontanée) est de : 64% de FAD_{ox}^* , 12% de $\text{FADH}^{\bullet*}$, 16% de FADH^{-*} et 8% de MTHF^* (cf. la partie 4.4 du chapitre VI). La population à l'état excité est hétérogène mais elle est encore dominée par FAD_{ox} . Les impulsions de la pompe ont ici une énergie de 0,29 μJ , focalisées sur une section de l'échantillon de l'ordre de 4800 μm^2 . L'expérience est réalisée en régime linéaire.

2.1.2.1 Analyse spectrale

Nous nous sommes d'abord assurés que l'expérience d'absorption transitoire anisotrope était compatible avec l'expérience à l'angle magique en reconstruisant le signal isotrope (en fait le signal isotrope multiplié par 3) par le calcul suivant :

$$\Delta A_{\text{tot}}^{\text{iso}} = \frac{\Delta A_{\parallel} + 2 \times \Delta A_{\perp}}{3} ; 3 \times \Delta A_{\text{tot}}^{\text{iso}} = \Delta A_{\parallel} + 2 \times \Delta A_{\perp} \quad (4.1)$$

Les spectres différentiels obtenus sont représentés sur la Figure 2.13. Nous constatons qu'ils sont beaucoup plus bruités que ceux enregistrés pour OtCPF2-Iso (cf. la Figure 2.3), ce qui était attendu, vu la faible concentration de l'échantillon OtCPF2-Aniso. Nous avons restreint la fenêtre d'observation spectrale entre 370 nm et 650 nm (car le rapport signal/bruit est trop mauvais au-delà de ces bornes). Toutefois la tendance générale est retrouvée : une bande négative entre 415 nm et ~490 nm dominée par du blanchiment, la contribution de l'émission stimulée de l'état excité est observée à $t = 0,4$ ps par le creux entre 510 nm et 580 nm et deux bandes positives, dominées par de l'absorption transitoire, situées dans les plages spectrales 370-415 nm (AT-UV) et 494-650 nm (AT). Nous observons une évolution rapide de la contribution de l'émission stimulée qui disparaît entre 0,4 ps et 10 ps. Au-delà de 10 ps, les spectres différentiels semblent ensuite décliner de façon quasi-homothétique.

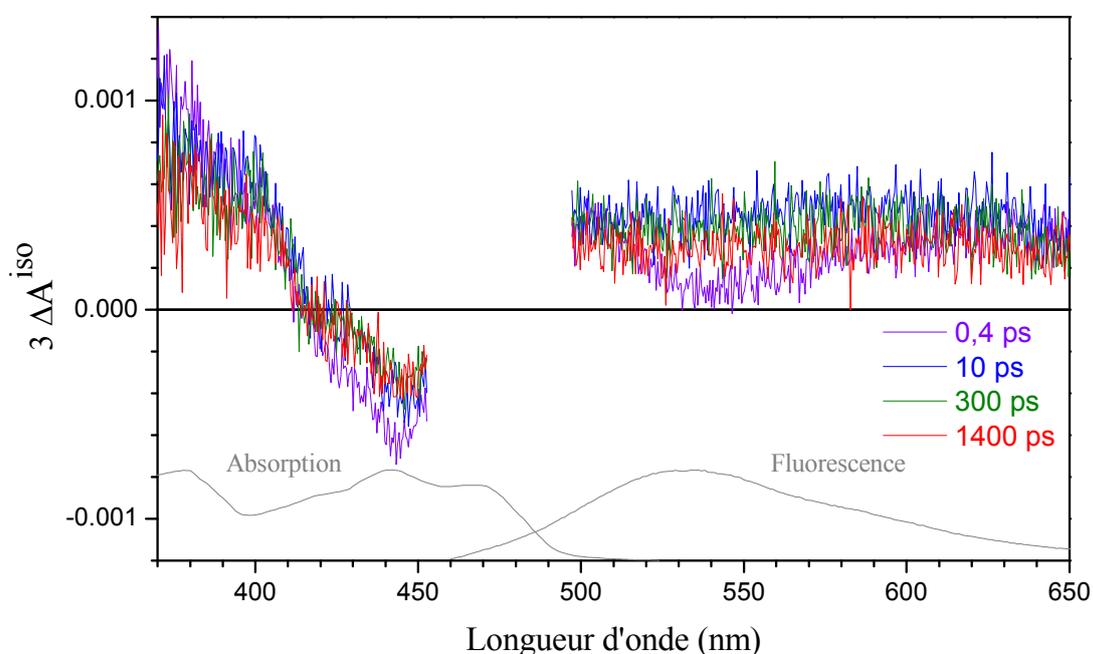


Figure 2.13 : Spectres d'absorption transitoire en reconstruisant le signal isotrope de OtCPF2-Aniso en solution tampon TRIS à pH 8,0 et à 5°C ($A_{386} = 0,07$ pour 1 mm de trajet optique), mesurés après excitation à 470 nm pour des retards pompe-sonde de 0,4 ps (violet), 10 ps (bleu), 300 ps (vert) et 1400 ps (rouge). Le spectre d'absorption stationnaire de FAD_{ox} au sein de EcCPD [175] et le spectre de fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm) de OtCPF2 sont donnés en gris.

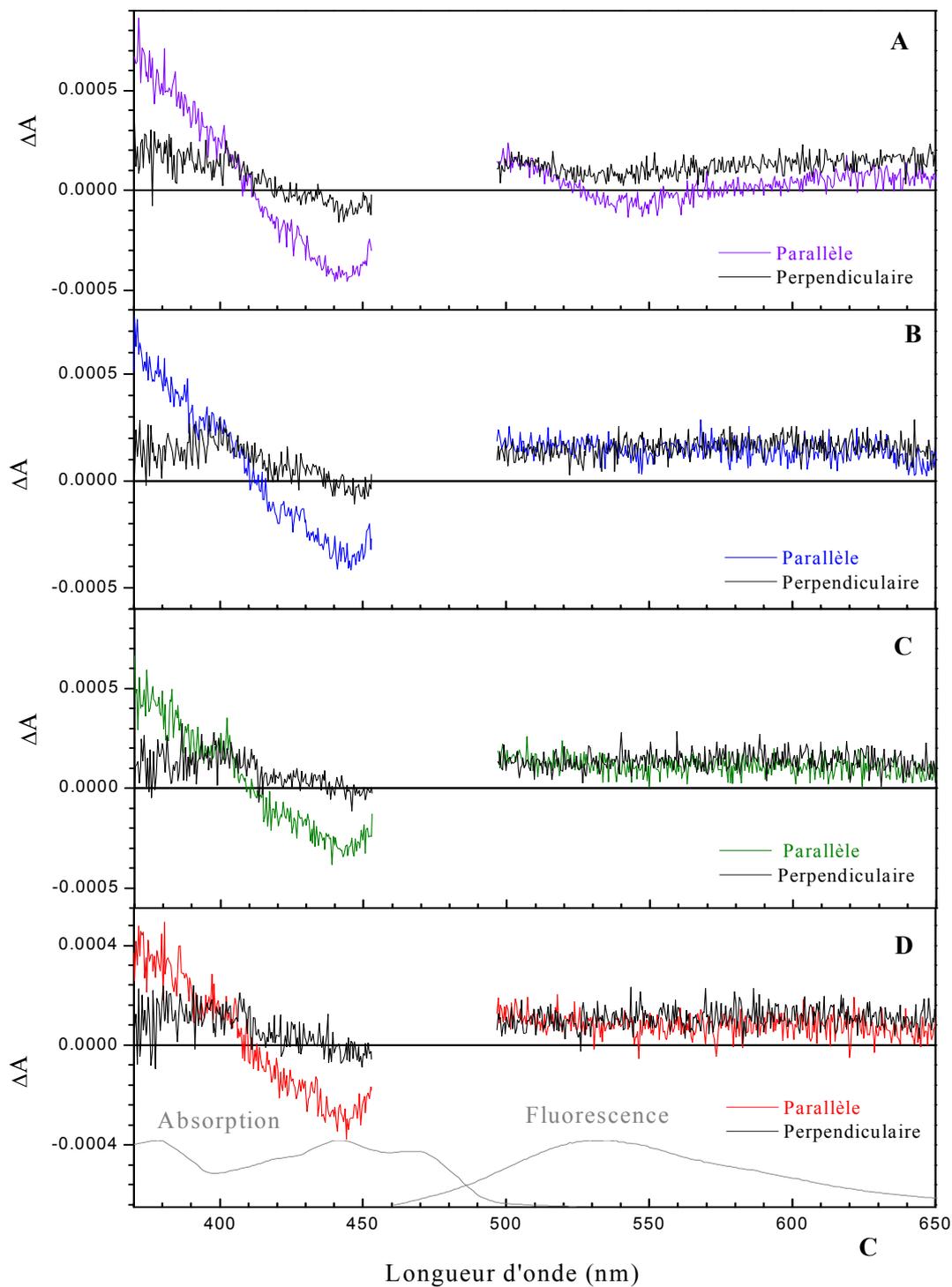


Figure 2.14 : Spectres d'absorption transitoire de OtCPF2-Aniso en solution tampon TRIS à pH 8,0 et à 5°C ($A_{386} = 0,07$ sur 1 mm), mesurés après excitation à 470 nm pour des retards pompe-sonde de 0,4 ps (A), 10 ps (B), 300 ps (C) et 1400 ps (D). Les spectres différentiels obtenus en polarisation parallèle sont représentés en couleur et ceux en polarisation perpendiculaire en noir. Le spectre d'absorption stationnaire de FAD_{ox} au sein de EcCPD [175] et le spectre de fluorescence ($\lambda_{exc} = 450$ nm) de OtCPF2 sont rappelés en gris.

La Figure 2.14 montre les spectres d'absorption transitoire de l'échantillon OtCPF2-Aniso en polarisation parallèle et perpendiculaire, pour quelques retards pompe-sonde. Les spectres différentiels en polarisation parallèle et perpendiculaire sont toujours différents, quel que soit le retard pompe-sonde considéré, dans les bandes AT-UV et de blanchiment. Les spectres enregistrés à 400 fs ne sont pas superposables dans la bande d'émission stimulée et AT. En revanche les spectres différentiels pour les retards pompe-sonde de 10ps, 300 ps et 1400 ps sont superposables dans la bande AT.

2.1.2.2 Analyse cinétique

Nous avons tout d'abord analysé les spectres isotropes reconstruits de OtCPF2-Aniso. Le meilleur ajustement paramétrique global (par le biais de la décomposition SVD) est obtenu pour une somme de trois exponentielles et d'une fonction plateau (convoluées à la fonction réponse du dispositif). Nous trouvons les durées de vie suivantes : $\tau_1 = 0,41 \pm 0,05$ ps, $\tau_2 = 8 \pm 2$ ps, $\tau_3 = 334 \pm 63$ ps et $\tau_4 = \infty$ (plateau imposé) et l'ajustement paramétrique est de bonne qualité ($\sigma = 3,5 \times 10^{-4}$). Les DADS sont présentés sur la Figure 2.15.

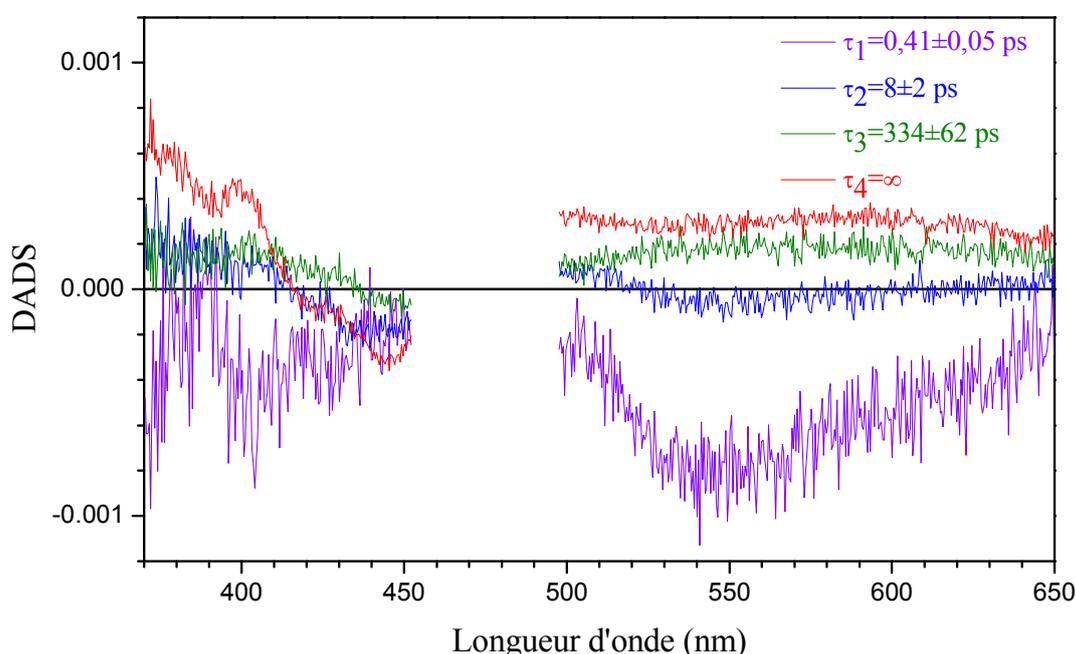


Figure 2.15 : Spectres de facteurs pré-exponentiels ou DADS associés aux durées de vie de 0,41 ps (violet), 8 ps (bleu), 334 ps (vert) et au plateau (rouge) pour OtCPF2-Aniso après reconstruction du signal isotrope en solution aqueuse (pH = 8,0, 5°C et $A_{386} = 0,07$ sur 1 mm).

Nous constatons que ces DADS sont très voisins de ceux obtenus lors de l'analyse cinétique de OtCPF2-Iso (cf. la Figure 2.4). Notamment le DADS2 présente la signature caractéristique d'une contribution d'émission stimulée vers 550 nm, comme nous l'avions

déjà vue. Les durées de vie obtenues ici sont similaires à celles obtenues lors de l'étude par spectroscopie d'absorption isotrope, ce qui est rassurant quant à la fiabilité des présentes mesures.

Nous avons ensuite réalisé un ajustement paramétrique global simultané (via SVD) des spectres d'absorption transitoire (corrigés du chirp) de OtCPF2-Aniso en polarisation parallèle et perpendiculaire. Le meilleur ajustement global ($\sigma = 1,6 \times 10^{-4}$) est obtenu pour une somme de trois exponentielles et d'une fonction plateau et conduit aux durées de vie suivantes : $\tau_1 = 0,46 \pm 0,05$ ps, $\tau_2 = 9 \pm 2$ ps, $\tau_3 = 301 \pm 50$ ps et $\tau_4 = \infty$ (plateau imposé). Les DADS sont présentés sur la Figure 2.16. Les durées de vie trouvées ici sont à nouveau similaires à celles trouvées lors de l'analyse cinétique de OtCPF2-Iso. Nous pouvons en particulier en conclure que la diffusion rotationnelle ne joue aucun rôle dans les mesures anisotropes. Ceci n'explique pas que les différents chromophores sont rigidement en interaction avec la protéine, dont le temps de corrélation rotationnel est probablement supérieur à 30 ns (cf. l'estimation pour EcCPD dans [6]) donc insensible dans notre fenêtre temporelle.

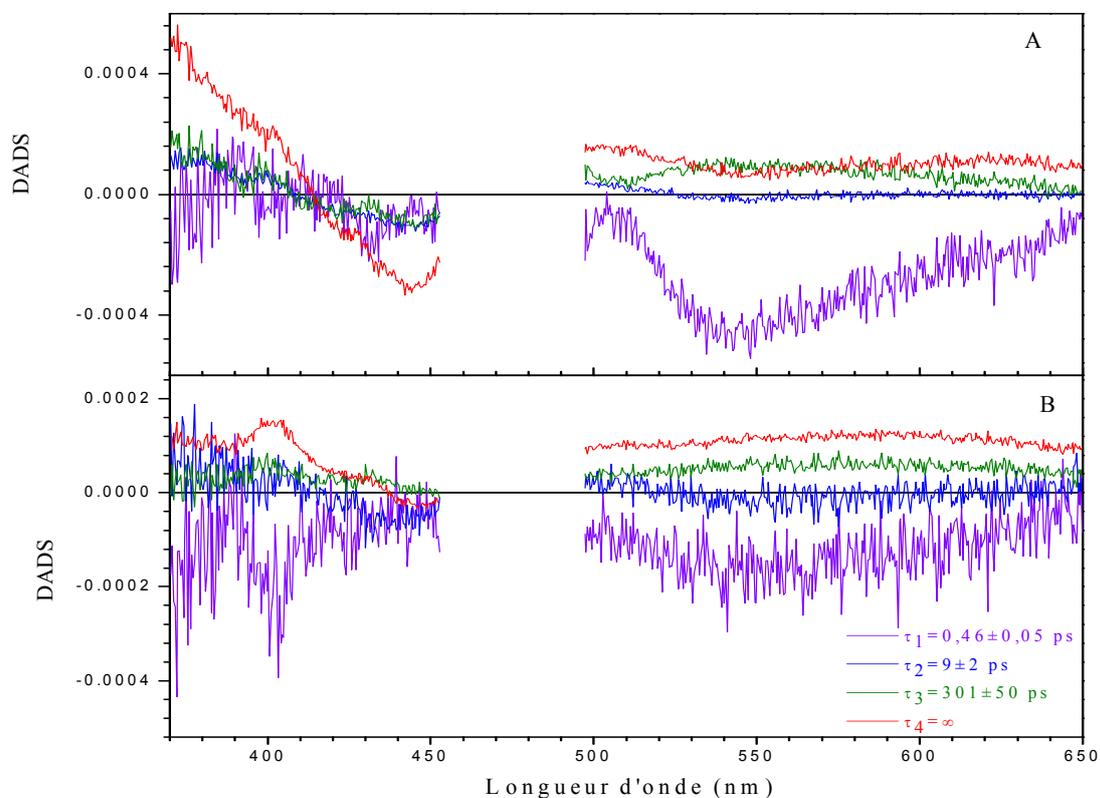


Figure 2.16 : DADS associés aux durées de vie de 0,46 ps (violet), 9 ps (bleu), 301 ps (vert) et au plateau (rouge) pour OtCPF2-Aniso en solution aqueuse (pH = 8,0, 5°C et $A_{386} = 0,07$ sur 1 mm) en polarisation parallèle (A) et en polarisation perpendiculaire (B).

2.1.2.3 Anisotropie

L'anisotropie d'absorption transitoire $r(t,\lambda)$, définie par l'équation 6.23 du chapitre VI, est une grandeur physique sensible à la diffusion rotationnelle (que nous avons éliminée ci-dessus) des molécules et aux directions des différents moments dipolaires de transition. Nous avons tout d'abord réalisé, comme Byrdin et al. [8], un premier ajustement paramétrique du signal isotrope reconstruit afin de pouvoir remplacer le dénominateur de l'anisotropie dans l'équation 6.23 par son ajustement paramétrique moins bruité. La Figure 2.17 représente l'anisotropie pour deux retards pompe-sonde caractéristiques de l'évolution cinétique de OtCPF2 entre 520 nm et 600 nm (région spectrale où les radicaux tryptophanyles ont des contributions).

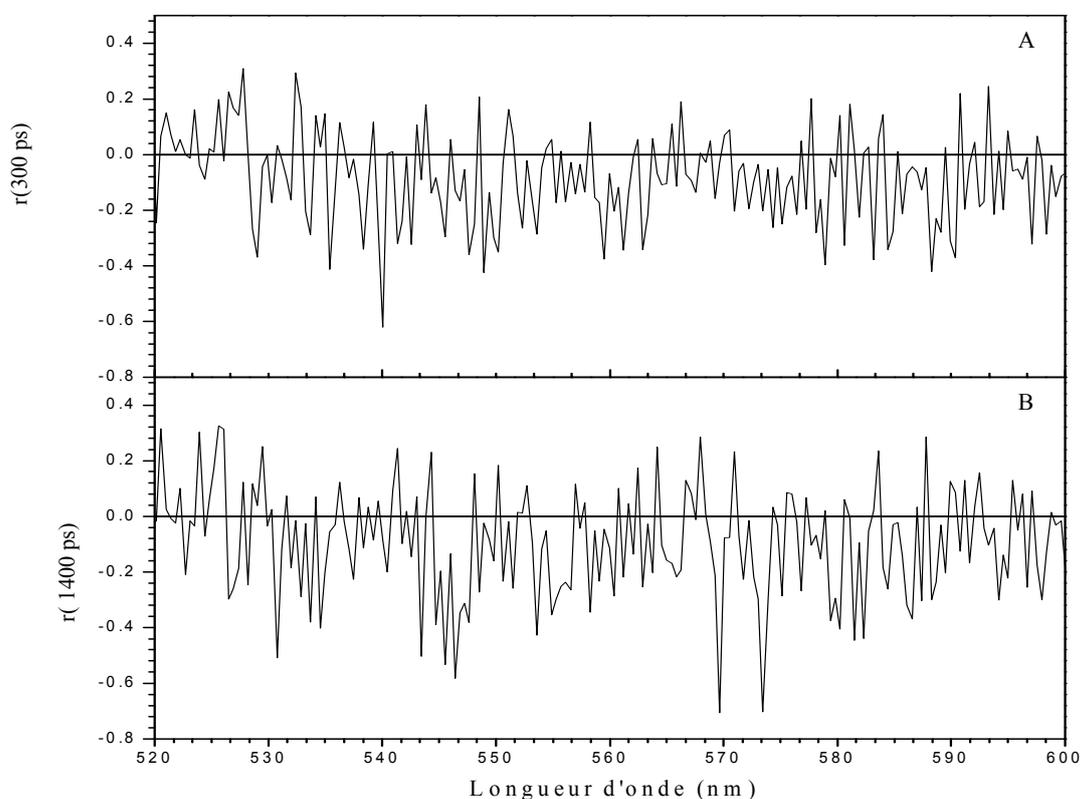


Figure 2.17 : Anisotropie d'absorption transitoire de OtCPF2-Aniso, après excitation à 470 nm, calculée entre 520 nm et 600 nm, pour des retards pompe-sonde de 300 ps (A) et 1400 ps (B).

Nous pouvons observer que les anisotropies pour des retards pompe-sonde de 300 ps et de 1400 ps valent environ 0 de 550 nm et sont très bruitées. Byrdin et al. ont réalisé des expériences d'anisotropie d'absorption transitoire sur la photoréduction de $FADH^\bullet$ au sein de EcCPD [8]. L'expression de l'anisotropie totale (équation 6.25 du chapitre VI) se simplifie beaucoup lorsqu'une seule espèce contribue à l'absorption transitoire. Pour des retards

pompe-sonde supérieur à 100 ps et en se plaçant vers 550 nm, seul le radical tryptophanyl [4] contribue au signal d'anisotropie de OtCPF2, puisque les autres photoproduits de la réduction de FAD_{ox} n'absorbent pas dans cette région spectrale.

Comme nous avons vu que l'anisotropie obtenue précédemment est très bruitée, nous proposons de calculer l'anisotropie à partir des EADS' qui sont un résumé de l'évolution cinétique des spectres transitoires et sont beaucoup moins bruités. Cette construction donne des r_i indépendants du temps, mais associés à des états du système. Le r_3 calculé à partir des EADS3' représenterait l'anisotropie des photoproduits déclinant en 301 ps ($WH_{404}^{\bullet+}/FAD^{\bullet-}$ selon le modèle proposé sur la Figure 2.12) et le r_4 les photoproduits finaux (hypothétiquement $WH_{351}^{\bullet+}/FAD^{\bullet-}$). Nous reportons donc, sur la Figure 2.18, les anisotropies calculées à partir des EADS3' et EADS4' entre 515 nm et 600 nm. Nous observons une différence d'anisotropie de deux états à 550 nm : elle vaut environ 0 et -0,15 pour les EADS3' et EADS4' respectivement.

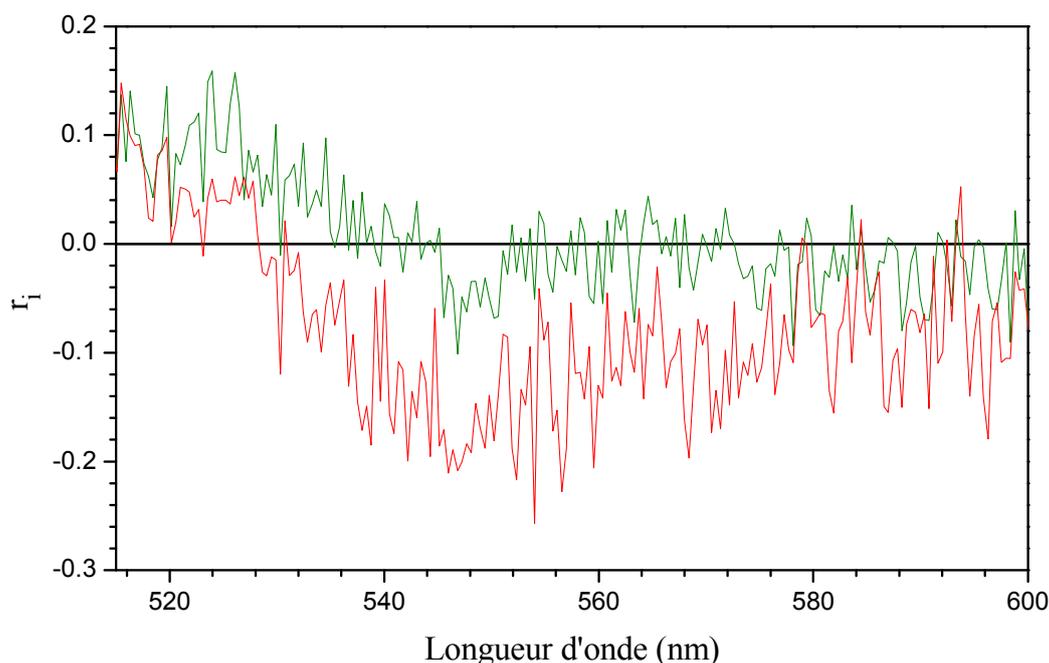


Figure 2.18 : Anisotropie d'absorption transitoire de OtCPF2-Aniso, après excitation à 470 nm, calculée à partir des EADS3' (vert) et EADS4' (rouge).

Byrdin et al. appliquèrent les résultats bien connus pour l'anisotropie de fluorescence [192] au calcul de l'anisotropie (totale) du système [8]. Dans des conditions où une seule transition est excitée et où une seule transition i est détectée, l'anisotropie dépend de l'angle α_i entre les deux moments dipolaires de transitions, comme suit :

$$r_i(t) = r_{0,i}e^{-t/\tau_{rot,i}} \text{ avec } r_{0,i} = \frac{1}{5}(3(\cos\alpha_i)^2 - 1) \quad (4.2)$$

Nous pouvons déduire α_3 et α_4 des valeurs de l'anisotropie trouvées à 550 nm : 55° et 73°.

À partir de OtCPF2 modélisée par homologie (cf. la Figure 2.5 du chapitre V), nous pouvons donner une valeur approximative de l'angle entre le moment de transition de FAD_{ox} excitée et celui des trois radicaux cations tryptophanyl produits : 47°, 28° et 70° en s'éloignant de la flavine. La valeur calculée pour α_4 correspond assez bien à l'angle entre les moments de transition de FAD_{ox}* et WH₃₅₁^{•+}, ce qui confirme que les espèces de durée de vie longue correspondent au couple FAD^{•-}/WH₃₅₁^{•+}. Étant donné que l'angle entre les moments d'orientation entre FAD_{ox}* et WH₄₂₇^{•+} et FAD_{ox}* et WH₄₀₄^{•+} sont proches, nous ne pouvons pas attribuer précisément le couple d'espèces radicalaires qui décline selon la durée de vie de 301 ps. Nous remarquons que la valeur de 55° se rapproche des 47° mesurés à partir de OtCPF2 modélisée.

Nous pouvons ainsi préciser le modèle cinétique proposé sur la Figure 2.12, en confirmant la dernière étape.

2.1.3 Transfert d'énergie au sein de OtCPF2

Le transfert d'énergie au sein d'un Cry-DASH (de *Vibrio cholerae*, VcDASH) a été étudié par Saxena et al., mais uniquement par spectroscopie de fluorescence résolue en temps [187]. Les auteurs observèrent un déclin de fluorescence décrit par trois exponentielles de durée de vie 10 ps, 60 ps et 845-1045 ps selon la longueur d'onde d'excitation. Ils assignèrent les deux premiers temps aux transferts d'énergie depuis MTHF excité vers FAD_{ox} et FADH⁻, respectivement. Le dernier déclin fut attribué au déclin de MTHF seul dans la protéine. À partir de la théorie du transfert d'énergie résonant de Förster (FRET), ils calculèrent un rapport des facteurs d'orientation (liés aux orientations des moments de transition du donneur et de l'accepteur d'énergie : cf. le chapitre V) associés aux deux transferts de $1,7 (\kappa^2(\text{FADH}^-) / \kappa^2(\text{FAD}_{\text{ox}}))$. Ils proposèrent que ce rapport traduise une différence de structure locale selon que la protéine porte FADH⁻ ou FAD_{ox}.

Nous avons montré dans la partie 1.1 que OtCPF2 porte la photoantenne MTHF, ainsi que le chromophore FAD sous différents états d'oxydo-réduction. Afin de déterminer si un ou plusieurs des transferts d'énergie existent depuis MTHF excité vers les différents états d'oxydo-réduction de FAD au sein de OtCPF2, nous avons réalisé des expériences d'absorption transitoire en excitant un premier échantillon de OtCPF2 (n'ayant subi aucun traitement particulier), noté OtCPF2-TE1, à 387,5 nm. À cette longueur d'onde, l'espèce

principalement excitée est la photoantenne MTHF. Pour différencier les différents transferts d'énergie, nous avons diminué la proportion de l'espèce réduite en faisant buller du dioxygène dans l'échantillon de OtCPF2-TE1, ce qui a donné un nouvel échantillon noté OtCPF2-TE2.

2.1.4 Échantillon OtCPF2-TE1

L'échantillon OtCPF2-TE1 est contenu dans une cuve en silice fondue de faible volume (~50µL) montée sur une platine en translation afin de renouveler le volume excité entre chaque tir de la pompe. La configuration de polarisation de la pompe est réglée à l'angle magique (cf. le chapitre VI). Nous avons étudié OtCPF2-TE1 à 5°C en solution tampon à pH 8,0. L'absorbance à 386 nm vaut 0,42 pour 1 mm de trajet optique. Dans ces conditions, la distribution des différents états d'oxydo-réduction au sein de OtCPF2-TE1, à l'état fondamental, est la suivante : 21% de FAD_{ox} ([FAD_{ox}] = 54,4 ± 0,7 µmol L⁻¹), 5% de FADH[•] ([FADH[•]] = 12 ± 2 µmol L⁻¹) et 74% de FADH⁻ ([FADH⁻] = 193 ± 2 µmol L⁻¹). Le rapport de la concentration de MTHF ([MTHF] = 109,0 ± 0,4 µmol L⁻¹) à la concentration totale des différents états d'oxydo-réduction de FAD ([FAD_{tot}] = 260 ± 5 µmol L⁻¹) est de 42%. Ce rapport est beaucoup plus faible que celui obtenu pour les échantillons OtCPF2-Iso et OtCPF2-Aniso, probablement parce que la protéine a ici été purifiée plus lentement, avec des étapes à température ambiante et une conservation de quelques mois à -80°C. En termes de fractions molaires rapportées à l'ensemble des chromophores (photoantenne comprise), cela correspond à : 46% de MTHF, 16% de FAD_{ox}, 2% de FADH[•] et 36% de FADH⁻. Avec une excitation de l'échantillon à 387,5 nm, les fractions molaires prédites à l'état excité (avant toute évolution spontanée) sont de : 70% de MTHF*, 17% de FADH^{-*}, 11% de FAD_{ox}* et 2% de FADH^{•*} (cf. la partie 4.4 du chapitre VI). La population à l'état excité est à nouveau hétérogène et ici dominée par MTHF. Les impulsions de la pompe ont ici une énergie de 0,13 µJ, focalisées sur une section de l'échantillon de l'ordre de 4800 µm². Nous avons vérifié que l'expérience est réalisée en régime linéaire.

2.1.4.1 Analyse spectrale

La Figure 2.19 présente les spectres d'absorption transitoire de l'échantillon OtCPF2-TE1 pour des retards pompe-sonde allant de 0,3 ps à 1400 ps.

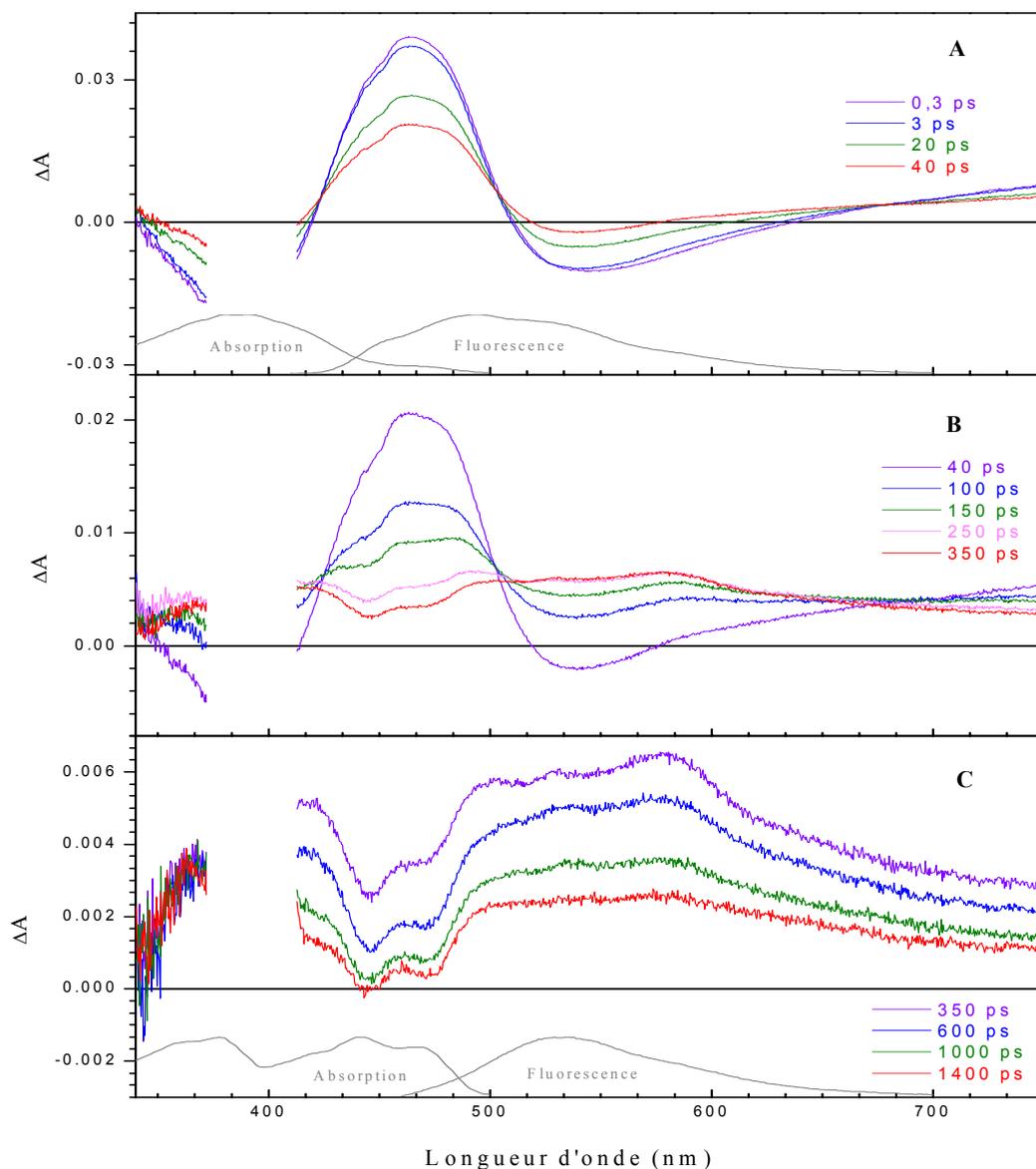


Figure 2.19 : Spectres d'absorption transitoire de l'échantillon OtCPF2-TE1 en solution tampon TRIS à pH 8,0 et à 5°C ($A_{386} = 0,42$ sur 1 mm), mesurés après excitation à 387,5 nm pour des retards pompe-sonde de 0,3 ps à 40 ps (A), 40 ps à 350 ps (B) et 350 ps à 1400 ps (C). Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence ($\lambda_{exc} = 400$ nm) stationnaires de OtCPF2 sont rappelés en gris dans le cadre A. Le spectre d'absorption stationnaire de FAD_{ox} au sein de EcCPD [175] et le spectre de fluorescence ($\lambda_{exc} = 450$ nm) de OtCPF2 sont donnés en gris dans le cadre C.

L'évolution des spectres différentiels de OtCPF2-TE1, après excitation à 387,5 nm, se divise en trois phases :

- phase 1 (Figure 2.19-A) : les spectres déclinent entre 0,3 ps et 40 ps. Ils présentent une bande négative, située entre 340 nm et 418 nm, dominée par du blanchiment de MTHF. Une deuxième bande négative entre 519 nm et 630 nm révèle la contribution d'émission stimulée de MTHF. Deux bandes

positives dominées par de l'absorption transitoire sont observées dans les régions 418-519 nm (AT) et 630-750 nm (AT-IR). Nous observons un affinement de la bande d'émission stimulée du côté rouge, ainsi que la trois points isobestiques temporaires à 423 nm, 504 nm et 677 nm.

- phase 2 (Figure 2.19-B) : pour des retards pompe-sonde de 40 ps à 350 ps, les bandes négatives précédemment mentionnées disparaissent. Une bosse apparaît à 580 nm. À 450 nm, la bande AT se creuse.
- phase 3 (Figure 2.19-C) : entre 350 ps et 1400 ps, les bandes déclinent. À 1400 ps, le signal est non nul. Les spectres différentiels sont composés d'une très large bande positive, couvrant presque la totalité de la fenêtre spectrale, dans laquelle se creusent des minima locaux à 445 nm et 475 nm.

2.1.4.2 Analyse cinétique

Nous avons procédé à l'analyse cinétique globale des données de l'échantillon OtCPF2-TE1 par la procédure SVD décrite au chapitre VI, au moyen de la somme de trois exponentielles et d'une fonction plateau (convoluées par la réponse expérimentale de notre dispositif). Nous avons trouvé les durées de vie suivante : $\tau_1 = 17,3 \pm 0,7$ ps, $\tau_2 = 108 \pm 4$ ps, $\tau_3 = 548 \pm 39$ ps et $\tau_4 = \infty$ (plateau imposé), avec $\sigma = 1,7 \times 10^{-3}$. Nous avons calculé les spectres des facteurs pré-exponentiels associés à chaque déclin (cf. la Figure 2.20-A).

Le DADS1, associé à la durée de vie de 17,3 ps, présente un signal négatif dans les zones spectrales correspondant aux bandes de blanchiment et d'émission stimulée et un signal positif dans les bandes dominées par de l'absorption transitoire. Nous observons une bosse positive vers 447 nm.

Le DADS2, associé à la durée de vie de 108 ps, est plus intense que le DADS1, notamment à 465 nm. Les DADS1 et DADS2 ne sont pas superposables, surtout pour les longueurs d'onde supérieures à 500 nm. Le DADS2 ne présente pas de bosse à 447 nm.

Le DADS3, associé à la durée de vie de 548 ps a une valeur positive sur l'ensemble de la fenêtre spectrale. Il présente un creux vers 465 nm, une bosse jusqu'à 590 nm et une pente plus abrupte vers 625 nm.

Le DADS4, associé au plateau, est positif sur presque toute la fenêtre spectrale sauf à 445 nm et 475 nm où nous observons deux minima négatifs.

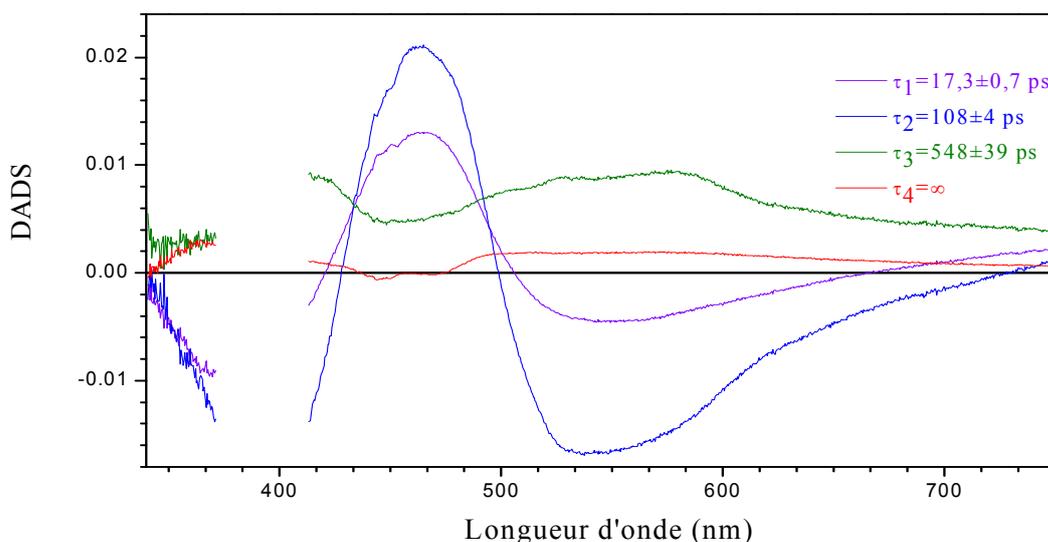


Figure 2.20 : Spectres des facteurs pré-exponentiels ou DADS associés aux durées de vie de 17,3 ps (violet), 108 ps (bleu), 548 ps (vert) et au plateau (rouge) de OtCPF2-TE1 en solution aqueuse (pH = 8,0, 5°C et $A_{386} = 0,42$ sur 1 mm).

2.1.4.3 Discussion

2.1.4.3.1 Identification des accepteurs d'énergie

Pour mieux comprendre ces DADS, ouvrons une parenthèse et examinons le cas simplifié où le donneur d'énergie excite un accepteur qui n'évolue ensuite pas. Le DADS correspondant au transfert d'énergie est alors proportionnel au spectre transitoire du donneur moins le spectre transitoire de l'accepteur pondéré par le rendement de la réaction. Les DADS1 et DADS2 présentent la signature spectrale du MTHF excité (cf. la partie 3 du chapitre II) mais ne sont pas identiques. Dans le cas de VcDASH, Saxena et al. montrent que le transfert d'énergie depuis MTHF excité vers FAD_{ox} se fait avec une constante de temps de 10 ps et celui vers $FADH^-$ en 60 ps [187]. Ces durées de vie sont proches de celles associées aux DADS1 et DADS2 dans OtCPF2-TE1 : 17,3 ps et 108 ps. Ces deux durées de vie pourraient être attribuables aux transferts d'énergie depuis MTHF excité vers FAD_{ox} et $FADH^-$ respectivement. Sur le DADS1 nous observons une bosse centrée à 447 nm qui peut correspondre à l'apparition (signe opposé) du blanchiment de FAD_{ox} . Le DADS2 présente par rapport à la signature spectrale du MTHF excité une bande supplémentaire entre 500 nm et 600 nm, qui pourrait correspondre à l'apparition de $FADH^-$ excité [98].

Nous proposons donc que les DADS1 et DADS2 correspondent aux deux transferts d'énergie depuis MTHF excité vers FAD_{ox} et $FADH^-$, respectivement, avec les durées de vie

de 17,3 ps et 108 ps. Ces transferts d'énergie conduisent aux états excités de FAD_{ox} et $FADH^-$ qui évoluent de manière différente.

2.1.4.3.2 État excité de $FADH^-$

Le DADS3 ne présente pas de signal négatif et une bande large avec une bosse à 590 nm. Cela semble correspondre au signal additionnel observé sur le DADS2 (en positif). Si le transfert d'énergie vers $FADH^-$ se fait en 108 ps et que $FADH^*$ décline ensuite en 548 ps, nous nous attendons alors à une contribution négative de $FADH^*$ dans le DADS2. Cette contribution positive pourrait s'expliquer par un déclin partiel rapide de $FADH^*$ excité directement (nous rappelons que l'échantillon est hétérogène et que la deuxième population la plus excitée est $FADH^-$, avec 17%). Ce DADS est similaire au spectre transitoire de $FADH^-$ enregistré par le groupe Mataga dans EcCPD [98, 106]. Nous proposons que la durée de vie de 548 ps corresponde au déclin de $FADH^-$ excité.

Nous proposons de confirmer cette observation en superposant sur la Figure 2.21 le DADS3 normalisé de OtCPF2-TE1 avec le DADS3 de $FADH^-$ libre à basse fluence. Les deux DADS présentent des allures générales proches sauf dans le rouge. Nous savons cependant que l'environnement du chromophore influence beaucoup sa signature spectrale.

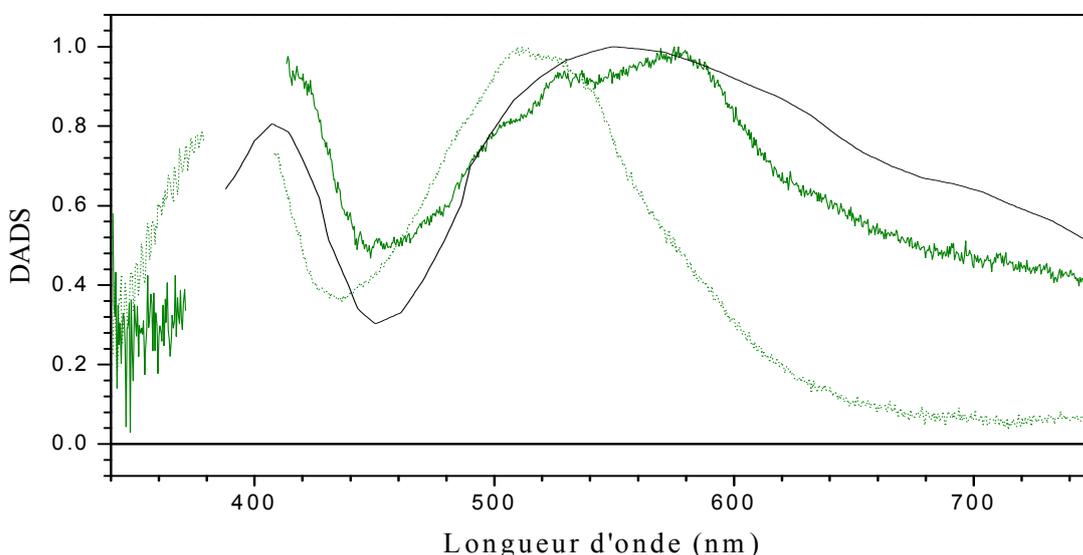


Figure 2.21 : DADS normalisés associés à la durée de vie de 548 ps de OtCPF2-TE1 (vert, trait plein) et à la durée de vie de 31 ps de $FADH^-$ libre (basse fluence, chapitre II, vert, pointillés). Spectre différentiel pour un retard pompe-sonde de 300 ps lors de l'étude de $FADH^-$ au sein de EcCPD (extrait de l'article de Okamura et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113 (8), 3143-4145, noir) [106].

Le spectre différentiel de $FADH^-$ excité dans EcCPD pour un retard pompe-sonde de 300 ps [98] est aussi représenté sur la Figure 2.21. Cette dernière superposition est meilleure

que la précédente, notamment dans le rouge. Ceci nous amène à confirmer que l'espèce décrite par le DADS3 de OtCPF2-TE1 est bien FADH^- excité.

2.1.4.3.3 État excité de FAD_{ox}

Le DADS4 présente deux minima locaux à 447 nm et 475 nm traduisant la présence de blanchiment de FAD_{ox} . Nous avons vu dans la partie 2.1 que l'état excité de FAD_{ox} décline avec une durée de vie de 590 fs pour donner des photoproduits de réduction de la flavine. Nous ne pouvons pas observer cette étape ici étant donné que le transfert d'énergie est plus lent que la réaction. Nous proposons donc que le DADS4 corresponde aux photoproduits de la réduction de FAD_{ox} .

La superposition des DADS4, normalisés à 500 nm, des expériences OtCPF2-TE1 (transfert d'énergie) et OtCPF2-Iso (photoréduction) est représentée sur la Figure 2.22. Bien que la superposition ne soit pas parfaite, nous reconnaissons la contribution de blanchiment et surtout la bande large dans le rouge. Les différences sont sans doute attribuables aux contributions des populations restantes excitées (cf. la partie 2.1.1.3.4).

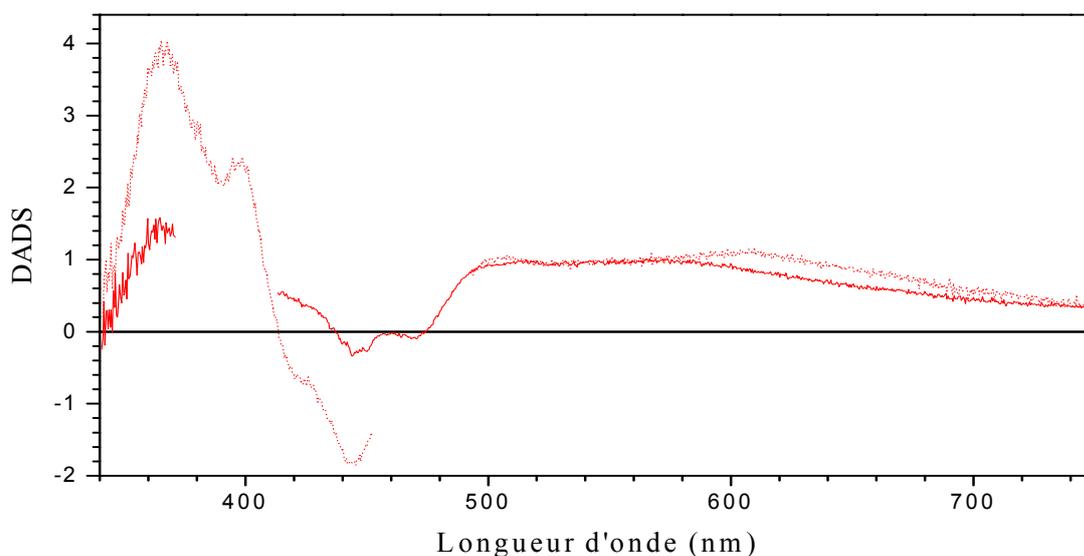


Figure 2.22 : DADS normalisés à 500 nm associés : au plateau de OtCPF2-TE1 native lors de l'expérience de transfert d'énergie (rouge, trait plein) et au plateau de OtCPF2-Iso lors de l'étude de la photoréduction (partie 2.1.1.2, rouge, en pointillés).

2.1.5 Échantillon OtCPF2-TE2

Dans l'hypothèse où un transfert d'énergie aurait bien lieu depuis MTHF excité vers les deux formes oxydo-réductrices de FAD les plus abondantes dans OtCPF2, nous avons diminué la concentration en FADH^- par bullage de dioxygène. L'échantillon de OtCPF2-TE2 a ainsi une population réduite d'enzyme contenant MTHF et FADH^- .

La nouvelle répartition des différentes formes d'oxydo-réduction de FAD à l'état fondamental est la suivante : 23% de FAD_{ox} ([FAD_{ox}] = 57,1 ± 0,6 μmol L⁻¹), 8% de FADH[•] ([FADH[•]] = 22 ± 1 μmol L⁻¹) et 69% de FADH⁻ ([FADH⁻] = 173 ± 2 μmol L⁻¹). Il y a 44% de MTHF ([MTHF] = 111,0 ± 0,3 μmol L⁻¹) par rapport à toutes les formes oxydo-réductrices de FAD. Après excitation de OtCPF2-TE2 à 387,5 nm, la distribution des différents chromophores à l'état excité (avant évolution spontanée) est : 71% de MTHF*, 11% de FAD_{ox}*, 3% de FADH[•]* et 15% de FADH⁻*. La distribution de la population à l'état excité est donc quasiment identique pour OtCPF2-TE1 et OtCPF2-TE2 et globalement dominée par MTHF*. La différence fondamentale entre les deux expériences est que parmi la population de protéines dont nous avons excité MTHF, la fraction contenant FAD sous forme réduite est plus faible dans OtCPF2-TE2 que dans OtCPF2-TE1. Si le transfert d'énergie de durée de vie de 108 ps est bien celui vers FADH⁻, nous devrions observer une diminution de son amplitude.

Les impulsions d'excitation à 387,5 nm ont une énergie identique à celle de l'expérience précédente, soit 0,13 μJ, focalisées sur une section de l'échantillon de l'ordre de 4800 μm². L'expérience est réalisée en régime linéaire.

2.1.5.1 Analyse spectrale

La Figure 2.23 présente les spectres d'absorption transitoire de l'échantillon OtCPF2-TE2 pour des retards pompe-sonde allant de 0,3 ps à 1400 ps.

L'évolution des spectres différentiels est quasiment identique à celle décrite dans la partie 2.1.4.1. Les points isosbestiques temporaires à 423 nm, 504 nm et 677 nm sont toujours observés pour des retards pompe-sonde de 0,3 ps à 40 ps. En revanche, à 1400 ps, les deux minima à 445 nm et 475 nm, déjà observés lors de l'expérience précédente, sont plus prononcés et atteignent maintenant tous les deux des valeurs négatives.

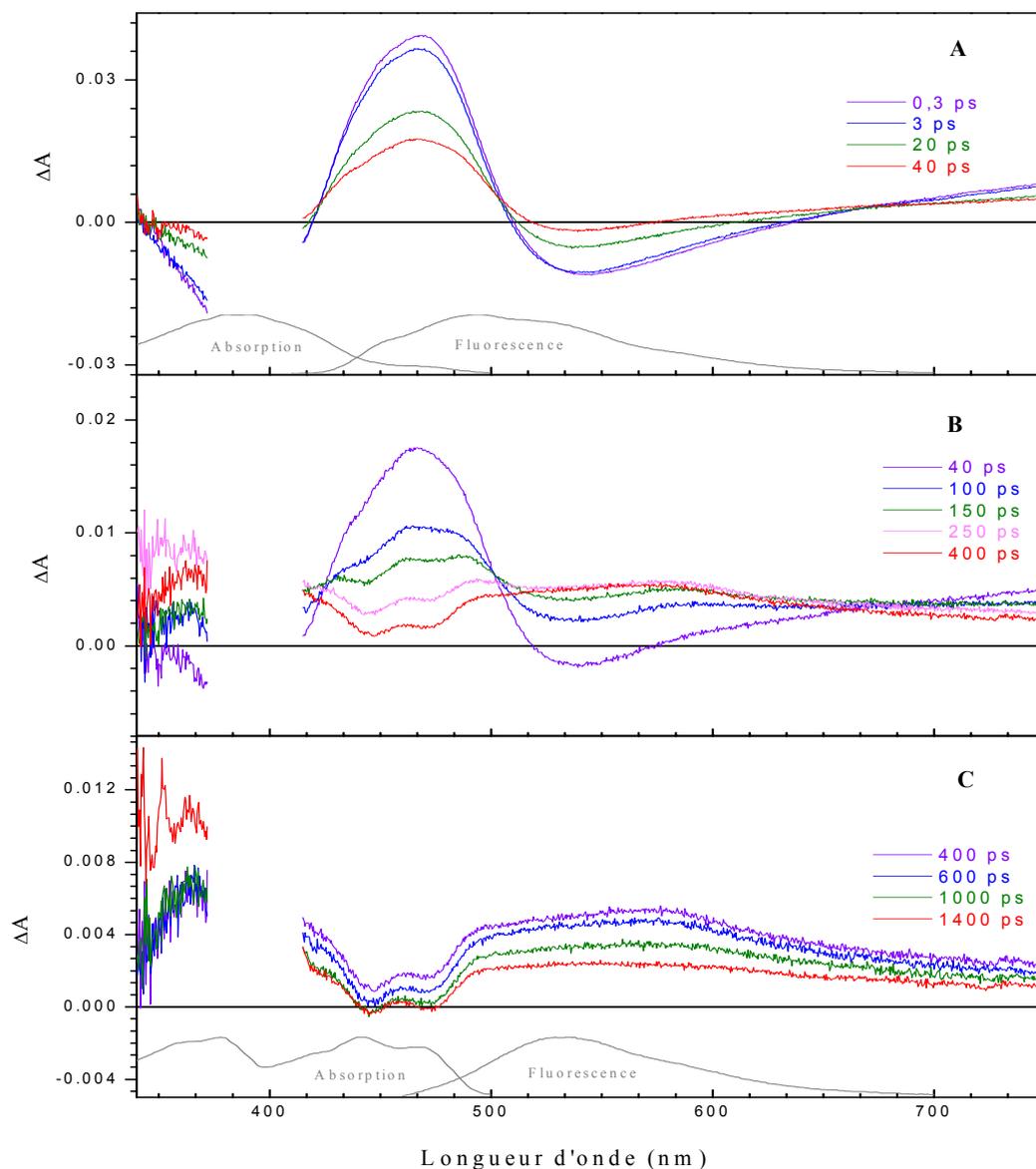


Figure 2.23 : Spectres d'absorption transitoire de OtCPF2-TE2 en solution tampon TRIS à pH 8,0 après bullage de dioxygène et à 5°C ($A_{386} = 0,46$ sur 1 mm), mesurés après excitation à 387,5 nm pour des retards pompe-sonde de 0,3 ps à 40 ps (A), 40 ps à 400 ps (B) et 400 ps à 1400 ps (C). Les spectres d'absorption et de fluorescence ($\lambda_{exc} = 400$ nm) stationnaires de OtCPF2 sont rappelés en gris dans le cadre A. Le spectre d'absorption stationnaire de FAD_{ox} au sein de EcCPD [175] et le spectre de fluorescence ($\lambda_{exc} = 450$ nm) de OtCPF2 sont donnés en gris dans le cadre C.

2.1.5.2 Analyse cinétique

L'analyse cinétique des spectres différentiels de OtCPF2-TE2 conduit aux durées de vie suivantes : $\tau_1 = 13 \pm 1$ ps, $\tau_2 = 91 \pm 9$ ps, $\tau_3 = 538 \pm 161$ ps et $\tau_4 = \infty$ (plateau imposé), avec $\sigma = 6,6 \times 10^{-3}$. Ces durées de vie sont pratiquement identiques à celles obtenues pour l'échantillon OtCPF2-TE1. Les processus observés sont probablement les mêmes dans les deux expériences. Les spectres des facteurs pré-exponentiels sont présentés sur la Figure 2.24.

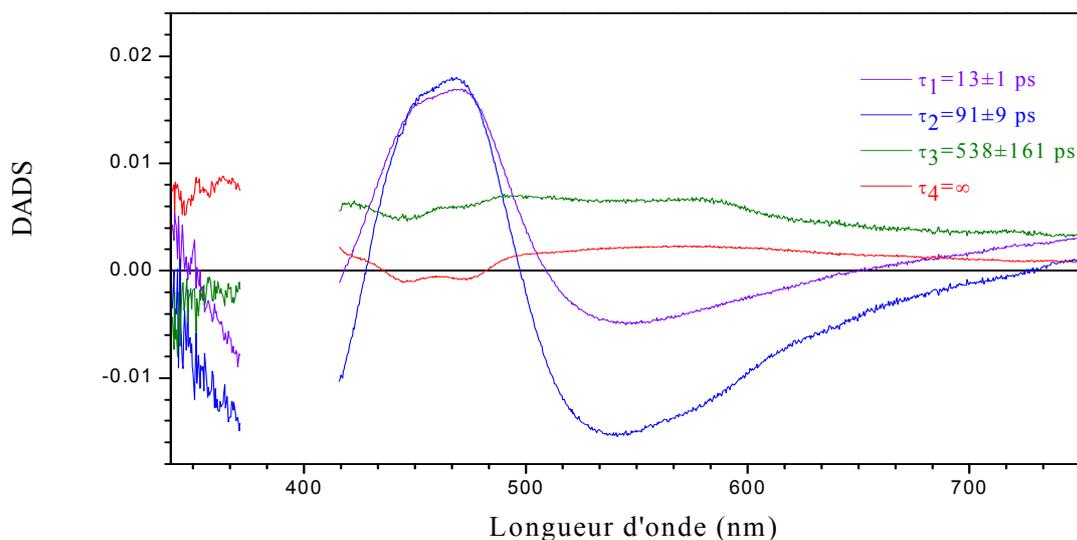


Figure 2.24 : DADS associés aux temps de 13 ps (violet), 91 ps (bleu), 538 ps (vert) et au plateau (rouge) de OtCPF2-TE2, en solution aqueuse (pH = 8,0, 5°C, et $A_{386} = 0,46$ sur 1 mm).

Les DADS sont assez proches de ceux obtenus précédemment pour OtCPF2-TE1 sans bullage de dioxygène avec cependant quelques différences :

- les DADS1 et DADS2 sont superposés à 465 nm,
- le signal relatif du DADS3, associé au temps de 538 ps, a une amplitude plus faible,
- le DADS4 est plus intense et les minima à 445 et 475 nm sont plus marqués.

2.1.5.3 Discussion

L'amplitude relative du DADS2 par rapport au DADS1 diminue pour OtCPF2-TE2, comme nous l'espérons. Ceci nous permet donc de confirmer que le DADS1 (13-17,3 ps) est la signature spectrale du transfert d'énergie depuis MTHF excité vers FAD_{ox} et que le DADS2 (91-108 ps) est celle du transfert d'énergie depuis MTHF excité vers $FADH^-$.

Nous avons vu que les deux minima à 445 nm et 475 nm du DADS4 sont plus marqués pour l'échantillon OtCPF2-TE2 que pour OtCPF2-TE1. Ces minima avaient été attribués à la contribution du blanchiment de FAD_{ox} après transfert d'énergie. Après ajout de dioxygène, la proportion de protéines portant MTHF et FAD_{ox} augmente légèrement. Il est donc possible qu'un plus grand nombre de molécules de FAD_{ox} soit excité dans OtCPF2-TE2 et que la contribution du blanchiment de FAD_{ox} soit ainsi plus grande.

Cette étude nous permet finalement de proposer un modèle cinétique, représenté sur la Figure 2.25 pour le transfert d'énergie dans OtCPF2 après excitation à 387,5 nm. Le transfert

d'énergie de durée de vie de $\tau_1 = 13-17,3$ ps est attribué à la population de protéines portant MTHF et FAD_{ox} . Le transfert d'énergie observé pour la population de protéines contenant MTHF et $FADH^-$ a lieu avec la durée de vie $\tau_2 = 91-108$ ps. Le déclin de l'état excité de $FADH^-$ se fait avec une durée de vie de 538-548 ps. Enfin les espèces associées au plateau sont attribuées aux produits de photoréduction de FAD_{ox} .

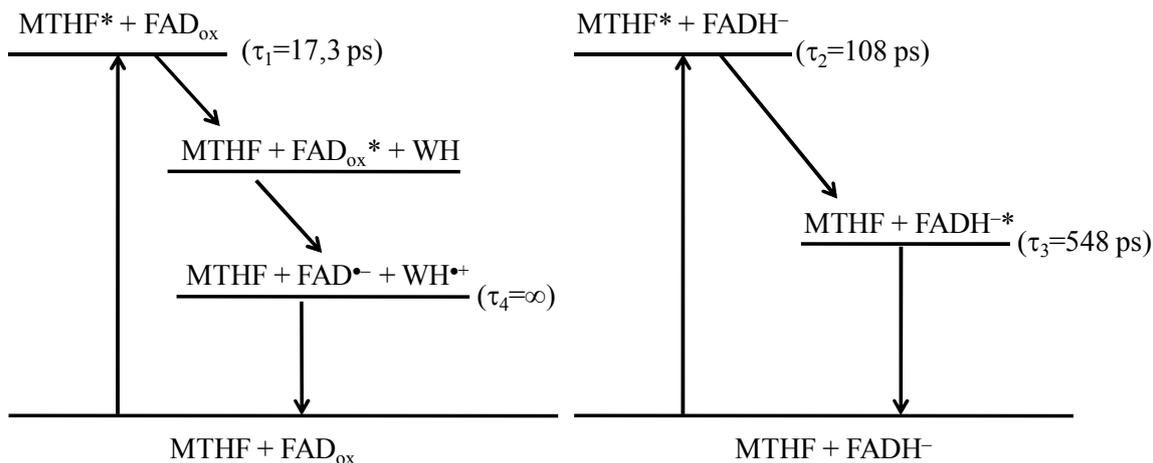


Figure 2.25 : Modèle cinétique simplifié du transfert d'énergie au sein de OtCPF2 après excitation à 387,5 nm.

2.1.6 Orientations relatives de la photoantenne et de la flavine

En ce qui concerne l'étude de OtCPF2, le donneur d'énergie est MTHF excité, et les accepteurs sont FAD_{ox} et $FADH^-$. Nous savons qu'il y a un transfert d'énergie vers ces deux formes oxydo-réductrices de FAD. En appliquant la théorie du transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET, cf. la partie 2.5.5 du chapitre VI) à OtCPF2, nous pouvons déterminer le rapport des facteurs d'orientation afin de déterminer si un changement d'orientation des chromophores au sein de OtCPF2 a lieu. Le calcul du rapport des constantes de transfert d'énergie depuis MTHF excité vers FAD_{ox} (notation « ox ») et $FADH^-$ (notation « red ») se simplifie selon :

$$\frac{k_{ET}^{ox}}{k_{ET}^{red}} = \left[\frac{R_0^{ox}}{R_0^{red}} \right]^6 = \left[\frac{R_0^{ox}}{R_0^{red}} \right]^6 \times \left[\frac{R^{red}}{R^{ox}} \right]^6 = \left[\frac{\kappa_{ox}^2 \times J^{ox}}{\kappa_{red}^2 \times J^{red}} \right]^6 \times \left[\frac{R^{red}}{R^{ox}} \right]^6 \quad (4.3)$$

Nous observons des durées de vie qui résultent de la compétition entre le transfert d'énergie et le déclin intrinsèque de MTHF (noté τ_{MTHF}) au sein de OtCPF2. Étant donné que nous ne connaissons pas le déclin intrinsèque de MTHF au sein de OtCPF2, nous avons choisi d'utiliser la valeur de 845 ps, rapportée par Saxena et al., lors de l'étude du transfert d'énergie

au sein de Cry-DASH de *Vibrio cholerae* (VcDASH) [187]. Nous avons préféré cette valeur à celles rapportées pour EcCPD (354 ps et 480 ps) [98, 106], parce qu'il s'agit d'un Cry-DASH comme OtCPF2. La constante de transfert d'énergie vers FAD_{ox} est déterminée en réalisant le calcul suivant :

$$k_{ox} = \frac{1}{\langle \tau_{ox}(OtCPF2) \rangle} - \frac{1}{\tau_{MTHF}} \quad (4.4)$$

avec $\langle \tau_{ox}(OtCPF2) \rangle$ la valeur moyenne des durées de vie du transfert d'énergie de MTHF excité vers FAD_{ox} obtenues pour les échantillons OtCPF2-TE1 et OtCPF2-TE2. Nous obtenons ainsi les constantes de transfert d'énergie vers FAD_{ox} et FADH⁻ : $6,55 \times 10^{-14} \text{ s}^{-1}$ et $8,82 \times 10^{-15} \text{ s}^{-1}$. Les distances entre MTHF et FAD_{ox} et FADH⁻ ont été déterminées à partir du modèle par homologie de OtCPF2 présenté dans la partie 2.2.2. du chapitre V et valent 1,55 nm et 1,56 nm respectivement. Les intégrales de recouvrement sont calculées à partir des spectres de référence issus de EcCPD [175]. Nous en déduisons le rapport des facteurs d'orientation :

$$\frac{\kappa_{red}^2}{\kappa_{ox}^2} = 1,2 \quad (4.5)$$

Cette valeur est plus faible que celle de 1,7, rapportée par Saxena et al., lors de l'étude du transfert d'énergie au sein de VcDASH [187]. Il faut souligner que les auteurs n'ont pas pris en compte la contribution du déclin intrinsèque de MTHF au sein de VcDASH. Si nous faisons l'application numérique avec cette dernière contribution, le rapport des facteurs d'orientation vaut alors 1,6. Nous trouvons aussi un rapport supérieur à un. Saxena et al. attribuèrent cette différence à un changement de structure locale de la protéine selon la forme d'oxydo-réduction de FAD qu'elle porte. Ceci se conçoit bien étant donné que FADH⁻ est une espèce chargée qui optimise ses interactions électrostatiques avec les acides aminés voisins [187]. Cependant une telle différence d'orientation de FAD_{ox} et FADH⁻ n'a pas été observée sur le modèle de la structure tertiaire de OtCPF2 que nous avons obtenu (cf. le chapitre V). Il est possible que la différence entre les facteurs d'orientation ne soit pas liée à un changement structural mais tout simplement au fait que les moments de transition de la forme oxydée [193] et de la forme réduite de FAD [194] forment entre eux un angle de $\sim 50^\circ$. Nous avons entrepris, dans le chapitre V, le calcul des facteurs d'orientation et obtenu un rapport très inférieur à un. Nous en concluons qu'il y a très probablement un changement structural local important entre les protéines portant FAD_{ox} ou FADH⁻, même si les modèles générés au chapitre V n'ont pas pu les mettre en évidence.

Conclusion

Nous avons montré par spectroscopies d'absorption et de fluorescence stationnaires que le Cry-DASH OtCPF2, issu de l'algue verte *O. tauri*, porte le chromophore FAD, que nous trouvons sous différents états d'oxydo-réduction et que la protéine porte également la photoantenne MTHF. Nous avons pu vérifier que OtCPF2 est stable à 5°C pendant une dizaine d'heures et que, même en présence d'un réducteur externe comme le glutathion réduit, l'irradiation continue de cette protéine en solution aqueuse n'entraîne aucune accumulation d'espèces photoinduites de durée de vie longue, contrairement à ce qui a été observé pour OtCPF1 (cf. le chapitre III). Ces conditions relativement favorables nous ont permis d'étudier les différents processus primaires de OtCPF2 par spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde, dans trois conditions expérimentales distinctes.

Nous avons en premier lieu réalisé une expérience d'absorption transitoire isotrope sur l'échantillon noté OtCPF2-Iso, en utilisant une excitation à 470 nm. Cette longueur d'onde permet d'exciter majoritairement FAD_{ox}, ce qui n'a été rapporté dans la littérature pour des protéines CPF que récemment [20]. Nous avons pu mettre en évidence la photoréduction ultrarapide (590 fs) de FAD_{ox} excité, comme pour OtCPF1 (cf. le chapitre III). Nous avons interprété nos résultats en postulant une hétérogénéité de l'échantillon. Une première population, dite non réactive, décline en 13 ps sans donner lieu à une photoréduction par un résidu protéique. Nous l'attribuons hypothétiquement à une classe de protéines portant FAD_{ox} dans le site de complexation de MTHF. La seconde population de FAD_{ox} excitée est photoréduite par un résidu tryptophane voisin, WH₄₂₇. Un saut d'électron d'un tryptophane plus éloigné de FAD vers le radical WH₄₂₇^{•+}, accompagné d'une recombinaison de charge vers l'état fondamental semble être observé lors de l'étape de 13 ps. Le modèle de OtCPF2 présenté dans le chapitre V montre que la chaîne de photoréduction homologue à la chaîne de trois tryptophanes connue pour EcCPD est constituée des trois tryptophanes suivants : WH₄₂₇, WH₄₀₄ et WH₃₅₁ (en s'éloignant de FAD). Nous avons donc proposé que le tryptophane oxydé et qui décline avec la durée de vie de 13 ps soit WH₄₂₇, que celui de durée de vie de 340 ps soit WH₄₀₄ et que celui de durée de vie longue soit WH₃₅₁.

En second lieu nous avons entrepris une expérience d'anisotropie d'absorption transitoire sur OtCPF2 (échantillon OtCPF2-Aniso) dans le but d'individualiser les différents

radicaux tryptophanyl par l'orientation de leur moment dipolaire de transition. L'excitation à 470 nm de OtCPF2-Aniso nous a permis également d'exciter majoritairement FAD_{ox}. Nous concluons que le dernier tryptophane oxydé que nous détectons aux temps les plus longs de notre mesure serait WH₃₅₁. Nous n'avons pas pu distinguer si le premier tryptophane oxydé pur que nous observons et qui décline en environ 300 ps, serait WH₄₂₇ ou WH₄₀₇ puisque leurs de moments de transition ont des orientations relativement similaires au sein de OtCPF2 (d'après notre modélisation ; cf. le chapitre V).

En utilisant une excitation à 387,5 nm et une configuration de spectroscopie d'absorption transitoire isotrope, nous avons finalement étudié les processus induits par excitation de MTHF. Nous avons mis en évidence un transfert d'énergie rapide de MTHF excité vers le chromophore flavine. Ce transfert est sensiblement plus rapide vers FAD_{ox} (17,3 ps) que vers FADH⁻ (108 ps). Ceci a déjà été observé par le groupe Zhong pour EcCPD [133] et pour le cryptochrome 1 de *Vibrio cholerae* [187]. Une fois les deux transferts d'énergie achevés, nous observons, d'une part, le déclin de l'état excité de FADH⁻, et d'autre part, les photoproduits de la réduction de FAD_{ox}. Les optimisations obtenues par modélisation suggèrent qu'il n'y a pas de changement structural local entre les protéines portant FAD_{ox} ou FADH⁻. Cependant le calcul du rapport des facteurs d'orientation dans les deux transferts laisse penser qu'il y aurait un changement local majeur de la structure de la protéine selon le nombre d'oxydation de FAD. Nous proposons que ce rapport non égal à un soit lié à un changement structural local important tout en prenant en compte le fait que les moments de transition de FAD_{ox} et FADH⁻ soient différemment orientés.

**CHAPITRE V : Étude structurale de OtCPF1 et
OtCPF2**

Introduction

Les chapitres III et IV sont consacrés à l'étude spectroscopique de deux protéines purifiées, appartenant aux protéines CPF, provenant de l'algue verte *Ostreococcus tauri* : OtCPF1 et OtCPF2. Nous avons vu que l'interprétation des résultats obtenus par spectroscopie d'absorption transitoire nécessite des informations structurales. Les structures cristallographiques de ces protéines n'étant pas connues, nous avons généré des modèles de leur structure tertiaire par homologie avec des structures connues. Cette méthode est particulièrement efficace pour les protéines CPF qui présentent des caractéristiques structurales très conservées au sein d'un même groupe (cf. le chapitre I). Nous avons pour cela établi une collaboration entre notre équipe et celle dirigée par Francine Acher au Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques (UMR 8601) de l'université Paris Descartes.

Il a été vu, dans les chapitres I et III, que OtCPF1 appartient à la fois aux groupes des photolyases (6-4) et des cryptochromes animaux [2]. Il est important de noter que ces deux sous-familles de protéines n'ont pas les mêmes fonctions biologiques mais sont groupées ensemble lors des études phylogénétique et structurale. Dans la première partie nous présenterons un alignement de la séquence d'acides aminés de OtCPF1 avec celle d'autres protéines CPF et principalement des photolyases (6-4). La première structure cristallographique d'une photolyase (6-4), celle de la photolyase (6-4) de *Drosophila melanogaster* (Dm64), a été résolue fin 2008 [92]. Il s'est donc imposé à nous de modéliser OtCPF1 à partir de cette structure cristallographique. Cette modélisation sera présentée dans la première partie. Le modèle généré permettra d'identifier les acides aminés importants en interaction avec le chromophore FAD ainsi que ceux potentiellement impliqués dans la photoréduction de FAD. Il faut noter que, depuis que cette étude a été réalisée, une nouvelle structure cristallographique de photolyase (6-4) a été résolue : celle de la photolyase (6-4) de *Arabidopsis thaliana* (At64).

Nous avons montré qu'aucune photoantenne n'est présente dans OtCPF1 purifiée (cf. le chapitre III). Nous avons décrit, au chapitre I, les différents acides aminés en interaction avec les photoantennes : MTHF et 8-HDF. L'alignement des acides aminés de OtCPF1 avec ceux de différentes protéines CPF nous indiquera quelle photoantenne est potentiellement présente dans OtCPF1 *in vivo*. Un modèle de OtCPF1 avec sa photoantenne

sera alors proposé par ancrage moléculaire (docking, en anglais) de la photoantenne dans le modèle de OtCPF1 précédemment généré.

OtCPF2 appartient au groupe des cryptochromes DASH (cf. les chapitres I et IV) et aucune donnée structurale n'est connue pour cette protéine. Dans la deuxième partie nous présenterons l'alignement de la séquence primaire de OtCPF2 avec celle d'autres protéines CPF et tout particulièrement avec celles des cryptochromes DASH (Cry-DASH).

À ce jour, seules les structures cristallographiques du Cry-DASH de *Arabidopsis thaliana* (AtCry3) [86, 88] et du Cry-DASH de *Anacystis nidulans* (AnDASH) [80] ont été résolues. Nous avons généré la structure tertiaire de OtCPF2 par homologie avec la structure cristallographique de AtCry3 portant simultanément le chromophore FAD et la photoantenne MTHF [88]. La structure cristallographique de AnDASH n'a pas été retenue parce qu'elle est donnée sans photoantenne. Cette modélisation nous permettra d'identifier les acides aminés en interaction avec FAD, MTHF, ainsi que ceux potentiellement impliqués dans la photoréduction.

Lors de l'étude du transfert d'énergie depuis MTHF excité vers FAD_{ox} ou FADH⁻ dans OtCPF2, nous avons observé que le facteur d'orientation κ^2 (lié à l'orientation relative de la photoantenne et de la flavine) n'est pas constant entre ces deux transferts. Saxena et al. observèrent également ce phénomène dans le cryptochrome 1 de *Vibrio cholerae* et l'attribuèrent à un changement structural local entre la photoantenne et la flavine dont l'état d'oxydo-réduction a évolué [187]. Dans le cadre du modèle de OtCPF2, nous avons pu modifier le nombre d'oxydation et l'état de protonation de FAD. Après une nouvelle optimisation, nous avons pu comparer les distances et les orientations entre MTHF et les deux états d'oxydo-réduction de FAD : FAD_{ox} et FADH⁻ dans OtCPF2.

Les modèles tridimensionnels par homologie de OtCPF1 et OtCPF2 ainsi que leurs nouvelles optimisations après ajout du 8-HDF pour OtCPF1 et modification du nombre d'oxydation et de l'état de protonation de FAD pour OtCPF1 et OtCPF2 ont été réalisés par Laetitia Mony, doctorante au sein de l'équipe de Francine Acher.

1 Étude structurale de OtCPF1

1.1 Alignement de la structure primaire

Un alignement de structures primaires est une comparaison des séquences d'acides aminés visant à trouver et à mettre en regard (aligner) des parties similaires. Cette comparaison est optimisée afin que le plus grand nombre d'acides aminés identiques ou ayant des propriétés chimiques proches soient placés les uns en face des autres, c'est-à-dire alignés (cf. la partie 5.1 du chapitre VI, pour une description des outils informatiques).

La séquence d'acides aminés de OtCPF1 a été alignée sur celle des photolyases (6-4) de quelques organismes (Dm64, *Danio rerio* (Dr64), *Xenopus laevis* (Xl64), At64, *Dunaliella salina* (Ds64)), des photolyases CPD de *E. coli* (EcCPD) et de *A. nidulans* (AnCPD), du cryptochrome de *Arabidopsis thaliana* (AtCry1) et du Cry-DASH de *Arabidopsis thaliana* (AtCry3). L'alignement obtenu est représenté sur la Figure 1.1. Le taux d'identité globale (pourcentage d'acides aminés identiques pour toutes les séquences d'acides aminés) est de 5,9 % et celui d'homologie (pourcentage d'acides aminés ayant des propriétés chimiques voisines) de 12,7%. Ce taux d'homologie est proche de celui rapporté par Sancar lors de l'étude des séquences d'acides aminés de protéines CPF [19].

CHAPITRE V : Étude structurale de OtCPF1 et OtCPF2

	1	10	20	30	40	50	60	70	
OtCPF1	-----	-----	-----	-----	MSV	ASTSAAAKGR	LWVFRKAL	RVHDNPA	LSRG
Dm64	-----	-----	MASWSHPQFEK	GAST	SLYKK	AGLMDSQRSTL	VHWFRKGL	LRLHDNPA	LSHI
Dr64	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MSHNTI	HWFRKGL	LRLHDNPA
Xl64	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MRHNS	IHWFRKGL	LRLHDNPA
At64	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MATGSGS	LIWFRKGL	RVHDNPA
Ds64	MLRCAQPKYAPL	KRQA	FNQ	LNRLVAAARTPSKSS	STRM	ASTSSGQGRS	ILWFRKGL	LRLHDNPA	LRDA
EcCPD	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TTHL	VWFRQDL	LRLHDNPA
AnCPD	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MAAPI	LFWHRRD	LRLSDNPA
AtCry1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AtCry3	-----	MNDHI	HRV	PAL	TEEEIDSVAIKTFERY	ALPSS	SSSVKRRKGGVT	ILWFRNDR	LRVLDNDL
	80	90	100	110	120	130	140		
OtCPF1	TLHAT	-----	ACQP	VFLDP	-----	WFCQPSRV	GANRMRFL	LQSLRDL	DAQLRAR
Dm64	FTAANAAPGRYFVRP	IFILD	PGILD	-----	WM	-----	QV	GANRWRFL	QQTLEDL
Dr64	LKDCRH	-----	IYPL	FLLD	-----	WPKNTRI	GINRWRFL	LIEALKDL	DSSLKKL
Xl64	MKDCAE	-----	LHPI	FILD	-----	WPKNMQV	SVNRWRFL	LIDALKDL	DENLKKI
At64	SKGSEF	-----	MYP	VFVID	PHYMESDPS	FSPGSSRA	GVNRIRF	LLESKDL	DSSLKKL
Ds64	CTGSAA	-----	VFPI	FIID	PYFLQKS	-----	NNKV	GVNRYQF	LLESKDL
EcCPD	CRNSSA	-----	RVLAL	LIAT	PRQWAT	-----	HNM	SPRQAEL	INAQLNGL
AnCPD	R-AQSA	-----	QLIGL	FLCLD	PQILQS	-----	ADM	APARVAY	LQGLQEL
AtCry1	VRAG	-----	PVIAL	LVWAP	PEEEGH	-----	YHP	GRVSRWWL	LKNSLAQL
AtCry3	WSSSD	-----	TILPV	VYCLD	PRLFHTT	-----	HFFNFPKT	GALRGGF	LMECLVDL
	150	160	170	180	190	200	210		
OtCPF1	PRVV	LPRACK	KWRVDS	VTWE	HDIEPYAKIR	DAA	VRGALERAG	-----	VECHAA
Dm64	PAEV	FPRIFK	SWRVEM	LTFE	TDIEPYSVTR	DAA	VQKLAKAEG	-----	VRVETH
Dr64	PTEV	LPKLFKQ	WKITRL	TFEV	DTPEYSQSR	KEV	MKLAKEYG	-----	VEVTPK
Xl64	PAEV	FPLLFK	KWKVTR	LTFE	VDIEPYSRQR	DAE	VEKLAAEH	-----	VQVIQK
At64	PGEV	LVRCLQE	WKVKRL	CFEY	DTDPYYQAL	DVK	KDYASSTG	-----	VEVFS
Ds64	PEEV	IPRVLRD	WSIKKL	CYEI	DTPEYAKAR	DAR	VDDMAREAG	-----	VEVKKH
EcCPD	DFVA	SVEIV	KQVCAE	NSVTHL	FYNYQYEVNERAR	DVE	VERALRN	-----	VVCEGFD
AnCPD	PQHL	IPQLAQQ	LQAEAV	YWNQ	DIPEYGRDR	DGQ	VAAALKTAG	-----	IRAVQLWD
AtCry1	SVAS	LLDVVK	STGASQI	FFNH	LYDPLSLVR	DHR	AKDVLTAQG	-----	IAVRSF
AtCry3	KPEEI	LPSLAKD	DFGART	VFAH	KETCSEEV	DVER	LNQGLKRV	-----	GNSTKLELI
	220	230	240	250	260	270	280		
OtCPF1	CKGAPPTTYQG	FFKIVDKM	GAP	NAPI	DAMEKMPG	SFASDDEETKAL	VQGVADAY	GIPTLEDL	GYPELGD
Dm64	NL GKAPITYQK	FLGIVEQL	KVP	KV	LG	VPEKLNKMP	TPPKD	-----	EVEQKDSA
Dr64	NNGKTPMTYIR	LQSVVKAM	GHP	-----	KKPIPAPT	NEDMRG	VSTPLSDD	HEEKFGI	PTLEDL
Xl64	NNGKPLTYVRF	QTVLAPL	GPP	-----	KRPIKAPT	LENMKD	CHTPWKSS	YDEKYGV	PTLEEL
At64	NGGKPLSYQS	FLLKAVGEP	SCA	-----	KSELVMS	YSSLPP	IGDIGNLG	ISEVPSL	EELGYKDD
Ds64	NKGKAPLTMQA	FEKLVDRV	GHP	-----	LTALPAPT	ARLPP	VVDVSLP	GIKDAEV	GVPTWQEMGF
EcCPD	EMYKV	FTPFKN	AWLKR	LR	REGMP	-----	ECVAAP	KVRSSG	SIEPS
AnCPD	NPYSV	YGF	FWKNWQA	QPKP	-----	-----	TPVAT	PTTEL	VDLSP
AtCry1	LGRPF	SFMAFWER	CLSM	YD	-----	-----	ESPLL	PKKI	ISGDV
AtCry3	VFDLP	PDVYT	QFRKS	V	EAKCS	-----	-----	IRS	STRIP
	290	300	310	320	330	340	350		
OtCPF1	DEGFP	GGVGGETE	GLRRL	RLML	LARK	EWIGQFEK	PSTNPTTRF	HGL	SQSGKTKPK
Dm64	GP	NKFP	GGETE	ALRR	MEESL	KDEI	WVARFEK	PNTAP	-----
Dr64	GP	HLFP	GGEQE	ALRRL	DEHMERT	NWVCK	FEKPTSP	-----	-----
Xl64	GP	HLYP	GGEESE	ALSR	LDLHM	KRTSWV	CNFKPETEP	-----	-----
At64	DW	TPFR	GGEESE	ALKRL	TKSIS	DKAWAN	FEKPGDPS	-----	-----
Ds64	PT	AIFK	GGETE	ALKRL	EHYMK	DTKWX	ASFEKPTDPS	-----	-----
EcCPD	FDTAH	FPVEEKA	AI	IAQL	RQFC	QNGAGE	YEQRD	-----	-----
AnCPD	LPTL	KQLG	FDWD	GGFP	VEP	GETAAI	ARLQ	EFCD	RAIADYDP
AtCry1	LLAR	AWSP	GWNSG	DKAL	TT	FING	PLLEYS	KNRR	KADS
AtCry3	TRGMR	FVGG	ESAG	VGRV	FEY	FWK	DLLK	VYK	ETRNGMLG
	360	370	380	390	400	410	420		
OtCPF1	SGAEALMIP	STTALS	SPYMK	FGCV	SPRV	FYHE	L	TAVY	KELEG
Dm64	NSLEPS	TTVL	SPYL	KFG	CL	SARL	FNQ	KEI	IKR
Dr64	NSLIP	TTVL	SPY	VRF	CL	SART	F	WWR	L
Xl64	NSLTP	TTVL	SPY	VKFG	CL	SART	F	W	K
At64	AFLK	PAT	VM	SPYL	KFG	CL	SR	Y	F
Ds64	AFT	EP	STTALS	SPYL	KFG	CL	SAR	F	F
EcCPD	FPA	VEG	T	SRL	S	ASL	AT	G	L
AnCPD	AEAG	T	SGL	SPAL	K	FGA	I	G	R
AtCry1	AT	S	F	SP	HL	H	F	G	E
AtCry3	P	D	Y	ST	K	F	S	P	W

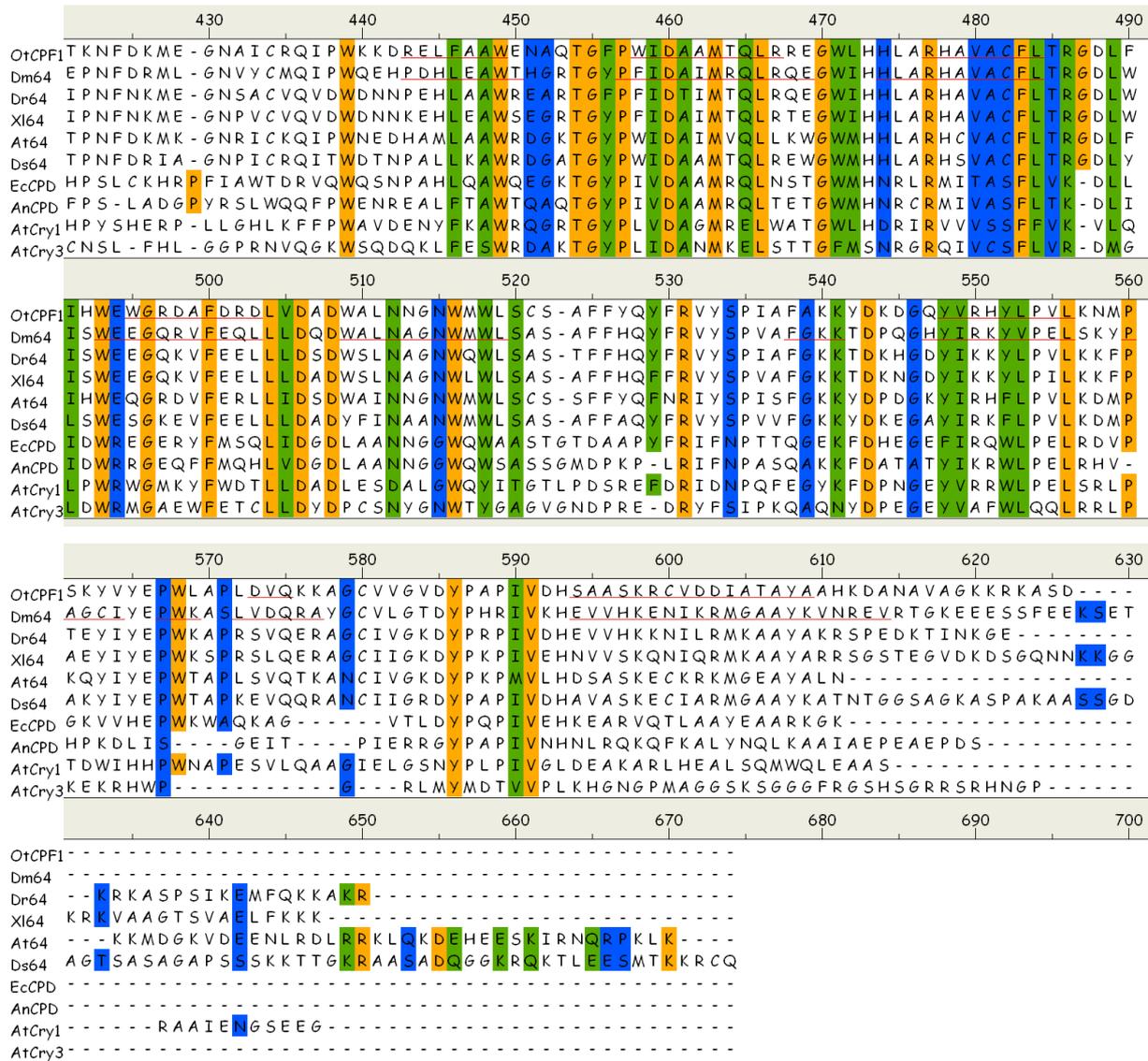


Figure 1.1 : Alignement de la structure primaire de OtCPF1 avec celle de Dm64, Dr64, Xl64, At64, Ds64, EcCPD, AnCPD, AtCry1 et AtCry3. En orange sont représentés les acides aminés identiques, en vert ceux de forte homologie et en bleu ceux de faible homologie. Pour les séquences primaires de OtCPF1 et Dm64, les acides aminés soulignés en rouge et en vert sont prédits pour OtCPF1 et extraits de la structure cristallographique pour Dm64 pour former des hélices α et feuilletts β , respectivement.

Afin de confirmer que OtCPF1 est une chromoprotéine appartenant au groupe des photolyases (6-4), les taux d'identité ont été comparés deux à deux entre la séquence de OtCPF1 et celles des autres protéines CPF. Nous comparons toutes les protéines avec l'intégralité de leur séquence d'acides aminés et sans se restreindre au domaine photolyase (partie commune à toutes les protéines CPF, cf. le chapitre I). Les taux d'identité sont compris entre 41,1% et 44,0% avec les photolyases (6-4) et il chute vers 20% avec les photolyases CPD et les cryptochromes (cf. le Tableau 1.1). Comme nous avons vu au chapitre I, les taux d'identité permettent de classer la protéine dans les différents groupes des protéines CPF : photolyases CPD, photolyases (6-4) et cryptochromes animaux, Cry-DASH,

cryptochromes. Nous confirmons ici que OtCPF1 fait bien partie du groupe des photolyases (6-4) et cryptochromes animaux.

Espèce comparée à OtCPF1	Identité (%)	Homologie (%)
photolyase (6-4) de <i>Drosophila Melanogaster</i> (Dm64)	41,6	57,7
photolyase (6-4) de <i>Danio rerio</i> (Dr64)	43,8	59,8
photolyase (6-4) de <i>Xenopus laevis</i> (Xl64)	42,5	61,1
photolyase (6-4) de <i>Arabidopsis thaliana</i> (At64)	44,0	60,0
photolyase (6-4) de <i>Dunaliella salina</i> (Ds64)	41,1	56,1
photolyase CPD de <i>Escherichia coli</i> (EcCPD)	21,2	37,5
photolyase CPD de <i>Aspergillus nidulans</i> (AnCPD)	22,0	37,7
cryptochrome de <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtCry1)	20,0	37,7
Cry-DASH de <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtCry3)	22,2	38,5

Tableau 1.1 : Taux d'identité et d'homologie obtenus par comparaison de l'alignement de la structure primaire de OtCPF1 avec celui des autres protéines utilisées pour l'alignement représenté sur la Figure 1.1.

Par prédiction des structures secondaires (cf. la partie 5.1 du chapitre VI), deux domaines sont délimités :

- le domaine α/β , formé par les acides aminés 1 à 167, comprend cinq hélices α et cinq feuillets β
- le domaine α , avec onze hélices α , entre les acides aminés 229 et 559.

La présence de ces deux domaines est en bon accord avec les données de la littérature pour les protéines CPF [19]. Par ailleurs le domaine α qui porte le chromophore flavine (FAD) est bien mieux conservé que le domaine α/β où nous retrouvons les photoantennes de nature différente (MTHF, 8-HDF, FMN) selon les protéines CPF.

1.2 Génération d'un modèle tridimensionnel par homologie

À partir de l'alignement optimisé, un modèle tridimensionnel de OtCPF1 a été généré grâce à la structure cristallographique de Dm64 [92] (code PDB : 3CVU). Dans la structure 3CVU, Dm64 porte la flavine dans son état oxydé. Le principe de la modélisation par homologie est décrit dans la partie 5.2 du chapitre VI. Il s'avère que la structure cristallographique résolue et en libre accès sur la PDB porte un chromophore FAD pour lequel les atomes d'hydrogène ne sont pas résolus. En important cette structure dans le logiciel Accelrys, le chromophore se trouve sous sa forme réduite protonée (FADH₂). Ainsi le

modèle de OtCPF1 a été optimisé en présence de ce dernier chromophore, même si dans la structure de référence le chromophore porté est FAD_{ox}.

Un problème se pose pour modéliser la partie de la protéine située entre les positions 257 et 293. En effet, cette partie de la protéine OtCPF1 n'existe pas dans la structure de référence de Dm64. Une hélice α est prédite par l'application PROF (cf. la partie 5.1 du chapitre VI) pour la séquence PKSPFEIAAGR en position 271-281. Lors de la génération du modèle par homologie, nous avons donc imposé pour les résidus de cette séquence une conformation en hélice α . Les deux grandes boucles encadrant l'hélice α en position 271-281 ont ensuite été raffinées. Le modèle final obtenu a un score Profiles-3D (cf. la partie 5.2 du chapitre VI) égal à 241,71, ce qui correspond à 98% du score maximal théorique pouvant être obtenu pour des protéines de la même taille (score Profiles-3D égal à 245,958). Le modèle obtenu est donc de bonne qualité théorique.

Par ailleurs OtCPF1 portant FAD_{ox} au lieu de FADH₂ a été obtenu en modifiant le nombre d'oxydation et le nombre de proton de FAD, puis en minimisant la géométrie des résidus situés dans une sphère de 1 nm autour du chromophore (cf. la Figure 1.2).

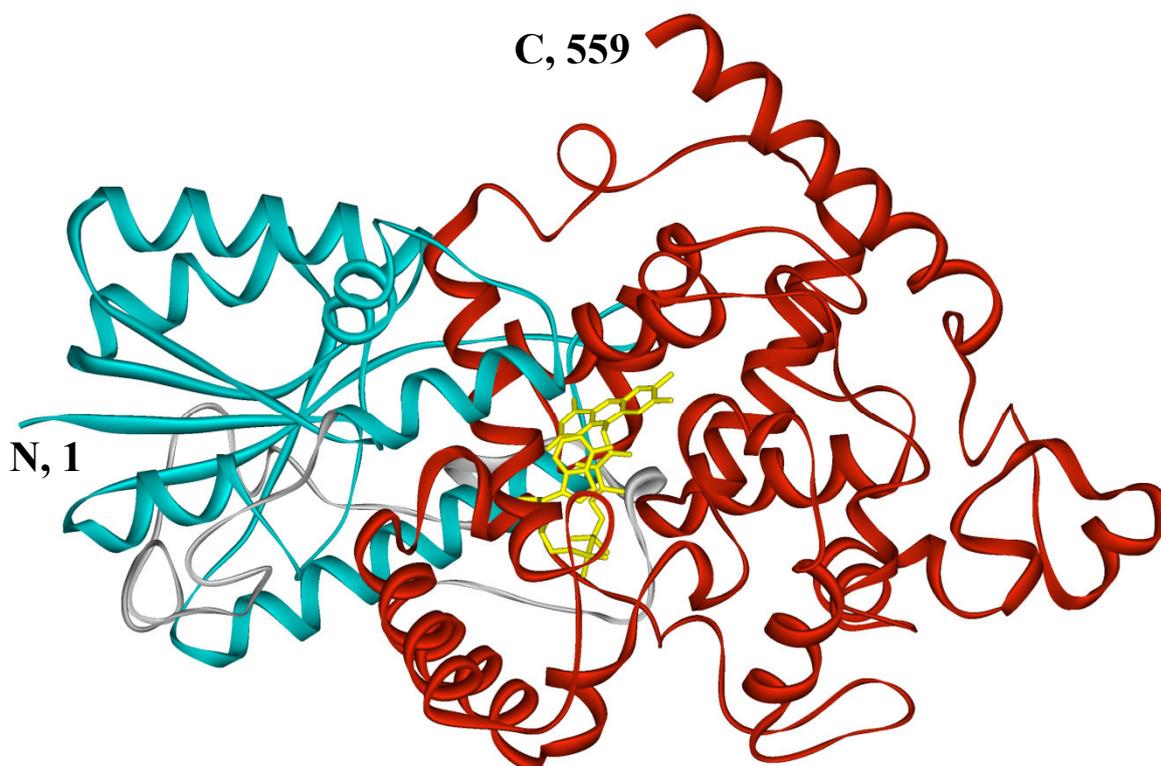


Figure 1.2 : Structure tertiaire de OtCPF1 obtenue après modélisation par homologie sur la structure cristallographique de Dm64 (3CVU) avec le chromophore FAD_{ox} (jaune) [92]. Les acides aminés en position N-terminale (N, 1) et C-terminale (C, 559) sont indiqués. Les domaines α/β (acides aminés de 1 à 167) et α (229-559) sont représentés en cyan et en rouge respectivement. La boucle connectant ces deux domaines est représentée en gris.

1.2.1 Interaction avec le chromophore FAD

Comme il a déjà été vu au chapitre I, les acides aminés impliqués dans la fixation de FAD sont très conservés au sein des photolyases et des cryptochromes. Le modèle de OtCPF1 nous permet d'identifier les acides aminés impliqués dans la fixation du FADH₂. Grâce à l'alignement présenté sur la Figure 1.1, nous pouvons comparer les résidus impliqués dans la fixation du FADH₂ dans OtCPF1 avec ceux impliqués chez EcCPD, ainsi qu'avec les résidus potentiellement impliqués dans la fixation du FADH₂ chez les autres photolyases (6-4). Les résultats sont indiqués dans le Tableau 1.2 et confirment que les résidus impliqués dans la fixation du FADH₂ sont très conservés au sein des protéines CPF.

N° EcCPD	222	234	235	236	237	238	271	278	338	341	344	372	374	378	381
N° OtCPF1	247	300	301	302	303	304	339	346	405	408	411	440	442	446	449
EcCPD	Y	T	S	R	L	S	W	R	W	N	R	D	D	N	G
OtCPF1	G	T	T	A	L	S	L	R	W	H	R	D	D	N	N
Dm64	A	T	T	V	L	S	L	R	W	H	R	D	D	N	N
Dr64	C	T	T	V	L	S	L	R	W	H	R	D	D	N	N
Xl64	C	T	T	V	L	S	L	R	W	H	R	D	D	N	N
Ds64	A	T	T	A	L	S	L	R	W	H	R	D	D	N	N
At64	A	T	T	V	M	S	L	R	W	H	R	D	D	N	N
AtCry1	Y	T	S	F	L	S	F	R	W	D	R	D	D	D	G
AtCry3	K	S	T	K	F	S	V	R	F	N	R	D	D	N	N
AnCPD	L	T	S	G	L	S	W	R	W	N	R	D	D	N	G

Tableau 1.2 : Comparaison des résidus impliqués dans le site de fixation du FADH₂ dans EcCPD et OtCPF1 (et les autres protéines) et potentiellement impliqués dans le site de fixation du FADH₂ chez les autres protéines (cf. la Figure 1.1). Les numéros de ces résidus sont indiqués pour EcCPD et OtCPF1. Les rectangles en trait plein et en pointillés représentent les acides aminés conservés chez toutes les protéines et chez toutes les photolyases (6-4), respectivement.

Cinq acides aminés (entourés par un rectangle en trait plein) sur les quatorze impliqués dans le site de fixation de FAD sont identiques au sein des cryptochromes et photolyases que nous avons comparés ; seulement trois résidus ne sont pas homologues. En se restreignant aux photolyases (6-4), dont OtCPF1, le nombre d'acides aminés identiques atteint onze (rectangles en pointillés). Quatre acides aminés (en cyan sur la Figure 1.3) stabilisent FAD par des liaisons hydrogènes avec les oxygènes de ses groupes phosphates. Des interactions de type Van der Waals sont observées entre les acides aminés arginine 411 et acide aspartique 440 (en vert sur la Figure 1.3) et l'isoalloxazine de FAD.

L'asparagine 446 de OtCPF1, correspondant à l'asparagine 378 de EcCPD, est représentée en rouge sur la Figure 1.3. Elle est conservée chez toutes les photolyases (6-4) et

joue un rôle essentiel dans la stabilisation de FAD portant un hydrogène en N5 de l'isoalloxazine (toutes les molécules FAD sauf sous formes oxydées et $\text{FAD}^{\bullet-}$, cf. les Figures 1.1 et 1.3 du chapitre I) par un réseau de liaisons hydrogènes [94]. L'étude spectroscopique stationnaire de OtCPF1 a montré que le radical $\text{FAD}^{\bullet-}$ n'est pas stable mais existe uniquement sous sa forme protonée. Park et al. montrèrent qu'il existe une liaison hydrogène entre le carbonyle de l'amide de l'asparagine 378 de EcCPD et le N5 de FAD. La présence de l'asparagine stabilise la forme protonée du radical parce que la forme non protonée ne porte pas d'hydrogène sur le N5 de l'isoalloxazine de FAD.

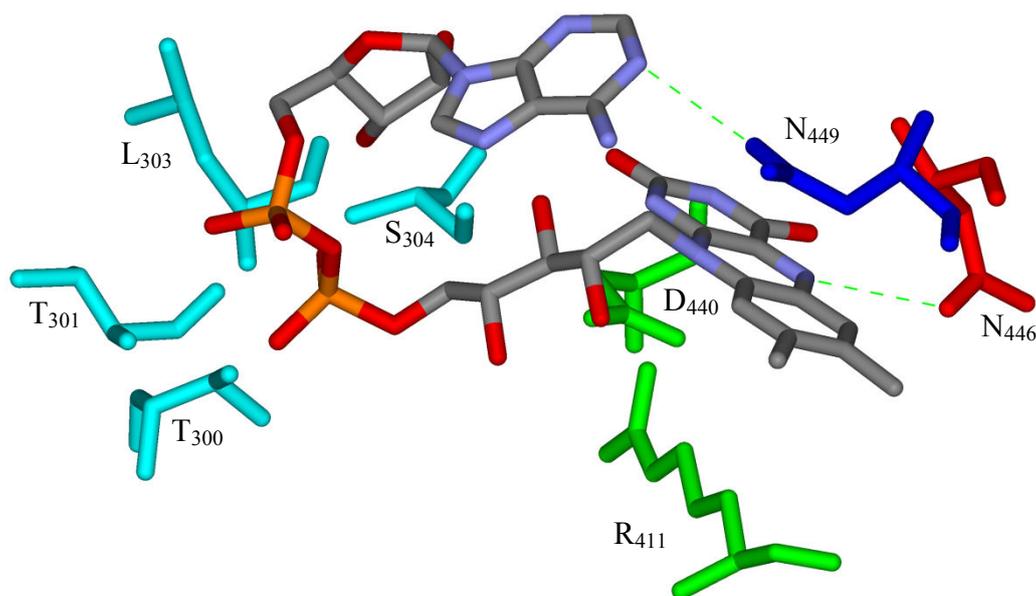


Figure 1.3 : Acides aminés en interaction avec FADH_2 chez OtCPF1. Les liaisons hydrogène avec les asparagines (N) 446 (rouge) et 449 (bleu) sont indiquées par des pointillés verts. Les acides aminés en interaction de type Van der Waals avec FADH_2 sont représentés en vert (R411 et D440). Les acides aminés en interaction avec FADH_2 par liaison hydrogène sont présentés en cyan (T300, T301, L303 et S304).

Park et al. proposèrent aussi que la stabilisation de la forme FADH^- dans EcCPD soit assurée par liaison hydrogène entre l'hydroxyle 3' de la chaîne ribityle et le N1 de l'isoalloxazine (cf. la Figure 1.1 du chapitre I) [85]. Par ailleurs, Kao et al. proposèrent que la protonation de $\text{FAD}^{\bullet-}$ soit assurée par une molécule d'eau placée entre l'asparagine 378 (pKa de 17, trop basique pour être l'acide) et le N5 selon la structure cristallographique de EcCPD [20]. Nous n'avons pas observé la présence d'une telle molécule d'eau entre ces deux molécules sur la structure cristallographique de EcCPD importée dans le logiciel Accelrys. Nous proposons donc d'écarter cette hypothèse. En ce qui concerne OtCPF1 modélisée, nous n'avons pas pu observer de liaison hydrogène intramoléculaire puisque le N1 de FADH_2 est protoné, ce qui entraîne la perte de liaison hydrogène intramoléculaire.

Brudler et al. observèrent chez le Cry-DASH de *Synechocystis* (SynDASH) la présence d'une asparagine créant des liaisons hydrogènes avec l'adénine de FAD et altérant la structure électronique de FAD (et ainsi le transfert d'électron depuis l'isoalloxazine vers le dimère de l'ADN endommagé) [80]. Cette asparagine est conservée dans toutes les photolyases (6-4) étudiées dans ce chapitre et correspond à N449 chez OtCPF1. Elle remplace la glycine 381 de EcCPD. Nous avons vu au chapitre III, que les spectres d'absorption stationnaire de chromophore FAD sont très sensibles à l'environnement et qu'un décalage spectral vers le rouge est observé pour les spectres de FADH[•] et FAD_{ox} portés par des photolyases (6-4) par rapport à des photolyases CPD. Nous avons observé ce décalage spectral vers le rouge pour OtCPF1 (cf. la partie 1.3 du chapitre III). Un décalage vers le rouge d'une transition électronique traduit un abaissement d'énergie pour cette transition, autrement dit un écart énergétique plus faible entre les deux niveaux électroniques impliqués dans la transition. Nous proposons que la présence d'une liaison hydrogène supplémentaire pourrait expliquer ce phénomène pour OtCPF1.

1.2.2 Interaction avec une photoantenne : MTHF ou 8-HDF

Contrairement au site de fixation de FAD qui est bien conservé chez les photolyases et les cryptochromes, celui de la photoantenne (MTHF ou 8-HDF) diffère beaucoup selon les protéines CPF (cf. la partie 2.2.2.2 du chapitre I) [19]. Les sites d'interaction de la photoantenne avec les protéines diffèrent entre les photolyases CPD et les Cry-DASH [86]. Des différences plus marquées existent entre les protéines possédant MTHF ou 8-HDF [87]. Puisqu'après purification, OtCPF1 ne porte plus de photoantenne, il est bien difficile de connaître la photoantenne présente *in vivo*.

L'étude de la conservation des acides aminés impliqués dans la fixation du 8-HDF ou du MTHF dans les protéines CPF pourrait cependant indiquer si la photoantenne potentiellement présente chez OtCPF1 est MTHF ou 8-HDF. EcCPD [85] et AtCry3 [80] portent MTHF, en revanche AnCPD [87] porte 8-HDF. Les sites de fixation de la photoantenne sont différents pour ces trois protéines et leur structure cristallographique est résolue. Nous allons donc identifier les acides aminés de OtCPF1 correspondant aux acides aminés impliqués dans la fixation de la photoantenne pour ces trois protéines et essayer d'en déduire quel est la photoantenne présente probablement *in vivo* chez OtCPF1 et plus généralement chez les photolyases (6-4).

1.2.2.1 MTHF

Prenons tout d'abord comme protéine de référence EcCPD, une photolyase CPD qui porte MTHF. À partir de l'alignement obtenu précédemment (cf. la Figure 1.1) et de la connaissance des acides aminés en interaction avec MTHF porté par EcCPD, nous pouvons déduire les acides aminés potentiellement en contact avec MTHF pour OtCPF1. Ils sont représentés dans le Tableau 1.3.

Un seul acide aminé impliqué dans la liaison du MTHF chez EcCPD (K293 pour OtCPF1) est conservé parmi OtCPF1 et les autres photolyases (6-4). L'acide glutamique 109 qui, dans EcCPD, stabilise MTHF par deux liaisons hydrogènes très importantes [85] est notamment substitué par une alanine chez OtCPF1. Sur la base de EcCPD, OtCPF1 ne porterait donc pas MTHF de la même manière que les photolyases CPD.

N° EcCPD	44	108	109	292	293	375
N° OtCPF1	54	114	115	360	361	443
EcCPD	H	N	E	C	K	L
OtCPF1	S	Y	A	D	K	W
Dm64	-	Y	S	D	R	W
Dr64	T	Y	S	N	K	W
Xl64	M	Y	S	N	K	W
Ds64	N	Y	A	D	R	Y
At64	S	Y	Y	D	K	W

Tableau 1.3 : Alignement des résidus impliqués dans le site de fixation du MTHF chez EcCPD [85] avec ceux correspondants de OtCPF1 et des photolyases (6-4) (cf. la Figure 1.1). Les numéros de ces résidus sont indiqués pour EcCPD et OtCPF1.

Le site de fixation du MTHF dans les Cry-DASH diffère de celui des photolyases CPD. Les acides aminés en interaction avec MTHF au sein de AtCry3 sont identifiés et donnés comme référence dans le Tableau 1.4. D'après l'alignement de la séquence d'acides aminés de OtCPF1 avec celles d'autres protéines CPF représenté sur la Figure 1.1, nous avons identifié les acides aminés de OtCPF1 potentiellement en interaction avec MTHF, si ce dernier se liait dans OtCPF1 de la même manière que dans AtCry3.

Là encore aucun acide aminé impliqué dans le site de fixation du MTHF chez les Cry-DASH n'est conservé chez OtCPF1 ni chez les photolyases (6-4) testées ici. Nous avons présenté au chapitre I que la mutation de l'acide glutamique E149 en alanine chez AtCry3 implique la perte de MTHF [88]. Cet acide aminé est crucial pour la fixation de MTHF dans les cyrptochromes DASH. Chez OtCPF1, le résidu E149 est remplacé par la tyrosine 114. Une tyrosine est un acide aminé plus encombrant qu'un acide glutamique et les liaisons

hydrogènes qu'elle peut établir avec MTHF sont moins fortes que celles de l'acide glutamique. Il est donc peu probable que MTHF soit la photoantenne présente chez OtCPF1.

N° AtCry3	84	147	148	149	150	341	344	345	417	423	425	429
N° OtCPF1	49	112	113	114	115	357	361	362	435	441	443	447
AtCry3	H	C	S	E	E	N	F	H	E	Y	P	Y
OtCPF1	W	E	P	Y	A	K	K	M	D	A	W	N
Dm64	W	E	P	Y	S	P	R	M	E	Q	W	A
Dr64	W	E	P	Y	S	P	K	M	E	S	W	A
Xl64	W	E	P	Y	S	P	K	M	E	A	W	A
Ds64	-	E	P	Y	A	P	R	I	E	A	Y	A
At64	F	D	P	Y	Y	P	K	M	E	S	W	N

Tableau 1.4 : Alignement des résidus impliqués dans le site de fixation du MTHF chez AtCry3 [86] avec ceux correspondants de OtCPF1 et des photolyases (6-4) (cf. la Figure 1.1). Les numéros de ces résidus sont indiqués pour EcCPD et OtCPF1.

1.2.2.2 8-HDF

La deuxième photoantenne souvent présente chez les protéines CPF est 8-HDF. La protéine de référence portant 8-HDF et dont nous connaissons la structure cristallographique est AnCPD [87]. Les acides aminés en interaction avec 8-HDF au sein de AnCPD sont identifiés. D'après l'alignement de la séquence d'acides aminés de OtCPF1 avec celles d'autres protéines CPF représenté sur la Figure 1.1, nous avons identifié les acides aminés potentiellement en interaction avec 8-HDF pour OtCPF1 (cf. le Tableau 1.5).

N° AnCPD	35	38	41	51	55	101	103	106	109	248	249
N° OtCPF1	45	48	51	60	64	110	112	115	118	308	309
AnCPD	F	D	I	R	L	D	E	G	R	K	F
OtCPF1	F	D	-	R	L	D	E	A	R	K	F
Dm64	F	D	I	R	L	D	E	S	R	K	F
Dr64	F	D	-	R	L	D	E	S	R	R	F
Xl64	F	D	-	R	L	D	E	S	R	K	F
Ds64	F	D	F	R	L	D	E	A	R	K	F
At64	F	D	Y	R	L	D	D	Y	L	K	F

Tableau 1.5 : Alignement des résidus impliqués dans le site de fixation du 8-HDF chez AnCPD [87] avec ceux correspondants de OtCPF1 et des photolyases (6-4) (cf. la Figure 1.1). Les numéros de ces résidus sont indiqués pour AnCPD et OtCPF1. Les rectangles encadrent les acides aminés identiques dans AnCPD, OtCPF1 et les photolyases (6-4).

Contrairement aux sites d'interaction avec MTHF, sept acides aminés en contact avec 8-HDF chez AnCPD (encadrés) sont identiques chez OtCPF1 et les autres photolyases (6-4) testées dans ce chapitre. Comme les acides aminés sont très conservés pour les cinq autres

photolyases (6-4) présentées dans cette partie, nous proposons que la photoantenne présente chez OtCPF1 et, plus généralement chez les photolyases (6-4), soit 8-HDF.

Sur le modèle tridimensionnel de OtCPF1 que nous avons optimisé, 8-HDF a été inséré puisqu'il n'est pas présent dans la structure cristallographique de Dm64 et que nous supposons qu'il s'agisse de la photoantenne présente dans OtCPF1. Les principaux acides aminés en interaction avec 8-HDF chez AnCPD sont représentés sur la Figure 1.4-A, et ceux correspondants chez OtCPF1 modélisée et après ancrage du 8-HDF sont représentés sur la Figure 1.4-B. Nous pouvons constater que l'arrangement spatial des résidus du site putatif du 8-HDF, dans le domaine α/β de OtCPF1, est similaire à celui présent chez AnCPD. La lysine 308 est un acide aminé conservé chez OtCPF1 et essentiel à la stabilisation du 8-HDF par liaison hydrogène. La forte conservation des résidus impliqués dans la liaison du 8-HDF entre AnCPD et OtCPF1 renforce donc l'hypothèse que 8-HDF est la photoantenne présente chez OtCPF1.

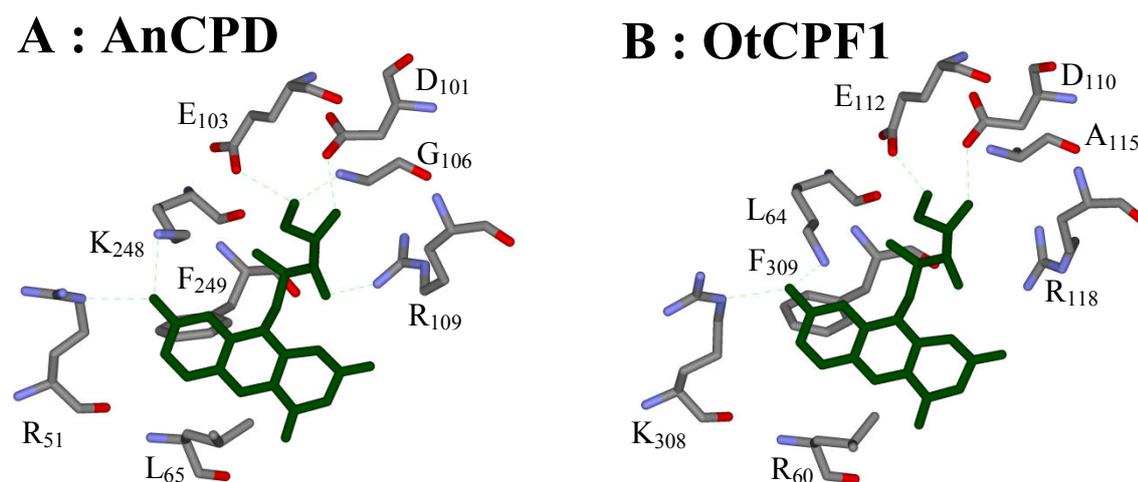


Figure 1.4 : A : acides aminés en interaction avec 8-HDF chez AnCPD d'après sa structure cristallographique (code PDB : 1QNF). B : acides aminés potentiellement en interaction avec 8-HDF chez OtCPF1 modélisée après insertion du 8-HDF. Les liaisons hydrogène sont indiquées en pointillés.

Notre proposition est que les photolyases (6-4), OtCPF1 compris, porteraient 8-HDF *in vivo* mais aucune de ces protéines n'a pu être surexprimée et purifiée en présence d'une photoantenne. Ceci semble un peu paradoxal étant donné que MTHF, moins enfoui dans la protéine que 8-HDF, reste fixé dans certaines protéines CPF après surexpression et purification. Takao et al. observèrent que AnCPD *in vivo* porte 8-HDF, mais qu'après surexpression dans *E. coli* et *in vivo* dans *E. coli*, elle ne le porte plus [195]. Ils en conclurent que 8-HDF est absent dans *E. coli*. Les protéines portant 8-HDF ont été surexprimées dans

E. coli, purifiées et 8-HDF a été ajouté ultérieurement [96]. Comme OtCPF1 a été surexprimée dans *E. coli* et qu'aucun ajout de 8-HDF n'a été réalisé, il n'est pas surprenant que 8-HDF, putativement photoantenne de OtCPF1, ne soit pas présent dans OtCPF1.

1.2.3 Mécanisme de photoréduction

Dans la partie 2.2.2.4 du chapitre I, nous avons vu que les acides aminés impliqués dans la photoréduction de FADH^\bullet en FADH^- chez EcCPD ont été identifiés : il s'agit des tryptophanes 382, 359 et 306, en se dirigeant de la flavine vers l'extérieur de la protéine [5, 96]. Lors de l'excitation de FADH^\bullet , W_{382} réduit la flavine en FADH^- . Le radical W_{382} oxydé est ensuite réduit par W_{359} qui est lui-même réduit par W_{306} [5-8, 10, 196]. Cette chaîne de tryptophanes est très bien conservée au sein de toutes les protéines CPF et se retrouve chez OtCPF1 (W_{450} , W_{427} et W_{373}). Les Figure 1.5-A et Figure 1.5-B représentent cette chaîne pour EcCPD et OtCPF1, respectivement. En suivant l'exemple de Kao et al. [20], nous pourrions nous référer génériquement à ces résidus en tant que W_p (proximal), W_m (moyen) et W_d (distant), en se dirigeant du plus proche de la flavine au plus éloigné.

Nous constatons que les distances entre W_p et l'isoalloxazine de FAD sont très proches pour OtCPF1 modélisée et EcCPD. Lors de l'étude par spectroscopie d'absorption transitoire de OtCPF1, nous avons pourtant constaté que le premier transfert d'électron photoinduit vers FAD_{ox} est plus rapide dans OtCPF1 (390 fs) que dans EcCPD (0,8 ps-1,2 ps [20]). Ceci ne peut pas être expliqué par une distance plus faible entre FAD_{ox} et W_p dans OtCPF1 que dans EcCPD. Une explication plausible serait une modification de l'orientation des moments de transitions de FAD_{ox} et des tryptophanes. Nous reviendrons sur ce point ultérieurement. Par ailleurs la distance entre W_p et W_m est plus petite pour OtCPF1 que pour EcCPD, ce qui ne permet pas d'expliquer le fait que nous observions un transfert d'électron depuis W_m vers le radical tryptophanyl de W_p avec une constante de temps plus lente (~10 ps) que pour EcCPD (< 4 ps) [196]. En revanche la distance plus grande entre W_m et W_d pour OtCPF1 pourrait expliquer que le dernier saut d'électron le long de cette chaîne soit plus lent pour OtCPF1 (~80 ps) que pour EcCPD (< 30 ps) [196].

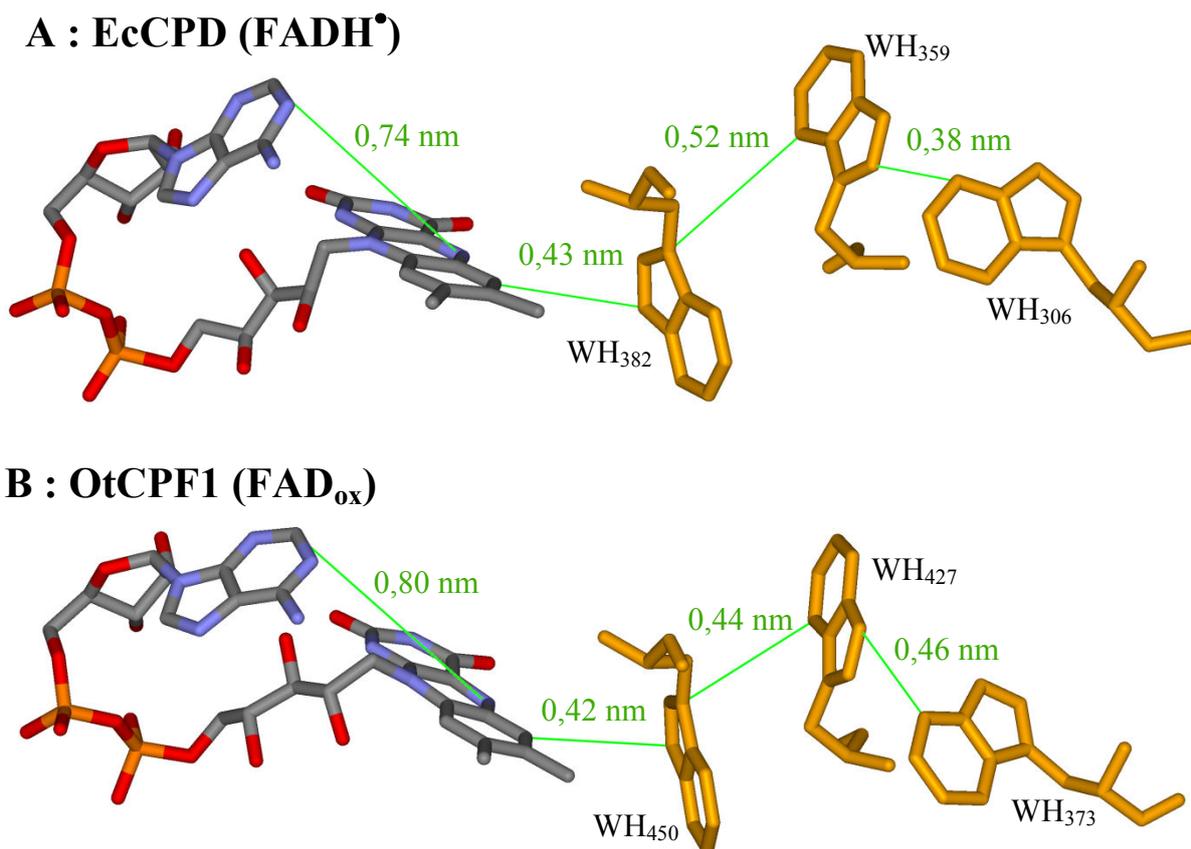


Figure 1.5 : A : tryptophanes impliqués dans la photoréduction de FADH[•] chez EcCPD d'après sa structure cristallographique (code PDB : 1DNP). B : tryptophanes supposés impliqués dans la photoréduction de FAD_{ox} chez OtCPF1, issue du modèle tridimensionnel optimisé. Certaines distances caractéristiques sont indiquées par des traits verts. Les sphères vertes marquent le centre des noyaux aromatiques.

Une autre cause de différence de constante de vitesse de transfert d'électron au sein des protéines est l'orientation relative de l'isoalloxazine et des différents résidus tryptophanes. Après superposition de la structure cristallographique de EcCPD et du modèle tridimensionnel obtenu pour OtCPF1, nous obtenons, sur la Figure 1.6, une estimation des orientations relatives de ces différents partenaires. Nous constatons que les orientations diffèrent de plus en plus en s'éloignant de la flavine. Afin de s'assurer de cette observation, nous avons calculé de façon identique l'angle entre le moment de transition de FAD_{ox} [193] et de chaque radical tryptophanyl protoné [8] pour EcCPD et OtCPF1. Les angles obtenus sont, respectivement, pour EcCPD et OtCPF1 : 53° et 49° pour W_p, 34° et 37° pour W_m, 65° et 46° pour W_d. La tendance générale est retrouvée avec un écart assez conséquent pour les derniers tryptophanes.

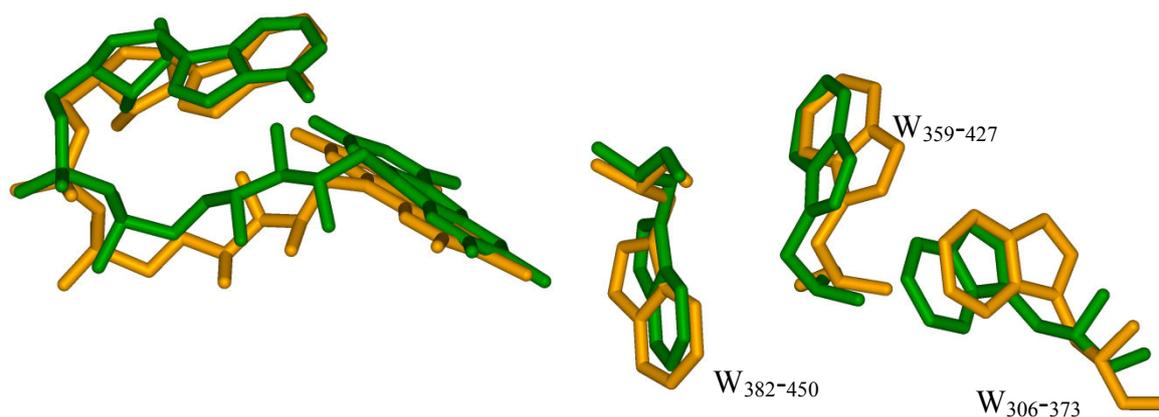


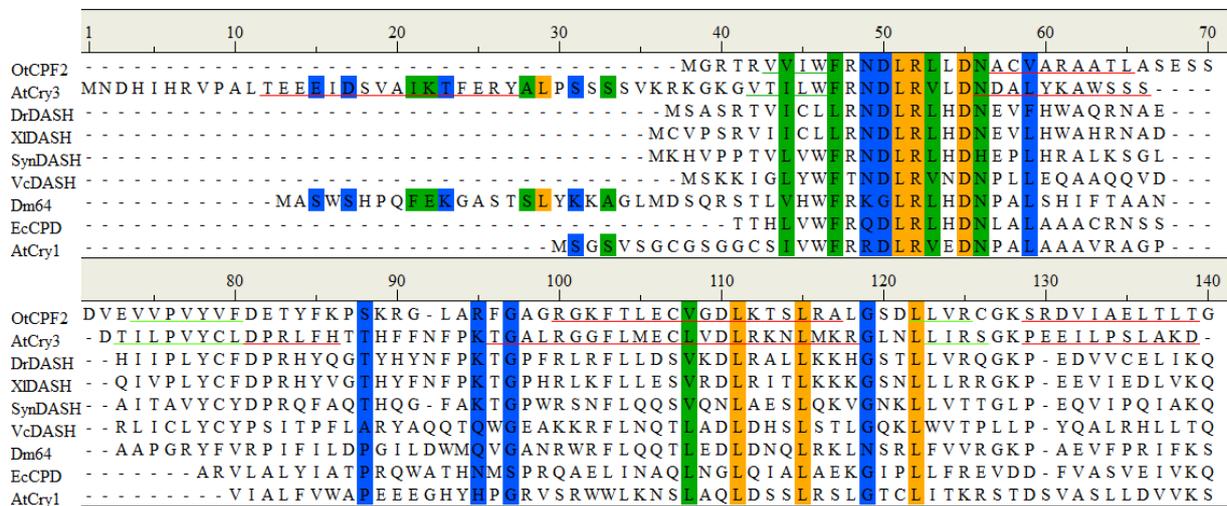
Figure 1.6 : Chaîne des tryptophanes impliqués dans la photoréduction de FADH^\bullet chez EcCPD (orange) et celle des tryptophanes supposés impliqués dans la photoréduction de FAD_{ox} chez OtCPF1 (vert), après superposition de la structure cristallographique de EcCPD (1DNP) et du modèle tridimensionnel optimisé de OtCPF1.

Par ailleurs la distance entre l'isoalloxazine et l'adénine dans FAD est plus importante pour OtCPF1 modélisée que pour EcCPD. Nous avons vu lors de l'étude de FAD_{ox} en solution (cf. le chapitre II) que, dans la conformation fermée de FAD_{ox} , il existe une inhibition rapide (5 ps) de l'état excité par transfert de charge depuis l'adénine vers l'isoalloxazine. Nous nous attendons à ce que cette inhibition soit en compétition avec la photoréduction au sein de OtCPF1 et de EcCPD. Notre modèle de OtCPF1 permet de prévoir que le mécanisme compétitif serait moins efficace pour OtCPF1 que pour EcCPD en raison de l'augmentation de la distance entre l'isoalloxazine et l'adénine. Nous avons vu au chapitre III que le rendement de transfert d'électron photoinduit primaire dans OtCPF1 est proche de un. Nous nous attendons donc à ce que le rendement de transfert d'électron photoinduit primaire dans EcCPD soit plus faible que celui dans OtCPF1. À ce jour, nous ne possédons pas de telles données sur EcCPD qui nous permettraient de conclure définitivement.

2 Étude structurale de OtCPF2

2.1 Alignement de la structure primaire

Un alignement de la structure primaire de OtCPF2 a été réalisé, selon la méthode décrite dans la partie 5.1 du chapitre VI, avec les séquences d'acides aminés de Cry-DASH de quelques organismes (*AtCry3*, *Danio rerio* (DrDASH), *Xenopus leavis* (XIDASH), *Synechocystis* (SynDASH), *Vibrio cholerae* (VcDASH)), de la photolyase (6-4) de *D. melanogaster* (Dm64), de la photolyase CPD de *E. coli* (EcCPD) et du cryptochrome de *A. thaliana* (AtCry1). Il est représenté sur la Figure 2.1. Le taux d'identité globale est de 4,8% et celui d'homologie de 10,6%, ce qui est en bon accord avec les valeurs trouvées dans la partie 1.1.



CHAPITRE V : Étude structurale de OtCPF1 et OtCPF2

	150	160	170	180	190	200	210
OtCPF2	ANDRTIILLTQTEVTSEETE	MDVAVERATRERARGGAA	-	SATMERHWGSTLYHI	----	DDVPFDVT	SGLSD
AtCry3	FGARTVFAHK-ETCSEEV	VERLVNQGLKRVG	----	NSTKLELIWGSTMYHK	----	DDLPDFDV	----
DtDASH	LGSVSTVAFHEEVASEEKS	VEEKLKEICCNK	----	VRVQTFWGSTLYHR	----	DDLPFSSH	----
XiDASH	LGNVSAVTLHEEATKEETD	VESAVKQACTRLG	----	IKYQTFWGSTLYHR	----	EDLPFRH	----
SynDASH	IN-AKTIYYHREVTQEELD	VERNLVKQLTILG	----	IEAKGYWGSTLCHP	----	EDLPFS	----
VcDASH	VEITDIYVDVAVAGS DERQA	IAR IHQDFSSVH	----	IHQALHSLSE	----	PQLPFA	----
Dm64	WRVEMLTFETDIEPYSVT	----	RDAAVQKLAKA	EGV	RVVETHCSTI	YNP	----
EcCPD	VCAENSVTHLFYNYQYEVN	----	ERARDVEVERAL	RNV	VEBGFDDSV	LPPGAVMTGN	----
AtCry1	TGASQIFFNHLYDPLSLVR	----	DHRAKDVLT	AO	I	AVRSFNADL	YEP
	220	230	240	250	260	270	280
OtCPF2	LPDV	TPFRNKVESKCKVR	DVIPAPTANELGHVPASVEGF	EWMPKPSDL	PFASSE	IAMDCD	KIKDCLDE
AtCry3	LPDV	TQFRKSVKAKCSIRS	STRIPLS	LGTP	SVDDWGDVPTL	EKL	GV
DtDASH	LPDV	TQFRKAVEAQR	----	VRPVLSTPEQVKSPSGLEEGPI	TFDSL	----	QTEPLDDC
XiDASH	LPDV	TQFRKAVETQGK	----	VRPTFQMPDKLKLPLPSGLEEGSV	PHEDFD	----	QDPLTDP
SynDASH	LPDL	TKFRKDIKKSIS	----	IRPCFFAPSQLLPSN	IKLELTAPPE	----	QINFDH
VcDASH	LPST	TQFRKQVETLSLS	----	APMGYPRVLPPIEQGWQL	PLMDIVAEPN	----	----
Dm64	APIT	QKFLGIVEQLKVP	----	KVLGVPEKLNMP	TPPKDEVEQKDS	AAAYDCP	----
EcCPD	MYKV	TQFKNAWLKRLREG	----	MPECVAAPKVRSSGS	IEPS	SITL	NY
AtCry1	LGRP	SMFAAFWERCL	SMP	----	YDPESPLLPK	II	SGDVS
	290	300	310	320	330	340	350
OtCPF2	RSVLDFKGGESN	ALARKVYYLWES	DRLATYFETRNGML	GGDYS	-TKLAPW	LALGCV	SPHVVSE
AtCry3	TRGMRVGGESAGVGR	VFEYFWKKDLLK	VYKETRNGML	GGDYS	-TKFSPW	LAFGC	SPFIYEE
DtDASH	RSAFP	CRGGETEALARK	LKHFWDTNAVATYKETRNGMI	GVDFS	-TKFSPW	LALGCV	SPFIYEQ
XiDASH	RTAFPCSGGESQAL	QRLEHYFWETNL	VASYKDRNGL	IGLDYS	-TKFAPW	LALGCV	SPFIYEQ
SynDASH	RSVLA	FQGGETAGLAR	LQDYFWHGDR	LKDYKETRNGMV	GADYS	-SKFSPW	LALGCV
VcDASH	--HS	AVGGEQAGLTHCQNYFS	-SMLPSRYKETRNGLD	GMDYS	-TKFSPW	LALGAV	SPFIYAM
Dm64	LGNPK	FPGGETEALRR	MEESLKDEI	WVARFEK	PNTAPNS	LEP	STTVL
EcCPD	FDTA	HFVVEEKA	AAIAQLRQFCQNGAGEYE	QQRDFPAVE	G	----	TSRLS
AtCry1	GSNALL	ARAWSPGWS	NGDKAL	TT	INGPLLEYS	KNRRK	AD
	360	370	380	390	400	410	420
OtCPF2	ERVEN	----	KSTYWV	FELIWR	DFFKFFALKHG	NKIFHLDG	TAGRR
AtCry3	ERVAN	----	NSTYWV	FELIWR	DYFRFLS	IKCGNSL	FHLGGPRNVQ
DtDASH	ERTAN	----	QSTYWV	FELLWR	DYFKFVAL	KYGNRIF	FYMNGLQDKH
XiDASH	ERTAN	----	QSTYWV	FELLWR	DYFRFVAL	KYGRRI	FFLRGLQDKD
SynDASH	ERVS	N	----	DSTHWL	FELLWR	DFFRFVAQ	KYGNKLFNRGGLLNKN
VcDASH	VHGAN	----	DSTYWI	FELLWR	EYFYWY	ARRYGAKL	FRFSGIGEKK
Dm64	RQPKH	S	----	QPPVSL	IGQLMWR	EYFY	YTVAAE
EcCPD	QALDG	----	GAGSVW	LNELIWR	EYFRHL	I	YHPSLCKHRPF
AtCry1	AWANE	GNEAGEES	SVNLF	LKS	IGLREYS	RYISFNHP	-YSHERPLLGH
	430	440	450	460	470	480	490
OtCPF2	LIDANMRE	ELAA	TGFMSNRGR	QNVASW	LAL-DAG	IDWRHG	GADWFEHLL
AtCry3	LIDANMKE	ELST	TGFMSNRGR	QIVCS	FLVR	-DMGLD	WRMGA
DtDASH	FVDANMRE	ELALT	GFMSSNRGR	QNVAS	FLTK-DLGL	DWR	LGA
XiDASH	FVDANMRE	ELAMT	GFMSSNRGR	QNVAS	FLTK-DLGL	DWR	LGA
SynDASH	LVDANMRE	LNLT	GFMSSNRGR	QNVAS	FLCK-NLGL	DWR	WGA
VcDASH	LVDANM	RQLNQT	GFMSSNRGR	QLVAS	CLVH-ELGL	DWR	YGA
Dm64	FIDA	IMRQLRQEG	WIHHLAR	HAVAC	FLTRGD	LWISWEE	GQRVFEQL
EcCPD	LVDAA	MRQLNST	GWMHNRL	RMITAS	FLVK-DLL	IDWR	EGERY
AtCry1	LVDAG	MRE	LWAT	GWLH	DRIRVV	VSS	FFVK-VLQL

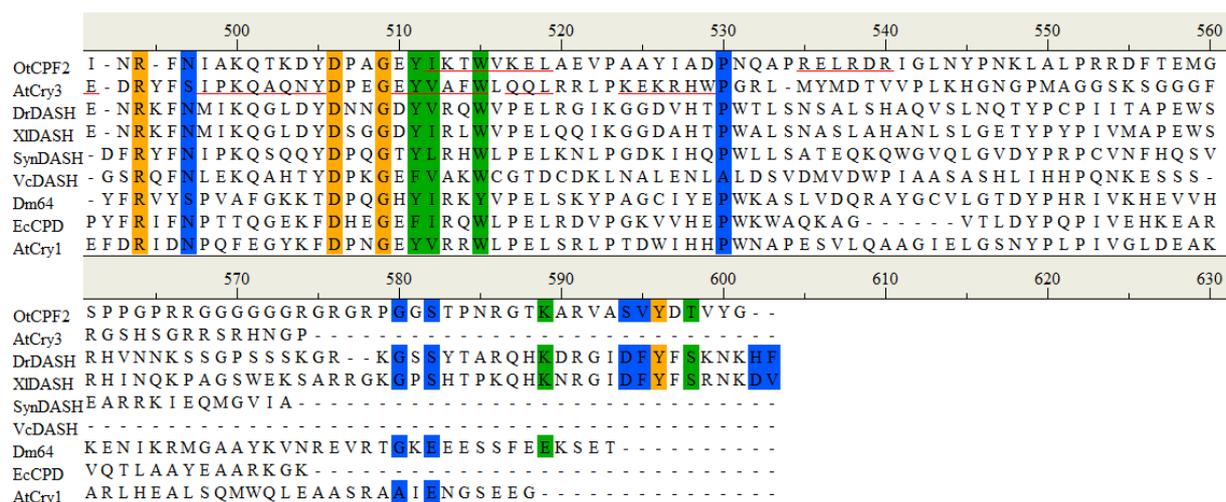


Figure 2.1 : Alignement des structures primaires de OtCPF2, AtCry3, DrDASH, XIDASH, SynDASH, VcDASH, Dm64, EcCPD et AtCry1. En orange sont représentés les acides aminés identiques, en vert ceux de forte homologie et en bleu ceux de faible homologie. Pour les séquences primaires de OtCPF2 et AtCry3, les acides aminés soulignés en rouge et en vert sont prédits pour OtCPF2 et extraits de la structure cristallographique pour AtCry3 pour former des hélices α et feuillets β respectivement.

Afin de confirmer que OtCPF2 est une chromoprotéine appartenant au groupe des Cry-DASH, les taux d'identité ont été calculés deux à deux entre la séquence non restreinte au domaine Phr de OtCPF2 et chacune des autres séquences. Les taux d'identité sont compris entre 28,3% et 39,6% avec les Cry-DASH et ce taux diminue vers 20% avec les photolyases et les cryptochromes (cf. le Tableau 2.1). Ceci confirme que OtCPF2 fait bien partie des cryptochromes DASH.

Espèce comparée à OtCPF2	Identité (%)	Homologie (%)
Cry-DASH de <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtCry3)	37,5	54,6
Cry-DASH de <i>Danio rerio</i> (DrDASH)	38,2	56,7
Cry-DASH de <i>Xenopus laevis</i> (Xl64)	39,6	56,3
Cry-DASH de <i>Synechocystis</i> (SynDASH)	38,8	55,6
Cry-DASH de <i>Vibrio cholerae</i> (VcDASH)	28,3	47,2
photolyase CPD de <i>Escherichia coli</i> (EcCPD)	21,3	36,6
Cryptochrome de <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtCry1)	18,2	34,7
photolyase (6-4) de <i>Drosophila melanogaster</i> (Dm64)	21,5	35,7

Tableau 2.1 : Taux d'identité et d'homologie obtenus par comparaison de l'alignement de la structure primaire de OtCPF2 avec celui des autres protéines utilisées pour l'alignement représenté sur la Figure 2.1.

D'après la prédiction des structures secondaires selon la méthode décrite dans le chapitre VI, deux domaines sont délimités :

- le domaine α/β comprenant cinq hélices α et cinq feuillets β , formé par les acides aminés 1 à 147,

- le domaine α avec onze hélices α entre les acides aminés 247 et 546.

Comme pour OtCPF1, le domaine d'interaction avec FAD, c'est-à-dire le domaine α , est bien mieux conservé que le domaine α/β dans lequel se trouve les photoantennes.

2.2 Génération d'un modèle tridimensionnel par homologie

La génération du modèle tridimensionnel de OtCPF2 à partir de la structure cristallographique de AtCry3 [88] (code PDB : 2IJG) a été réalisée à l'aide de l'alignement optimisé présenté dans la partie 2.1 (cf. le chapitre VI). Par ailleurs Laetitia Mony a modifié le nombre d'oxydation et le nombre de proton de FADH₂, afin d'obtenir un modèle optimisé de OtCPF2 portant MHF et FAD_{ox}. Le modèle final obtenu est représenté sur la Figure 2.2.

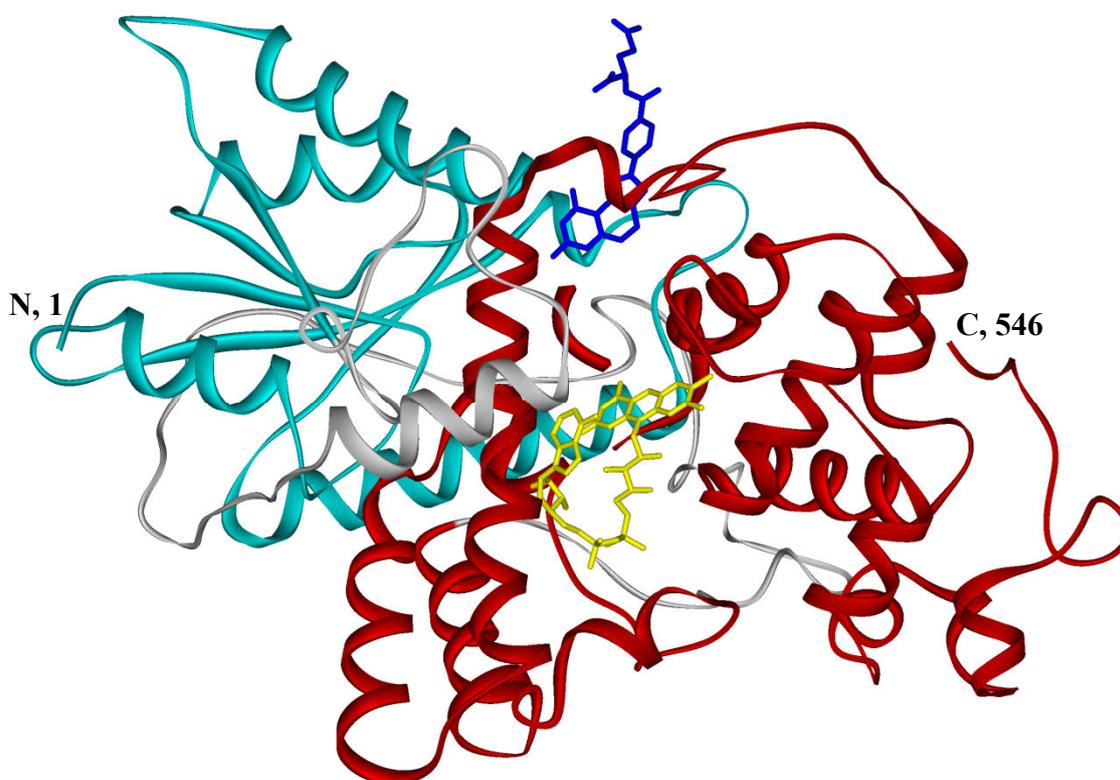


Figure 2.2 : Structure tertiaire de OtCPF2 portant le chromophore FAD_{ox} (jaune) et la photoantenne MHF (bleu) obtenue par modélisation par homologie à partir de la structure cristallographique de AtCry3 (code PDB : 2IJG). Les acides aminés en position N-terminale (N, 1) et C-terminale (C, 546) sont indiqués. Les domaines α/β (acides aminés de 1 à 147) et α (247-546) sont représentés en cyan et en rouge respectivement. La connexion entre les deux domaines est une boucle avec une hélice α représentée en gris.

Dans la structure 2IJG, AtCry3 porte la flavine dans un mélange d'états d'oxydation avec en majorité FAD_{ox} selon les auteurs [86]. Pour OtCPF2, le modèle a été généré avec le chromophore FADH₂ et la photoantenne MHF, qui figurent dans la structure de référence récupérée grâce au logiciel Accelrys depuis la PDB. Le MHF est un dérivé du MTHF ayant

perdu la double liaison en N10 (cf. la Figure 1.5 du chapitre I). Le MHF et MTHF semblent proches structurellement et l'utilisation de l'un pour l'autre ne devrait pas apporter des modifications importantes sur l'arrangement spatial de l'ensemble protéine/chromophores. Les modèles de OtCPF2 sont optimisés en présence de ces deux chromophores. Le score Profiles-3D de ce modèle vaut 223,74, ce qui correspond à 99% du score maximal théorique pouvant être obtenu pour des protéines de la même taille (score Profiles-3D égal à 224,31). Le modèle obtenu est donc de très bonne qualité théorique.

2.2.1 Interaction avec le chromophore FAD

Comme il a déjà été vu au chapitre I partie 1.2.2., les acides aminés identifiés pour la fixation de FAD dans EcCPD sont très conservés au sein des protéines CPF. Grâce au modèle de OtCPF2, nous pouvons identifier les résidus impliqués dans la fixation du FAD dans OtCPF2 et les comparer à ceux de EcCPD en utilisant l'alignement représenté sur la Figure 2.1. Le Tableau 2.2 présente ces acides aminés pour EcCPD et les protéines étudiées dans la partie 2.1.

Quatre acides aminés (rectangles en trait plein) sur les quatorze impliqués dans le site de fixation de FAD au sein des cryptochromes et des photolyases sont identiques et seulement quatre ne sont pas homologues. Parmi les Cry-DASH que nous avons étudiés dont OtCPF2, le nombre d'acides aminés identiques atteint sept (rectangles en pointillés).

N° EcCPD	222	234	235	236	237	238	271	278	338	341	344	372	374	378	381
N° OtCPF2	265	-	281	282	283	284	317	324	383	386	389	417	419	423	426
EcCPD	Y	T	S	R	L	S	W	R	W	N	R	D	D	N	G
OtCPF2	A	-	T	K	L	A	V	R	F	N	R	D	D	N	N
AtCry3	K	-	T	K	F	S	V	R	F	N	R	D	D	N	N
DrDASH	A	-	T	K	F	S	V	R	F	N	R	D	D	N	N
XIDASH	A	-	T	K	F	A	V	R	F	N	R	D	D	N	N
SynDASH	K	-	S	K	F	S	L	R	F	N	R	D	D	N	N
VcDASH	S	-	T	K	F	S	I	R	Y	N	R	D	D	N	N
Dm64	A	T	T	V	L	S	L	R	W	H	R	D	D	N	N
AtCry1	P	T	S	F	L	S	F	R	W	D	R	D	D	D	G

Tableau 2.2 : Comparaison des résidus impliqués dans le site de fixation du FADH₂ dans EcCPD et OtCPF1, et potentiellement impliqués dans le site de fixation du FADH₂ chez les autres protéines (cf. la Figure 1.1). Les numéros de ces résidus sont indiqués pour EcCPD et OtCPF1. Les rectangles en trait plein et en pointillés représentent, respectivement, les acides aminés conservés chez toutes les protéines et chez tous les Cry-DASH.

Les résidus thréonine 281 et lysine 282 pour OtCPF2 (représentés en cyan sur la Figure 2.3) stabilisent FAD par liaison hydrogène entre les groupements -NH des liaisons

peptidiques et les oxygènes des groupes phosphates de FAD. Des interactions de type Van der Waals avec FADH₂ sont observées pour les acides aminés arginine 389 et acide aspartique 417 (en vert sur la Figure 2.3).

Comme il a été vu précédemment lors de l'étude de OtCPF1, l'asparagine 423 (en rouge sur la Figure 2.3) portée par OtCPF2, correspondant à l'asparagine 378 de EcCPD, est un acide aminé très important pour stabiliser la forme protonée (en N5) du radical de FADH[•] par la liaison hydrogène avec le N5 de l'isoalloxazine.

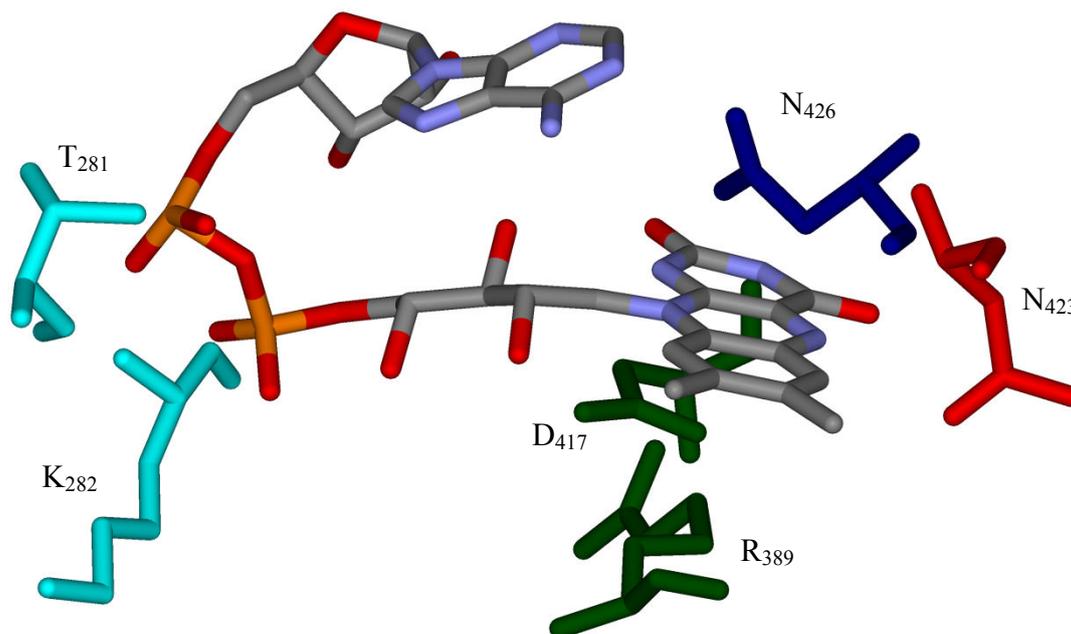


Figure 2.3 : Acides aminés en interaction avec FADH₂ chez OtCPF2. Les asparagines N423 et N426 sont représentées en rouge et bleu respectivement. Les liaisons hydrogène entre l'isoalloxazine et les N423 et 426 sont indiquées en pointillés gris. Les acides aminés en interaction de type Van der Waals avec FADH₂ sont donnés en vert (R389 et D417). Les acides aminés en interaction avec FADH₂ par liaison hydrogène sont présentés en cyan (T281 et K282).

2.2.2 Interaction avec la photoantenne MTHF

L'étude spectroscopique de OtCPF2 a permis d'identifier la présence de MTHF comme photoantenne. Les interactions entre MTHF et les protéines diffèrent s'il s'agit d'un Cry-DASH ou d'une photolyase CPD (cf. la partie 2.2.2.2 du chapitre I) [86]. Comme OtCPF2 appartient au groupe des Cry-DASH, nous avons étudié la conservation au sein des Cry-DASH des acides aminés correspondant à ceux en interaction avec MTHF chez AtCry3 (cf. le Tableau 2.3). Cette étude permet de vérifier si la séquence de OtCPF2 est bien compatible comme nous le croyons avec une photoantenne MTHF.

Huit sur douze acides aminés en interaction avec MTHF chez AtCry3 sont conservés chez OtCPF2 (rectangles en trait plein) ; seulement trois acides aminés (rectangles en pointillés) sont identiques chez tous les Cry-DASH étudiés. Il faut remarquer que l'acide

glutamique 149 essentiel à la complexation du MTHF chez AtCry3 [80] fait partie de ces acides aminés conservés.

N° AtCry3	84	147	148	149	150	341	344	345	417	423	425	429
N° OtCPF2	49	112	113	114	115	357	361	362	435	441	443	447
AtCry3	H	C	S	E	E	N	F	H	E	Y	P	Y
OtCPF2	K	T	S	E	E	N	F	H	E	Y	T	W
DrDASH	Y	A	S	E	E	N	F	Y	E	H	V	Y
XIDASH	H	T	K	E	E	R	F	F	E	Y	V	Y
SynDASH	H	T	Q	E	E	N	F	N	E	Y	V	W
VcDASH	R	S	D	E	R	A	F	R	E	Y	V	W

Tableau 2.3 : Comparaison des résidus impliqués dans la liaison du MTHF dans AtCry3 et potentiellement impliqués dans la liaison du MTHF chez les autres protéines Cry-DASH (cf. la Figure 1.1). Les numéros de ces résidus sont indiqués pour AtCry3 et OtCPF2. Les rectangles en trait plein et en pointillés représentent, respectivement, les acides aminés conservés chez AtCry3 et OtCPF2 et chez tous les Cry-DASH.

Nous savons que la position et l'orientation de la photoantenne par rapport au chromophore est très importante pour le transfert d'énergie depuis MTHF vers FAD (cf. la partie 2.3 du chapitre IV). Le modèle de OtCPF2 obtenu par homologie porte FAD sous forme réduite neutre, FADH₂ et MHF. Afin d'avoir une estimation de la position relative de MTHF par rapport à FAD_{ox} et FADH⁻, Laetitia Mony a modifié le nombre d'oxydation et/ou le nombre de proton de FAD, puis elle a réalisé une minimisation des résidus situés dans une sphère de 1 nm autour du chromophore. La Figure 2.4-A présente les positions relatives de MHF et FAD_{ox}, la Figure 2.4-B celles de MHF et FADH⁻. Nous supposons que la substitution de MTHF par MHF modifie peu la position relative de la photoantenne par rapport à l'ensemble structural. Nous constatons que les distances entre MHF et l'isoalloxazine de FAD_{ox} ou FADH⁻ sont pratiquement identiques : 1,55 et 1,56 nm, respectivement. Les angles entre le plan de l'isoalloxazine et le centre des noyaux aromatiques de MHF diffèrent un peu avec 72° pour FAD_{ox} et 74° pour FADH⁻.

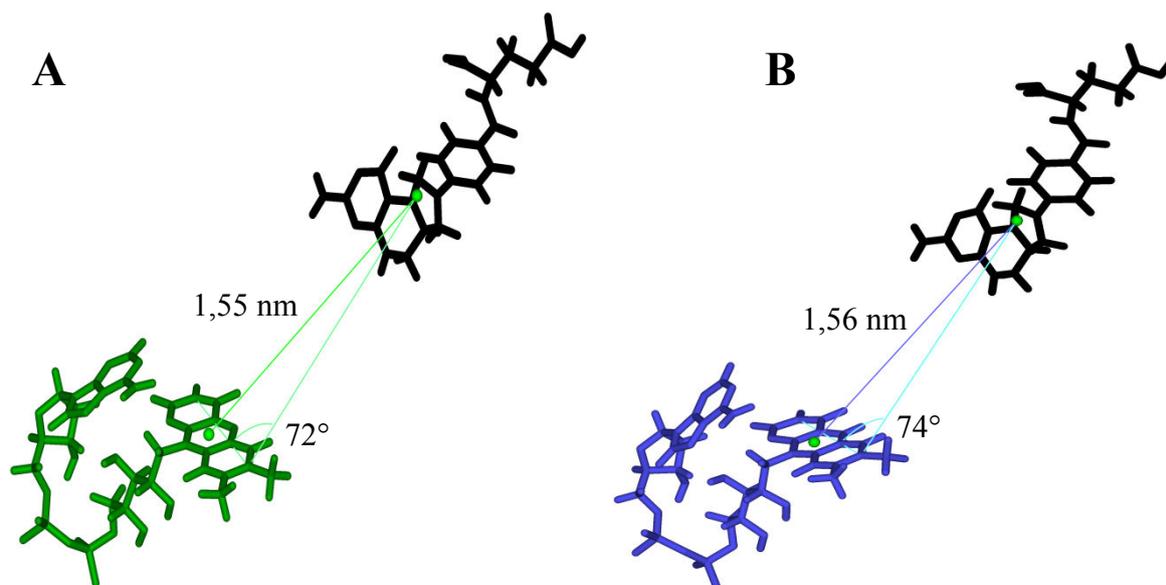


Figure 2.4 : A : FAD_{ox} (vert foncé) et MTHF (noir) sont représentés avec la distance entre les centres de leurs noyaux aromatiques en vert clair, et l'angle entre le cycle isoalloxazine et le centre des noyaux aromatiques du MTHF en cyan. B : FADH⁻ (bleu foncé) et MTHF (noir) sont représentés avec la distance entre les centres de leurs noyaux aromatiques en bleu clair, et l'angle entre le cycle isoalloxazine et le centre des noyaux aromatiques du MTHF en cyan.

Nous avons observé au chapitre IV que les constantes de vitesse de transfert d'énergie diffèrent selon que le transfert se fait vers FAD_{ox} ou FADH⁻. Les constantes de vitesse varient selon deux paramètres : le facteur d'orientation et les intégrales de recouvrement des spectres d'émission de fluorescence et d'absorption. Le rapport des facteurs d'orientation κ^2 impliqués dans les vitesses de transfert d'énergie (cf. la théorie du transfert d'énergie résonant de Förster décrite dans la partie 2.5.5 du chapitre VI) ont été déterminés pour OtCPF2. Les facteurs d'orientation mettent en jeu l'orientation du moment de transition d'absorption de FAD recouverte par le spectre d'émission de la photoantenne. Comme les positions relatives de FAD_{ox} et FADH⁻ par rapport à MTHF présentent de faibles modifications, cela ne semble pas permettre d'expliquer la différence observée des facteurs d'orientation. Les moments de transition de FAD_{ox} et FADH⁻ ne sont cependant pas colinéaires. Ceci permettrait d'expliquer, en partie, les différentes constantes de vitesse de transfert d'énergie.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé le calcul des facteurs d'orientation à partir des deux modèles de OtCPF2 portant respectivement FAD_{ox} et FADH⁻. Le moment de transition de FAD_{ox} considéré est celui de la bande centrée à 448 nm [193] et celui de FADH⁻ celui de la bande à 440 nm [194]. Les deux moments de transition font entre eux un angle de 50°. Le vecteur R, reliant l'isoalloxazine et le MTHF, est le vecteur entre le N10 de l'isoalloxazine (cf. la Figure 1.1 du chapitre I) et le N5 du MTHF (cf. la Figure 2.2 du chapitre I). Le moment de transition d'émission du MTHF est pratiquement colinéaire à R

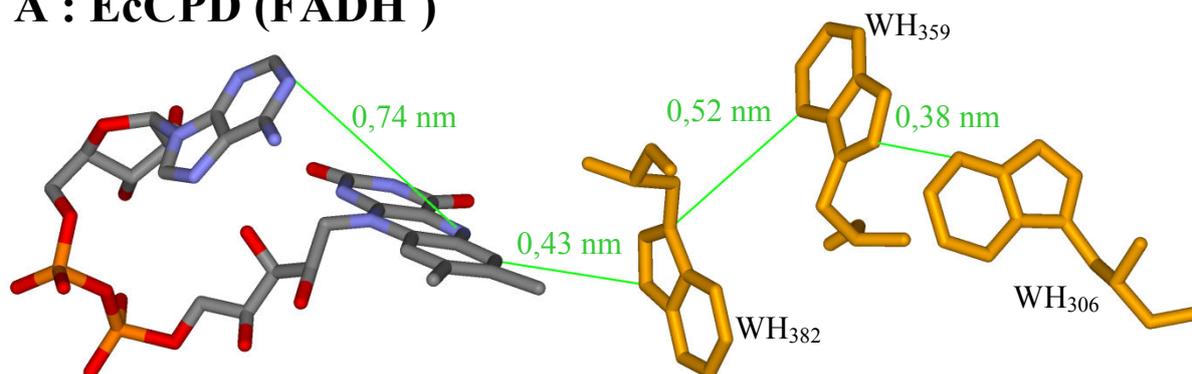
[105]. Nous obtenons alors : $\kappa^2(\text{FAD}_{\text{ox}}) = 2,5$ et $\kappa^2(\text{FADH}^-) = 0,081$, d'où un rapport de 0,03 entre la forme réduite et la forme oxydée. Ce rapport très inférieur à 1 est en contradiction avec nos propres résultats expérimentaux et ceux rapportés par Saxena et al. [187] avec un rapport supérieur à 1. Ceci pourrait s'expliquer par un changement structural important que la modélisation n'a pas pu mettre en évidence ici.

2.2.3 Mécanisme de photoréduction

Nous nous sommes aussi intéressés à la photoréduction de FAD_{ox} au sein de OtCPF2, dans les parties 2.1 et 2.2 du chapitre IV. La chaîne de résidus tryptophane impliqués dans la photoréduction de FADH^\bullet en FADH^- dans EcCPD (W_{382} , W_{359} et W_{306} [8, 196]) est très bien conservée chez OtCPF2 (W_{427} , W_{351} et W_{404}) comme pour toutes les protéines CPF connues.

La Figure 2.5-A représente la géométrie de la triade de tryptophanes de EcCPD portant FADH^\bullet et la Figure 2.5-B celle de OtCPF2 portant FAD_{ox} .

A : EcCPD (FADH^\bullet)



B : OtCPF2 (FAD_{ox})

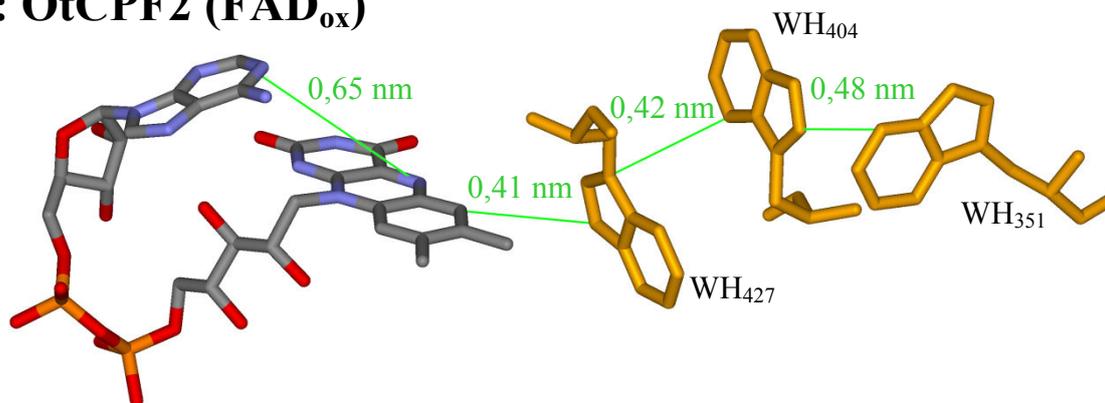


Figure 2.5 : A : tryptophanes (orange) impliqués dans la photoréduction de FADH^\bullet (couleur des atomes) chez EcCPD (code PDB : 1DNP) [85]. B : tryptophanes (orange) supposés impliqués dans la photoréduction de FAD_{ox} chez OtCPF2 (vert). Certaines distances caractéristiques sont indiquées par des traits verts et les ronds verts marquent le centre des noyaux aromatiques.

Nous constatons que les distances entre l'isoalloxazine de FAD et les résidus tryptophanes impliqués dans la photoréduction sont proches chez EcCPD et OtCPF2. Ceci ne permet pas d'expliquer que les constantes de temps observées lors du transfert d'électron soient plus rapides dans OtCPF2 (590 fs, chapitre IV) que dans la EcPCD (0,8 ps-1,2 ps [20]).

Comme nous l'avons vu pour OtCPF1, l'orientation relative des différents résidus tryptophanes par rapport à l'isoalloxazine peut expliquer des différences de constante de vitesse. Nous avons réalisé une superposition de la structure cristallographique de EcCPD et du modèle tridimensionnel de OtCPF2 obtenu avec FAD_{ox} (cf. la Figure 2.6). Nous constatons une meilleure superposition de l'isoalloxazine ainsi que du W_p. Les différences d'orientation s'amplifient encore pour les résidus les plus éloignés. Le fait que les W_p soient mieux superposés pour OtCPF2 que pour OtCPF1 pourrait justifier que le premier transfert d'électron photoinduit dans OtCPF2 ait une vitesse plus proche de celle de EcCPD. Nous avons aussi déterminé les angles entre le moment de transition de FAD_{ox} [193] et chaque radical tryptophanyl cation [8] impliqué dans la chaîne de photoréduction pour OtCPF2 (nous rappelons ceux obtenus pour EcCPD entre parenthèses) : 47° (53°) pour W_p, 28° (34°) pour W_m et 70° (65°) pour W_d.

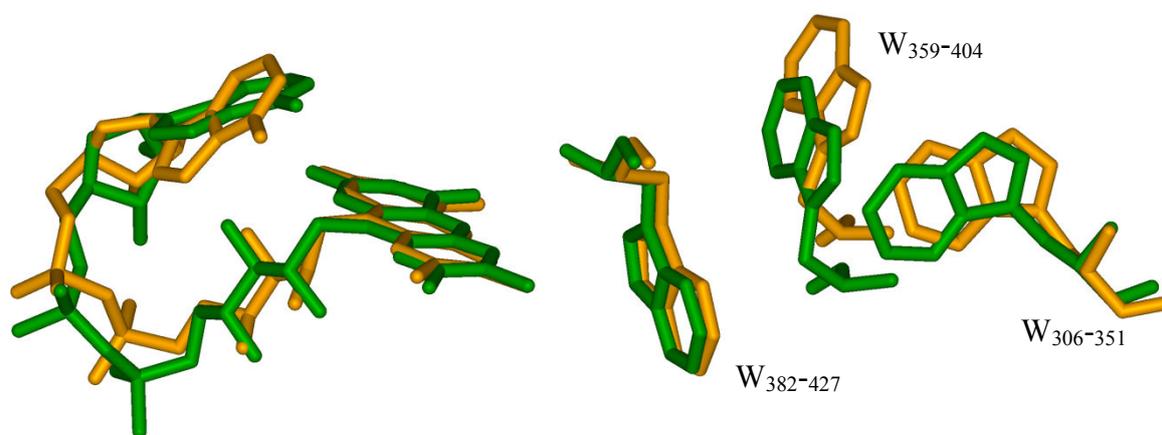


Figure 2.6 : Chaîne des tryptophanes impliqués dans la photoréduction de FADH• chez EcCPD (orange) et celle des tryptophanes supposés impliqués dans la photoréduction chez OtCPF2 (vert), après superposition de la structure cristallographique de EcCPD (code PDB : 1DNP) et du modèle tridimensionnel optimisé de OtCPF2.

Par ailleurs la distance entre l'adénine et l'isoalloxazine de FAD_{ox} portée par OtCPF2 est plus petite que celle trouvée pour EcCPD, contrairement à OtCPF1 (cf. la partie 1.2.3). Cette plus petite distance pourrait expliquer qu'une inhibition de l'état excité de FAD_{ox} dans OtCPF2 se produise comme pour FAD_{ox} en conformation fermée en solution (cf. le chapitre II). Ceci pourrait expliquer que le rendement de photoproduits à séparation de charge primaire soit moins grand pour OtCPF2 que pour OtCPF1.

Conclusion

L'étude de la séquence primaire de OtCPF1 permet de confirmer que cette protéine appartient au groupe des photolyases (6-4) et cryptochromes animaux. Les alignements de structures primaires de OtCPF1 et d'autres protéines CPF semblent indiquer que 8-HDF est la photoantenne présumée de OtCPF1 *in vivo*, qui n'est pas présente dans OtCPF1 surexprimée chez *E. coli* et purifiée. Nous en tirons une généralité pour les photolyases (6-4) : la photoantenne portée par les photolyases (6-4) serait 8-HDF non observé jusqu'à présent parce que les protéines sont surexprimées dans *E. coli* qui ne contient pas cette molécule. De plus l'insertion du 8-HDF sur OtCPF1 modélisée montre que OtCPF1 pourrait porter 8-HDF.

OtCPF1 modélisée par homologie donne des indications notamment sur la conservation de la chaîne de tryptophanes mise en jeu dans la photoréduction de FAD_{ox} porté par OtCPF1. La distance augmentée entre l'isoalloxazine et l'adénine dans FAD porté par OtCPF1 permettrait d'expliquer que le rendement de transfert d'électron photoinduit soit proche de 1 puisque l'inhibition de l'état excité de la flavine n'a pas lieu par transfert d'électron depuis l'adénine vers l'isoalloxazine.

Les alignements de structures primaires de OtCPF2 et d'autres protéines CPF nous ont permis de confirmer que OtCPF2 appartient au groupe des Cry-DASH. La génération d'une structure tridimensionnelle de OtCPF2 par homologie sur celle de AtCry3 donne les sites de fixation de FAD et MTHF au sein de OtCPF2. Ces deux sites sont bien conservés au sein de OtCPF2 et correspondent à ceux présents chez les Cry-DASH.

L'optimisation de OtCPF2 modélisée après modification du nombre d'oxydation de FAD et du nombre de proton permet de comparer les positions relatives de FAD_{ox} et FADH⁻ par rapport à MHF. Cette étude suggère que la variation des facteurs d'orientation au sein de OtCPF2 ne s'explique pas par un changement structural local important non observé lors de la génération des modèles de OtCPF2 portant FAD_{ox} ou FADH⁻.

La chaîne de tryptophanes impliquée dans la photoréduction de FADH[•] dans EcCPD est conservée dans OtCPF2. Nous obtenons ainsi l'ordre des acides aminés impliqués dans la photoréduction chez OtCPF2, ainsi que leurs distances et leurs orientations relatives par rapport à FAD.

Une distance réduite entre l'adénine et l'isoalloxazine de FAD_{ox} dans OtCPF2 pourrait expliquer que nous observions un rendement de séparation de charge photoinduit moins grand pour OtCPF2 que pour OtCPF1.

CHAPITRE VI : Méthodes expérimentales

Introduction

Ce chapitre est consacré à la description des dispositifs expérimentaux, des méthodes de traitement des données, des méthodes d'obtention des échantillons et des outils de modélisation utilisés au cours de l'étude des flavines et du MTHF en solution, présentée au chapitre II et de celle des protéines OtCPF1 et OtCPF2, présentées dans les chapitres III et IV. Les méthodes expérimentales employées lors de l'étude de la photophobie de *Blepharisma japonicum* ne sont pas décrites ici mais dans les parties expérimentales de chaque article joint au chapitre VII.

Les deux premières parties seront consacrées aux méthodes spectroscopiques. Les spectroscopies électroniques stationnaires seront décrites dans la première partie. Dans la deuxième partie, nous présenterons d'abord la source laser femtoseconde, puis le dispositif expérimental d'absorption transitoire sub 100 femtoseconde de type pompe-sonde, enfin le traitement des données associé.

Dans la troisième partie, nous décrirons les méthodes de préparation des échantillons de flavines réduites et de protéines ainsi que les différents traitements chimiques employés pour analyser ou modifier les protéines : dénaturation, réduction du MTHF et oxydation du FAD. La quatrième partie présentera les méthodes employées pour caractériser les échantillons de chromoprotéine : concentration en apoprotéine, nature et concentration des différents chromophores. Finalement les protocoles expérimentaux pour réaliser des tests de stabilité thermique, stabilité chimique et photostabilité seront donnés.

Dans la cinquième partie, nous présenterons les outils utilisés pour réaliser les alignements de structures primaires (comparaison de plusieurs séquences d'acides aminés afin d'aligner le plus possible d'acides aminés similaires) ainsi que ceux pour la modélisation par homologie (prédiction de la structure tertiaire d'une protéine à partir de sa séquence primaire et de la structure tertiaire d'une autre protéine proche structurellement de la protéine à modéliser) des protéines.

1 Spectroscopies stationnaires

Les spectroscopies stationnaires d'absorption UV-vis et de fluorescence constituent le point de départ de toute étude des propriétés photophysiques d'un chromophore en phase condensée. Les mesures ont été réalisées dans des cuves en silice fondue (Hellma QS) appariées (pour l'échantillon et la référence) de 1 mm ou de 10 mm de trajet optique. Afin de pouvoir étudier les faibles volumes d'échantillons biologiques, nous nous sommes servis de cuves spéciales de largeur réduite à 2 mm, au lieu de 10 mm pour les cuves standard. Le volume nécessaire pour remplir une cuve de 1 mm vaut alors 50 μL , contre 500 μL pour une cuve de 10 mm de largeur.

1.1 Spectroscopie d'absorption

Les spectres d'absorption stationnaire ont été mesurés à l'aide de deux spectrophotomètres à double faisceau : Safas UV-mc2 et Varian CARY 300, pilotés par ordinateur. La plage spectrale s'étend de 190 nm à 1000 nm. La résolution spectrale est de 0,5 nm pour le spectrophotomètre Safas et de 1 nm pour celui de chez Varian.

1.2 Spectroscopie d'excitation et d'émission de fluorescence

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence ont été enregistrés à l'aide du spectrofluorimètre Jobin-Yvon FluoroMax-3, également piloté par ordinateur. La source lumineuse est une lampe à arc au xénon de puissance 150 W dont le spectre s'étend de 200 nm à 900 nm. La résolution spectrale est de 0,5 nm.

Les solutions ont été diluées jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0,1 pour 10 mm de trajet optique au maximum d'absorption afin de minimiser la réabsorption de la fluorescence par l'échantillon. Des corrections sont apportées aux spectres d'excitation et d'émission pour compenser la distribution spectrale de l'ensemble lampe-monochromateur d'excitation, d'une part et la réponse spectrale de l'ensemble monochromateur d'émission-photomultiplicateur, d'autre part. À chaque spectre de fluorescence est soustrait le spectre du solvant pur, enregistré dans des conditions strictement identiques.

Afin de travailler à 5°C, les spectromètres ont été équipés de supports thermostatables. Un liquide (mélange eau/glycérol), à température fixée par un bain thermostaté, circule dans les parois des supports. La température des solutions contenues dans les cuves est ainsi ajustée. La condensation des molécules d'eau présentes dans l'air est réduite par l'arrivée d'air sec et pur sur les supports thermostatables réfrigérés.

2 Spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde

En biologie et en chimie, l'étude de réactions élémentaires, comme les transferts d'électron, de proton ou d'énergie nécessite des techniques de mesure permettant l'accès à des échelles de temps aussi courtes que quelques dizaines ou centaines de femtosecondes [197]. En ce qui concerne les réactions photoinduites, les méthodes expérimentales optiques sont des outils privilégiés capables d'atteindre ces performances. Les méthodes optiques à haute résolution temporelle nécessitent des lasers à impulsions courtes (quelques dizaines de femtosecondes à quelques picosecondes). Les sources laser commerciales disponibles actuellement (le plus souvent des lasers titane-saphir) délivrent couramment des impulsions d'une centaine ou quelques dizaines de femtosecondes, voire moins. Les impulsions courtes sont obtenues en mettant en phase des modes longitudinaux d'une cavité laser (blocage de modes, ou mode locking en anglais) dont le milieu amplificateur est excité par un laser continu.

La méthode expérimentale que nous utilisons pour étudier les réactions élémentaires est un montage d'absorption transitoire de type pompe-sonde avec continuum (ou large bande). Ce type de montage nécessite deux faisceaux appelés pompe et sonde. Afin de s'accorder aux transitions électroniques des molécules devant être étudiées, le faisceau pompe doit essentiellement être accordable en longueur d'onde. Son énergie doit être suffisamment importante pour produire une concentration d'état excité assez élevée pour être détectée par absorption ou émission stimulée. Le faisceau de sonde est un continuum de lumière blanche femtoseconde peu énergétique afin de ne pas perturber la population de l'état excité, ayant un spectre large.

Nous allons voir dans les parties suivantes les solutions qui ont été choisies au laboratoire afin de réaliser les études sur les flavines et MTHF en solution et les protéines OtCPF1 et OtCPF2.

2.1 Source laser femtoseconde

Les expériences d'absorption transitoire ont été réalisées avec une source laser femtoseconde amplifiée schématisée sur la Figure 2.1. Elle est composée de deux éléments commerciaux : un oscillateur titane-saphir à modes bloqués (Tsunami, Spectra-Physics) et un amplificateur régénératif (Spitfire, Spectra-Physics).

2.1.1 Oscillateur titane-saphir

Le matériau amplificateur solide de l'oscillateur est l'ion titane Ti^{3+} inclus comme dopant dans un cristal de saphir (alumine Al_2O_3). Le cristal $Ti:Al_2O_3$ possède une très large bande d'émission spontanée (650-950 nm) [198] mais, en pratique, notre modèle de Tsunami n'est pas accordable sur toute cette gamme spectrale : il est optimisé pour fonctionner à 810 nm et nous l'avons souvent accordé à 775 nm. Le cristal $Ti:Al_2O_3$ est pompé par un laser $Nd:YVO_4$ (vanadate d'yttrium dopé au néodyme ; Millennia, Spectra-Physics), doublé en fréquence, émettant à 532 nm, c'est-à-dire au maximum de la bande d'absorption du $Ti:Al_2O_3$. Le blocage en phase des modes de la cavité laser se fait de manière passive, par un effet d'autofocalisation, c'est-à-dire de lentille Kerr (variation de l'indice de réfraction en fonction de l'intensité de l'onde lumineuse) dans le cristal amplificateur. Un modulateur acousto-optique permet cependant d'assurer activement l'amorçage et le maintien du blocage.

Pompé par le laser $Nd:YVO_4$ avec une puissance de 4 W, cet oscillateur délivre un faisceau ayant une puissance de 350 mW, un taux de répétition de 83 MHz et composé d'impulsions de 35 fs centrées à 775 nm.

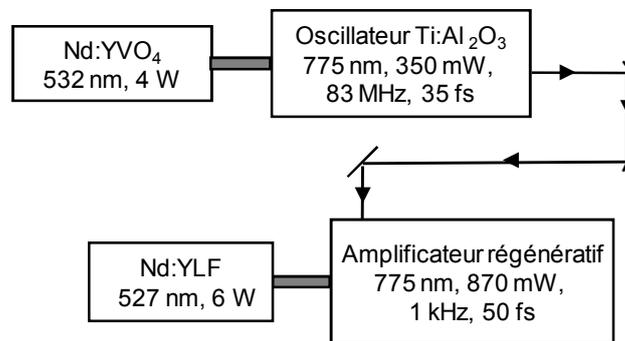


Figure 2.1 : Schéma général de la source laser femtoseconde amplifiée.

2.1.2 Amplificateur régénératif

Le principe de l'amplificateur régénératif est d'augmenter l'énergie de certaines impulsions produites par l'oscillateur titane-saphir. Les impulsions sont sélectionnées et piégées dans une cavité laser par des cellules de Pockels. L'impulsion sélectionnée et piégée effectue plusieurs passages dans le milieu amplificateur (cristal de $Ti:Al_2O_3$) de la cavité, pompé par un laser $Nd:YLF$ (fluorure d'yttrium et de lithium dopé au néodyme). Ce dernier laser, dont la puissance vaut 6 W, est cadencé à 1 kHz, doublé en fréquence dans la cavité et émet à 527 nm. L'impulsion piégée s'amplifie à chaque passage dans le milieu amplificateur et est extraite de la cavité lorsqu'elle a atteint son énergie maximale. Afin d'éviter la

détérioration du cristal amplificateur ainsi que des différents composants optiques, l'impulsion incidente est allongée temporellement jusqu'à environ 100 ps par plusieurs passages sur un réseau avant son injection dans la cavité. Elle est ensuite recomprimée après amplification. Un faisceau ayant une puissance de 870 mW, à la cadence de 1 kHz et composé d'impulsions de 50 fs, est obtenu en sortie de l'amplificateur régénératif (cf. la Figure 2.1).

2.2 Montage de spectroscopie d'absorption transitoire

2.2.1 Faisceau pompe

Comme il a été vu précédemment, le faisceau de pompe est accordé en longueur d'onde pour pouvoir exciter l'échantillon à analyser dans une de ses bandes d'absorption optiques. Le faisceau pompe est généré de deux manières différentes : par un amplificateur paramétrique optique non-colinéaire (NOPA), ou par génération de la seconde harmonique. Dans les deux cas la polarisation est linéaire.

2.2.1.1 Amplificateur paramétrique optique non-colinéaire (NOPA)

Le principe du NOPA consiste à amplifier une longueur d'onde spécifique d'un faisceau dit signal, initialement polychromatique et de faible intensité, en soustrayant de l'énergie aux photons d'un faisceau pompe.

Dans un premier temps le faisceau pompe à 387,5 nm est généré par doublage en fréquence d'une fraction du faisceau à 775 nm dans un cristal de borate d'oxyde de baryte (BBO). Pour des raisons d'optimisation de l'amplification, la pompe est élargie temporellement par passage dans deux pavés de verre. Parallèlement, la source du faisceau signal, un continuum de lumière blanche, est générée par focalisation d'une fraction (ajustée grâce à un diaphragme) de la partie restante du faisceau à 775 nm dans un cristal de saphir.

Le recouvrement spatial et temporel des faisceaux pompe et signal dans un second cristal de BBO permet de diviser les photons de la pompe en photons à la fréquence du signal et en photons résiduels à la fréquence différence. Ceci entraîne l'amplification du faisceau signal et la génération d'un faisceau résiduel peu énergétique (dit idler) situé dans l'infra-rouge proche lorsque le signal est dans le domaine visible. L'orientation du cristal « diviseur » doit être ajustée de manière à satisfaire une condition dite d'accord de phase. L'angle entre les faisceaux pompe et signal doit aussi être réglé de manière à maximiser l'énergie du faisceau signal.

En sortie du NOPA l'impulsion du faisceau signal est allongée temporellement en raison de la dispersion de vitesse de groupe rencontrée dans les matériaux traversés : se propageant plus vite, les grandes longueurs d'onde sont en avance par rapport aux courtes

longueurs d'onde. Ce phénomène est appelé dérive de fréquence (chirp, en anglais). Cet effet indésirable est corrigé en faisant faire au faisceau un aller-retour dans une paire de prismes disposés dans une géométrie particulière. Ceci permet aux grandes longueurs d'onde de prendre un retard par rapport aux courtes longueurs d'onde et, ainsi, de recomprimer temporellement le faisceau. Le faisceau est constitué d'impulsions de durée comprise entre 35 fs et 55 fs en fonction de la longueur d'onde générée, cadencé à 1 kHz et d'une dizaine de milliwatts (cf. la partie bleue de la Figure 2.2). Pour étudier FAD_{ox} , FMN_{ox} , la photoréduction de OtCPF1 et OtCPF2, nous avons préparé des impulsions de 55 fs à 470 nm et de largeur spectrale à mi-hauteur de ≈ 10 nm.

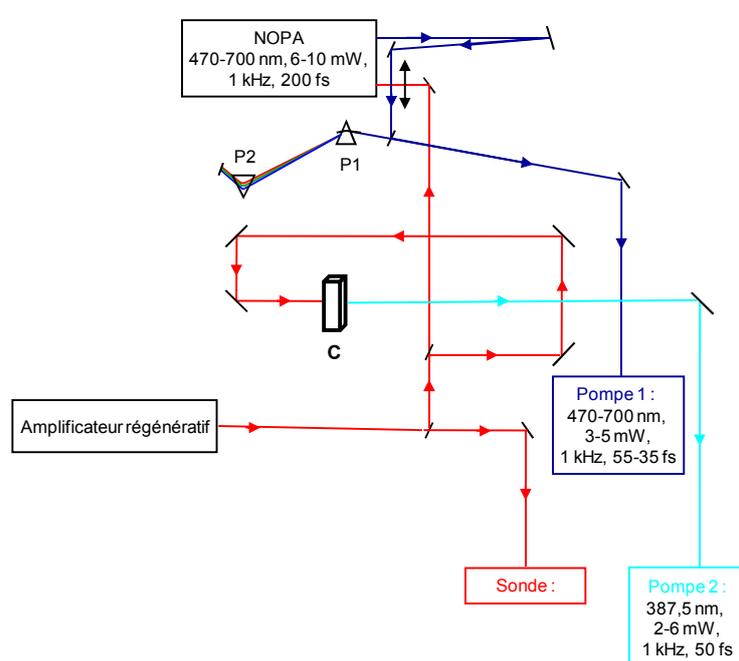


Figure 2.2 : Génération des faisceaux de pompe en sortie de la source laser solide. P1 et P2 sont les prismes servant à comprimer les impulsions en sortie de NOPA. C est un cristal de BBO.

2.2.1.2 Génération de la seconde harmonique

Un second faisceau pompe peut être obtenu par génération de la seconde harmonique du faisceau à 775 nm dans un cristal de BBO. Nous obtenons ainsi des impulsions de 50 fs à 387,5 nm (cf. la partie cyan de la Figure 2.2). Cette configuration de la pompe a été utilisée pour l'étude des flavines réduites, la photoantenne MTHF et du transfert d'énergie au sein de OtCPF2.

2.2.1.3 Dispositif expérimental

Deux longueurs d'onde ont été utilisées : 470 nm (NOPA) et 387,5 nm (génération de la seconde harmonique). Le faisceau est focalisé sur l'échantillon au moyen d'un miroir parabolique afin de réduire l'allongement des impulsions dû à la dispersion de vitesse de

groupe dans les milieux matériels traversés. La fluence (énergie par unité de surface) du faisceau doit permettre de porter quelques pourcents des molécules dans un état excité. Elle est ajustée à la fois par le réglage de l'énergie et du diamètre du faisceau sur l'échantillon.

Une lame demi-onde ($\lambda/2$) modifie la polarisation du faisceau pompe. En général, cette polarisation est ajustée à l'angle magique ($54,7^\circ$) par rapport à celle du faisceau sonde (verticale), pour s'affranchir des phénomènes dus à la diffusion rotationnelle du soluté. Lors des expériences d'anisotropie d'absorption transitoire, l'absorbance de l'échantillon est sondée par un faisceau dont la polarisation est soit parallèle, soit perpendiculaire à celle de la pompe. Pour cela la lame demi-onde ($\lambda/2$) est ajustée à 45° par rapport à la polarisation du faisceau sonde (verticale). Le faisceau sonde contient de ce fait deux contributions égales ayant des directions de polarisation respectivement parallèle et perpendiculaire à la polarisation du faisceau pompe. Un polariseur analyseur permet ensuite de sélectionner l'une ou l'autre des contributions.

Une fraction ($\approx 4\%$) du faisceau de pompe est prélevée et dirigée vers une photodiode afin de mesurer l'intensité de pompage de chaque tir laser. Cet enregistrement permet de discerner les tirs pompés et ceux non-pompés (cf. la partie 2.2.3) et de réaliser une correction des fluctuations de l'énergie de pompage.

2.2.2 Faisceau sonde

La sonde polychromatique est obtenue en focalisant des impulsions ultracourtes à 775 nm (3 mW), par propagation dans un milieu Kerr (ici une lame de fluorine, CaF_2). La variation de l'indice du milieu crée une modulation temporelle de sa phase, ce qui engendre un continuum de lumière blanche. La sonde est utilisable entre 340 nm et 750 nm. Le délai entre la sonde et la pompe est ajusté en faisant passer le faisceau qui produit le continuum par une ligne à retard constituée d'un coin de cube (système réfléchissant assurant le parallélisme des faisceaux incident et réfléchi) monté sur une table de translation micrométrique motorisée (cf. la Figure 2.3). La sonde est ensuite séparée en deux faisceaux de polarité verticale d'intensités égales par une lame séparatrice. L'un est focalisé sur l'échantillon au moyen d'un miroir parabolique, l'autre sert de référence pour la correction des fluctuations du continuum. Le continuum sonde présente un pic de très grande amplitude à la longueur d'onde du faisceau qui le génère ($\lambda = 775$ nm). Un filtre BG40 placé avant la lame séparatrice permet de filtrer ce pic et d'obtenir un continuum plus lisse pour les deux faisceaux.

Les faisceaux de pompe et de sonde sont superposés sur l'échantillon. L'angle qu'ils font entre eux est inférieur à 5° , ce qui assure leur recouvrement spatial tout au long de la

cuve contenant l'échantillon. Les faisceaux référence et transmis par l'échantillon sont collectés et focalisés par des lentilles achromatiques sur la fente d'entrée d'un spectrographe à réseau (SP306i, Acton) couplé à un détecteur CCD (Spec-10 100B, 1340/100 pixels, Roper Scientific). La fente est telle que la résolution spectrale des mesures est de 2 nm.

Pour des expériences d'anisotropie d'absorption transitoire, nous collectons en alternance le faisceau sonde transmis par l'échantillon et analysé avec un polariseur orienté dans une direction soit parallèle (45° par rapport à la verticale) soit perpendiculaire (315° par rapport à la verticale).

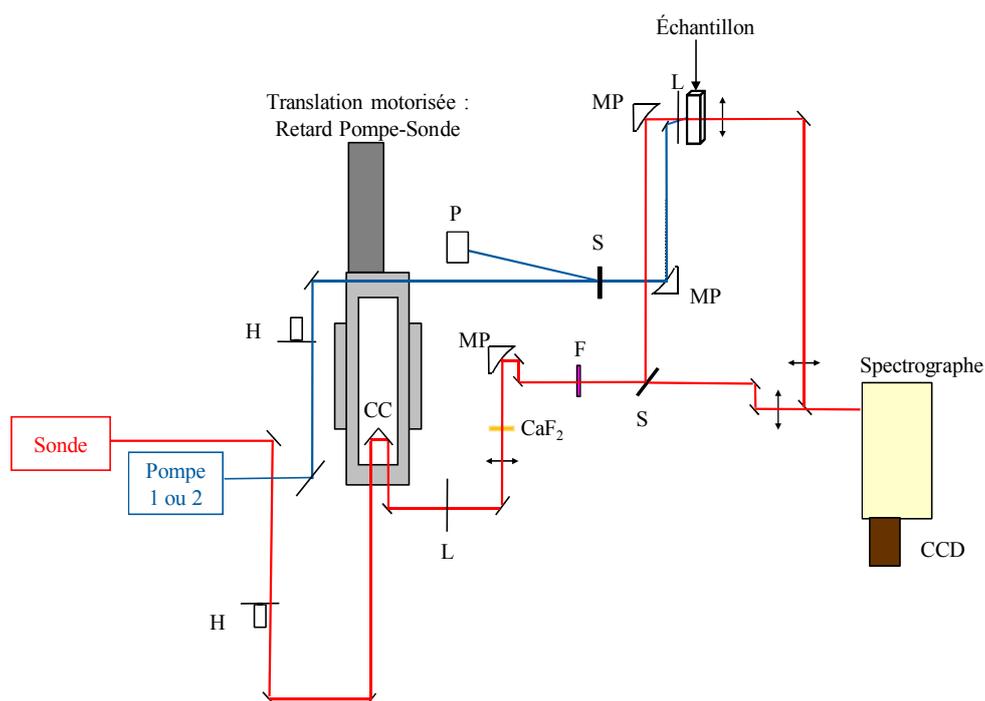


Figure 2.3 : Schéma du montage expérimental d'absorption transitoire de type pompe-sonde. H : hacheur de faisceau. CC : coin de cube. L : lame demi-onde ($\lambda/2$). MP : miroir parabolique. CaF_2 : lame de fluorine. F : filtre BG40. S : séparatrice. P : photodiode.

Une partie de la diffusion engendrée par le passage du faisceau d'excitation dans la cellule contenant l'échantillon (importante pour des solutions de protéines) est éliminée en plaçant un diaphragme autour du faisceau sonde transmis par l'échantillon. Une partie est cependant émise dans la même direction que la sonde, parvient au spectrographe et perturbe la mesure à la longueur d'onde d'excitation. Notons également qu'une faible fraction de la fluorescence spontanément émise par un échantillon excité suit ce même chemin et est détectée. La position de la ligne à retard correspondant au recouvrement temporel entre les faisceaux pompe et source (le temps dit zéro) est déterminée avant chaque expérience en observant la montée du signal. Pour des retards pompe-sonde augmentant par pas de 100 fs,

nous pouvons caler le temps dit zéro tel que nous observions du signal jusqu'à 30 nm après la longueur d'onde d'excitation et aucun signal pour des longueurs d'onde supérieures.

2.2.3 Échantillon

L'échantillon est placé dans une cellule en silice fondue (Hellma QS) de 1 mm d'épaisseur. La cellule est montée sur une platine en translation verticale continue pour renouveler le volume pompé entre deux tirs de pompe et éviter ainsi de photolyser le soluté par réexcitations successives. Le support de la cuve est thermostaté afin que la température de la solution contenue dans la cuve soit de 5°C. Comme en spectroscopie stationnaire, l'abaissement de température est réalisé à l'aide d'un liquide réfrigérant (mélange eau/glycérol) qui circule dans les parois du support. Un flux d'air sec est dirigé sur les faces de la cuve afin d'éviter la condensation de l'eau présente dans l'air.

La solution échantillon est préparée de manière à avoir idéalement une absorbance de l'ordre de 1 par mm à la longueur d'onde du maximum d'absorption. Pour l'étude des protéines OtCPF1 et OtCPF2 des échantillons beaucoup plus dilués ont malheureusement dû être utilisés.

2.3 Acquisition d'un spectre

Afin d'augmenter le rapport signal sur bruit, les mesures enregistrées pour un délai donné entre la pompe et la sonde sont moyennées sur environ 3000 tirs de pompe. La procédure est d'effectuer une acquisition alternée de configurations avec pompe et sonde ou avec sonde seulement. Les données sont stockées et traitées sur ordinateur.

Un hacheur de faisceau (disque troué en rotation, chopper en anglais) est placé sur le trajet des faisceaux pompe et sonde avant l'échantillon. La cadence des impulsions sonde est réduite car, comme le temps de lecture de la matrice CCD est d'environ de 2,5 ms, nous ne pouvons enregistrer le signal qu'à la cadence maximale de 333 Hz. La cadence de la sonde est donc réglée à 333 Hz. Comme nous enregistrons en alternance les tirs « pompés » et « non pompés », la cadence de la pompe est de 166 Hz.

La différence d'absorbance $\Delta A(\lambda, t)$ d'un échantillon pour un retard pompe-sonde t , est donnée par la relation :

$$\Delta A(\lambda, t) = A_p(\lambda, t) - A_{np}(\lambda) \quad (6.1)$$

où $A_p(\lambda, t)$ et $A_{np}(\lambda)$ sont les absorbances au temps t avec pompage (p) et sans pompage (np).

L'absorbance différentielle est calculée de la façon suivante :

$$\Delta A = -\log \left[\frac{\left(\frac{I_E^{p s} - I_E^{p ns}}{I_R^{p s} - I_R^{p ns}} \right)}{\left(\frac{I_E^{np s} - I_E^{np ns}}{I_R^{np s} - I_R^{np ns}} \right)} \right] \quad (6.2)$$

où I_E et I_R sont, respectivement, les intensités du faisceau sonde qui traverse l'échantillon et du faisceau sonde référence dans quatre configurations différentes :

- pompé (p) et sondé (s) (absorption des états présents) : $I_E^{p s}$, $I_R^{p s}$
- non pompé (np) et sondé (s) (absorption de l'état fondamental) : $I_E^{np s}$, $I_R^{np s}$
- pompé (p) et non sondé (ns) (diffusion + fluorescence + bruit de fond) : $I_E^{p ns}$, $I_R^{p ns}$
- non pompé (np) et non sondé (ns) (bruit de fond) : $I_E^{np ns}$, $I_R^{np ns}$

La signification physique de ces différents termes peut se résumer ainsi :

- $I_E^{p s} - I_E^{p ns}$: cette différence corrige le spectre d'absorption transitoire différentiel de la fluorescence. La diffusion du faisceau de pompe est malheureusement mal corrigée ici. La raison principale est que cette diffusion est de trop grande intensité. Les fluctuations tir à tir du spectre de la pompe représentent une difficulté supplémentaire.
- $\frac{I_E^{p s} - I_E^{p ns}}{I_R^{p s} - I_R^{p ns}}$: ce rapport corrige les fluctuations du détecteur CCD
- $\frac{\left(\frac{I_E^{p s} - I_E^{p ns}}{I_R^{p s} - I_R^{p ns}} \right)}{\left(\frac{I_E^{np s} - I_E^{np ns}}{I_R^{np s} - I_R^{np ns}} \right)}$: le logarithme de ce rapport correspond à la différence d'absorbance

entre l'échantillon pompé et l'échantillon non pompé.

Rappelons que l'alternance des tirs pompés et non pompés est reconnue par le logiciel d'acquisition des données grâce à la mesure de l'intensité de la pompe lue par la photodiode de contrôle.

2.4 Correction des artéfacts

2.4.1 Normalisation de l'énergie de pompage

Les spectres peuvent être corrigés des fluctuations de l'énergie du faisceau de pompe au cours de l'expérience par une opération dite de normalisation. Cette correction est réalisée en utilisant l'intensité du faisceau de pompe mesurée par la photodiode de contrôle. En régime linéaire (la population excitée varie linéairement avec l'énergie de pompage), la fonction de

correction est une loi linéaire. Lorsque l'expérience est réalisée en régime saturé (la population excitée cesse d'être proportionnelle à l'énergie de la pompe), l'ajustement paramétrique de la courbe de saturation (polynôme du second degré) donne la fonction de correction de normalisation.

La normalisation n'améliore pas toujours le rapport signal sur bruit, notamment quand les fluctuations tir à tir de l'énergie du laser sont peu importantes. La statistique des retards pompe-sonde identiques et répétés permet de déterminer la reproductibilité de l'expérience et de choisir si la normalisation a un effet visible sur le rapport signal sur bruit.

2.4.2 Correction du chirp

Le continuum de lumière constituant la sonde présente une dérive de fréquence (chirp) relativement importante notamment due à la traversée de différents milieux matériels dispersifs (lame de fluorine, filtre BG40, face avant de la cuve contenant l'échantillon) : le bord rouge arrive sur l'échantillon avant le bord bleu, déformant le profil temporel de l'impulsion. Le temps zéro (coïncidence temporelle des impulsions pompe et sonde) varie donc en fonction de la longueur d'onde. Il est possible de corriger cette dérive en réalisant une mesure indépendante de la courbe de variation du temps zéro (t_0) en fonction de la longueur d'onde. Un artéfact expérimental dit « temps zéro » (modulation de phase croisée, effet Raman stimulé ; cf. la partie 2.4.3) est utilisé pour cela et est observé lors de la superposition des impulsions pompe et sonde. Des spectres d'absorption transitoire du solvant pur utilisé pour l'étude du soluté sont enregistrés pour des délais pompe-sonde allant de -5 ps à 5 ps. Le seul signal mesuré est dans ce cas l'artéfact « temps zéro ». Les cinétiques observées aux différentes longueurs d'onde du continuum permettent alors de déterminer le t_0 par ajustement paramétrique avec la fonction M que nous décrirons dans la partie 2.4.3.

Afin de lisser les erreurs de mesure et de pouvoir ensuite utiliser plus facilement les valeurs obtenues, celles-ci sont dans un premier temps ajustées à l'aide de la fonction suivante :

$$t_0(\lambda) = C + \sum_i \frac{e_i}{v_{g_i}(\lambda)} \quad (6.3)$$

Ici $t_0(\lambda)$ est supposé être exclusivement dû au temps de propagation de la sonde à la longueur d'onde λ dans les différents matériaux traversés, e_i est l'épaisseur du matériau i , v_{g_i} est la vitesse de groupe correspondante (modélisée à partir de l'équation de Sellmeier pour l'indice de réfraction) et C est une constante homogène à un temps. Les meilleurs ajustements sont

obtenus en considérant que le faisceau traverse quelques millimètres de verre BK7 et de fluorine (cf. la Figure 2.4).

L'ajustement paramétrique obtenu est lui-même finalement ajusté (quasi parfaitement) par un polynôme de degré six, encore plus simple à utiliser.

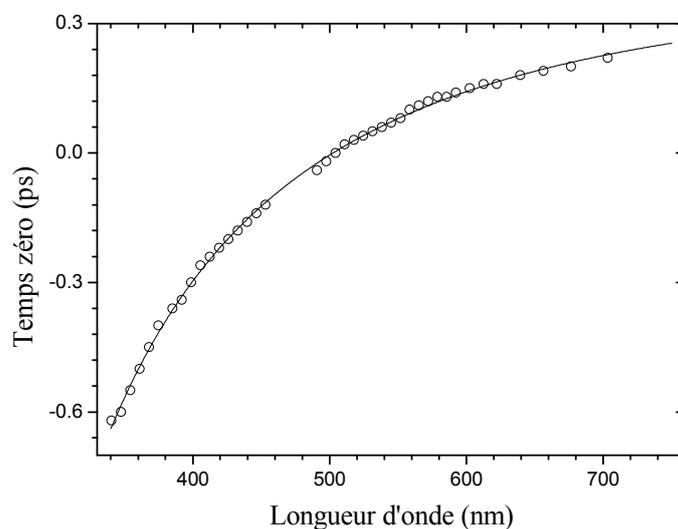


Figure 2.4 : Variations du temps zéro en fonction de la longueur d'onde (ronds). La courbe continue en noir représente l'ajustement des données par la fonction (6.3).

La correction effective du chirp se fait en choisissant une longueur d'onde de référence $\lambda_{\text{réf}}$ et en décalant chaque cinétique à la longueur d'onde λ d'une quantité $t_0(\lambda) - t_0(\lambda_{\text{réf}})$. Pour obtenir les valeurs de cette cinétique décalée aux mêmes temps que ceux de la cinétique à $\lambda_{\text{réf}}$ une interpolation linéaire est réalisée.

2.4.3 Artéfact « temps zéro »

Généralement des oscillations d'assez grande amplitude sont observées sur les spectres différentiels (corrigés du chirp) pour les temps proches du temps zéro. La Figure 2.5 en donne un exemple dans le cas de la protéine OtCPF1 en solution dans un tampon TRIS à pH 8,0. Ce phénomène n'est pas dû à une réponse moléculaire du soluté puisqu'il est retrouvé essentiellement à l'identique pour le solvant pur. Au moins deux effets physiques contribuent à cet artéfact que nous nommerons « temps zéro » par simplicité. Le plus important est la modulation de phase croisée. Il s'agit d'une modulation de l'indice de réfraction des milieux matériels traversés par la sonde (solvant, fenêtre de la cuve) par la forte amplitude de la pompe. La sonde chirpée voit alors sa phase perturbée par ce milieu d'indice de réfraction transitoirement modifié [199].

Une seconde contribution à l'artéfact temps zéro est celle de l'effet Raman stimulé dans le solvant voire le soluté. Du côté Stokes de la longueur d'onde d'excitation une

transition Raman générée par la pompe est stimulée par la sonde ; cela se traduit par une amplification de la sonde (signal négatif). Du côté anti-Stokes une transition Raman générée par la sonde est stimulée par la pompe et c'est une absorption de la sonde qui est observée (signal positif). Cet effet est notamment visible par des bandes intenses de signe opposé à 406,1 nm et 560,8 nm sur la Figure 2.5. Elles correspondent à une fréquence de vibration de l'ordre de 3400 cm^{-1} attribuable à l'élongation O-H de l'eau du solvant.

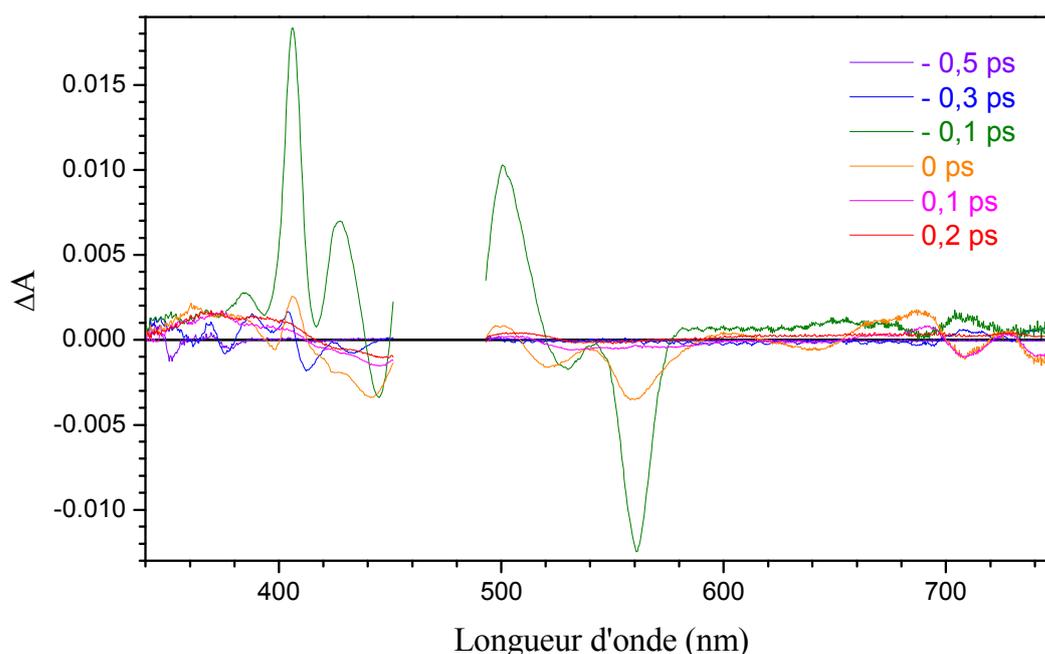


Figure 2.5 : Spectres d'absorption transitoire, corrigés du chirp, de OtCPF1 dans un tampon TRIS à pH 8,0 mesurés pour des retards pompe-sonde de -0,5 ps (violet), -0,3 ps (bleu), -0,1 ps (vert), 0 ps (orange), 0,1 ps (rose) et 0,2 ps (rouge).

Pour l'instant, nous modélisons cet effet par une fonction mathématique empirique composée d'une gaussienne et de ses deux premières dérivées temporelles, comme cela a déjà été rapporté par le groupe Ernstring [200]. La largeur de cette gaussienne est imposée comme étant la même que celle qui sert à représenter la fonction réponse de l'instrument. Cette fonction, notée M , s'écrit sous la forme suivante :

$$M(b_1, b_2, b_3, \lambda, dt) = b_1(\lambda) \times \text{gauss}(dt) + b_2(\lambda) \times \frac{d\text{gauss}(dt)}{dt} + b_3(\lambda) \times \frac{d^2\text{gauss}(dt)}{dt^2} \quad (6.4)$$

2.5 Analyse des données

2.5.1 Analyse spectrale

Les spectres d'absorption différentielle sont en général constitués de la superposition de trois contributions : l'absorption transitoire, le blanchiment et l'émission stimulée. Les transitions d'absorption transitoire contribuent positivement : elles traduisent l'absorption des

espèces transitoires ($S_1 \rightarrow S_n$, $T_1 \rightarrow T_n$, ...). Le blanchiment contribue négativement : il correspond à la perte d'absorbance de l'état fondamental ($S_0 \rightarrow S_1$) due à la dépopulation de celui-ci par l'excitation. L'émission stimulée est également négative : elle correspond à l'amplification des photons de la sonde dans une transition d'un état excité vers l'état fondamental (typiquement $S_1 \rightarrow S_0$).

La Figure 2.6 présente un exemple typique de spectre d'absorption différentielle : il s'agit de FAD_{ox} en solution concentrée dans un tampon TRIS à pH 8,0 (après excitation à 470 nm, pour un retard pompe-sonde de 1 ps).

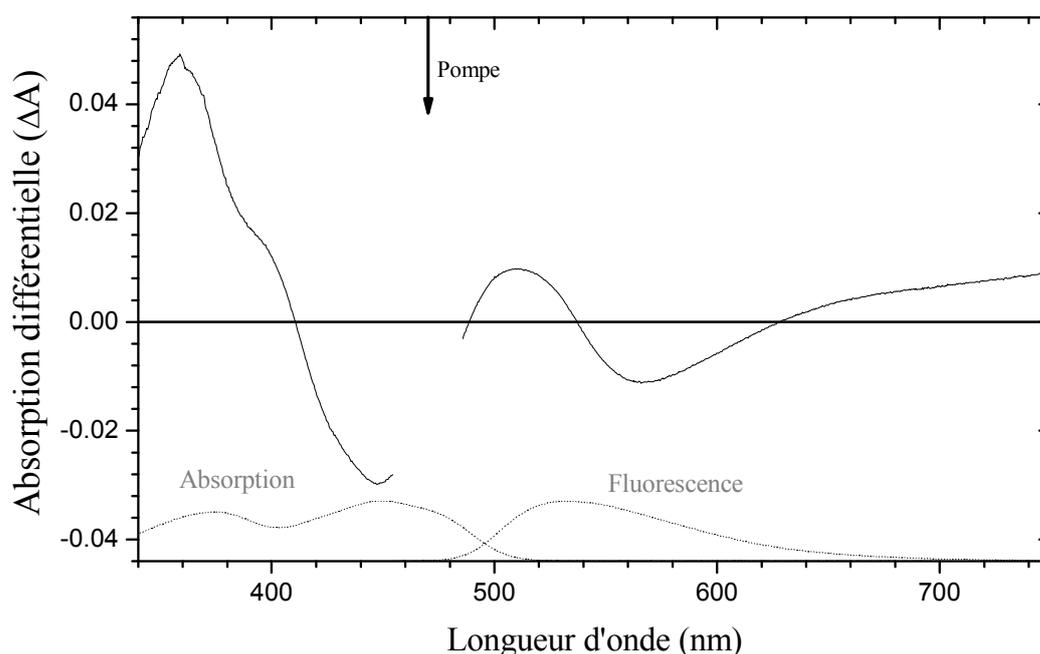


Figure 2.6 : Spectre d'absorption différentielle (ΔA) de FAD_{ox} en solution concentrée ($A_{450} = 0,69$ pour 1 mm de trajet optique) en solution tampon TRIS à pH 8,0, mesuré après excitation à 470 nm (flèche) pour un retard pompe-sonde de 1 ps. Les spectres d'absorption et de fluorescence de FAD_{ox} en solution sont indiqués en pointillés.

Il présente des bandes positives et négatives résultant de la superposition des trois contributions fondamentales. La bande négative située entre 410 nm et 454 nm est dominée par le blanchiment : elle sera nommée bande de blanchiment. Une autre contribution de blanchiment est aussi attendue vers 370 nm mais n'est pas visible. Cela est dû à la superposition de cette contribution par une transition d'absorption transitoire dominante. La bande négative vers 540-628 nm est dominée par l'émission stimulée : elle sera appelée bande d'émission stimulée ou de gain. Nous remarquons que son maximum est nettement déplacé vers le rouge par rapport au spectre de fluorescence. Ceci est en particulier dû à la superposition avec une forte bande d'absorption transitoire sur son bord bleu. Les trois bandes

positives situées dans les plages spectrales 340-410 nm, 487-540 nm et 628-750 nm sont dominées par de l'absorption transitoire. Nous les appelons bandes d'absorption transitoire même si, en raison des diverses superpositions, les transitions d'absorption transitoire pures sous-jacentes peuvent avoir des maxima différemment situés. Les spectres d'absorption transitoire sont masqués aux alentours de la longueur d'onde d'excitation (470 nm ici) afin de cacher les erreurs de mesure dues à la diffusion du faisceau de pompe.

Une description simplifiée, mais souvent utile, de l'absorption différentielle $\Delta A(t)$ est de considérer qu'elle correspond à la superposition des contributions de N états transitoires discrets, chacun d'eux ayant un spectre d'absorption transitoire pur et d'émission stimulée bien défini et indépendant du temps (relaxé). La Figure 2.7 représente un modèle à un état transitoire ($N = 1$). Cette description exclue a priori les situations où les états et/ou leurs spectres évoluent continûment au cours du temps comme ce qui est observé dans les phénomènes de solvatation dynamique, relaxation vibrationnelle, « hole burning », réactions sans barrière de potentiel, ...

En l'absence de pompage toute la population est à l'état fondamental et l'absorbance est donnée par la loi de Beer-Lambert (en supposant qu'il n'y a qu'une seule espèce absorbante) :

$$A_{np}(\lambda) = \varepsilon_a(\lambda) \times l \times c \quad (6.5)$$

où l est le trajet optique parcouru par le faisceau dans la solution en cm et c est la concentration totale de soluté.

À un temps t après excitation, chaque état transitoire i est peuplé avec la concentration c_i ; c_0 est la concentration de molécules à l'état fondamental. L'absorbance de l'échantillon est donnée par :

$$A_p(\lambda, t) = \sum_i A_{p,i}(\lambda, t) = \sum_i l \times \left(\varepsilon_a(\lambda) \times c_0(t) + \varepsilon_{u,i}(\lambda) \times c_i(t) - \varepsilon_{e,i}(\lambda) \times c_i(t) \right) \quad (6.6)$$

Étant donné que quelque soit t , $c = c_0 + \sum_{i=1}^N c_i$, la différence d'absorption s'écrit alors :

$$\Delta A(\lambda, t) = A_p(\lambda, t) - A_{np}(\lambda) = \sum_{i=1}^N l \times \left(\varepsilon_{u,i}(\lambda) - \varepsilon_{e,i}(\lambda) - \varepsilon_a(\lambda) \right) \times c_i(t) \quad (6.7)$$

La contribution de chaque état i à ΔA est positive quand l'absorption transitoire est dominante, c'est-à-dire que $\varepsilon_{u,i} > \varepsilon_{e,i} + \varepsilon_a$. De même la contribution à ΔA est négative quand le blanchiment est dominant ($\varepsilon_a > \varepsilon_{u,i}$ et $\varepsilon_a \gg \varepsilon_{e,i}$) ou que l'émission stimulée est dominante ($\varepsilon_{e,i} > \varepsilon_{u,i}$ et $\varepsilon_{e,i} \gg \varepsilon_a$) ou encore que le blanchiment et l'émission stimulée forment une superposition dominante ($\varepsilon_{e,i} + \varepsilon_a > \varepsilon_{u,i}$).

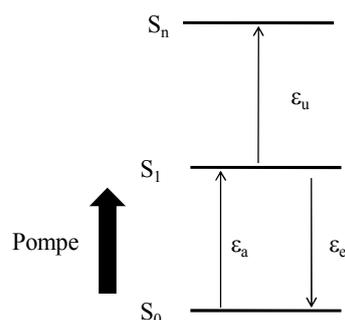


Figure 2.7 : Modèle à deux populations lors d'une excitation par un faisceau de pompe (flèche épaisse noire).

Dans la version de ce modèle à un état transitoire seulement, l'évolution des spectres est purement homothétique. Elle présente des points isobestiques dont la valeur est nécessairement $\Delta A = 0$ aux longueurs d'onde où $\epsilon_{e,1} + \epsilon_a = \epsilon_{u,1}$.

Notons que pour généraliser l'équation (6.7) aux cas où les états transitoires ne peuvent pas être considérés comme relaxés, il faut introduire la dépendance temporelle des coefficients d'extinction molaire.

2.5.2 Analyse cinétique

2.5.2.1 Théorie

Une analyse cinétique des données transitoires est nécessaire pour quantifier la dynamique des phénomènes photoinduits. Lors d'une expérience d'absorption transitoire, le signal transitoire $\Delta A(\lambda, t)$ est enregistré pour différents retards pompe-sonde. Nous obtenons une matrice de spectres pour différents retards pompe-sonde, dite matrice spectrotemporelle, notée A et de dimension $p \times q$. Les cinétiques sont les p lignes de A et les spectres sont les q colonnes de A .

Les cinétiques sont ajustées paramétriquement afin de concevoir un modèle cinétique des réactions observées. Les cinétiques sont souvent ajustées par une somme d'exponentielles décroissante de durée de vie τ_i (e^{-t/τ_i}). Ce choix peut se justifier par le fait qu'une somme d'exponentielles est la solution la plus générale d'un système de réactions unimoléculaires du premier ordre couplées décrivant l'évolution des concentrations de différentes espèces transitoires relaxées se convertissant les unes en les autres. Le nombre d'exponentielles est alors égal au nombre d'états transitoires du système. Dans la limite où nous ignorons les phénomènes d'évolution continue des états et/ou de leurs spectres (cf. la partie 2.5.1), nous pouvons considérer qu'une telle description concentre l'essentiel du comportement dynamique de l'échantillon excité. Il faut remarquer que, dans cette même limite, les mêmes

exponentielles doivent se retrouver, affectées de coefficients multiplicateurs variables, à toutes les longueurs d'onde de l'expérience. Si le comportement dynamique du système excité est plus riche que cela, la complexité du système peut être rendue par des exponentielles dont la durée de vie dépend alors de la longueur d'onde.

Pour une exponentielle de durée de vie infinie (c'est-à-dire très grande par rapport à 1,4 ns, le plus grand délai accessible de notre expérience), nous utilisons en pratique une fonction constante. Pour représenter le démarrage de la cinétique à $t = 0$ s, toutes les fonctions exponentielles sont multipliées par la fonction échelon (dite de Heaviside, $h(t)$) qui prend la valeur 0 pour tous les temps négatifs et vaut 1 pour tous les temps positifs. Cette somme de fonctions est convoluée par la réponse impulsionnelle du dispositif expérimental, décrite par une fonction gaussienne de largeur dt (la même que celle entrant dans la définition de la fonction M de l'artéfact « temps zéro »). La largeur dt est la fonction de corrélation croisée des impulsions pompe et sonde et donne la résolution temporelle du montage de spectroscopie d'absorption transitoire (entre 70 fs et 120 fs selon les échantillons).

À une longueur d'onde donnée, l'ajustement cinétique s'effectue au moyen de la fonction suivante :

$$y(a_i, b_i, \tau_i, dt, t) = \sum_i a_i \times [e^{-t/\tau_i} \otimes \text{gauss}(dt)] + M(b_i) \quad (6.8)$$

où les paramètres ajustables sont les facteurs pré-exponentiels (a_i), les durées de vie (τ_i), les paramètres internes à la fonction artéfact « temps zéro » $M(b_i)$ et la largeur de la réponse expérimentale du dispositif (dt).

En première approximation, il faut signaler que si la cinétique est de signe positif, alors un facteur a_i positif correspond à la perte d'une espèce alors qu'un signe négatif signifie la montée retardée d'une espèce. Et si la cinétique est de signe négatif, alors un facteur a_i positif signifie la montée retardée d'une espèce, tandis qu'un signe négatif décrit la disparition d'une espèce. En réalité les coefficients a_i contiennent la signature spectrale des espèces qui disparaissent et apparaissent simultanément. Par conséquent il s'agit d'un mélange complexe de signaux interprétable en gardant bien à l'esprit qu'il existe des superpositions de signaux.

Comme indiqué plus haut, dans la limite où les phénomènes d'évolution continue des états et/ou de leurs spectres sont ignorés, les mêmes exponentielles doivent se retrouver à toutes les longueurs d'onde de l'expérience. Une analyse globale consiste à réaliser un

ajustement paramétrique simultané de plusieurs cinétiques au moyen d'une somme de mêmes exponentielles (les paramètres τ_i sont partagés). L'équation (6.8) devient alors :

$$y(a_i, b_i, \tau_i, dt, t, \lambda) = \sum_i a_i(\lambda) \times [e^{-t/\tau_i} \otimes \text{gauss}(dt)] + M(b_i, \lambda) \quad (6.9)$$

Cette analyse globale peut être réalisée sur une sélection de quelques cinétiques particulièrement significatives, c'est-à-dire quelques lignes de la matrice spectrotemporelle A, ou bien sur l'intégralité de cette matrice afin d'exploiter l'ensemble des données disponibles.

Pour réaliser l'analyse globale sur l'intégralité de la matrice A, la décomposition en valeurs singulières est la technique la plus efficace [201]. Précisons qu'il s'agit ici d'une matrice de données corrigées du chirp (cf. la partie 2.4.2). La décomposition en valeurs singulières est une généralisation de la diagonalisation des matrices carrées. C'est une fonction prédéfinie facilement accessible dans le logiciel de calcul Mathematica® que nous utilisons. La matrice A (dimension $p \times q$) est décomposée exactement en le produit suivant :

$$A = U.S.V^t \quad (6.10)$$

U est la matrice de dimension $p \times p$ des spectres orthogonaux (colonnes) normés, S est une matrice pseudo-diagonale de dimension $p \times q$ contenant les valeurs singulières classées par ordre décroissant sur sa diagonale et V est la matrice de dimension $q \times q$ des cinétiques orthogonales (colonnes) normées. Les cinétiques orthogonales sont les lignes de la transposée de V : V^t .

Après décomposition, une troncature des trois matrices précédentes est envisageable en ne conservant que les m valeurs singulières les plus grandes (en remplaçant les autres par 0). La matrice S se réduit ainsi à une matrice diagonale de dimension m. La partie utile de la matrice U, notée U' , n'a plus qu'une dimension $p \times m$ (m spectres orthogonaux). De même la partie utile de la matrice V, notée V' , n'a plus qu'une dimension $q \times m$ (m cinétiques orthogonales). Ces trois matrices définissent une approximation A' de la matrice A :

$$A' = U'.S'.V'^t \text{ tel que } A = A' + \text{bruit} \quad (6.11)$$

Le critère de sélection de m est le suivant : c'est le plus petit nombre tel que la partie des données qui est négligée par la troncature ne contienne pas de signal significatif. La construction de la matrice $A-A'$ permet de vérifier que son contenu est assimilable à du bruit ($A = A' + \text{bruit}$).

Nous réalisons ensuite une analyse globale des m premières cinétiques orthogonales pondérées par leur valeur singulière, c'est-à-dire $S'.V'^t$ par une somme de N exponentielles. Les différentes durées de vie (l'une d'entre elles peut être fixée à l'infini pour représenter un

signal résiduel de longue durée de vie) et les facteurs pré-exponentiels correspondants sont ainsi obtenus. Ceci s'écrit :

$$S'.V^t = F.T + \text{bruit} \quad (6.12)$$

F est la matrice $m \times N$ des facteurs pré-exponentiels et T est la matrice $N \times q$ des valeurs des N exponentielles aux q temps de l'expérience. D'où la constitution d'une approximation de A', notée A'', puisque l'ajustement ne produit pas exactement A' :

$$A'' = U'.F.T = B.T, \text{ avec } B = U'.F, \text{ tel que } A' = A'' + \text{bruit} \quad (6.13)$$

B est la matrice $p \times N$ des spectres de facteurs pré-exponentiels associés aux N exponentielles, pris aux p longueurs d'onde de l'expérience. Ces spectres, qui sont les colonnes de la matrice B, sont aussi appelés DADS : Decay-Associated Difference Spectra, en anglais. La matrice A'' doit aussi être une approximation de A, aussi vérifions-nous à ce stade que la matrice A-A'' ne contient toujours essentiellement que du bruit.

L'avantage de l'analyse globale par traitement SVD est que toute l'information spectrale se résume à un nombre réduit de cinétiques orthogonales qui sont facilement ajustables. Il est aussi possible de réaliser une analyse globale sur la totalité des cinétiques réelles, mais c'est beaucoup plus coûteux en temps de calcul.

2.5.2.2 Exemple : FAD_{ox} en solution concentrée

Lors de l'étude de FAD_{ox} concentrée en solution tampon à pH 8,0 après excitation par des impulsions de 55 fs à 470 nm pour des retards pompe-sonde allant de -2 ps à 1300 ps (cf. la partie 1.2.2.2 du chapitre II), nous avons réalisé une analyse cinétique globale que nous allons détaillée ici.

Étant donné que le signal aux temps courts est entaché de l'artéfact temps zéro, nous réalisons un premier ajustement paramétrique sur la matrice spectrotemporelle totale afin de déterminer les paramètres dt et t0. Après avoir appliqué la procédure SVD à la matrice spectrotemporelle des données de FAD_{ox} concentrée, les huit premiers cinétiques orthogonales pondérées (c'est-à-dire normalisées par le poids de la valeur singulière) sont ajustées par la somme de quatre exponentielles convoluées à une gaussienne représentant la réponse expérimentale de notre dispositif et de la fonction artéfact temps zéro. Les quatre premières cinétiques orthogonales pondérées avec leur ajustement respectif sont représentées sur la Figure 2.8. Ce premier ajustement global donne les paramètres suivants : $\tau_1 = 0,61 \pm 0,06$ ps, $\tau_2 = 4,9 \pm 0,4$ ps, $\tau_3 = 19 \pm 3$ ps, $\tau_4 = 2,4 \pm 0,3$ ns, dt = $0,075 \pm 0,001$ ps et t0 = $-0,280 \pm 0,001$ ps, avec un écart quadratique moyen $\sigma = 5,3 \times 10^{-3}$.

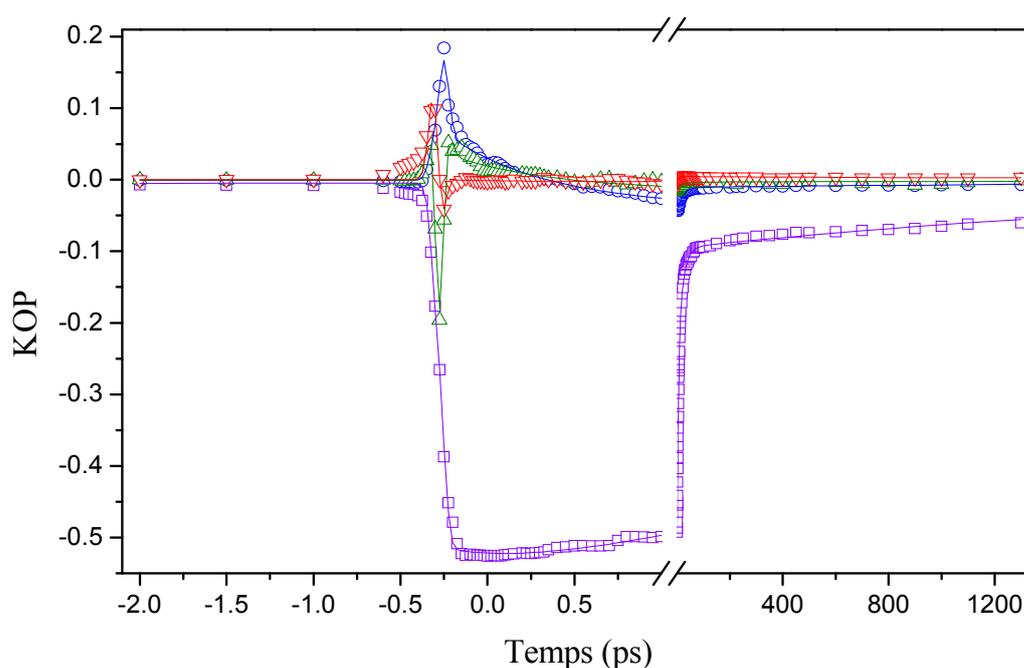


Figure 2.8 : Les quatre premières cinétiques orthogonales pondérées de FAD_{ox} concentrée en solution (KOP) en carrés violets, ronds bleus, triangle verts et triangles rouges dans l'ordre croissant. Les ajustements respectifs sont représentés en traits pleins en violet, bleu, vert et rouge, respectivement.

Ce premier ajustement paramétrique nous permet de travailler ensuite sur une matrice spectrotemporelle tronquée dans les temps courts, afin de s'affranchir de l'artéfact temps zéro et de déterminer de façon plus précise les durées de vie décrivant la dynamique du système. Ici la matrice spectrotemporelle a été tronquée à -100 fs. Les six premières cinétiques pondérées sont ajustées par la somme de quatre exponentielles convoluées à une gaussienne représentant la réponse expérimentale de notre dispositif. Les paramètres t_0 et dt sont fixés avec les valeurs trouvées lors de l'ajustement précédent. Sur la Figure 2.9, sont représentées les quatre premières cinétiques orthogonales pondérées avec leur ajustement respectif. Ce dernier ajustement global conduit aux durées de vie suivantes : $\tau_1 = 0,90 \pm 0,05$ ps, $\tau_2 = 5,2 \pm 0,2$ ps, $\tau_3 = 22 \pm 2$ ps et $\tau_4 = 2,6 \pm 0,2$ ns, avec $\sigma = 2,8 \times 10^{-3}$. Ce dernier ajustement donne les durées de vie retenues ainsi que les DADS.

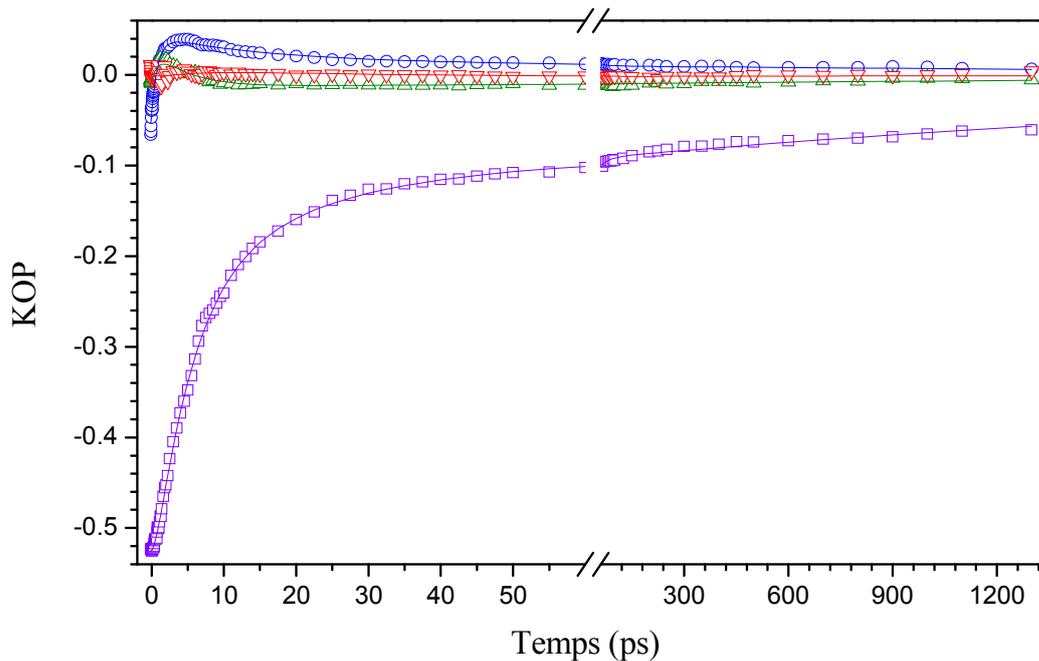


Figure 2.9 : Les quatre premières cinétiques orthogonales pondérées après troncature à -100 fs de FAD_{ox} concentrée en solution (KOP) en carrés violets, ronds bleus, triangle verts et triangles rouges dans l'ordre croissant. Les ajustements respectifs sont représentés en traits pleins en violet, bleu, vert et rouge, respectivement.

2.5.3 Modélisation cinétique

Une fois l'analyse cinétique réalisée, l'évolution du système peut être décrite par un modèle cinétique. Dans le cadre d'un système de réactions unimoléculaires du premier ordre couplées, impliquant N états transitoires, les équations cinétiques peuvent s'écrire sous la forme matricielle suivante :

$$\frac{dC(t)}{dt} = MC \cdot C(t) \quad (6.14)$$

C(t) est un vecteur de dimension N contenant les concentrations des N espèces transitoires au temps t et MC est une matrice contenant les constantes de vitesse du premier ordre liant ces espèces entre elles.

À $t < 0$ s, $C(t) = 0$ et à $t = 0$ s, l'impulsion de la pompe crée la population initiale C(0). En pratique, les concentrations initiales du ou des états excités ne sont pas connues précisément. Par conséquent C(0) ne peut pas être introduite de façon exacte. Une solution normalisée telle que la somme des concentrations initiales des espèces transitoires au temps $t = 0$ s soit égale à 1 est recherchée. Cette solution sera notée K(t). La solution réelle C(t) correspondant à la condition initiale C(0) sera simplement proportionnelle à K(t) :

$$C(t) = c_0^* \cdot K(t) \quad (6.15)$$

c_0^* est égal à la somme des concentrations des espèces transitoires au temps $t = 0$ s.

L'équation (6.14) devient alors :

$$\frac{dK(t)}{dt} = MC \cdot K(t) \quad (6.16)$$

Ce type de système différentiel matriciel se résout facilement si la matrice MC est diagonale et la solution est une fonction exponentielle pour chaque concentration. Si la matrice n'est pas diagonale mais est diagonalisable, il existe la relation suivante entre la matrice MC et sa matrice diagonale MD :

$$MC = P \cdot MD \cdot P^{-1} \quad (6.17)$$

P est la matrice de passage, dont les colonnes sont les vecteurs propres de MC et MD est la matrice diagonale contenant les valeurs propres de MC. D'où :

$$\frac{dK(t)}{dt} = P \cdot MD \cdot P^{-1} \cdot K(t) \quad (6.18)$$

$$\Rightarrow \frac{dY(t)}{dt} = MD \cdot Y(t) \text{ où } Y(t) = P^{-1} \cdot K(t) \quad (6.19)$$

La solution d'un tel système aboutit en général à une fonction exponentielle pour chaque élément du vecteur Y et donc à la somme de N fonctions exponentielles pour chaque concentration :

$$K(t) = MF \cdot E(t) \quad (6.20)$$

E(t) qui est un vecteur de dimension N contenant la valeur des exponentielles au temps t, et MF est une matrice N×N de facteurs pré-exponentiels. Le vecteur E(t) pris aux q temps de l'expérience forme la matrice T (dimension N×q) décrite dans la partie 2.5.2.1. L'ensemble des vecteurs concentrations K(t) pris aux q temps de l'expérience forme une matrice κ (dimension N×q) liée à la matrice T par la relation :

$$\kappa = MF \cdot T(t) \quad (6.21)$$

La matrice A'' de données prédites par le modèle peut se réexprimer sous la forme :

$$A'' = B \cdot T = (B \cdot MF^{-1}) \cdot (MF \cdot T) = Z \cdot \kappa, \text{ avec } Z = B \cdot MF^{-1} \text{ et } \kappa = MF \cdot T \quad (6.22)$$

Les lignes de κ sont les cinétiques normalisées des N espèces du modèle cinétique et les colonnes de Z sont leurs spectres différentiels associés (SADS, Species-Associated Difference Spectra en anglais). B et T étant connues, Z et κ sont calculées grâce à MF⁻¹ et MF. En multipliant κ par c₀^{*} et en divisant Z par c₀^{*}, nous retrouvons les cinétiques réelles et les spectres de coefficients d'absorption molaire (généralisés).

Les paramètres du modèle MC doivent être numériquement ajustés pour obtenir les N durées de vie τ_i mesurées expérimentalement et pour satisfaire d'éventuelles contraintes sur les SADS.

Dans le cas où le modèle cinétique est une cascade séquentielle simple où chaque précurseur produit un successeur avec un rendement de un, les SADS sont nommés EADS (Evolution-Associated Differenc Spectra en anglais).

Afin de quantifier les coefficients de fuite lorsque le rendement de chaque étape du modèle cinétique est inférieur à un, nous appliquons la contrainte dite des blanchiments. Cette contrainte consiste à ajuster les paramètres du modèle afin que les SADS en résultant contiennent tous la même contribution du blanchiment. Cette condition provient de l'équation (6.7) dans laquelle nous pouvons remarquer que le terme en $-\varepsilon_a$ est identique pour tous les états. La correction s'effectue en ajustant visuellement la fraction du spectre stationnaire de l'espèce excitée de manière à ce que la contribution du blanchiment soit identique pour tous les SADS. Il est important de noter que cette correction est approximative mais est réalisable.

2.5.4 Anisotropie

Les expériences d'absorption transitoire anisotrope (dichroïsme linéaire transitoire) sont très intéressantes car elles sont non seulement sensibles à la diffusion rotationnelle des molécules mais aussi aux directions des différents moments dipolaires de transition. Dans des cas où plusieurs espèces transitoires ont des spectres isotropes identiques, nous pouvons espérer mieux les distinguer par l'orientation relative de leurs moments de transition. Les spectres d'absorption transitoires ΔA_{\parallel} et ΔA_{\perp} correspondent aux configurations où les polarisations (linéaires) de la pompe et de la sonde sont respectivement parallèle et perpendiculaire. L'anisotropie d'absorption transitoire $r(t, \lambda)$ est définie ainsi :

$$r(t, \lambda) = \frac{\Delta A_{\parallel}(t, \lambda) - \Delta A_{\perp}(t, \lambda)}{\Delta A_{\parallel}(t, \lambda) + 2 \times \Delta A_{\perp}(t, \lambda)} \quad (6.23)$$

Comme l'ont rapporté Byrdin et al. [8], construire $r(t, \lambda)$ à partir des données brutes conduit à de mauvais résultats puisque un signal bruité est divisé par un autre signal bruité. Afin d'augmenter le rapport signal sur bruit, nous avons suivi l'exemple de ces auteurs et produit un ajustement paramétrique du dénominateur de l'équation (6.23) (trois fois le signal isotrope) par analyse globale (cf. la partie 2.5.2). Le dénominateur est ensuite simplement remplacé par l'ajustement qui, par définition ne contient aucun bruit.

Comme l'indiquent Byrdin et al., l'anisotropie (totale) du système peut se réduire à l'expression suivante :

$$r_{\text{tot}}(t, \lambda) = \frac{\sum_i r_i \times \Delta A_i^{\text{iso}}}{\Delta A_{\text{tot}}^{\text{iso}}} \quad (6.24)$$

r_i est l'anisotropie de chaque espèce absorbante en présence, ΔA_i^{iso} est le signal isotrope dû à l'espèce i et ΔA_{tot}^{iso} est le signal isotrope total :

$$\Delta A_{tot}^{iso} = \frac{\Delta A_{\parallel} + 2 \times \Delta A_{\perp}}{3} = \sum_i \Delta A_i^{iso} \quad (6.25)$$

L'expression (6.25) est vraie quelque soit le niveau de décomposition de la somme sur i (états du système global, molécules le composant, ...) cependant pour obtenir une expression simple (indépendante de la longueur d'onde) de chaque r_i , il est nécessaire de décomposer ΔA_{tot}^{iso} jusqu'aux transitions électroniques individuelles contribuant à l'absorption transitoire, car chacune d'elles est susceptible d'avoir un moment de transition orienté différemment. Les transitions de blanchiment sont également à comptabiliser car elles contribuent à ΔA_{tot}^{iso} par un terme négatif, proportionnel au coefficient d'absorption molaire et à la concentration manquante à l'état fondamental.

En procédant de la sorte, les résultats bien connus pour l'anisotropie de fluorescence [192] montrent que :

$$r_i(t) = \langle P_2(\cos\theta_i'') \rangle, \text{ avec } P_2(x) = \frac{(3x^2-1)}{2} \text{ le polynôme de Legendre d'ordre 2} \quad (6.26)$$

La notation $\langle \rangle$ signifie moyenne sur toutes les orientations possibles de l'espèce portant la transition i ; θ_i'' est l'angle entre le moment de transition i et la direction // (pompe). En supposant que l'espèce portant la transition i subit une diffusion rotationnelle isotrope de temps de corrélation $\tau_{rot,i}$, nous avons :

$$r_i(t) = r_{0,i} e^{-t/\tau_{rot,i}} \text{ avec } r_{0,i} = \frac{2}{5} P_2(\cos\alpha_i) \quad (6.27)$$

α_i est l'angle entre le moment de la transition considérée et le moment de la transition d'absorption excitée par le faisceau de pompe (supposée unique).

Ainsi que le soulignent Byrdin et al., lorsqu'une seule transition n'est détectée dans une gamme de temps et de longueurs d'onde donnée, l'anisotropie totale se réduit à un seul terme de type (6.27).

2.5.5 Théorie du transfert d'énergie par résonance de type Förster

La théorie du transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) [202] permet de calculer la vitesse du transfert d'énergie connaissant la distance (notée R) entre un donneur d'énergie (noté D) et un accepteur (noté A). La théorie s'applique uniquement pour des D et A distants d'au moins 1 nm [203]. Dans une telle situation, la constante de transfert d'énergie (k_{ET}) s'exprime selon l'équation :

$$k_{ET} = k_D \left[\frac{R_0}{R} \right]^6 \quad (6.28)$$

k_D^{-1} est la durée de vie de l'état excité de D en l'absence de A et R_0 est le rayon de Förster, c'est-à-dire la distance pour laquelle les constantes de vitesses k_{ET} et k_D sont égales. L'expression de R_0 est donnée par l'équation :

$$R_0^6 = \frac{9 \times \ln(10) \times \kappa^2 \times \Phi_D}{128 \pi^5 \times N_A \times n^4} \times J \quad (6.29)$$

avec Φ_D le rendement quantique de fluorescence du D, n l'indice de réfraction moyen du milieu, N_A la constante d'Avogadro et J l'intégrale de recouvrement qui se définit par les équations suivantes :

$$J = \int I_\lambda^{D*} \times \epsilon_A(\lambda) \times \lambda^4 \times d\lambda; \int I_\lambda^{D*} \times d\lambda = 1 \quad (6.30)$$

où I_λ^{D*} représente l'intensité de fluorescence du D après normalisation, $\epsilon_A(\lambda)$ est le coefficient d'extinction molaire de A en fonction de la longueur d'onde, λ est la longueur d'onde.

κ^2 est le facteur d'orientation définit selon :

$$\kappa^2 = \left(\frac{(\vec{\mu}_D \cdot \vec{\mu}_A) - 3(\vec{\mu}_D \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_A \cdot \vec{r})}{\mu_D \cdot \mu_A} \right)^2 \quad (6.31)$$

avec μ_D et μ_A les moments de transition du donneur et de l'accepteur respectivement et r le vecteur normalisé de R.

3 Préparation des échantillons

La flavine adénine dinucléotide (FAD, pureté $\geq 95\%$), la flavine mononucléotide (FMN, pureté $\geq 95\%$) et le 5-10-méthényl-tétrahydrofolate (MTHF, pureté $\geq 99\%$) ont été achetés chez Sigma Aldrich. Les flavines oxydées sont directement obtenues en solubilisant le produit commercial dans une solution tampon TRIS (cf. la partie 3.1.1). Les FAD réduites déprotonée (FADH^-) et protonée (FADH_2) ont été préparées au laboratoire à partir de solutions de FAD oxydée.

Les deux protéines, OtCPF1 et OtCPF2, ont été surexprimées et purifiées par Marc Heijde (doctorant) puis par moi-même avec l'aide de Gérald Zabulon (ingénieur d'étude) au département de biologie de l'École Normale Supérieure (Paris) dans le groupe de Biologie Moléculaire des Organismes Photosynthétiques dirigé par Chris Bowler (UMR 8186).

3.1 Chromophores libres

3.1.1 Flavines réduites déprotonées : FADH^-

Le pH d'une solution tampon de TRIS (tris-hydroxy-méthylaminométhane ou 2-amino-2-hydroxy-méthylpropane-1,3-diol) à 50 mmol L^{-1} et d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) à 20 mmol L^{-1} est ajusté à 8,0 à l'aide d'acide chlorhydrique à $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

FAD commerciale est dissous dans ce tampon jusqu'à atteindre une absorbance de 0,9 (pour un trajet optique de 1 mm) à 448 nm. La solution contenue dans une cuve de 1 mm est hermétiquement fermée par un septum. Afin d'éliminer le dioxygène présent dans la solution, un bullage avec de l'argon est réalisé pendant 40 min. La solution est maintenue sous atmosphère d'argon à l'aide d'un ballon de baudruche contenant ce gaz.

Après dégazage avec de l'argon, la solution est irradiée en continu à 450 nm afin de photoréduire FAD_{ox} par l'EDTA [23, 55]. L'obtention de la flavine réduite est contrôlée par spectroscopie d'absorption stationnaire.

3.1.2 Flavines réduites protonées : FADH_2

Le mode opératoire pour obtenir la flavine adénine dinucléotide protonée est identique à celui décrit dans la partie 3.1.1. La seule différence est le pH et la nature du tampon dans lequel est dissous FAD. Il s'agit ici d'une solution tampon aux phosphates à pH 5,6 à 50 mmol L^{-1} et contenant de l'EDTA à 20 mmol L^{-1} .

3.2 Chromoprotéines

3.2.1 Culture des cellules

Afin de pouvoir induire l'expression des gènes codant pour OtCPF1 et OtCPF2 dans *E. coli*, les deux gènes ont été clonés dans le vecteur de surexpression pGex4T3, qui ajoute une séquence GST (Glutathione-S-Transférase, en anglais) à la partie N-terminale des protéines exprimées. L'utilisation des enzymes de restriction EcoRI pour le gène codant pour OtCPF2 et BamHI et XhoI pour le gène codant pour OtCPF1 permet d'obtenir les plasmides codant pour OtCPF1 (noté pGEX-CPF1) et OtCPF2 (noté pGEX-CPF2). Le plasmide est inséré dans les cellules souches SY2 de *E. coli* par un choc thermique [2].

L'induction de la surexpression des protéines recombinantes chez la souche SY2 de *E. Coli* est réalisée par ajout d'IPTG en concentration finale de 1 mmol L⁻¹ lorsque la solution de *E. coli* atteint une absorbance de 0,5 sur 1 cm à 600 nm. Après une nuit d'agitation à 19°C, les cellules sont centrifugées à 3000 tr min⁻¹ à 4°C pendant 10 min. Le surnageant n'est pas conservé puisque les cellules contenant les protéines exprimées forment un culot lors de la centrifugation. Une analyse par électrophorèse SDS-PAGE des protéines produites est effectuée, afin de contrôler qu'il s'agit bien de OtCPF1 ou OtCPF2.

Pour récupérer les protéines contenues dans les cellules, il faut casser ces dernières. Les culots obtenus après centrifugation sont dissous dans une solution tampon aux phosphates (1 mol L⁻¹) à pH 8,0 (notée PBS) contenant des inhibiteurs de protéase (enzyme qui coupe les chaînes polypeptidiques). Les cellules dissoutes sont cassées à l'aide d'une presse de French. Après centrifugation des cellules cassées à 4°C, pendant 30 min et à 12000 tr min⁻¹, nous récupérons une solution contenant les protéines dans le surnageant.

3.2.2 Purification des chromoprotéines

La purification des chromoprotéines est réalisée par chromatographie d'affinité. La phase stationnaire est une résine (Glutathione Sepharose 4B, en anglais) fonctionnalisée par des récepteurs à la GST (glutathion greffé par liaison covalente à la résine).

Pour 500 mL de milieu de culture, 500 µL de résine lavée par du PBS ont été utilisés. Le surnageant contenant les protéines à purifier est ajouté à la résine lavée et est agité pendant deux heures doucement à 4°C. Les protéines OtCPF1 ou OtCPF2 portent la GST dans leur partie N-terminale. Elles rentrent ainsi en interaction avec la résine.

L'élimination des protéines non fixées sur la résine est réalisée en centrifugeant pendant 5 min à 2300 tr min⁻¹ et 4°C et en éliminant le surnageant. 10 mL de PBS contenant

des inhibiteurs de protéases sont ajoutés et centrifugés à 4°C pendant 5 min à 2300 tr min⁻¹. Le surnageant est éliminé. Ceci est répété une première fois avec 10 mL de PBS et une seconde fois avec 1 mL.

La récupération des protéines OtCPF1 ou OtCPF2 est réalisée en ajoutant une solution dite GEB contenant un tampon à 100 mmol L⁻¹ de TRIS à pH 8,0, 100 mmol L⁻¹ de NaCl et du glutathion réduit (GSH) à 20 mmol L⁻¹. La GST portée par les protéines OtCPF1 ou OtCPF2 ayant une meilleure constante d'affinité avec le GSH qu'avec le récepteur de la résine, OtCPF1 ou OtCPF2 sont décrochées de la résine par compétition. 500 µL de GEB sont ajoutés. La solution est agitée à 4°C pendant 20 min. Après centrifugation pendant 5 min à 2300 tr min⁻¹ à 4°C, le surnageant contenant OtCPF1 ou OtCPF2 est récupéré. L'ajout de GEB et la récupération du surnageant après centrifugation sont répétés deux fois. Un contrôle de la pureté de OtCPF1 ou OtCPF2 est réalisé par électrophorèse.

Il s'est avéré nécessaire d'éliminer le GSH pour les échantillons de OtCPF1 (cf. le chapitre III). Pour cela une dialyse a été réalisée sur OtCPF1. Le tampon est constitué de 100 mmol L⁻¹ de TRIS à pH 8,0, 100 mmol L⁻¹ de NaCl sans le glutathion réduit. La dialyse est réalisée avec un boudin de dialyse (Cellu Sep T2, 6-8 kDa) et avec quatre changements de solution tampon. Les conditions expérimentales de chaque changement ont été fixées de façon à avoir un rapport des volumes de 600 et un équilibre établi pendant 30 min.

Les protéines ainsi collectées sont très diluées. Les expériences d'absorption transitoire nécessitant des échantillons concentrés (cf. la partie 2.2), nous avons concentré les solutions à l'aide d'un filtre centrifugeable (Centricon, 10 kDa) qui permet de concentrer les molécules dont la masse moléculaire est supérieure à 10 kDa. Finalement nous obtenons 60 µL d'une solution ayant une absorbance comprise entre 0,01 et 0,42 pour 1 mm de trajet optique. Ces absorbances sont très faibles mais nous n'avons pas pu obtenir de solutions plus concentrées. Une agrégation des protéines (possiblement par interaction électrostatique) est suspectée à forte concentration. Nous avons donc dû travailler sur des volumes très faibles et des échantillons peu concentrés.

Les protéines sont conservées dans du glycérol à 10% en volume et à -80°C.

3.2.3 Dénaturation

La dénaturation des protéines est réalisée en chauffant une solution les contenant à 65°C pendant 10 min. Après centrifugation à 14000 tr min⁻¹ pendant 10 min, le surnageant jaune contenant les chromophores libres est séparé d'un solide blanc composé des apoprotéines précipitées.

3.2.4 Réduction du MTHF

MTHF dans les protéines est réduit par ajout d'une solution de tétrahydroborate de sodium (NaBH_4) à 100 mmol L^{-1} dans du tampon TRIS à pH 8,0 et à 0°C .

3.2.5 Oxydation de OtCPF2

L'oxydation de OtCPF2 est réalisée en bullant du dioxygène directement dans une cuve de 1 mm contenant la protéine. Un contrôle de l'oxydation de l'échantillon est réalisé par spectroscopie d'absorption stationnaire.

4 Caractérisation des chromoprotéines

4.1 Apoprotéine

Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer la concentration en protéine : la mesure de la masse d'apoprotéine et la mesure de l'absorbance à 280 nm.

Dans la première méthode, le solide blanc obtenu après dénaturation des protéines est séché sous vide pendant deux heures. La masse du solide sec constitué des apoprotéines est pesée.

Dans la seconde méthode, le spectre d'absorption d'une solution diluée (facteur de dilution D) des protéines est mesuré entre 220 nm et 400 nm. Ce spectre ne peut pas être utilisé directement pour déterminer la concentration de protéine à cause de la contribution des autres espèces absorbant dans cette gamme spectrale, notamment les flavines et les acides nucléiques présents sur les protéines. L'élimination des contributions spectrales de ces espèces est effectuée en soustrayant le spectre d'absorption du surnageant après dénaturation des protéines du spectre des protéines avant dénaturation. Le coefficient d'extinction molaire de l'apoprotéine à 280 nm (ϵ_{280}) est calculé en utilisant le modèle de Pace [178] à partir de la structure primaire de la protéine. La concentration en apoprotéine est alors calculée selon :

$$[\text{Apoprotéine}] = \frac{A_{280}}{\epsilon_{280} \times l} \times D \quad (6.32)$$

avec A_{280} l'absorbance de l'apoprotéine à 280 nm et l le trajet optique de la mesure.

4.2 Présence de FAD

Le surnageant après dénaturation des protéines est divisé en deux fractions identiques. La première fraction est diluée avec du TRIS à pH 8,0. La seconde est acidifiée avec une solution d'acide chlorhydrique à 100 mmol L⁻¹ jusqu'à l'obtention d'un pH de 3,0. La présence d'une flavine de type flavine adénine dinucléotide est testée en enregistrant les spectres de fluorescence du surnageant à pH 8,0 et pH 3,0.

La concentration totale en FAD est déterminée de deux manières : en réalisant un ajustement global du spectre d'absorption du surnageant après dénaturation de la protéine et en réalisant un ajustement du spectre d'absorption des protéines directement. Le premier ajustement est effectué au moyen d'un spectre de référence de FAD_{ox} en milieu neutre. La concentration totale en FAD est calculée en sommant les concentrations de chaque état d'oxydo-réduction de FAD présent dans l'échantillon (cf. la partie 4.4). Les concentrations calculées selon ces deux manières sont similaires et peuvent être moyennées.

4.3 Présence de MTHF

Pour tester la présence de MTHF, les protéines sont traitées par du tétrahydroborate de sodium (NaBH_4) à 100 mmol L^{-1} dans du tampon TRIS à pH 8,0 et à 0°C . Les spectres de fluorescence avant et après réduction de MTHF dans les protéines permettent de contrôler la présence de la photoantenne.

La concentration en MTHF est déterminée de deux manières : par ajustement global du spectre d'absorption des deux échantillons différents. Le premier échantillon est le surnageant de la protéine après dénaturation. Ce surnageant contient MTHF hydrolysé, soit le 10-FTHF, dont le spectre d'absorption est connu. Le second échantillon est la protéine elle-même. La décomposition en chromophores de la protéine donne une seconde valeur de la concentration en MTHF. Ces deux manières de calculer la concentration en MTHF sont concordantes et leur moyenne est retenue comme concentration en MTHF.

4.4 Distribution des différents chromophores

FAD portée par les protéines OtCPF1 et OtCPF2 se trouve dans trois états d'oxydo-réduction possibles : FAD_{ox} , FADH^\bullet et FADH^- . Pour OtCPF2, la photoantenne MTHF est aussi présente. Les concentrations de ces trois ou quatre espèces dans nos échantillons de protéines sont quantifiées par ajustement global du spectre d'absorption stationnaire de l'échantillon (enregistré entre 330 nm et 700 nm), par une somme des spectres (dits de référence) de coefficients d'absorption molaire de chaque espèce. La fonction d'ajustement est donnée par :

$$A_{\text{pr}}(\lambda) = \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \times C_i \times l + c^{\text{te}} \quad (6.33)$$

$\varepsilon_i(\lambda)$ et C_i sont le coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde λ et la concentration en l'espèce i , respectivement. Une constante est ajoutée afin de prendre en compte un éventuel décalage (offset) de la ligne de base.

Deux bases de spectres de référence différentes ont été choisies pour traiter les spectres de OtCPF1 et OtCPF2 parce qu'elles décrivent le mieux nos données. Les spectres de référence utilisés pour OtCPF1 sont ceux de FAD_{ox} , FADH^\bullet et FADH^- portés par la photolyase (6-4) de *Xenopus laevis*. Ces spectres ont été extraits (numérisés) de l'article de Schleicher et al. [159]. Ces spectres ont été ajustés afin que le coefficient d'extinction molaire de FAD_{ox} à 450 nm soit égal à $11000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (valeur moyenne rencontrée dans la littérature [3, 175, 176]). En ce qui concerne OtCPF2, les spectres de coefficients d'extinction

molaire de référence sont ceux de FAD_{ox} , $FADH^\bullet$, $FADH^-$ et MTHF portés par la photolyase CPD de *Escherichia coli*. Ils ont été extraits directement de l'article de Jorns et al. [175].

Les concentrations de chaque espèce présente dans les protéines permettent de calculer des pourcentages relatifs de chaque population. Deux cas de figure se présentent : OtCPF1 sans photoantenne et OtCPF2 avec MTHF comme photoantenne.

En ce qui concerne OtCPF1, il y a quatre populations de protéine :

- OtCPF1 sans chromophore, notée E
- FAD_{ox} portée par OtCPF1, notée E- FAD_{ox} et de concentration c_1 ,
- $FADH^\bullet$ portée par OtCPF1, notée E- $FADH^\bullet$ et de concentration c_2 ,
- $FADH^-$ portée par OtCPF1, notée E- $FADH^-$ et de concentration c_3 .

La première population E ne nous intéresse pas pour les études spectroscopiques. Nous déterminons la fraction relative, x , de chaque espèce à l'état fondamental (symbolisé ici par l'indice i) en calculant :

$$x_i = \frac{c_i}{\sum_i c_i} \quad (6.34)$$

Pour l'expérience d'absorption transitoire réalisée sur OtCPF1 excitée à 470 nm (cf. la partie 3 du chapitre III), nous calculons la distribution des fractions molaires de chaque espèce à l'état excité. La population excitée (initiale) de l'espèce i est considérée proportionnelle à la population de l'état fondamental correspondant et au coefficient d'extinction molaire de l'espèce à la longueur d'onde d'excitation, ici 470 nm ($\epsilon_{470}(i)$). À partir des spectres de référence extraits de la X164, nous calculons les $\epsilon_{470}(i)$ en moyennant les coefficients d'extinction molaire entre 460 nm et 480 nm. Nous obtenons alors l'expression des pourcentages relatifs des espèces à l'état excité :

$$x_i^* = \frac{c_i \times \epsilon_{470}(i)}{\sum_i c_i \times \epsilon_{470}(i)} \quad (6.35)$$

Comme OtCPF2 porte les différents états d'oxydo-réduction de FAD et la photoantenne MTHF, la protéine peut alors être trouvée sous huit formes différentes :

- OtCPF2 sans chromophore : E
- OtCPF2 portant FAD_{ox} seulement: E- FAD_{ox} , concentration c'_1 ,
- OtCPF2 portant $FADH^\bullet$ seulement : E- $FADH^\bullet$, concentration c'_2 ,
- OtCPF2 portant $FADH^-$ seulement : E- $FADH^-$, concentration c'_3 ,
- OtCPF2 portant MTHF seulement : E-MTHF
- OtCPF2 portant MTHF et FAD_{ox} : E-MTHF- FAD_{ox} , concentration m_1 ,

- OtCPF2 portant MTHF et FADH[•] : E-MTHF-FADH[•], concentration m_2 ,
- OtCPF2 portant MTHF et FADH⁻ : E-MTHF-FADH⁻, concentration m_3 .

La première population E ne nous intéresse pas lors des études spectroscopiques. Nous supposons que la concentration de la population E-MTHF est négligeable puisque la photoantenne est plus labile que FAD. Il ne reste donc plus que six populations. À l'issue de l'ajustement paramétrique par les spectres de référence de EcCPD, nous obtenons quatre concentrations :

- c_1 : concentration de FAD_{ox} dans E-FAD_{ox} et E-MTHF-FAD_{ox}, $c_1 = c_1' + m_1$
- c_2 : concentration de FADH[•] dans E-FADH[•] et E-MTHF-FADH[•], $c_2 = c_2' + m_2$
- c_3 : concentration de FADH⁻ dans E-FADH⁻ et E-MTHF-FADH⁻, $c_3 = c_3' + m_3$
- m : concentration de MTHF dans E-MTHF-FAD_{ox}, E-MTHF-FADH[•] et E-MTHF-FADH⁻, $m = m_1 + m_2 + m_3$.

Un premier calcul de pourcentages relatifs de chaque espèce à l'état fondamental peut être réalisé en séparant les différents états d'oxydo-réduction de FAD (symbolisé ici par l'indice i) et MTHF (symbolisé par l'indice m) :

$$x_i = \frac{c_i}{\sum_i c_i} \quad (6.36)$$

$$x_m = \frac{m}{\sum_i c_i} \text{ pour MTHF/FAD} \quad (6.37)$$

Nous avons constaté, dans les chapitre III et IV, que la concentration de MTHF est inférieure à celle de FAD, ce qui appuie le fait que MTHF est plus faiblement en interaction avec OtCPF2 que FAD et que nous éliminions la population E-MTHF.

Une seconde hypothèse est que la probabilité pour que MTHF soit le voisin de l'un des états d'oxydo-réduction de FAD est la même quelque soit cet état. Nous avons donc :

$$\frac{m_1}{c_1} = \frac{m_2}{c_2} = \frac{m_3}{c_3} = \frac{m}{\sum_i c_i} = x_m \quad (6.38)$$

Nous en déduisons les m_i et les concentrations $c_i' = c_i - m_i$. Cela nous permet de calculer les pourcentages relatifs de chaque population. Sachant que par étude spectroscopique nous ne faisons pas la différence entre les espèces FAD_i portée par OtCPF2 avec ou sans MTHF. Nous calculons donc les fractions molaires relatives rapportées à l'ensemble des chromophores :

$$x_i^r = \frac{c_i}{\sum_i c_i + m} \quad (6.39)$$

$$x_m^r = \frac{m}{\sum_i c_i + m} \text{ pour MTHF} \quad (6.40)$$

Nous calculons les coefficients d'extinction molaire des espèces, i , qui absorbent aux longueurs d'onde d'excitation, λ , ($\epsilon_{\lambda}(i)$), à partir des spectres de référence extraits de EcCPD. Nous obtenons alors l'expression des pourcentages relatifs des espèces à l'état excité :

$$x_i^* = \frac{c_i \times \epsilon_{\lambda}(i)}{\sum_i c_i \times \epsilon_{\lambda}(i) + m \times \epsilon_{\lambda}(\text{MTHF})} \quad (6.41)$$

$$x_{m_i}^* = \frac{m_i \times \epsilon_{\lambda}(\text{MTHF})}{\sum_i c_i \times \epsilon_{\lambda}(i) + \sum_i m_i \times \epsilon_{\lambda}(\text{MTHF})} \quad (6.42)$$

4.5 Évaluation de la stabilité des échantillons protéiques

4.5.1 Stabilité thermique

La stabilité thermique des protéines est suivie en enregistrant leurs spectres d'absorption stationnaire à différentes températures. Pour OtCPF1 et OtCPF2, l'élévation de température est arrêtée à 15°C, où l'absorbance commence à être perturbée par la diffusion de l'échantillon.

4.5.2 Stabilité chimique

La stabilité chimique des protéines, conservées dans l'obscurité à 5°C, en présence d'air, est suivie en enregistrant leurs spectres d'absorption toutes les 20 min à 30 min pendant 6h pour OtCPF1 et 4h30 pour OtCPF2. À partir des spectres enregistrés, les concentrations des différentes espèces FAD et de MTHF sont déterminées par décomposition spectrale décrite dans la partie 4.4. Les variations de chaque concentration sont représentées en fonction du temps.

Une analyse dite « target » (c'est-à-dire sur un modèle cible) est ensuite réalisée sur les évolutions temporelles des concentrations. Pour ce faire, un modèle cinétique est choisi. L'évolution théorique des concentrations s'exprime sous forme d'une équation en fonction des paramètres du modèle (constantes de vitesse et concentrations initiales). Les données expérimentales sont ensuite simultanément ajustées avec ces équations théoriques à l'aide du logiciel Origin. Nous en déduisons les constantes de vitesse ainsi que les concentrations initiales de chaque espèce.

4.5.3 Photostabilité

Les propriétés photochimiques des échantillons ont été étudiées en exposant une cuve (de section 2×10 mm) contenant les échantillons sous irradiations continue à 400 nm ($I_{400} = 4,03 \text{ mW cm}^{-2}$), 450 nm ($I_{450} = 3,75 \text{ mW cm}^{-2}$) et 620 nm ($I_{620} = 2,25 \text{ mW cm}^{-2}$), en présence d'air. La lampe à arc au xénon de puissance 150 W du spectrofluoromètre est utilisée comme source d'excitation. Après deux minutes d'irradiation, la cuve est déplacée

rapidement dans le spectrophotomètre et le spectre d'absorption est enregistré. La surface d'excitation (S_{exc}) vaut $0,48 \text{ cm}^{-2}$, atteignant environ 40% du volume de l'échantillon ($V_{éch}$). Le chemin optique pour l'irradiation est de 2 mm (l_{exc}). Les spectres d'absorption sont enregistrés perpendiculaire à l'épaisseur excitée, pour un chemin optique de 10 mm (l_{pro}).

À partir des spectres enregistrés, les concentrations sont déterminées par décomposition spectrale et représentées en fonction du temps. Une analyse « target » est réalisée sur ces évolutions temporelles après avoir choisi un modèle cinétique décrivant le système. Ces études n'ont été réalisées que pour OtCPF1 puisqu'aucune évolution significative n'a été observée pour OtCPF2. Un ajustement par une loi affine est juste réalisé pour OtCPF2 afin de bien mettre en évidence la non évolution des concentrations de chaque espèce sous irradiation.

Le rendement de modification de FAD photoinduit, pour une forme d'oxydo-réduction donnée (symbolisée ici par l'indice i), est défini comme le rapport du nombre de moles de FAD (sous la forme i) modifiée par l'irradiation (Δn_i) au nombre de moles de photons absorbé par l'échantillon (n_{hv}^{abs}) comme le montre l'équation suivante :

$$\Phi_{mod}^i = \frac{\Delta n_i}{n_{hv}^{abs}} \quad (6.43)$$

Comme Song et al. l'ont indiqué [153] cette expression se réexprime ainsi :

$$\Phi_{mod}^i(\lambda_{exc}) = \frac{\Delta C_i \times e}{R_{exc} \times t_{exc} \times \left\{ 1 - \frac{T(\lambda_{exc}, 0) + T(\lambda_{exc}, t_{exc})}{2} \right\}} \quad (6.44)$$

avec $e = V_{éch}/S_{exc}$, ΔC_i est la variation de concentration de l'espèce i , R_{exc} est de flux molaire d'excitation (moles de photons incidents par unité de temps et de surface) et t_{exc} est le temps d'excitation. $T(\lambda_{exc}, 0)$ et $T(\lambda_{exc}, t_{exc})$ sont les transmittances de l'échantillon, mesurées à la longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}) selon la direction d'excitation, respectivement avant et après l'excitation lumineuse. La transmittance est déterminée à partir de l'absorbance en utilisant la relation $T(\lambda_{exc}) = 10^{-A(\lambda_{exc}) \times l_{exc}/l_{pro}}$, où $A(\lambda_{exc})$ est l'absorbance mesurée à λ_{exc} avec un trajet optique de l_{pro} .

Notons que Φ_{mod}^i n'a pas de sens universel dans le cas général puisque n_{hv}^{abs} est le nombre de photons absorbés par toutes les espèces en présence. Il dépend donc de la composition de l'échantillon et de la longueur d'onde d'excitation. Si seule l'espèce i absorbe à la longueur d'onde λ_{exc} alors Φ_{mod}^i a bien le sens classique d'un rendement de modification photoinduit de l'espèce i , dû à la seule excitation de l'espèce i .

5 Modélisation par homologie

La modélisation par homologie consiste à prédire la structure tertiaire d'une protéine (appelée protéine cible) à partir de sa séquence primaire et de la structure tertiaire d'une autre protéine (appelée protéine de référence), qui est susceptible d'avoir une structure tertiaire similaire à la protéine cible. En général, deux protéines, qui partagent une certaine identité de séquence ($\geq 15\%$), sont considérées comme ayant une structure tertiaire similaire. Cette méthode nécessite d'abord la création d'un alignement de séquences primaires entre la protéine cible et la protéine de référence. Cet alignement et la structure tridimensionnelle de la protéine de référence sont ensuite utilisés pour générer des modèles par homologie de la protéine cible.

5.1 Alignement de séquences primaires

L'alignement des séquences de OtCPF1 ou OtCPF2 sur les séquences des protéines CPF a été réalisé grâce au logiciel d'alignement multiple ClustalW2 [204], disponible en ligne, notamment sur le site de l'European Bioinformatics Institute (EBI, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Ce premier alignement est optimisé à la main (ajustement manuel des alignements) en vérifiant qu'aucune ouverture n'existe entre les acides aminés impliqués dans les structures secondaires (hélice α ou feuillet β). Pour les protéines dont la structure tertiaire est inconnue, les structures secondaires ont été prédites à partir de leur structure primaire grâce à l'application PROF (<http://www.predictprotein.org>) [205, 206].

5.2 Structure tertiaire modélisée

Les modèles par homologie ont été réalisés par Laetitia Mony, doctorante dans l'équipe de Francine Acher, au sein du Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, à l'université Paris Descartes. Ils sont générés par l'application automatisée de modélisation comparative de MODELER 9.0 (DS Modeling 2.0; Accelrys, San Diego, CA) [207]. En ce qui concerne OtCPF1, le modèle est généré en utilisant les coordonnées de la photolyase (6-4) de la *Drosophila melanogaster* (Dm64) [92] et à partir de l'alignement optimisé des structures primaires de plusieurs protéines CPF. Le modèle généré pour OtCPF2 utilise la structure du cryptochrome DASH de *Arabidopsis thaliana* (AtCry3) [88] et l'alignement optimisé des structures primaires de plusieurs protéines CPF. Pour chaque protéine cible, trente modèles sont générés. La qualité structurale des modèles est tout d'abord évaluée grâce à la fonction densité de probabilité (appelée énergie PDF) de

MODELER. Cette fonction décrit les caractéristiques géométriques de la protéine modélisée. Plus l'énergie PDF est importante, moins la qualité structurale du modèle est bonne. Dans notre cas, parmi les trente modèles obtenus, les dix modèles ayant l'énergie PDF la plus petite ont été sélectionnés. La qualité des dix modèles sélectionnés est ensuite évaluée grâce à la fonction de score Profiles-3D (DS Modeling 2.0). Le score obtenu par cette fonction décrit, pour chaque acide aminé, la qualité de son environnement électrostatique dans la protéine. Ainsi, un acide aminé hydrophobe dans un environnement polaire aura un faible score Profiles-3D. Par contre un acide aminé chargé dans le même environnement aura un important score Profiles-3D. Le modèle ayant le meilleur score Profiles-3D est sélectionné. Les boucles de ce modèle sont ensuite raffinées avec MODELER : le programme génère, pour une boucle donnée, plusieurs conformations qui sont évaluées selon leur énergie PDF et leur score Profiles-3D, de la même façon que pour les modèles par homologie.

Les modèles par homologie ont été générés et optimisés en présence du chromophore sous forme réduite FADH_2 et, dans le cas de OtCPF2, en présence de la photoantenne MHF. Les modèles des protéines contenant le chromophore sous forme FAD_{ox} ou FADH^- ont été générés à partir des modèles de OtCPF1 et OtCPF2 contenant FADH_2 : les nombres d'oxydation et de protonation du chromophore ont été modifiés à la main, puis le chromophore et les résidus situés dans une sphère de 1 nm autour du chromophore ont été optimisés par minimisation d'énergie en utilisant le logiciel CHARMM [208] (D.S Modeling version 2.0).

5.3 Ancrage des photoantennes MHF et 8-HDF

L'ancrage moléculaire des photoantennes MHF et 8-HDF a été réalisé par l'application C-Docker (DS Modeling 2.0). Lors de l'opération d'ancrage (docking, en anglais), le récepteur est gardé fixe. Dans ce récepteur, l'expérimentateur place une sphère dont le centre définit le centre du site de liaison du ligand à ancrer. Ensuite, le logiciel génère dix conformations aléatoires des ligands à ancrer par la méthode de Monte Carlo. Les dix conformations sont ensuite placées dans le récepteur au niveau du centre de la sphère. Pour chaque conformation, différentes orientations sont ensuite générées en modifiant légèrement la conformation donnée autour du centre de la sphère. Le tout est ensuite optimisé par dynamique moléculaire, puis une minimisation d'énergie est réalisée. Les dix modèles présentant la plus faible énergie sont retenus.

Dans notre cas, nous avons défini le centre du site de liaison putatif du MHF dans OtCPF1 à partir de AtCry3 [88], protéine cristallisée en présence de cette photoantenne. Nous

avons superposé les structures de AtCry3 et OtCPF1, puis à partir de cette superposition la position du site de liaison putatif du MHF dans OtCPF1 a pu être aisément déduite. Le même protocole a été réalisé pour définir le site de liaison putatif du 8-HDF dans OtCPF1, en utilisant comme protéine de référence AnCPD [87].

**CHAPITRE VII : Photocycle ultrarapide et état
signalant du photorécepteur de *Blepharisma*
*japonicum***

Introduction

Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction générale, nous avons également travaillé sur les questions ouvertes par la thèse de Mathilde Mahet sur le photorécepteur appelé OBIP (OxyBlépharismine bInding Protein, en anglais) de la forme adaptée à la lumière du protozoaire cilié *Blepharisma japonicum*. Les études de Mathilde Mahet, réalisées dans le cadre d'une collaboration avec le groupe Lenci (Institut de Biophysique du CNR, Italie), avaient permis de montrer que OBIP existe sous deux formes, l'une dite non réactive (nrOBIP) avec un comportement semblable au chromophore isolé et une dite réactive (rOBIP) qui se désactive dans le régime picoseconde. Une nouvelle fonction biologique de photoprotection solaire mettant en jeu une réaction de transfert d'électron intramoléculaire caractérisée, avait été proposée pour expliquer un photocycle anormalement rapide, observé pour rOBIP, c'est à dire un retour à l'état fondamental en quelques centaines de picosecondes. Des expériences avec une résolution temporelle femtoseconde et un meilleur rapport signal sur bruit étaient nécessaires pour confirmer ce photocycle et caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu. Par ailleurs, excluant un état de ce photocycle comme l'état signalant de la réponse photophobique connue de *Blepharisma japonicum*, du fait des durées de vie trop courtes des états mis en jeu, il s'avérait nécessaire de chercher à caractériser les processus photochimiques plus lents potentiellement impliqués dans cette réponse. Nous avons donc essayé de répondre à ces questions en réalisant une étude de OBIP par spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde et de fluorescence picoseconde. Ces résultats seront résumés dans la première partie du chapitre.

Par ailleurs, M. Mahet avait démontré la spécificité du photorécepteur OBIP en montrant que sa photoréactivité ne pouvait pas être reproduite dans un complexe entre son chromophore OxyBP et l'albumine. Poursuivant la collaboration avec le groupe Lenci et avec T. Youssef (NILES, Égypte), nous avons également examiné le cas d'un complexe avec l' α -cristalline, sujet motivé par une comparaison avec le complexe : Hypéricine- α -cristalline intéressant la photothérapie dynamique. Ces travaux seront présentés dans la deuxième partie.

Comme le chromophore de OBIP appartient à la même famille de molécules que l'hypéricine, nous avons aussi travaillé sur la photophysique intrinsèque de cette molécule et d'un de ses dérivés : l'*O*-hexaméthoxyhypéricine. Ces travaux ont été réalisés en

collaboration avec C. Ley, ancien maître de conférence du groupe et seront décrits dans la troisième partie.

Ces travaux ont tous été publiés. Nous nous limiterons donc dans ce chapitre à présenter le contexte du sujet et à résumer brièvement les articles joints.

1 Photophobie du protozoaire *Blepharisma japonicum*

Blepharisma japonicum est un protozoaire cilié mesurant entre 150 μm et 500 μm et très sensible à la lumière. Il se déplace grâce à des cils vibratiles répartis de façon homogène sur la totalité de la cellule (cf. la Figure 1.1).

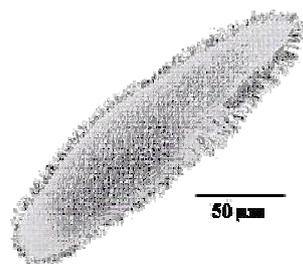


Figure 1.1 : Image SEM (Scanning Electron Microscopy, en anglais) de *Blepharisma japonicum* (*B. japonicum*) fournie par le Pr. Verni du département de biologie de l'université de Pise.

Kraml et Marwan découvrirent, en 1983, que *B. japonicum* présente deux réponses comportementales liées à une augmentation soudaine de l'intensité lumineuse : la photophobie et la photokinèse positive [209]. La photophobie est une réaction d'évitement déclenchée par un changement de luminosité. Et la photokinèse positive est une accélération photoinduite de la vitesse de déplacement. Sous irradiation lumineuse, *B. japonicum* s'arrête un instant puis nage rapidement en arrière en inversant le battement de ses cils [209]. L'organisme inverse ensuite de nouveau le battement de ses cils et reprend sa nage en avant dans une nouvelle direction (aléatoire) [210]. Ce processus se répète jusqu'à ce que la cellule regagne une zone sombre.

Dans son environnement naturel, *B. japonicum* est un organisme coloré rouge. Cette coloration est due à la présence d'un pigment appelé blépharismine (BP), représenté sur la Figure 1.2. Dans cette forme et sous irradiation faible, la cellule présente la réponse photophobique décrite ci-dessus à une irradiation continue (lumière blanche) faible ($I < 3 \text{ mW cm}^{-2}$). Sous irradiation moyenne, entre 3 mW cm^{-2} et 30 mW cm^{-2} et en présence de dioxygène, la BP contenue dans les cellules de *B. japonicum* se photooxyde lentement pour donner l'oxyblépharismine (OxyBP), représentée sur la Figure 1.2 [211]. OxyBP est un proche parent de l'hypéricine (Hyp, cf. la Figure 3.1), un photosensibilisateur puissant extrait du millepertuis. La photoconversion de BP en OxyBP donne à l'organisme une couleur bleue et lui confère une résistance beaucoup plus importante à l'irradiation. La cellule bleue n'est pas endommagée par une irradiation allant jusqu'à 1500 mW cm^{-2} pendant 5 min [212]. Dans cette forme *B. japonicum* continue à présenter une réponse photophobique.

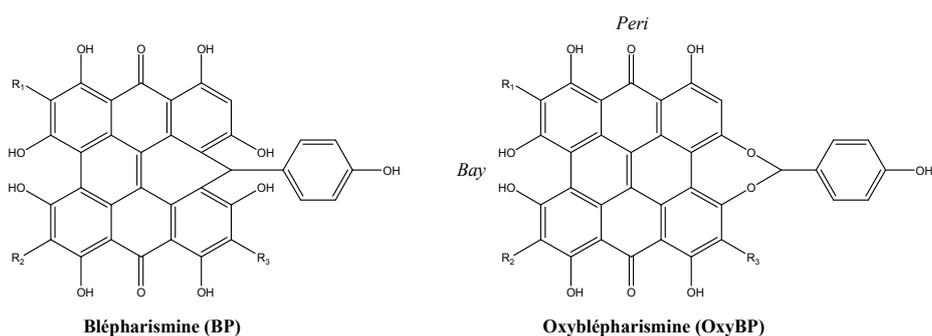


Figure 1.2 : Formules semi-développées des chromophores blépharismine (BP), oxyblépharismine (OxyBP). R₁, R₂, R₃ sont des groupes alkyles ou un hydrogène.

Lenci et al. ainsi que Matsuoka et al. montrèrent par spectroscopie d'action que le chromophore responsable de la photophobie des cellules rouges de *B. japonicum* est BP [213, 214] et celui des cellules bleues est OxyBP [215]. Il a par ailleurs été proposé que le photorécepteur est un complexe non covalent entre un chromophore, BP ou OxyBP, et une apoprotéine de 200 kDa [216]. Il faut noter que le protocole de Matsuoka et al., utilisé pour obtenir la chromoprotéine, ne permet d'isoler efficacement que le photorécepteur de la forme bleue de *B. japonicum*. Ce complexe est appelé OBIP (OxyBlepharismine binding Protein, en anglais). La structure primaire de la protéine n'est pas encore connue à ce jour.

Les premières études de la photoréactivité de OBIP par spectroscopie d'absorption transitoire sub-picoseconde furent réalisées par mon groupe d'accueil dans le cadre de la thèse de Mathilde Mahet, en collaboration avec le groupe Lenci [217-220]. Ils mirent en évidence un comportement dynamique multiexponentiel de OBIP, attribué à la coexistence de deux structures du photorécepteur : rOBIP « réactive » à l'origine d'une dynamique picoseconde et nrOBIP « non-réactive » se comportant comme OxyBP libre en solution avec une relaxation nanoseconde.

Pour rOBIP, ils observèrent en particulier une bande d'absorption transitoire spécifique, centrée à 685 nm, qui disparaît avec une dynamique biexponentielle de 4 ps et 56 ps. Ils montrèrent que cette bande transitoire est similaire à l'absorption qu'ils ont mesurée pour le radical OxyBP^{•+}. Ils proposèrent que la dynamique de rOBIP est liée à un transfert d'électron photoinduit sub-ps de OxyBP excitée vers un résidu protéique. Ils avancèrent la conjecture que la durée de vie de 4 ps pourrait correspondre à la déprotonation du radical OxyBP^{•+}. En 56 ps, le radical neutre déprotoné de OxyBP récupérerait un électron, voire un proton. Ils proposèrent que le photocycle de rOBIP est trop rapide pour pouvoir jouer un rôle

actif dans la chaîne de phototransduction sensorielle et qu'il ne servirait en fait qu'à évacuer un excès d'énergie lumineuse en agissant comme une « protection solaire », compatible avec l'idée que le photorécepteur est hébergé par le protozoaire dans sa forme adaptée à la lumière. Ils en conclurent que si la photophysique de OBIP est ainsi décrite, il faudrait s'orienter vers d'autres directions pour découvrir le photorécepteur réel du photomouvement de *B. japonicum*.

1.1 Nouvelle étude du photocycle rapide de rOBIP

Nous avons réalisé de nouvelles expériences d'absorption transitoire sur la chromoprotéine OBIP, avec une résolution temporelle inférieure à 100 fs. Afin de discriminer les espèces radicalaires produites (OxyBP^{•+} et autres espèces possibles) des états excités émissifs présents après excitation, des expériences de fluorescence résolue en temps (avec une caméra à balayage de fente ayant une résolution de ~10 ps) ont également été conduites. Afin de tester l'existence de transfert de proton éventuel, nous avons réalisé au laboratoire la deutération de la chromoprotéine (notée dOBIP). L'étude comparative a également été faite sur le chromophore libre (OxyBP) ainsi que sur le chromophore déprotoné en *peri* (notée dpOxyBP).

1.1.1 Les chromophores libres

Le comportement de l'état excité de OxyBP libre en solution est essentiellement décrit par les deux durées de vie lentes ($\tau_4 = 1,4 \pm 0,1$ ns et $\tau_5 = \infty$). La durée de vie de 1,4 ns est interprétée comme le déclin de l'état excité singulet alors que OxyBP revient à l'état fondamental ou passe à l'état triplet par croisement inter-système. Le plateau est attribué à la grande durée de vie à l'échelle nanoseconde de l'état triplet (bande différentielle caractéristique vers 635 nm [212, 218, 219]).

Les spectres d'absorption transitoire du chromophore déprotoné dpOxyBP ont une structure globalement semblable à ceux de OxyBP mais partiellement déplacée vers le rouge et sont élargis. L'analyse cinétique globale des données réalisée au moyen d'une somme de quatre exponentielles indique que le comportement de l'état excité de dpOxyBP est dominé par sa composante nanoseconde, $\tau_4 = 4,2 \pm 0,1$ ns (mal définie étant donné que notre fenêtre d'observation temporelle est limitée à 1,4 ns). La formation de l'état triplet de la molécule est possible mais n'a pas été démontrée.

1.1.2 OBIP

En ce qui concerne OBIP, les résultats de spectroscopies d'absorption stationnaire et d'excitation de fluorescence confirment l'idée précédemment émise [217-219] que nos échantillons de OBIP sont hétérogènes (cf. l'introduction) : les chromoprotéines absorbant dans le bord rouge du spectre d'absorption ont un rendement de fluorescence plus faible que celles qui absorbent dans le bord bleu. Nous avons par ailleurs constaté que le spectre de fluorescence de OBIP pourrait être décomposé en une superposition des spectres d'émission de OxyBP et de dpOxyBP. Cette observation, également faite pour dOBIP, suggère qu'il pourrait y avoir une déprotonation du chromophore de OBIP à l'état excité.

Nos expériences de spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde sur OBIP confirme la grande différence par rapport au chromophore libre dans l'aspect et la dynamique des spectres à partir de ~630 nm. Nous observons un massif presque plat au-delà de 680 nm pour un retard pompe-sonde de 100 fs qui s'affine en 1 ps en laissant apparaître un pic vers 683 nm. Ce pic continue de s'affiner et se déplace vers 678 nm en quelques dizaines de picosecondes. Conformément aux études précédentes nous retrouvons ici le fait que le spectre transitoire de OBIP aux temps longs tend vers celui de OxyBP en solution. Cette observation est en accord avec l'hypothèse d'hétérogénéité de l'échantillon [217-219] attribuant les spectres aux temps longs à une population particulière de chromoprotéines dites non réactives (nrOBIP).

Un ajustement global des données avec six composantes temporelles donne les durées de vie suivantes : $\tau_1 = 0,54 \pm 0,05$ ps, $\tau_2 = 3,7 \pm 0,4$ ps, $\tau_3 = 29 \pm 5$ ps, $\tau_4 = 133 \pm 19$ ps, $\tau_5 = 1,2 \pm 0,3$ ns et $\tau_6 = \infty$ (plateau imposé). La composante nanoseconde et le plateau sont attribués à l'espèce nrOBIP et les quatre composantes les plus rapides sont assignées à la population de chromoprotéines dites réactives (rOBIP). Si nous examinons les spectres de facteurs préexponentiels associés à la composante de 133 ps (spectre transitoire relaxé de rOBIP), nous retrouvons une forte ressemblance avec la signature spectrale du radical cation de OxyBP (pic centré à 678 nm), ce qui conforte la thèse du transfert d'électron intermoléculaire [217-219]. Tous les spectres d'absorption transitoire de rOBIP semblent cependant contenir une contribution d'émission stimulée vers 606 nm, en désaccord avec la formation d'espèces radicalaires, supposées à l'état fondamental. Réalisant des expériences de fluorescence résolue en temps sur OBIP, nous avons pu reconnaître sur le déclin de fluorescence toutes les composantes temporelles supérieures à 10 ps observées par absorption

transitoire. Cette constatation confirme donc la présence d'espèces émissives tout au long de l'évolution attribuée à la population rOBIP.

Nos expériences démontrent donc la présence d'un système ayant simultanément une signature spectrale de radical cation et d'émission stimulée à tous les temps.

Afin de rationaliser ces résultats peu communs, nous avons fait appel à des résultats du groupe Mataga (Japon) sur les transferts de charge photoinduits dans les complexes par liaison hydrogène de systèmes π conjugués donneur-accepteur d'électron en solvant non polaire (cf. par exemple les références [221, 222]). Pour certains de ces systèmes, Martin et al. apportèrent la preuve de l'établissement d'un équilibre entre l'état localement excité (LE) du complexe et l'état à transfert de charge (TC) [223]. Miyasaka et al. proposèrent un modèle théorique pour lequel la coordonnée réactionnelle promouvant le transfert de charge est le déplacement du proton impliqué dans la liaison hydrogène [224, 225]. Sur cette base, nous proposons que, dans OBIP, un équilibre s'établisse entre l'état LE de OxyBP et un état TC. Ceci permettrait d'expliquer la présence simultanée d'une espèce émissive (LE) et du radical cation de OxyBP produit par transfert de charge intermoléculaire. Afin d'expliquer les quatre déclinés de la dynamique de rOBIP, nous proposons que l'équilibre s'établisse avec la durée de vie de 0,54 ps et que ce premier équilibre évolue ensuite pour en donner un deuxième et un troisième avec les durées de vie de 3,7 ps et 29 ps. Nous proposons que cette évolution progressive serait due à une relaxation de la poche protéique autour de OxyBP induite par le transfert de charge. En retour cette relaxation modulerait la vitesse de recombinaison de charge. Notons que dans ce modèle, la recombinaison de charge achève de restituer rOBIP à son état fondamental en 133 ps. Nos résultats ne nous ont pas permis d'identifier la molécule jouant le rôle de partenaire dans la liaison hydrogène et d'accepteur d'électron. Il pourrait hypothétiquement s'agir d'un résidu histidine.

Nous avons répété les expériences sur un échantillon de OBIP dans un tampon deutéré (dOBIP) et avons constaté un effet isotopique cinétique (allongement de toutes les durées de vie). Cet effet est en accord qualitatif avec la théorie proposée par Miyasaka et al. dans laquelle la coordonnée réactionnelle est le déplacement du proton mis en jeu dans la liaison hydrogène [224].

Nous avons donc confirmé l'existence d'un photocycle rapide et avons proposé un mécanisme original. En accord avec la proposition initiale [219], ce mécanisme semble être un moyen relativement efficace d'éliminer un excès de photons absorbés par le système

(OBIP est extraite des cellules bleues adaptées à la lumière) et d'éviter l'accumulation d'espèces cytotoxiques (OxyBP est un photosensibilisateur, cf rappels sur *Blepharisma japonicum*).

1.2 État signalant de la photophobie

Comme il a été noté précédemment, le photocycle attribué à la population réactive de OBIP est apparemment trop rapide pour pouvoir produire un état signalant capable d'induire la photophobie de *B. japonicum*. Nous avons recherché cet état signalant dans une autre réponse photoinduite de OBIP. Il est utile de rappeler que plusieurs études supposent que la photophobie de *B. japonicum* est liée à une diminution du pH intracellulaire de l'organisme [226-228].

Nos résultats de spectroscopies d'absorption et d'excitation de fluorescence stationnaires confirment l'idée précédemment émise [217-219] que nos échantillons de OBIP sont hétérogènes (cf. l'introduction) : les chromoprotéines absorbant dans le bord rouge du spectre d'absorption ont un rendement de fluorescence plus faible que celles qui absorbent dans le bord bleu. Nous avons par ailleurs constaté que le spectre de fluorescence de OBIP pourrait se décomposer en une superposition des spectres d'émission du chromophore OxyBP et de sa forme déprotonée dpOxyBP. Cette observation, également faite pour dOBIP, suggère qu'il pourrait y avoir une déprotonation du chromophore de OBIP à l'état excité. Cette hypothèse est appuyée par notre étude par spectroscopie de fluorescence résolue en temps qui a mis en évidence un déclin de 4,4 ns en assez bon accord avec le déclin de 4,2 ns de dpOxyBP trouvé par absorption transitoire. Nous en déduisons la possibilité que ce soit la population dite non réactive de OBIP (nrOBIP) de durée de vie nanoseconde qui fasse l'objet de cette déprotonation et soit finalement à l'origine de la photophobie de *B. japonicum*.

Ces travaux ont été publiés dans l'article reproduit ci-dessous, dont la référence est : Brazard J., Ley, C. Lacombat, F. Plaza, P. Martin, M. M. Checcucci, G. Lenci, F., *J. Phys. Chem. B*, **2008**, 112 (47), 15182-15194.

Primary Photoprocesses Involved in the Sensory Protein for the Photophobic Response of *Blepharisma japonicum*

Johanna Brazard,[†] Christian Ley,[†] Fabien Lacomat,[†] Pascal Plaza,^{*,†} Monique M. Martin,[‡] Giovanni Checcucci,[‡] and Francesco Lenzi[‡]

UMR 8640 CNRS-ENS-UPMC, Département de Chimie, Ecole Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France, and Istituto di Biofisica del CNR, Via G. Moruzzi 1, 56100 Pisa, Italy

Received: July 2, 2008; Revised Manuscript Received: September 8, 2008

We present new femtosecond transient-absorption and picosecond fluorescence experiments performed on OBIP, the oxyblepharism-binding protein believed to trigger the photophobic response of the ciliate *Blepharisma japonicum*. The formerly identified heterogeneity of the sample is confirmed and rationalized in terms of two independent populations, called rOBIP and nrOBIP. The rOBIP population undergoes a fast photocycle restoring the initial ground state in less than 500 ps. Intermolecular electron transfer followed by electron recombination is identified as the excited-state decay route. The experimental results support the coexistence of the oxyblepharism (OxyBP) radical cation signature with a stimulated-emission signal at all times of the evolution of the transient-absorption spectra. This observation is interpreted by an equilibrium being reached between the locally excited state and a charge-transfer state on the ground of a theory developed by Mataga and co-workers to explain the fluorescence quenching of aromatic hydrogen-bonded donor–acceptor pairs in nonpolar solvents. OxyBP is supposed to bind to an as yet unknown electron acceptor by a hydrogen-bond (HB) and the coordinate along which forward and backward electron transfer proceed is assumed to be the shift of the HB proton. The observed kinetic isotope effect supports this interpretation. Protein relaxation is finally proposed to accompany the whole process and give rise to the highly multiexponential observed dynamics. As previously reported, the fast photocycle of rOBIP can be interpreted as an efficient sunscreen mechanism that protects *Blepharisma japonicum* from continuous irradiation. The nrOBIP population, the transient-absorption of which strongly reminds that of free OxyBP in solution, might be proposed to actually trigger the photophobic response of the organism through excited-state deprotonation of the chromophore occurring in the nanosecond regime. Additional femtosecond transient-absorption spectra of OxyBP and perideprotonated OxyBP are also reported and used as a comparison basis to interpret the results on OBIP.

1. Introduction

Studying the primary photoprocesses involved in biological photoreceptors is a fascinating field that teaches us on the various solutions evolved by Nature in order to convert light into a biological signal. Most of the known light-sensing proteins belong to one of the following six families: rhodopsins, phytochromes, xanthopsins, cryptochromes, phototropins, and BLUF proteins.^{1,2} The chromoprotein thought to be responsible for the step-up photophobic response of *Blepharisma japonicum*^{3–7} nevertheless belongs to a different family. *B. japonicum* is a red-colored photophobic ciliated protozoan, the biology of which was described by Giese.⁸ *B. japonicum* photoconverts into a blue, light-adapted, form upon continuous irradiation with weak intensities of white light (3–30 W m⁻²).^{5,9,10} Blue cells are particularly interesting because they still display the same phobic response as red cells⁹ and because a stable chromophore–protein complex could be extracted from them.^{6,7} This complex is made of a nonsoluble 200 kDa protein, noncovalently bound¹¹ to the chromophore identified as responsible for the photophobic response, namely oxyblepharism (OxyBP, see chemical structure in Scheme 1).^{4,5} OxyBP is a phenanthroperylene quinone derivative close to hypericin (Hyp, Scheme 1), a well-

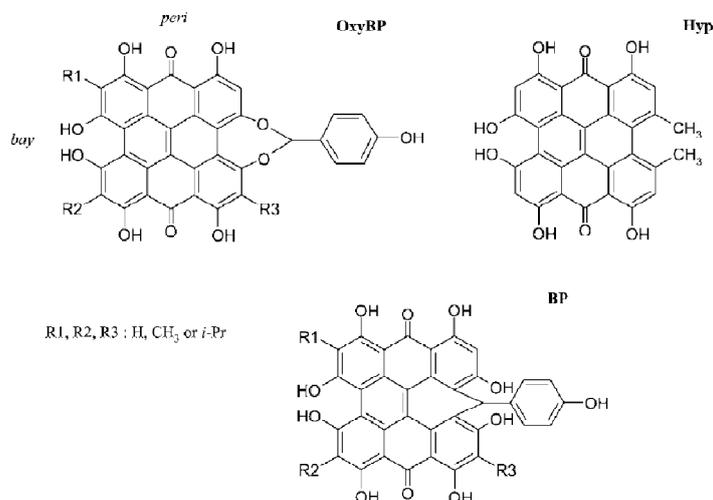
known photosensitizing agent.¹² OxyBP is also the photooxidized form of blepharism (BP, Scheme 1), which is the photoreceptor molecule of the dark-adapted (red-colored) form of *B. japonicum*.^{4,10} We will refer to the OxyBP–protein complex of *B. japonicum* as OBIP (OxyBlepharism Binding Protein). The primary structure of OBIP is still unknown. In a preceding series of papers, we reported comparative subpicosecond transient-absorption studies of OBIP and OxyBP.^{13–15} Electronically excited OxyBP in dimethyl sulfoxide (DMSO) was found to mainly decay in about 1 ns and to form the triplet state with a 25% yield. OBIP in a buffer solution exhibits a quite different and specific photoinduced behavior. First, the dynamics is much faster, displaying prominent 4 ps and 56 ps decay components over the entire experimental spectral range. A transient-absorption band centered around 680 nm was clearly observed for a pump–probe delay of 10 ps and was seen to vanish in the hundred picosecond time scale. After this decay, the transient species dominating the longer times was seen to be very similar to free OxyBP in solution. These facts were interpreted in terms of the existence of two classes of chromoprotein complex. A so-called reactive one (rOBIP) was thought to give rise to the specific spectral features in the 640–740 nm region, and to the fast 4 and 56 ps dynamics. A second, nonreactive, complex (nrOBIP) would mostly behave like the free chromophore in solution. This long-lived species is believed to be free to rotate in all directions inside the protein pocket, even if the value of

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +33 144322414. Email: Pascal.Plaza@ens.fr.

[†] UMR 8640 CNRS-ENS-UPMC.

[‡] Istituto di Biofisica del CNR.

SCHEME 1: Chemical Structures of Oxyblepharismine (OxyBP), Its Close Parent Hypericin (Hyp), and Its Natural Precursor Blepharismine (BP)^a



^a The five isospectral forms of OxyBP and BP only differ by their alkyl lateral substituents (Ri).⁴¹

the rotational correlation time indicates that the local viscosity is about ten times higher than in ethanol.¹³ We also showed that the distinctive 680 nm band bears a close similarity with the spectrum of the OxyBP radical cation.¹⁴ This analogy points toward electron transfer as the primary photoinduced process in OBIP, in agreement with the previous proposal of Angelini et al.¹⁶

Several issues nevertheless remained unsolved. The details of the charge transfer reaction dynamics were in particular not completely resolved. A precursor state (called X₁) was tentatively identified at very short times but retained some of the spectral feature of its, putatively charge-transferred, successor (Y₁, produced with a 4 ps lifetime). It was not clear if X₁ was the primary excited-state of OBIP or some intermediate in the pathway toward Y₁. On the other hand, the choice of excitation wavelength (605 nm) was such that the main vibronic band of the stimulated-emission signal was partly obscured by scattering of the pump beam. This shed some doubts on the ground versus excited-state nature of species Y₁.

The present paper provides new experimental data aimed at answering these questions. Femtosecond transient absorption spectroscopy, with enhanced time resolution and sensitivity was performed on OBIP in order to access the subpicosecond time scale; deuterated OBIP (dOBIP) was also studied. The excitation wavelength was slightly blue-shifted (560 nm for OBIP and 555 nm for dOBIP) in order to avoid pump-light scattering in the stimulated-emission region. Time-resolved fluorescence measurements were also carried out with a streak camera in order to identify emitting species along the overall kinetics. The observations will here be interpreted with the help of an improved model, and a tentative quantitative description will be proposed to support it. New elements concerning the issue of the relation between the excited-state behavior of OBIP and the photophobic response of *B. japonicum* will be given. In addition, several complementary measurements have been performed to calculate the fluorescence quantum yields of OBIP, dOBIP, and free OxyBP in aqueous solution (protonated and deprotonated, ordinary and deuterated). A comparison of the excited-state behaviors of protonated and deprotonated free OxyBP in aqueous solution is also given.

2. Materials and Methods

2.1. Samples Preparation. Red *Blepharisma japonicum* cells were grown in the dark at 23 °C in the presence of *Enterobacter aerogenes* as food supply. Blue (light adapted) cells were produced by in vivo photoconversion under a low intensity cold white lamp (below 10 W m⁻²) for a few days. Blue cells were washed, collected by low speed centrifugation, and resuspended in a 20 mmol L⁻¹ sodium cholate (NaCh) solution. The OBIP chromoprotein was purified by liquid chromatography of this preparation on a hydroxyapatite column.^{7,13,17} The protocol closely follows the one described by Checucci et al.,¹⁷ which proved to yield samples mainly containing the 200 kDa (SDS-PAGE determination) OBIP protein. The purity of our sample was not quantified. It was then concentrated by means of Pall (East Hills, USA) centrifugable membrane filters (30 kDa cutoff) in order to achieve an absorbance of ~0.85 at the absorption maximum (605 nm), over an optical path of 1 mm. The pH of the 0.2 mol L⁻¹ phosphate buffer, containing 10 mmol L⁻¹ NaCh, was adjusted at 7.4 (this buffer will be referred to as PBC, phosphate buffer with cholate).

Deuterated OBIP (dOBIP) was obtained by diluting a concentrated OBIP solution in deuterated phosphate buffer and reconcentrating it over centrifugable membrane filters. The procedure was repeated until the remaining ordinary water content was less than 1% vol/vol.¹⁸ In deuterated solution, the experimentally linear correlation between pD and pH reads as pD = pH + 0.4.^{19,20} In order to obtain similar acido-basic conditions as the ordinary buffer, pD of the deuterated phosphate buffer was adjusted at 7.8 (the pH meter was corrected for the isotope effect²¹). The absorbance of the final deuterated OBIP sample was ~0.7 at the absorption maximum (600 nm). Heavy water, 99.9 atom % D, was purchased from Aldrich (deuterated PBC will be noted dPBC).

Free chromophore (blepharismine) was extracted in acetone from dark-adapted (red) cells, dried, and photooxidized in vitro to OxyBP by irradiation for a few hours with a dim light (below 10 W m⁻²). The sample was finally purified by HPLC as previously described.²² To overcome the poor solubility of OxyBP in water, leading to the formation of polydispersed

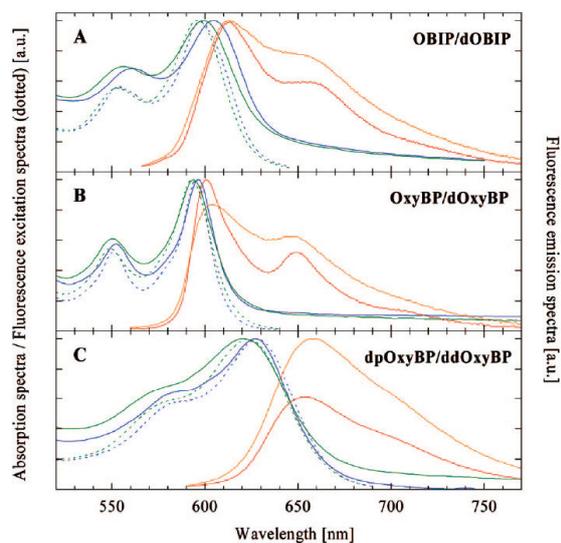


Figure 1. Steady-state absorption, fluorescence excitation, and fluorescence emission spectra of the following species in aqueous solutions: (A) OBIP and deuterated OBIP (dOBIP), (B) OxyBP and deuterated OxyBP (dOxyBP), (C) peri-deprotonated OxyBP (dpOxyBP) and peri-deuterated OxyBP (ddOxyBP). The absorption spectra of the ordinary species are plotted in blue and those of the deuterated species in green. The fluorescence excitation spectra are plotted in dotted lines, with the same color code. The fluorescence emission spectra are plotted in red for ordinary species and in orange for deuterated species. The detection (respectively excitation) wavelengths used for recording the fluorescence emission (respectively excitation) spectra are found in Table 1. All spectra have been normalized at their maxima, except for the weakest (at maximum) fluorescence emission spectrum of each view: the ratio of the two integrated fluorescence emission spectra is equal to the ratio of the fluorescence quantum yields of the corresponding species.

aggregates,²³ spectroscopic-grade ethanol (Merck) was added to the phosphate buffer at pH 7.4, containing 75 mmol L⁻¹ NaCh. The final ethanol content was 1% vol/vol (this solution will be referred to as PBCE, phosphate buffer with cholate and ethanol). The use of both NaCh and ethanol in these proportions reduces the amount of aggregates to a relatively low level, as shown by the correctly structured absorption spectrum (Figure 1B), to be compared to the absorption spectra of OxyBP in pure ethanol and in phosphate buffer saline without ethanol²³, although some nonfluorescent scattering background remains. The deuterated form of oxyblepharismine is noted dOxyBP. It was obtained by dissolving the free chromophore in a deuterated phosphate buffer at pD 7.8 containing 75 mmol L⁻¹ NaCh (this deuterated solution will be noted dPBC).

On the other hand, solutions of peri-deprotonated OxyBP (dpOxyBP) were prepared by setting the pH at 14.3 with a 2.1 mol L⁻¹ NaOH solution, containing 50 mmol L⁻¹ NaCh and 1% vol/vol EtOH (this aqueous solution will be referred to as WCE, water with cholate and ethanol). These conditions are in good agreement with previous studies on hypericin, a parent molecule (Hyp, see Scheme 1), situating the pK_a of the perihydroxyls of this very similar compound around 11.^{12,24,25} Since the pK_a of the bay hydroxyl of Hyp was reported around 2,²⁵ pH 14.3 ensures that most of the oxyblepharismine molecules should be bay monodeprotonated and peri-dideprotonated. It may be noted that the hydroxyl function of the lateral phenol of OxyBP, linked to the phenanthroperylene ring by two ether oxide groups, is also expected to be deprotonated at such pH (typical pK_a of a para-substituted phenol: 8–10²⁶). This effect

is nevertheless not expected to influence the spectroscopy of the molecule because the main aromatic ring is not conjugated to the lateral phenol. In the same way, peri-dedeuterated OxyBP (ddOxyBP) solutions were prepared in heavy water at pD ≈ 14.7, containing 75 mmol L⁻¹ NaCh (this deuterated solvent will be noted dWC).

2.2. Steady-State Spectroscopy. Optical absorption spectra were measured using a Safas UV-mc2 dual-beam spectrophotometer. Corrected fluorescence emission and excitation spectra were measured with a Jobin-Yvon Fluoromax-3 spectrofluorometer.

Fluorescence quantum yields were calculated²⁷ in aerated conditions both with rhodamine 101 (fluorescence quantum yield: $\Phi_{\text{fluo}} = 1$ in both deaerated and aerated solutions^{28,29}) and cresyl violet ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.54$ in the presence of dioxygen³⁰) as reference compounds. The values given in this work are the average of the two measurements. An estimate of the scattering background present on the absorption spectra was subtracted prior to correcting the sample absorbance at the excitation wavelength. The fluorescence excitation wavelengths were 560 nm for OBIP and dOBIP, 553 nm for OxyBP and dOxyBP, and 585 nm for dpOxyBP and ddOxyBP.

For the fluorescence excitation spectra, the emission wavelengths were fixed at 650 nm for OBIP, dOBIP, and OxyBP, 647 nm for dOxyBP, 700 nm for dpOxyBP, and 695 nm for ddOxyBP.

2.3. Transient Absorption Spectroscopy. Femtosecond transient absorption spectra were recorded by the pump-continuum-probe technique. The source was an amplified Ti:Sapphire laser system (Tsunami and Spitfire, Spectra Physics), delivering 50 fs pulses at 810 nm and 1 kHz. Part of this beam was used to run a 405 nm pumped noncollinear two-stage optical parametric amplifier (NOPA, Clark-MXR) in order to generate ~35 fs pump pulses (after compression), tuned at the secondary absorption maximum of the pigment (560 nm for OBIP, 555 nm for dOBIP, 552 nm for OxyBP in PBCE, and 590 nm for deprotonated OxyBP in WCE). An energy of 0.27 μJ (per pulse) of this beam was focused by a 90° off-axis parabolic mirror onto a 0.048 mm² section of the OBIP sample. Energies of 0.26, 0.33, and 0.18 μJ were focused onto a 0.35 mm² section for the dOBIP, OxyBP, and dpOxyBP experiments, respectively. Care was taken to check that this fluence lies in the linear regime and does not induce multiphotonic excitation such as those previously reported for Hyp¹¹ or *O*-hexamethoxyhypericin.³¹ The polychromatic probe beam (single-filament continuum extending from near-UV to near-IR nm) was generated by focusing a few μJ pulse⁻¹ of the 810 nm beam on a moving CaF₂ plate. The transmitted 810 nm wavelength was rejected from the probe by a 1 mm Schott BG40 bandpass filter. The continuum was split into a sample and a reference beam. The sample probe beam was focused by a 90° off-axis parabolic mirror onto the sample cell and crossed the pump beam at an angle of ~5°. The linear polarizations of the pump and probe beams were set at the magic angle. The sample solutions were contained in 1 mm thick fused-silica cuvettes. Photolysis was avoided by continuously moving the sample cell up and down; the steady-state absorbance of the samples was checked to remain constant during the experiments. The probe beam was delayed with respect to the pump beam by an optical delay line. Reference and sample probe beams were finally directly focused onto the entrance slit of an imaging spectrograph (Acton SP300i, 150 grooves/mm⁻¹, spectral resolution better than 2 nm). The spectra were recorded at 333 Hz on a CCD matrix detector (Spec-10 100B, Roper Scientific, 100 × 1340 pixels) and accumulated

TABLE 1: Spectral Positions of the Steady-State Absorption, Fluorescence Excitation, and Fluorescence Emission Maxima of OBIP, Deuterated OBIP (dOBIP), OxyBP, and Deuterated OxyBP (dOxyBP), Peri-Deprotonated OxyBP (dpOxyBP), and Peri-Dedeuterated OxyBP (ddOxyBP) in Aqueous Solutions (see Details in *Material and Methods*)^a

	OBIP	dOBIP	OxyBP	dOxyBP	dpOxyBP	ddOxyBP
absorption maximum (nm)	605.0	599.0	596.5	594.0	627.5	621.0
fluorescence excitation maximum (nm)	597.5	595.5	595.0	593.0	628.0	623.0
detection wavelength (nm)	<i>650</i>	<i>650</i>	<i>650</i>	<i>647</i>	<i>700</i>	<i>695</i>
fluorescence emission maximum (nm)	613.0	613.0	601.0	604.0	654.0	658.0
excitation wavelength (nm)	<i>560</i>	<i>560</i>	<i>553</i>	<i>553</i>	<i>585</i>	<i>585</i>
fluorescence quantum yield	0.023 ± 0.004	0.029 ± 0.005	0.098 ± 0.009	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.06	0.28 ± 0.08

^a The detection (resp. excitation) wavelengths used for recording the fluorescence excitation (resp. emission) spectra is indicated in italics under the fluorescence excitation (resp. emission) maximum. The fluorescence quantum yields of each species are given in the last line, with corresponding errors.

over 3000 pump shots. Two accumulated spectra were averaged for each pump–probe delay. The differential absorbance spectra (ΔA) were corrected from the chirp of the probe beam, arising from group velocity dispersion in the material media it passes through before reaching the sample. Since scattering of the pump beam obscures the signal in the spectral region corresponding to excitation, the corresponding part of the differential spectra was removed prior to data analysis and masked in the figures.

The complete set of experimental data was globally fitted to a sum of exponential functions by the following method. Singular value decomposition (SVD)³² was performed on the matrix containing the two-way chirp-corrected data (wavelength and time). In a first step, the kinetic vectors associated to the seven largest singular values (weighted by their corresponding singular values) were then simultaneously fitted to a sum of exponentials, convoluted by a Gaussian function representing the response function of the apparatus. The fwhm of the latter was found to be of the order of 100 fs. The presence of a cross-phase modulation (XPM) artifact during pump–probe overlap was empirically taken into account by adding the sum of the same Gaussian function and its time derivative. As this description of the XPM artifact is only approximate, we noted that the amplitude of any exponential component lying in the sub-500 fs regime could be slightly contaminated by remains of the incompletely fitted artifact. The difficulty was solved by running a second SVD analysis on a truncated data matrix, where times below 200 fs were removed. The kinetic vectors associated to the five largest singular values were then fitted by using parameters (width of the Gaussian function, time location of the pump–probe maximal overlap) obtained in the preceding step. The decay-associated difference spectrum (DADS) of each time component was finally calculated over the entire experimental spectral range.³³ The amplitude of the residue (2D-rms) was of the order of ± 0.3 mOD.

Note that such a multiexponential global approach is one convenient way to describe and quantify the transient behavior of the system. It also indirectly implies that the signal at all wavelengths may be explained by some (as yet undetermined) kinetic scheme, involving a limited number of transient species (compartments) linked by first order reaction rates. The knowledge of those rates as well as the intrinsic spectra associated to each compartment would lead to the lifetimes of the multiexponential fit. This procedure may face technical difficulties when the transient absorption spectra are found to display substantial time-dependent shift of the bands, such as those observed in solvation dynamics or cooling phenomena. In those cases, a discrete compartmental model is not adapted. However if the shifts are small as in some of the cases treated in this work (free pigments; the chromoprotein does not exhibit shifts), the procedure can converge and exhibit DADS which must be

interpreted in terms of the underlying continuous shift phenomenon.

2.4. Time-Resolved Fluorescence Measurements. For picosecond time-resolved fluorescence experiments, the excitation source was a homemade subpicosecond dye laser system described elsewhere.³⁴ The OBIP sample, held in a 1 mm cuvette, was excited with 4.5 μ J of the 600 fs pulses at 566 nm and at a repetition rate of 2.5 Hz. The back-emitted fluorescence was collected at $\sim 165^\circ$ from excitation, through a polarizer set at the magic angle. It was then analyzed with a streak camera (RGM-SC1, ARP-Optronis), the maximal time resolution of which is 4 ps. A 24 “wratten” Kodak filter was used to remove scattering of the excitation beam. All wavelengths greater than 580 nm were thereby integrated. A properly advanced reference pulse at 566 nm and the fluorescence decay were simultaneously recorded on the same camera image (at different positions along the entrance slit direction). An accumulated image was obtained by automatically superimposing the reference pulse of 1000–4000 single-shot images, in order to eliminate the jitter in triggering the camera sweep. The fluorescence decays were fitted to a sum of exponential functions, convoluted with a response function. The response function was assumed to be the sum of two Gaussians, the widths, time shift, and relative amplitudes of which being adjustable parameters. The main and short one is the genuine linear response function, which includes the fact that the photons emitted from different depths of the sample cuvette reach the camera at different times. With the fastest sweeping speed, the fwhm of this response was found to be 10 ps. The minor and long Gaussian empirically takes into account a background signal only observed with long-lived fluorescence. It may be an artifact due to the presence of remaining photoelectrons in the camera tube after the end of the sweep.

3. Results

The results are organized as follows: steady-state spectroscopy of all the compounds is first presented (Section 3.1), then transient absorption spectroscopy of the free pigments (Section 3.2) and of the chromoprotein (Section 3.3) are reported. The time-resolved fluorescence data on OBIP are shown last (Section 3.4).

3.1. Steady-State Spectroscopy. In this section we report steady-state absorption and fluorescence measurements complementing the already available data on OBIP and OxyBP.^{13,14,16,17,35} We present new measurements on ordinary and deuterated OBIP (dOBIP), ordinary and deuterated oxyblepharismine (OxyBP and dOxyBP, respectively), as well as peri-deprotonated and perideuterated OxyBP (dpOxyBP and ddOxyBP, respectively), in aqueous solutions (PBCE, dPBC, WCE, and dWC). Figure 1 displays the corresponding steady-state absorption, fluorescence excitation, and fluorescence emission spectra. The scat-

tering background observed in the red part of the absorption spectra is assigned to aggregated proteins in the case of OBIP and dOBIP, and to incompletely solubilized chromophore in the case of the OxyBP, dOxyBP, dpOxyBP, and ddOxyBP. Table 1 gives the spectral position of the maximum of each of those spectra, together with the detection (respectively excitation) wavelengths used for recording the fluorescence excitation (respectively emission) spectra.

The absorption spectra of the chromoprotein (OBIP, dOBIP) and the associated chromophore (OxyBP, dOxyBP) display a common vibrational progression with a principal and a secondary maximum, respectively situated around 600 and 560 nm (see Table 1 for exact values). The corresponding vibrational frequency lies in the range of 1300 cm^{-1} . The fluorescence emission spectra are mostly mirror images of the absorption spectra, with first and secondary maxima located around 610 and 650 nm respectively and an associated vibrational frequency in the range of 1100 cm^{-1} . The mirror image symmetry is best respected in the case of OxyBP in PBCE, as is known to be the case for OxyBP and Hyp in organic solvents.^{14,36} In the case of dOxyBP in dPBC, the vibrational progression of the fluorescence spectrum is much less clear than that of the absorption spectrum: the main peak is significantly broadened on its red side and the minimum between the two maxima (634 nm) is shallower. For OBIP in PBC, a similar although less pronounced trend can be seen with a shallower minimum at 642 nm as compared to the absorption spectrum. The effect is clearer as one compares the fluorescence emission spectrum of OBIP to its fluorescence excitation spectrum. The fluorescence/absorption dissymmetry is manifest in the case of dOBIP in dPBC, the main fluorescence peak being broadened on its red side and the secondary maximum being reduced to a shoulder.

The absorption spectrum of dpOxyBP is red-shifted by 31 nm as compared to that of OxyBP while the shift of the fluorescence spectrum is 53 nm. Similar values are observed for ddOxyBP as compared to dOxyBP.

It is worth noting that deuteration induces a slight blue shift (by a few nanometers) of the absorption and fluorescence excitation spectra, while the fluorescence emission spectrum either does not shift or slightly shifts toward the red. As noted above, deuteration also noticeably broadens the structure of the fluorescence emission spectrum of OxyBP and OBIP.

Both the absorption and fluorescence spectra of OBIP are red-shifted by 8.5 and 12.0 nm, respectively, as compared to those of OxyBP and significantly broadened. It is interesting to note that the fluorescence excitation spectrum of OBIP is significantly narrowed and blue-shifted as compared to the corresponding absorption spectrum. One may appreciate from Figure 1 that the removal of the scattering background in the fluorescence excitation spectrum may slightly contribute to the observed blue shift but cannot account for all of it. This observation indicates that the red edge of the absorption spectrum of OBIP yields a weaker fluorescence than the blue edge.

Fluorescence quantum yields (average value calculated with rhodamine 101 and cresyl violet as reference compounds) are given in the last line of Table 1. The fluorescence quantum yield of OBIP (2.3%) is smaller than that of OxyBP (9.8%) by a factor of 4, in qualitative agreement with previous determinations^{14,17} and the existence of specific fast deactivation processes in OBIP.^{13,14} The fluorescence quantum yield of the corresponding deuterated species are found to be somewhat larger (2.9% for dOBIP and 15% for dOxyBP), the dOBIP to dOxyBP fluorescence yield ratio being of the order of five. Significantly larger

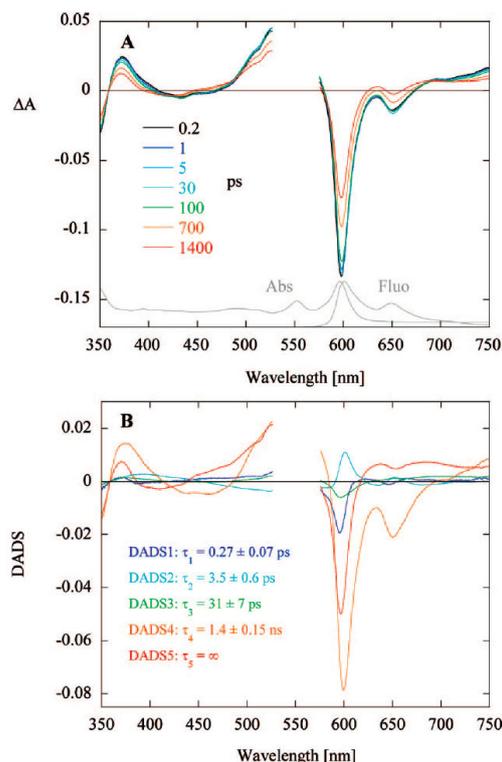


Figure 2. (A) Overview of the transient absorption spectra of solution of OxyBP in PBCE, excited at 552 nm, at a few selected pump-probe delays between 0.2 ps and 1.4 ns. The steady-state absorption and fluorescence spectra are reminded in gray line at the bottom of the graph. (B) Decay-associated difference spectra (DADS) attached to each of the five time components found in the global analysis of the transient absorption spectra.

fluorescence quantum yields were measured for the deprotonated/dedeuterated free chromophore (15.1% for dpOxyBP and 27.6% for ddOxyBP).

3.2. Transient Absorption Spectroscopy of OxyBP and dpOxyBP. Figure 2A displays an overview of the transient absorption spectra of an aqueous solution of OxyBP (containing 75 mmol L^{-1} NaCh and 1% vol/vol ethanol to solubilize the molecule at pH 7.4), excited at 552 nm, at a few selected pump-probe delays between 0.2 ps and 1.4 ns. As previously reported with a lower time resolution for OxyBP and Hyp in DMSO¹³ (and similarly for Hyp in DMSO¹¹), one observes relatively little spectral evolution in the subns regime. The sharp negative peak centered at 598 nm corresponds to the overlap of the main bleaching and the main stimulated-emission bands. The secondary bleaching minimum (~ 550 nm) is hidden in the region that was masked because of the pump beam scattering while the secondary stimulated-emission minimum is clearly apparent at 650 nm. The start of an additional bleaching band is detected below 360 nm. Two positive maxima are identified around 372 and 525 nm, which arise from the overlap of the above-mentioned negative bands and a broad transient absorption continuum, extending over most of the experimental spectral range.

Upon careful examination one sees a very slight red shift (~ 0.5 nm) of the two negative bands in the first few picoseconds. In the subnanosecond regime the decay of the excited-state spectrum appears mostly homothetic, although at 1.4 ns a growth of a positive signal is readily visible at 634 nm. A couple

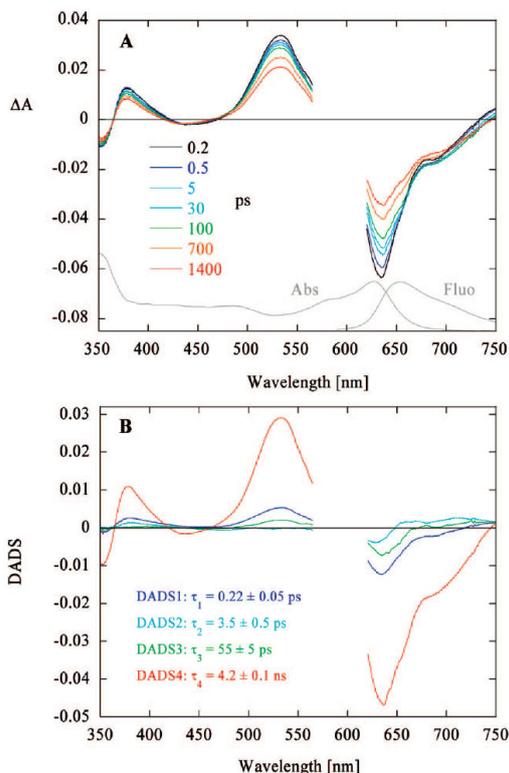


Figure 3. (A) Overview of the transient absorption spectra of solution of peri-deprotonated OxyBP in WCE, excited at 590 nm, at a few selected pump-probe delays between 0.2 ps and 1.4 ns. The steady-state absorption and fluorescence spectra are reminded in gray line at the bottom of the graph. (B) Decay-associated difference spectra (DADS) attached to each of the four time components found in the global analysis of the transient absorption spectra.

of isosbestic points (414, 489, and more unclearly around 703 nm) are observed at long times. Since their differential absorbance values are different from zero (trivial case arising from the decay of a single excited-state to the ground state), they most likely reveal the formation of a long-lived species.

The global analysis of the data reveals four exponential components followed by a plateau. The lifetimes of the exponentials are the following: 0.27 ± 0.07 ps, 3.5 ± 0.6 ps, 31 ± 7 ps, 1.40 ± 0.15 ns (standard errors as provided by the software (Origin 7.0) used for nonlinear fitting of the SVD kinetic vectors). Figure 2B shows the decay-associated difference spectra (DADS), that is, the preexponential factor spectra associated to each time component.

The transient absorption spectra of peri-deprotonated OxyBP in WCE (at $\text{pH} \approx 14.3$) after excitation at 590 nm are represented in Figure 3A. The overall spectral structure reminds that of OxyBP in WCE with a large red shift and broadening of the bleaching and stimulated-emission bands, as expected from the steady-state spectra. The main bleaching and stimulated-emission merged band appears at 635 nm and a stimulated-emission vibronic structure is visible as a shoulder around 690 nm. The transient-absorption bands seen at 378 and 532 nm are quite similar to the corresponding one of OxyBP. The global decay of the spectra is slower than for OxyBP and does not involve much changes of shape in the ns/subns regime. During the first 100 ps, some changes are nevertheless visible above 650 nm. The signal decreases on the blue side of the steady-

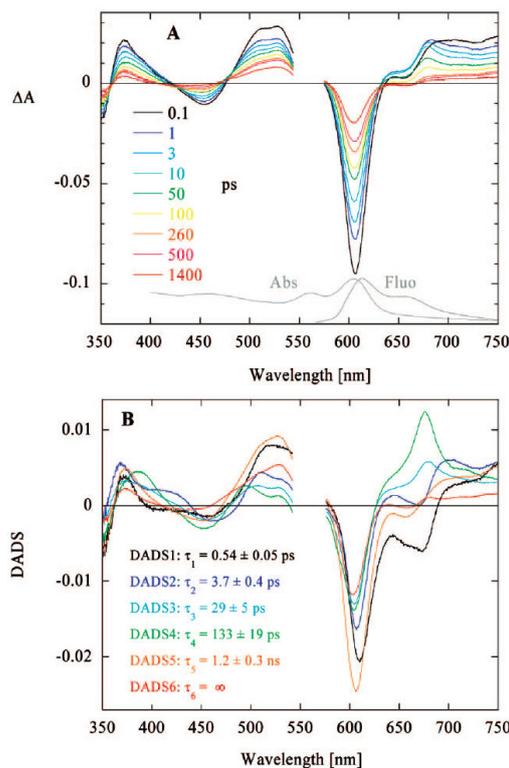


Figure 4. (A) Overview of the transient absorption spectra of solution of OBIP in PBC at pH 7.4, excited at 560 nm, at a few selected pump-probe delays between 0.1 ps and 1.4 ns. The steady-state absorption and fluorescence spectra are reminded in gray line at the bottom of the graph. (B) Decay-associated difference spectra (DADS) of the six time components found in the global analysis of the transient absorption spectra.

state fluorescence spectrum while it rises of the red side. The signal remains nearly constant around 662 nm.

As far as kinetic analysis of the data is concerned, the best fit would involve four exponential components followed by a plateau. However, the slowest component of such a fit is so slow (3.4 ns), as compared to our observation window, that its DADS and that of the plateau are ill-defined. We therefore reduced the fitting function to a sum of four exponentials. The lifetimes are the following: 0.22 ± 0.05 ps, 3.5 ± 0.5 ps, 55 ± 5 ps, 4.2 ± 0.1 ns. Figure 3B displays the corresponding DADS. It must however be kept in mind that the 4.2 ns component could in fact be the average of a somewhat shorter decay (3–4 ns) followed by a plateau.

3.3. Transient Absorption Spectroscopy of OBIP and dOBIP. Figure 4A plots a selection of transient-absorption spectra of OBIP, after excitation at 560 nm, for pump-probe delays lying between 0.1 and 1400 ps. It is most interesting that the present experimental setup allows the detection of new spectro-dynamic features, as compared to previously published results,^{13,14} at very short times (<1 ps) and provides a substantially enhanced S/N ratio over the entire spectral and temporal range. We confirm here that the transient spectra of OBIP display unique both temporal and spectral characteristics. Although their overall shape reminds that of free OxyBP with a large bleaching and stimulated-emission merged peak at 606 nm and transient-absorption bands at 373 and 528 nm, a specific behavior is in particular observed in the 630–750-nm range. At 0.1 ps, a nearly flat transient-absorption band extends from

688 to 750 nm, and the sharp short-wavelength edge of it is most likely arising from the secondary peak of the stimulated-emission signal. This band rapidly evolves in about 1 ps and produces a local maximum at 683 nm which further develops into a well-defined peak at 678 nm in some 10 ps. This fast evolution is accompanied by a decay of the whole spectrum below 635 nm. This decay is however not homothetic, as for example revealed by the presence of a nontrivial ($\Delta A \neq 0$) temporary isosbestic point at 482.5 nm, or by the blue shift (~ 3 nm) of the local bleaching minimum at 455 nm. Subsequently, in about 500 ps the 678 nm peak completely disappears while a net gain band appears at 655 nm. At the same time, the major bands further decay. The evolution is again nonhomothetic; the bleaching feature at 453 nm tends to vanish and the transient-absorption band that initially displays two comparable peaks at 510 and 528 nm tends to favor the 528 nm one with respect to the other.

Global analysis of the data is best performed with five exponential components and a plateau. The lifetimes of the exponentials are the following: 0.54 ± 0.05 ps, 3.7 ± 0.4 ps, 29 ± 5 ps, 133 ± 19 ps, 1.2 ± 0.3 ns. Figure 4B gives the corresponding DADS. As one normalizes DADS1 to DADS5 at the maximum of the main negative peak (not shown), one observes that this band most probably contains a stimulated-emission contribution on its long wavelength side in all five cases. This suggests that an emitting species decays with each of these time components, which could not be ascertained in previous works on this subject. This conclusion is further confirmed in Section 3.4 where the results of time-resolved fluorimetry will be presented. It can also be noted that bleaching is also contributing on the short wavelength side of the main negative band of each of the five time components, indicating that ground state recovery involves all those exponentials.

The transient-absorption spectra of a deuterated OBIP sample (dOBIP), that is, OBIP in deuterated PBC, were also recorded with femtosecond excitation at 555 nm (Figure 5A). These spectra essentially show the same type of spectro-temporal behavior as the ones of OBIP, in particular with the ultrafast growth of a positive band around 676 nm which subsequently decays in the subnanosecond regime. The overall evolution rates are nevertheless substantially reduced, as confirmed by global analysis. The complete set of data is here best described by the sum of six exponentials followed by a plateau. The corresponding lifetimes are the following: 0.18 ± 0.04 ps, 1.1 ± 0.1 ps, 6.8 ± 0.6 ps, 47 ± 13 ps, 184 ± 33 ps, 3.5 ± 6 ns. The last component and subsequent plateau are obviously not well determined because of the limited observation window our experiment (1.4 ns). However we did not simplify the fitting function to six exponentials without a plateau because the present fit allows an approximate one-to-one correlation of the DADS of dOBIP (Figure 5B; the DADS of the plateau was omitted) to those of OBIP (Figure 4B). It thus appears that the 0.18 and 1.1 ps components of dOBIP should be compared to the 0.54 ps component of OBIP. Similarly the 6.8 ps, 47 ps, 184 ps, and 3.5 ns components of dOBIP should correspond to the 3.7 ps, 29 ps, 133 ps, and 1.2 ns components of OBIP, respectively (see Table 2).

3.4. Time-resolved Fluorescence Spectroscopy of OBIP.

Figure 6 displays spectrally integrated fluorescence decays of a solution of OBIP in PBC, after 600 fs excitation at 566 nm, detected by a streak camera. The three kinetic traces correspond to three sweeping rates with increasing observation time window and decreasing time resolution. The decays were globally fitted to the sum of five shared exponentials, each trace involving

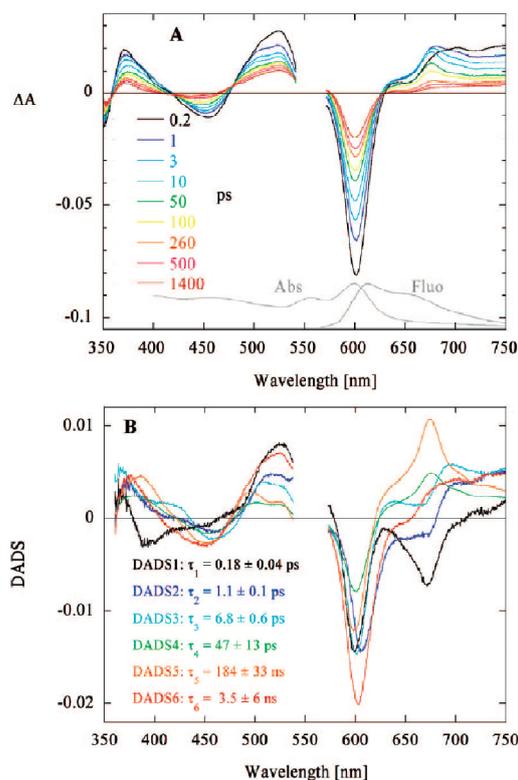


Figure 5. (A) Overview of the transient absorption spectra of solution of dOBIP in dPBC at pH 7.8, excited at 555 nm, at a few selected pump-probe delays between 0.2 ps and 1.4 ns. The steady-state absorption and fluorescence spectra are reminded in gray line at the bottom of the graph. (B) Decay-associated difference spectra (DADS) of the six exponential components found in the global analysis of the transient absorption spectra (the ill-defined plateau was omitted).

convolution by its own response function. The best fit includes a short component that could not be resolved (<10 ps) and the following four subsequent lifetimes: 21 ± 1 ps, 112 ± 1 ps, 891 ± 16 ps, 4.4 ± 0.1 ns. The relative weights of the four resolved components are: 15.5%, 15.8%, 29.1% and 39.6%, respectively.

The unresolved short component could well correspond to the 3.7 ps detected by transient-absorption spectroscopy (Trabs). The 21.3 and 112 ps fluorescence components are reasonable matches for the 29 and 133 ps Trabs components, respectively. The 891-ps and 4.4-ns fluorescence components are likely to be related to the 1.2-ns component and plateau found by Trabs, although a one-to-one correspondence may not be ascertained. Rather large errors are indeed attached to nanosecond Trabs components because of the limited observation window (three long time components might for example appear as two intermediate ones). Table 2 summarizes the correspondence between Trabs and time-resolved fluorescence data. The fluorescence experiments thus confirm that the second to fifth Trabs components involve emitting species (see section 3.3).

4. Discussion

In this discussion, the excited-state behaviors of the free pigments, protonated and peri-deprotonated, are first compared (Section 4.1) before examining issues related to the OBIP chromoprotein. The following questions are then treated:

TABLE 2: Comparison of the Exponential Time Components Obtained by Analysis of the Transient-Absorption (Trabs) Spectra of OBIP and dOBIP^a

time component	transient absorption			time-resolved fluorescence
	OBIP	dOBIP	τ_D/τ_H	OBIP
time1 (ps)		0.18 ± 0.04		
time2 (ps)	0.54 ± 0.05	1.1 ± 0.1	2.0 ± 0.4	
time3 (ps)	3.7 ± 0.4	6.8 ± 0.6	1.8 ± 0.4	<10
time4 (ps)	29 ± 5	47 ± 13	1.6 ± 0.7	21 ± 1
time5 (ps)	133 ± 19	184 ± 33	1.4 ± 0.5	112 ± 1
time6 (ns)	1.2 ± 0.3	3.5 ± 0.6	2.9 ± 0.6	0.891 ± 0.016
time7 (ns)				4.4 ± 0.1

^a The one-to-one correspondence was established on the basis of the spectral similarity of the DADS. The column entitled τ_D/τ_H quantifies the observed kinetic isotope effect as the ratio of the deuterated to ordinary homologous lifetimes. The last column gives the lifetimes coming from the analysis of the time-resolved fluorescence of OBIP, displayed in tentative correspondence with the Trabs data.

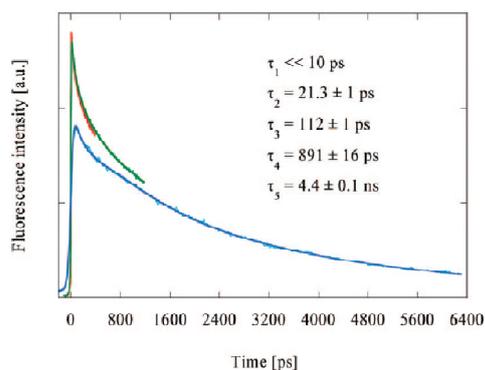


Figure 6. Spectrally integrated fluorescence decays of a solution of OBIP in PBC, after 600 fs excitation at 566 nm, detected by a streak camera. The three kinetic traces correspond to three sweeping rates. The decays were globally fitted to the sum of five exponentials. The best fit includes a short unresolved component (<10 ps) and the following four lifetimes: 21.3 ± 1 ps, 112 ± 1 ps, 891 ± 16 ps, 4.4 ± 0.1 ns.

heterogeneity of the sample (Section 4.2), excited-state deprotonation (Section 4.3), and primary photoprocesses (Section 4.4). The relevance of our findings to the photophobic response of *Blepharisma japonicum* is discussed last (Section 4.5).

4.1. Excited-State Behavior of Free OxyBP and dpOxyBP.

It is apparent from Figure 2B that most of the excited-state behavior of OxyBP in PBCE is accounted for by the nanosecond decay and by the plateau. The 1.4 ns component is compatible with reported values for the OxyBP excited-state lifetime in DMSO (1.3,¹⁶ 1 ns¹³) or in ethanol (1.6,¹⁶ 1.8 ns¹³). The difference spectrum of the long-lived species strongly reminds that of the triplet state of OxyBP with its characteristic positive signal around 635 nm.^{14,15,35} A slight negative dip nevertheless remains around 650 nm. It is probably due to insufficient discrimination between the 1.4 ns decay, bearing stimulated-emission at 650 nm, and the plateau. Our observation window was indeed limited to a maximum pump-probe delay of 1.4 ns. We therefore conclude that the long-lived species formed in 1.4 ns is the triplet state of OxyBP.

The three short lifetimes of OxyBP in PBCE are quite minor components, which we interpret as a combination of effects. The 0.27 and 3.5 ps components are related to the above-mentioned very slight red shift of the two negative bands (Figure 2A). This phenomenon, which probably arises from a dynamic Stokes shift of the stimulated-emission bands, is interpreted as the relaxation of the solvation cage, which is the case of this sample is some unknown assembly of water, phosphates, sodium cholate, and ethanol molecules, upon excitation of the solute.

For comparison, solvation dynamics in water involves three fast components below 900 fs³⁷ and the average solvation time of ethanol is 16 ps.³⁸ The very small amplitude of the solvation dynamics is consistent with the weak solvatochromic behavior of OxyBP.¹⁴ The third lifetime, 31 ps, might be compared to a similar weak component observed in the case of free OxyBP in DMSO (15 ps¹⁵) and previously assigned to a slight change of the nonplanar chiral conformational of the molecule in the excited state.^{12,39}

As far as dpOxyBP in WCE is concerned, the main excited-state decay occurs in 4.2 ns. This value is not precisely determined due to our observation window being limited to 1.4 ns. It is in fact possible, as some of our fits suggest, that a long-lived species would be produced in a slightly shorter time range of ca. 3–4 ns. As for OxyBP, the shorter time components (0.22, 3.5 and 55 ps) have rather small amplitudes (Figure 3B) and are associated to what appears as a red shift of the stimulated-emission signal (Figure 3A). We therefore tentatively assign them to solvation dynamics in the heterogeneous WCE medium. It may be noted that peri-deprotonation of OxyBP was achieved with 2.1 mol L⁻¹ NaOH. The presence of such a large ion concentration might add longer time components to the overall solvation response.⁴⁰ It cannot also be excluded that the 55 ps component is related to a structural relaxation of dpOxyBP, such as the one that was postulated for Hyp (60 ps in ethanol, 80 ps in DMSO).¹¹

4.2. Ground-State Heterogeneity of OBIP. We have seen in Section 3.1 that the strong blue shift and narrowing of the fluorescence excitation spectrum of OBIP as compared to its absorption spectrum is not observed in the case of the free chromophore in solution, despite of the spectral similarity of the two systems. Let us also recall that the fluorescence quantum yield of OBIP is smaller than that of OxyBP by a factor of 4. It is therefore quite unlikely that the binding of OxyBP to its natural protein partner opens up new intrinsic deactivation channels, yielding weaker fluorescence emission upon excitation on the low energy edge of the absorption spectrum. It is much more likely that the OBIP sample is actually heterogeneous and that the red part of the absorption spectrum corresponds to a population of chromoprotein undergoing a more efficient quenching of the fluorescent state.

This interpretation is in good agreement with the transient-absorption measurements on OBIP. It is indeed found that the spectrum observed at long times strongly reminds the one of free OxyBP in solution, with a net gain band around 655 nm and a small, flat bleaching contribution in the region of 440 nm. The corresponding lifetimes (1.2 ns for OBIP and 1.4 ns for OxyBP in PBCE) are also similar. Comparable findings were previously reported^{13–15} and interpreted in terms of the hetero-

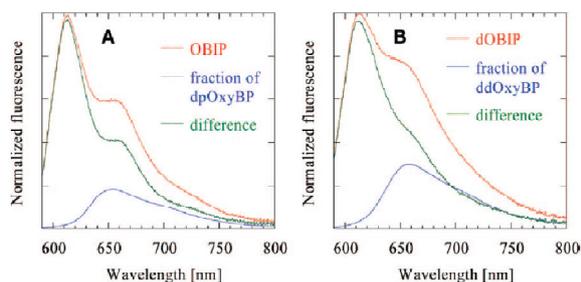


Figure 7. (A) Tentative decomposition of the steady-state fluorescence emission spectrum of OBIP in PBC (red) into the sum of a fraction of peri-deprotonated OxyBP emission (dpOxyBP in WCE, blue) and an OxyBP-like emission (difference spectrum in green). (B) Same procedure applied to dOBIP in dPBC (red) using the fluorescence spectrum of ddOxyBP in dWC (blue).

geneous composition of the OBIP sample. Two populations were then postulated: a reactive one (rOBIP), undergoing a fast photocycle and a nonreactive population (nrOBIP) mostly behaving like the free chromophore in solution. Photodissociation (excited-state decomplexation) was ruled out by energy arguments based on the small steady-state Stokes shift of the OBIP system.¹⁴ The fractions of rOBIP and nrOBIP were previously estimated to 60 and 40%, respectively.¹⁵ Our present results support this view and we assign to rOBIP the first four, subns time components of the global analysis (DADS1 to DADS4) and to nrOBIP the 1.2 ns decay and the plateau (DADS5 and DADS6). The estimation of the fractions of rOBIP and nrOBIP was not repeated here because our method relied upon the measurement of the pure bleaching signal around 560 nm, which is obscured by pump scattering in the present experiments. As we previously suggested,¹⁴ this heterogeneity could in particular arise from different configurations of the chromophore within the protein, such as different binding sites, different interactions between the protein and the five isospectral forms of OxyBP²¹ or different orientations of OxyBP inside the protein pocket. Different protein conformations or natures could also be involved but no experimental proof of any of those hypotheses is available to us at the moment.

4.3. Excited-State Deprotonation of OBIP. It is quite intriguing that the fluorescence emission spectrum of OBIP displays a less pronounced vibrational structure than the corresponding fluorescence excitation spectrum, with a shallower minimum between the two emission maxima and smaller intensity ratio of the first to second maxima. This dissymmetry is much more obvious for dOBIP. One can note that the fluorescence emission spectrum of dpOxyBP in WCE displays a broad maximum in the same spectral region as the secondary maximum of OBIP's fluorescence (around 650 nm). We thus may tentatively propose that the fluorescence emission spectrum of OBIP is in fact the superposition of two contributions: a conveniently red-shifted and broadened OxyBP-like emission and an associated peri-deprotonated OxyBP emission. The same hypothesis would also hold for dOBIP with an even larger contribution of the emission of the dedeuterated species. In order to show in a qualitative way that such a decomposition could be possible, we subtracted from the (normalized) emission spectrum of OBIP in PBC a fraction of the (normalized) emission spectrum of dpOxyBP in WCE. The fraction of dpOxyBP emission was loosely adjusted in such a way that the difference spectrum may appear as an improved mirror image of the fluorescence excitation spectrum (see Figure 7A). The same procedure was performed on dOBIP's fluorescence with

the help of the emission spectrum of ddOxyBP in dWC (Figure 7B). We stress on the fact that Figure 7 is not presented as a proof but rather as a visual guide supporting our hypothesis. It is also true that the real fluorescence spectrum of OBIP putatively bearing a peri-deprotonated chromophore would likely be somewhat different from the emission spectrum of dpOxyBP in WCE used here. Since the fluorescence excitation spectra of OBIP and dOBIP do not reveal the presence of peri-deprotonated species in the ground state, the interesting consequence of our proposal is that the occurrence of the peri-deprotonated emission would arise in both OBIP and dOBIP cases from an excited-state deprotonation process.

It was indeed shown in Section 3.1 that the absorption and fluorescence spectra of dpOxyBP are red-shifted as compared to those of OxyBP, the same being true for ddOxyBP as compared to dOxyBP. Such a red shift is assignable to a lowering of the perihydroxyl pK_a in the excited state. Application of the Förster cycle²⁷ yields $\Delta pK_a = pK_a^* - pK_a = -2.3$ for OxyBP and -2.2 dOxyBP, the 0–0 transition location being estimated by the average wavenumber position of the absorption and fluorescence maxima. Such values are similar to the ΔpK_a value of -2.7 reported for the perihydroxyl groups of Hyp by Eloy et al.²⁴ It may be argued that since the pK_a of the OxyBP perihydroxyl groups is situated around 11 in solution (reported value for Hyp^{24,25} and blepharismine⁴²), one would expect the corresponding excited-state pK_a in the range of 8–9. In order to explain that some excited-state deprotonation of OBIP occurs at pH 7.4, one would therefore need to hypothesize that the effective perihydroxyl pK_a of OxyBP is somewhat reduced to a lower value upon binding to the protein, as is for example the case for the phenol group of the chromophore covalently bound to the Photoactive Yellow Protein.⁴³ On the other hand, in the absence of photoinduced deprotonation of OxyBP in solution, the increase of its fluorescence yield upon deuteration (Figure 1B and Table 1) remains to be understood. One might think that this isotope effect has the same origin as that observed for the deprotonated form dpOxyBP. Table 1 indeed shows that the fluorescence yield of ddOxyBP is almost twice larger than that of dpOxyBP. Similar findings were in particular reported for xanthene dyes.⁴⁴ Deuteration of the solvent hydroxyl groups (water, alcohols) was found to reduce the internal conversion rate constant of the deprotonated dye by about 1.6, revealing the role of the solute–solvent hydrogen-bonding interaction in the non radiative relaxation. The present observation might thus indicate that hydrogen-bonding plays a role in the nonradiative relaxation of OxyBP in solution.

An additional experimental element in favor of excited-state deprotonation of OBIP is the occurrence of a substantial (39.6%) 4.4 ns time component in the integrated fluorescence decay reported in Section 3.4. Such a long lifetime does not match the excited-state decay time of OxyBP in PBCE provided by the present transient absorption experiment (1.4 ns) nor the previously reported fluorescence lifetimes of OxyBP in organic solvents (between 1 and 1.8 ns).^{13,16} It is on the other hand much more comparable to the excited-state decay time of peri-deprotonated OxyBP in WCE measured by our transient absorption setup, that is, 4.2 ns. Since the transient-absorption spectra of OBIP do not explicitly reveal the spectral features of deprotonated OxyBP within the 1.4 ns time window of the experiment, it may be supposed that excited-state deprotonation of OBIP would likely occur in the nanosecond time scale. The transient-absorption experiment evidenced a component of 1.2 ns while time-resolved fluorescence pointed to ~ 0.9 ns. The

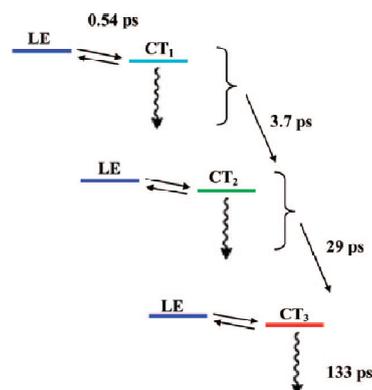
lifetime of the putative excited-state deprotonation of OBIP would then lie in the vicinity of those times.

4.4. Primary Photoresponse of rOBIP. As presented in Section 4.2, the first level of interpretation of our transient-absorption results consists in assigning to the reactive population (rOBIP) the first four time components of the global analysis, while the remaining two are attributed to the nonreactive population (nrOBIP). DADS4, which is the longest-lived (133 ps) species associated to rOBIP, displays a clear peak at 676 nm (Figure 4B) that we assign to a characteristic contribution of the OxyBP radical cation (OxyBP⁺), as was previously shown by direct comparison with an OxyBP⁺ difference spectrum obtained by photooxidation of OxyBP by p-benzoquinone (BZQ)¹⁵ (let us note that this spectrum also contains a contribution from the BZQ radical anion, BZQ⁻). A good superposition is also obtained for the present results if the radical cation spectrum is shifted by 8 nm toward the red in order to compensate for a solvatochromic shift between the two systems (not shown). The photooxidation experiment was indeed done in ethanol where the absorption of OxyBP is blue-shifted as compared to the chromoprotein.

What the present transient-absorption and time-resolved fluorescence (see Section 3.4) results suggest is that DADS4 not only bears the spectral signature of the oxyblepharism radical cation but also that of an emitting species. Although electron transfer is believed to be involved in the excited-state dynamics of rOBIP, it cannot be concluded that an irreversible electron transfer from OxyBP to a nearby electron acceptor (the disulphide bridge of a cysteine was previously proposed by Angelini et al.¹⁶) takes place and simply yields a ground-state photoproduct. In order to account for the observation of an emitting species that coexists with the radical cation signature and simultaneously decays with it, we propose that an equilibrium is actually reached between an electronically excited, emitting, precursor state and a charge-transfer state.

Such a situation was described some years ago by the group of Mataga in the context of fluorescence quenching within hydrogen bond (HB) complexes between pairs of conjugated π -electron systems in nonpolar solvents.^{45,46} One of the molecules acts as the electron donor, its ionization potential being substantially lowered by the hydrogen bonding,⁴⁷ while the other one is the electron acceptor. Mataga proposed that upon excitation the fluorescence of the donor can be efficiently quenched by the formation of a kind of nonfluorescent exciplex. A first curve crossing in the locally excited (LE) state leads to a charge-transfer (CT) state, which itself crosses the ground-state potential energy curve and induces back charge recombination down to the ground state.⁴⁵ Martin et al. showed that an equilibrium could actually be reached between the LE state and the CT state. The equilibrium is established in less than 10 ps in the case of the 7*H*-dibenzocarbazole-pyridine complex.⁴⁸ On the basis of *ab initio* calculations by Tanaka and Nishimoto,⁴⁹ Miyasaka et al. published a model in which the coordinate along which the electron transfer proceeds is the shift of the hydrogen bond proton toward the acceptor.⁵⁰ Two limiting cases were proposed. If the shift is large (1-pyrenol-pyridine case), crossing with the ground-state potential occurs close to the minimum of the CT state and charge recombination is fast. If the proton shift is small (1-aminopyrene-pyridine case), crossing with the ground-state potential occurs at a higher energy, the lifetime of the CT species is longer and the equilibrium with the LE state can be observed. It is interesting to note that recent advanced calculations on the indole-pyridine HB complex by Sobolewski and Domeke⁵¹ confirm the role of

SCHEME 2: Kinetic Model Proposed to Explain the Excited-State Behavior of rOBIP^a



^a An equilibrium is supposed to be reached between the locally-excited state (LE) and a charge-transfer state (CT). The CT state nonradiatively decays to the initial ground state (undulated arrow) through charge recombination. As the protein relaxes the spectrum of the CT state slightly evolves (from CT₁ to CT₃) and its decay rate slows down.

a charge transfer state connecting both the LE and ground states through conical intersections and of the proton shift as the reaction coordinate along which excited-state deactivation proceeds. These authors in fact advocate the relevance of such HB photochemistry to explain not only the photostability of DNA base pairs⁵² but also that of polypeptides.⁵³

We here tentatively propose that this framework could apply to the OBIP chromoprotein, the hydrogen-bond complex and the nonpolar environment being provided by the protein. The equilibrium between the LE and CT states would explain the coexistence within DADS4 of the stimulated-emission contribution and the radical cation signature, respectively. In order to explain the occurrence of three kinetic steps preceding the decay of DADS4, we additionally propose that the equilibrium is reached in the subps regime (0.54 ps component) or nonlinearly with both the 0.54 and 3.7 ps components. The following lifetimes (3.7 and 29 ps, or 29 ps alone) could be assigned to the relaxation of the protein pocket induced by the change of electronic distribution within the donor-acceptor pair. The probed dynamics could indeed be viewed as a LE \leftrightarrow CT charge-transfer reaction occurring on an excited surface defined by the proton-shift coordinate on the one hand and the protein pocket restructuring coordinate on the other hand, similarly to the description of intramolecular CT reactions in solution involving both intramolecular and solvent coordinates.⁵⁴ For OBIP, one would thus hypothesize that along the protein relaxation coordinate the CT potential well would evolve, preventing the CT state from fast return to the ground state. This relaxation would make the spectral signature of the radical cation sharper and reduce the charge recombination rate. It is interesting to note that the dynamics measured in the case of deuterated OBIP were slowed down by a factor of 1.6 to 2 as far as rOBIP is concerned (see Section 3.3 and Table 2, time1 to time4). This kinetic isotope effect may be considered as an element in favor of the Mataga-Miyasaka model presented above, in which electron transfer is coupled to the shift of the hydrogen-bond proton.

The feasibility of this idea was tested at an approximate, semiquantitative level with the simplified kinetic model depicted in Scheme 2. The initial excited state (LE, blue line) reaches

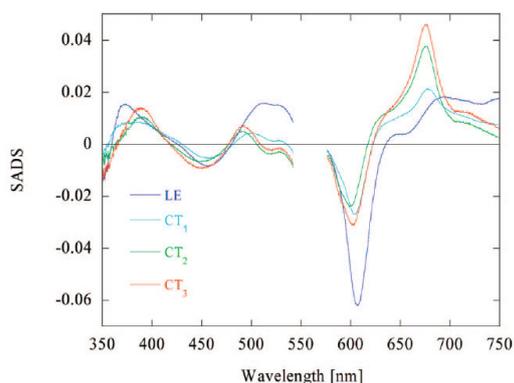


Figure 8. Species-associated difference spectra (SADS) corresponding to the analysis of the transient-absorption spectra of rOBIP (reactive population, see Section 4.2) in terms of the kinetic model depicted in Scheme 2.

an equilibrium with the charge-separated species (CT₁, cyan line) in 0.54 ps. As CT₁ decays to the ground state by charge recombination while the hypothesized response of the protein environment proceeds, both its spectrum and recombination rate evolve. In 3.7 ps CT₁ becomes CT₂ (green line) which turns into CT₃ (red line) in 29 ps. CT₃ finally decays to the initial ground-state in 133 ps. This model could be used to transform the DADS into species-associated difference spectra (SADS) according to a method described by Ernsting et al.³³ The parameters defining the model were semimanually adjusted so as to approximately satisfy the following constraints: (i) the SADS of the three CT species should not exhibit stimulated emission and (ii) the bleaching contribution of each SADS should be identical. We wish to stress the fact that this procedure was not an actual target analysis because the parameters were not fully optimized and because the constraints were evaluated by visual inspection of the SADS only. Our goal was limited to showing that the type of model described by Scheme 2 could provide an acceptable description of the data. Figure 8 displays a set of SADS roughly satisfying the above-mentioned constraints. The amplitude of the main negative peak of SADS1 (LE) is larger than that of the other three because it is the only one bearing a stimulated-emission contribution on its red side. The characteristic OxyBP⁺ peak around 675 nm of the CT species is seen to narrow, slightly shift toward the blue and gain intensity, from SADS2 to SADS4, as protein relaxation proceeds.

The 675 nm structure of SADS4 can readily be subtracted out with the help of the, properly shifted, OxyBP⁺–BZQ[–] spectrum¹⁵ mentioned above (data not shown). Although the obtained difference spectrum shows the expected negative contribution of the p-benzoquinone radical anion around 450 nm,⁵⁵ it does not allow the identification of a possible electron acceptor within OBIP. The conjugated, hydrogen-bond acceptor, electron acceptor of OBIP, required within the Mataga–Misayaka model, might hypothetically be a histidine residue. It has indeed been reported that this molecule may act as an electron acceptor in proteins and yield an absorption band around 360 nm,⁵⁶ which in our results would possibly be masked by a bleaching feature in the same region.

It is interesting to note that the initial spectrum of rOBIP (SADS1) is substantially different from that of nrOBIP (see Figure 4A for a time delay of 500 ps, or the sum of DADS5 and DADS6 in Figure 4B), which reminds free OxyBP in solution (Figure 2). The rather flat transient-absorption band of

rOBIP-SADS1, extending from 688 to 750 nm, together with the absence of net gain band around 655 nm could in fact be observed in the case of an artificial complex of OxyBP with alpha-Crystallin, the major protein in charge of maintaining transparency and proper refractive index of the eye lens.²³ It may be hypothesized that the special shape of rOBIP-SADS1 reveals a particular interaction of OxyBP with its protein environment, also found in the complex with alpha-Crystallin but absent in the complex with human serum albumin.¹⁴ This sole interaction is however not sufficient to induce the characteristic fast evolution of OBIP because this one was not observed in the case of the alpha-Crystallin complex.²³ This difference confirms the previously commented specific nature of the OBIP photoinduced behavior.¹⁴

4.5. Photophobic Response of *Blepharisma japonicum*. As noted in a previous report,¹⁵ the dynamics associated with rOBIP is likely too fast to generate any biologically useful signaling state, and hence may not be responsible for the photophobic response of *B. japonicum*. We proposed that the fast photocycle of rOBIP could in fact be a fast efficient deactivation pathway of the excited state, providing a sunscreen mechanism that protects *B. japonicum* from continuous irradiation. Let us indeed remind that the active pigment of the dark-adapted form of the cell, blepharismine (BP, Scheme 1), is highly phototoxic⁵⁷ and that the OBIP chromoprotein, bearing OxyBP as a chromophore, only exists in the light-adapted form of the organism.⁴ This hypothesis may be maintained although one should keep in mind that the present experiments were done in vitro, in the absence of possible protein partners. It could also be argued that a less costly sunscreen would be constituted by stacked OxyBP molecules, that would deactivate very fast, since it is known that the pigment is contained in large concentration in specialized granules.^{58,59} On the other hand, we previously suggested that continuous visible excitation induces artificial complexes of OxyBP with alpha-Crystallin to pack, leading to fluorescence quenching of OxyBP.²³ If such a process were active for OBIP in vivo, a particular type of sunscreen could even build up in blue *B. japonicum*, as a result of irradiation. The fast photocycle of rOBIP would however constitute a more immediate solar protection of blue *B. japonicum*, independent of the stacking condition of the pigment. It would in any case be considered as potential complementary sunscreen, in addition to any other protection mechanism. Let us finally mention that no comparative data is presently available for the red blepharismine binding protein, which was once isolated from red *B. japonicum* cells^{58,60} but apparently releases its chromophore much more easily than OBIP (G. Checcucci, unpublished results).

If the fast photocycle of rOBIP were indeed not to be linked with the photophobic response of *B. japonicum*, the real primary photoprocess at the origin of the photophobic response of *B. japonicum* would have to be looked for in another direction. It has to be recalled that action spectroscopy demonstrated that the OxyBP molecules trigger the photophobic response of *B. japonicum*.^{4,5} It was also claimed that irradiation of the cell induces an intracellular pH jump.^{61–63} It could therefore be suggested that nrOBIP chromoproteins would just release protons upon excitation and thereby trigger the transduction chain, as reported for the photoreceptor of another ciliate, *Stentor coeruleus*.^{64,65} This hypothesis is compatible with our present results since, as discussed in Section 4.3, we indirectly infer that OBIP undergoes excited-state peri-deprotonation. Deprotonation would likely take place during the excited-state lifetime of nrOBIP, that is, in the nanosecond/subnanosecond regime. Alternatively, one could consider that unbound OxyBP mol-

ecules may be the source of photorelease protons, possibly from their triplet state as was suggested by J. Petrich in the case of hypericin.⁶⁶

5. Conclusion

The present femtosecond transient-absorption and picosecond fluorescence experiments performed on OBIP bring new insights into the photoinduced dynamics of this chromoprotein, as compared to formerly reported works.^{11,13–15} The fast formation of a characteristic 675 nm absorption band, assigned to the OxyBP radical cation, has here been resolved and seen to occur in the subpicosecond regime with a lifetime of 0.54 ps. The band then decays while sharpening with time constants of 3.7 and 29 ps, and finally disappears with a lifetime of 133 ps. We additionally demonstrated that a stimulated-emission signal, also detected by time-resolved fluorescence, coexists with this band at all times of its evolution.

Our interpretation of the data confirms in the first place the previously proposed model involving two independent classes of chromoproteins: while the reactive population rOBIP undergoes the fast dynamics, the nonreactive species nrOBIP mostly behaves like the free chromophore in solution with a nanosecond decay and a net gain band around 655 nm. The difference absorption spectrum of the initial excited-state of rOBIP could be resolved for the first time by the present experiments and has been shown to be different from the one of nrOBIP. Its particular structure with a flat transient-absorption band in the red part of the spectrum and no net gain band around 655 nm is assigned to a specific type of interaction of the chromophore with its protein environment. The photophysics of rOBIP has been refined in terms of a reversible excited-state intermolecular electron transfer (equilibrium between LE and CT states) followed by electron recombination in the ground state. The spectrum of the CT species is supposed to sharpen as a result of protein relaxation while the recombination rate decreases. Within the framework of the theory developed by Mataga and Miyasaka to explain the fluorescence quenching of aromatic hydrogen-bonded donor–acceptor pairs in nonpolar solvents,⁵⁰ we hypothesize that OxyBP is involved in a hydrogen-bond interaction with an as yet unknown electron acceptor and that the shift of the proton involved in the hydrogen bond is the reaction coordinate.

As previously discussed,¹⁵ we propose that the fast dynamics of rOBIP may act, through an efficient deactivation of the excited state, as a sunscreen mechanism aimed at protecting *B. japonicum* against excessive irradiation. On the basis of a comparative study including steady-state and time-resolved fluorescence of OBIP as well as transient absorption spectroscopy of peri-deprotonated free OxyBP in solution, we further hypothesize that the triggering process of the photophobic response of the organism could be an excited-state deprotonation of the so-called nrOBIP class of chromoprotein, occurring in the nanosecond regime.

Acknowledgment. The authors acknowledge financial support from the ANR (French National Agency for Research) to the “Femtomotile” project (ANR-05-BLAN-0188-01).

References and Notes

- van der Horst, M. A.; Hellingwerf, K. J. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 13.
- Losi, A. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 1283.
- Ghetti, F. *Biophysics of Photoreceptors and Photomovements in Microorganisms*; Plenum Press: New York, 1991; p 257.
- Matsuoka, T.; Matsuoka, S.; Yamaoka, Y.; Kuriu, T.; Watanabe, Y.; Takayanagi, M.; Kato, Y.; Taneda, K. *J. Protozool.* **1992**, *39*, 498.
- Checucci, G.; Damato, G.; Ghetti, F.; Lenci, F. *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 686.
- Matsuoka, T.; Sato, M.; Maeda, M.; Naoki, H.; Tanaka, T.; Kotsuki, H. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 915.
- Matsuoka, T.; Tokumori, D.; Kotsuki, H.; Ishida, M.; Matsushita, M.; Kimura, S.; Itoh, T.; Checucci, G. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *72*, 709.
- Giese, A. C. *Blepharisma: The Biology of a Light-Sensitive Protozoan*; Stanford University Press: Stanford, CA, 1973.
- Giese, A. C. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1946**, *28*, 119.
- Spitzner, D.; Höfle, G.; Klein, I.; Pohl, S.; Ammermann, D.; Jaenicke, L. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4003.
- Plaza, P.; Mahet, M.; Tchaikovskaya, O. N.; Martin, M. M. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *408*, 96.
- Falk, H. *Angew. Chem.* **1999**, *38*, 3116.
- Plaza, P.; Mahet, M.; Martin, M. M.; Angelini, N.; Malatesta, M.; Checucci, G.; Lenci, F. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 754.
- Mahet, M.; Plaza, P.; Martin, M. M.; Checucci, G.; Lenci, F. *J. Photochem. Photobiol. A* **2007**, *185*, 345.
- Plaza, P.; Mahet, M.; Martin, M. M.; Checucci, G.; Lenci, F. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 690.
- Angelini, N.; Quaranta, A.; Checucci, G.; Song, P.-S.; Lenci, F. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 864.
- Checucci, G.; Takada, Y.; Matsuoka, T. *Mem. Fac. Sci. Kochi Univ. D* **2001**, *22*, 39.
- Chattoraj, M.; King, B. A.; Bublit, G. U.; Boxer, S. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 8362.
- Coetzee, J. F.; Ritchie, C. D. *Solute–Solvent Interactions*; M. Dekker: New York, 1969; p 663.
- Krezel, A.; Bal, W. *J. Inorg. Chem.* **2004**, *98*, 161.
- Glasoe, P. K.; Long, F. A. *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*, 188.
- Checucci, G.; Shoemaker, R. S.; Bini, E.; Cerny, R.; Tao, N.; Hyon, J.-S.; Giolfiré, D.; Ghetti, F.; Lenci, F.; Song, P.-S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5762.
- Youssef, T.; Brazard, J.; Ley, C.; Lacombat, F.; Plaza, P.; Martin, M. M.; Sgarbossa, A.; Checucci, G.; Lenci, F. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 844.
- Eloy, D.; Le Pellec, A.; Jardon, P. *J. Chim. Phys.* **1996**, *93*, 442.
- Leonhartsberger, J. G.; Falk, H. *Monat. Chem.* **2002**, *133*, 167.
- Vollhardt, P.-C.; Schore, N.-E. *Organic Chemistry*, 4th ed.; W.H. Freeman: New York, 2003.
- Valeur, B. *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
- Karstens, T.; Kobs, K. *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 1871.
- Frank, A. J.; Otvos, J. W.; Calvin, M. *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 716.
- Magde, D.; Brannon, J. H.; Crémers, T. L.; Olmsted, J. *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 696.
- Ley, C.; Brazard, J.; Lacombat, F.; Plaza, P.; Martin, M. M.; Kraus, G. A.; Petrich, J. W. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *457*, 82.
- Henry, E. R.; Hofrichter, J. *Methods Enzymol.* **1992**, *210*, 129.
- Ernsting, N. P.; Kovalenko, S. A.; Senyushkina, T.; Saam, J.; Farztdinov, V. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 3445.
- Dai Hung, N.; Plaza, P.; Martin, M. M.; Meyer, Y. H. *Appl. Opt.* **1992**, *31*, 7046.
- Ghetti, F.; Checucci, G.; Lenci, F.; Heelis, P. F. *J. Photochem. Photobiol. B* **1992**, *13*, 315.
- Kraus, G. A.; Zhang, W.; Fehr, M. J.; Petrich, J. W.; Wannemuehler, Y.; Carpenter, S. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 523.
- Jimenez, R.; Fleming, G. R.; Kumar, P. V.; Maroncelli, M. *Nature* **1994**, *369*, 471.
- Horng, M. L.; Gardocki, J. A.; Papazyan, A.; Maroncelli, M. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17311.
- Pieroni, O.; Plaza, P.; Mahet, M.; Angelini, N.; Checucci, G.; Malatesta, M.; Martin, M. M.; Lenci, F. *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 1343.
- Chapman, C. F.; Maroncelli, M. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 9095.
- Maeda, M.; Naoki, H.; Matsuoka, T.; Kato, Y.; Kotsuki, H.; Usumi, K.; Tanaka, T. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7411.
- Losi, A.; Vecchi, A.; Viappiani, C. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *69*, 435.
- Demchuk, E.; Genick, U. K.; Woo, T. T.; Getzoff, E. D.; Bashford, D. *Biochemistry* **2000**, *39*, 1100.
- Martin, M. M.; Lindqvist, I. *Chem. Phys. Lett.* **1973**, *22*, 309.
- Mataga, N. *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56*, 1255.
- Mataga, N.; Miyasaka, H. *Electron Transfer-From Isolated Molecules to Biomolecules, Part 2*; Wiley-Interscience: New York, 1999; p 431.
- Martin, M. M.; Grand, D.; Ikeda, N.; Okada, T.; Mataga, N. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 167.

CHAPITRE VII : Photocycle ultrarapide et état signalant du photorécepteur de *Blepharisma japonicum*

15194 *J. Phys. Chem. B*, Vol. 112, No. 47, 2008

Brazard et al.

- (48) Martin, M. M.; Ikeda, N.; Okada, T.; Mataga, N. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 4148.
- (49) Tanaka, H.; Nishimoto, K. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 1052.
- (50) Miyasaka, H.; Tabata, A.; Ojima, S.; Ikeda, N.; Mataga, N. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 8222.
- (51) Sobolewski, A. L.; Domcke, W. G. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 11725.
- (52) Sobolewski, A. L.; Domcke, W.; Hattig, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 17903.
- (53) Sobolewski, A. L.; Domcke, W. *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 561.
- (54) Kim, H. J.; Hynes, J. T. *J. Photochem. Photobiol. A* **1997**, *105*, 337.
- (55) Shida, T. *Electronic Absorption Spectra of Radical Ions*; Elsevier: Amsterdam, 1988.
- (56) Faraggi, M.; Klapper, M. H.; Dorfman, L. *J. Phys. Chem.* **1978**, *82*, 508.
- (57) Terazima, M. N.; Iio, H.; Harumoto, T. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *69*, 47.
- (58) Matsuoka, T.; Tsuda, T.; Ishida, M.; Kato, Y.; Takayanagi, M.; Fujino, T.; Mizuta, S. *Photochem. Photobiol.* **1994**, *60*, 598.
- (59) Sgarbossa, A.; Ceccucci, G.; Lenci, F. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 459.
- (60) Matsuoka, T.; Murakami, Y.; Kato, Y. *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 1042.
- (61) Matsuoka, T.; Muraka, Y.; Furukohri, T.; Ishida, M.; Taneda, K. *Photochem. Photobiol.* **1992**, *56*, 399.
- (62) Fabczak, H.; Fabczak, S.; Song, P.-S.; Ceccucci, G.; Ghetti, F.; Lenci, F. *J. Photochem. Photobiol. B* **1993**, *21*, 47.
- (63) Matsuoka, T.; Kotsuki, H. *J. Exper. Zool.* **2001**, *289*, 467.
- (64) Song, P.-S.; Walker, E. B.; Auerbach, R. A.; Wilse, G. *Biophys. J.* **1981**, *35*, 551.
- (65) Walker, E. B.; Yoon, M.; Song, P.-S. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *634*, 289.
- (66) Fehr, M. J.; McCloskey, M. A.; Petrich, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1833.

JP805815E

2 Étude de complexes blépharismines- α -cristalline

Nous avons réalisé l'étude, par spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde, des processus photoinduits dans un complexe artificiel entre OxyBP et une importante protéine constitutive du cristallin, l' α -cristalline. Cette étude a permis de répondre à une double interrogation.

En premier lieu se posait la question de savoir si le comportement photoinduit ultrarapide de OBIP a un caractère spécifique propre à *B. japonicum* ou s'il peut être reproduit avec d'autres protéines. Dans une étude précédente Mahet et al. [219] avaient montré que le complexe artificiel qui peut se former entre OxyBP et l'albumine ne présente aucune des caractéristiques de OBIP et que son comportement photoinduit est similaire à celui de OxyBP en solution. La présente étude apporte un autre éclairage à cette question en traitant le cas de l' α -cristalline.

Le second intérêt de l'étude consistait en une évaluation des risques liés à l'utilisation potentielle de OxyBP ou BP pour la photothérapie dynamique (PDT : le principe consiste à exciter optiquement la molécule et à produire de l'oxygène singulet, cytotoxique, par transfert d'énergie depuis son état triplet vers l'oxygène moléculaire). Cette idée vient du fait que Hyp est elle-même sérieusement étudiée pour la PDT du cancer, surtout pour les organes exposés à la lumière comme les yeux et la peau [229]. Les blépharismines ayant aussi des propriétés photosensibilisatrices intéressantes [230, 231], la question se pose de savoir si sa présence dans l'organisme pourrait provoquer des effets secondaires. Dans le cas particulier du traitement des lésions oculaires, il a été montré que Hyp peut pénétrer dans le cristallin et former des complexes avec l' α -cristalline [232-234]. Le groupe Lenci montra que l'irradiation de Hyp dans ces complexes, induit des altérations de la structure des protéines, se traduisant par une tendance à l'agglomération (polymérisation, agrégation, ou compaction) [232, 233]. Il fut cependant montré que l'activité physiologique (protéine chaperon) de l' α -cristalline n'est pas perdue par irradiation [234]. Nous avons voulu réexaminer cette question en collaboration avec le groupe Lenci et Tareq Youssef (NILES, Égypte) dans le cas des complexes de l' α -cristalline avec BP et OxyBP.

La spectroscopie d'absorption transitoire montre que les complexes OxyBP: α -cristalline présentent une signature spectrale transitoire différente de celles, similaires entre elles, de OxyBP en solution et de OxyBP complexée à l'albumine sérique humaine (HSA). Il est en revanche remarquable que cette signature des complexes

OxyBP:α-cristalline présente une forte ressemblance avec le spectre d'absorption transitoire aux temps courts du complexe naturel (nommé OBIP) que forme OxyBP avec une protéine du protozoaire *B. japonicum* (cf. la partie 1). Nous interprétons cette ressemblance comme révélant un type d'interaction particulier entre le chromophore et la protéine, que nous pouvons rencontrer dans certains complexes (OxyBP:α-cristalline, OBIP) mais pas dans tous (OxyBP:HSA). Toutefois, le transfert de charge intermoléculaire bien spécifique de rOBIP n'est pas observée dans le cas du complexe OxyBP : α -cristalline.

L'analyse cinétique globale des données a été réalisée au moyen d'une somme de trois exponentielles et d'une fonction plateau. Les deux durées de vie les plus courtes ($\tau_1 = 2,0 \pm 0,5$ ps et $\tau_2 = 13 \pm 3$ ps) sont interprétées comme la réorganisation de la protéine autour du chromophore excité et comme un changement de conformation de OxyBP. Les deux plus longues ($\tau_3 = 480 \pm 40$ ps et la fonction plateau) présentent des spectres de facteurs pré-exponentiels (DADS) voisins. Nous avons proposé que ces composantes soient associées à deux types de complexes OxyBP: α-cristalline indépendants. Le premier met en jeu un chemin de désactivation rapide non connu qui pourrait être dû à l'agglomération des protéines sous excitation lumineuse.

Une dénaturation partielle de la protéine a été réalisée par ajout de chlorure de guaninium ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) à la solution contenant le complexe OxyBP: α-cristalline. Cette opération produit une protéine à l'état dit de globule fondu et modifie donc l'environnement de OxyBP dans le complexe. Nous retrouvons dans ce complexe modifié des signatures spectrale et temporelle plus proches de celles de OxyBP en solution. Nous observons notamment le déclin nanoseconde de l'état excité singulet du chromophore et l'apparition de l'état triplet. Cet effet révèle que le chromophore est plus en contact avec l'eau dans le complexe modifié que dans le complexe avec la protéine native. Ces résultats ont montré que l'environnement de OxyBP détermine sa dynamique après photoexcitation.

En ce qui concerne l'aspect intéressant de la photothérapie dynamique, aucune réaction photoinduite directe entre OxyBP et l'α-cristalline, aboutissant à la production de radicaux (réaction photodynamique de type I) n'a été mise en évidence. Il n'est cependant pas impossible qu'un mécanisme de type II (production d'oxygène singulet depuis l'état triplet) soit impliqué mais des expériences avec une gamme temporelle plus longue seraient nécessaires pour s'en assurer. Nous avons toutefois montré que lors de l'excitation visible

($\lambda > 400$ nm) continue d'un complexe OxyBP: α -cristalline nous observons une diminution d'intensité de fluorescence sans altération importante du spectre d'absorption. Nous avons interprété ce phénomène par un changement de l'environnement du complexe. En nous basant sur le cas du complexe Hyp: α -cristalline, pour lequel il a été avancé l'hypothèse d'une polymérisation photoinduite et l'apparition d'agglomérats de protéines sous irradiation visible [232-234], nous proposons que le même phénomène ait lieu pour les complexes OxyBP: α -cristalline. Nous interprétons l'inhibition de la fluorescence de OxyBP par une interaction par empilement (stacking, en anglais) des chromophores, mis en proximité des uns des autres suite à l'agglomération des protéines. Nous avons par ailleurs observé que l'intensité de fluorescence des résidus tryptophanes (excités à 280 nm), diminue sous irradiation visible continue. Cet effet est attribué à une modification de l'environnement local des tryptophanes ou à leur photooxydation [235, 236]. Il pourrait s'agir d'une modification structurale des protéines, liée au phénomène d'agglomération dont nous avons émis l'hypothèse ci-dessus.

L'article publié reproduit ci-dessous détaille cette étude : Youssef T., Brazard J., Ley C., Lacombe F., Plaza P., Martin M. M., Sgarbossa A., Checcuci G., Lenci F., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, 7, 844-853.

Steady-state and femtosecond photoinduced processes of blepharismins bound to alpha-crystallin

T. Youssef,^a J. Brazard,^b C. Ley,^b F. Lacomat,^b P. Plaza,^{*b} M. M. Martin,^b A. Sgarbossa,^{*c} G. Checcucci^c and F. Lenci^c

Received 18th January 2008, Accepted 7th May 2008

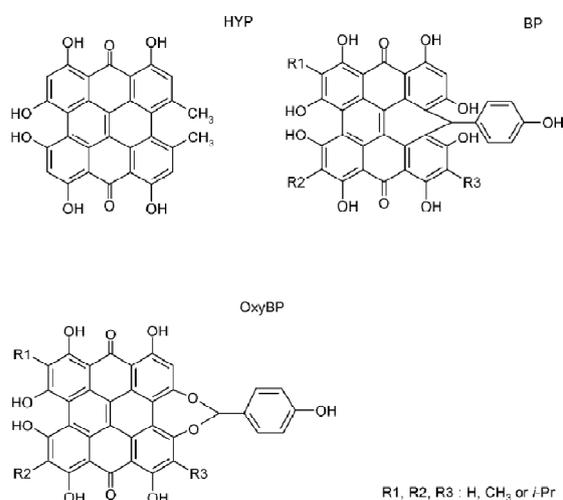
First published as an Advance Article on the web 22nd May 2008

DOI: 10.1039/b800848e

The interaction of blepharismins (BP) and oxyblepharismins (OxyBP) with bovine alpha-crystallin (BAC) has been studied both by steady-state and femtosecond spectroscopy, with the aim of assessing the possible phototoxicity of these compounds toward the eye tissues. We showed that these pigments form with BAC potentially harmful ground-state complexes, the dissociation constants of which have been estimated to be $6 \pm 2 \mu\text{mol L}^{-1}$ for OxyBP and $9 \pm 4 \mu\text{mol L}^{-1}$ for BP. Irradiation with steady-state visible light of solutions of blepharismins in the presence of BAC proved to induce a quenching of both the pigment and the intrinsic protein fluorescences. These effects were tentatively rationalized in terms of structural changes of alpha-crystallin. On the other hand, femtosecond transient absorption spectroscopy was used to check the occurrence of any type I photoactivity of oxyblepharismins bound to alpha-crystallin. The existence of a particular type of fast photoinduced reaction, not observed in former studies with human serum albumin but present in the natural oxyblepharismins-binding protein, could here be evidenced but no specific reaction was observed during the first few nanoseconds after excitation. Partial denaturation of alpha-crystallin was however found to alter the excited-state behaviour of its complex with oxyblepharismins, making it partly resemble that of free oxyblepharismins in solution.

Introduction

Hypericin (HYP, see Scheme 1) is a natural photosensitizing pigment of the phenanthroperylene quinone family, found in particular in the plants of the genus *Hypericum*.^{1,2} It has been recognized as a potent antiviral, antibacterial, and antineoplastic agent.³ A great deal of attention has recently been devoted to this pigment as a non-porphyrin photodynamic drug in the field of photodynamic therapy (PDT), particularly for light-exposed organs like the eye and the skin.⁴ Blepharismins (BP) and oxyblepharismins (OxyBP) are hypericin-like pigments and consequently also have interesting photosensitizing properties. They are believed to be the photoreceptor pigments mediating the photomotile responses of the red and blue forms of the ciliate *Blepharisma japonicum*, respectively.⁵⁻⁷ Upon exposure of red cells to dim visible light, blepharismins is irreversibly photo-oxidized into oxyblepharismins, and the cells turn blue.^{8,9} Exposure to higher irradiances nevertheless causes cell death.¹⁰ The photokilling of red cells was attributed to photosensitized production of singlet oxygen by the endogenous pigment (type II mechanism), with a relatively high yield.^{11,12} The photodynamic action of BP, first suggested by Giese,¹³ has been shown by Matsuoka and his group.¹⁴ They indeed found that BP has a bactericidal activity,



Scheme 1 Chemical structures of hypericin (HYP), blepharismins (BP) and oxyblepharismins (OxyBP). The five isospectral forms of BP and OxyBP only differ by their alkyl lateral substituents (R_i).

namely inhibiting the growth of Gram-positive bacteria. Since OxyBP also displays photodynamic properties,¹⁵ the blepharismins family could constitute a new group of natural pigments of potential use in treating serious diseases in combination with light.

The molecular and spectral similarity of blepharismins with hypericin suggests they could also be investigated as possible photosensitizers to treat eye microbial infections as well as intraocular

^aNational Institute of Laser Enhanced Sciences (NILES), Cairo University, Giza, Egypt

^bEcole Normale Supérieure, Département de Chimie, UMR 8640-PASTEUR, 24 rue Lhomond, 75005, Paris, France. E-mail: pascal.plaza@ens.fr

^cCNR Istituto di Biofisica, Via G. Moruzzi 1, 56100, Pisa, Italy. E-mail: antonella.sgarbossa@pi.ibf.cnr.it

tumours and age-related macular degeneration. Of course, like any photoactive drug,^{16,17} BP and OxyBP may enter into the eye lens and bind to alpha-crystallin, the major lens protein in charge of maintaining transparency and proper refractive index of the lens. The molecular mass of alpha-crystallin is about 800 kDa. It is a multimer in which two evolutionarily related subunits, α A and α B, with molecular masses of approximately 20 kDa each, form the building blocks of the multimer.^{18–22} It is thus necessary to ensure that PDT of the eye with blepharismsins does not induce any alteration of the physiological functions of alpha-crystallin.

In a similar fashion as previously done in the case of hypericin,²³ the present paper provides quantitative estimations of the degree of association of BP and OxyBP to alpha-crystallin and assessment of the effects of visible light irradiation on the spectral properties of both the pigments and the protein by means of steady-state absorption and fluorescence spectroscopies.

In addition, we here report the results of ultrafast optical transient absorption spectroscopic measurements, performed to investigate the primary photoinduced reactions that result from the interaction of electronically excited OxyBP with alpha-crystallin. Special attention was paid to possible type I mechanisms with direct interaction (electron/proton transfer) of the photosensitizer with its substrate. Such an interaction is indeed supposed to be at work when oxyblepharismine is bound to its native protein partner (the oxyblepharismine-binding protein, OBIP) in light-adapted *B. japonicum*.^{24–27} We also used partial denaturation of alpha-crystallin (molten globule state²⁸) as a mean to alter the environment of the chromophore bound to alpha-crystallin. Our objective was to probe the excited-state dynamics of OxyBP in interaction with this modified surrounding and compare it to the case of native alpha-crystallin, in order to bring further evidence that the photophysics of the chromophore is controlled by its interaction with the environment.

In this study we intended to provide meaningful contributions to the issues of phototoxicity of BP and OxyBP for the eye tissues in view of their possible use as photodynamic pigments.

Materials and methods

Pigments preparation

Red cells were grown in the dark at 23 °C in the presence of *Enterobacter aerogenes* as food supply and pigment crude extracts were prepared according to the Gioffrè protocol.²⁹ OxyBP was obtained by photooxidating BP *in vitro* under a low-intensity cold white lamp (below 10 W m⁻²) for a few days. The pigments were dissolved in methanol for purification by HPLC (Shimadzu, LC-10AD VP) using a Nucleosil C18 reversed phase column (Alltech; 250 × 22 mm, 5 μ m, 10 nm), eluted with a mixture of methanol, ethyl acetate, water and trifluoroacetic acid in variable percentages.⁹ Fractions corresponding to the five isospectral forms of OxyBP³⁰ were collected together. The purified pigments were then dried over a rotatory evaporator (Büchi).

Samples for steady-state spectroscopy and irradiation

Bovine alpha-crystallin (Sigma-Aldrich, ref. C4163; noted BAC) was dissolved in a phosphate buffered saline (PBS), at pH 7.4.

PBS was prepared by mixing 10 mmol L⁻¹ KH₂PO₄ (Sigma), 10 mmol L⁻¹ K₂HPO₄ (Carlo Erba), 120 mmol L⁻¹ NaCl (Baker) and 2.7 mmol L⁻¹ KCl (Merck). To overcome the very poor solubility of blepharismsins in pure PBS, leading to the formation of polydispersed aggregates, the pigments were first dissolved in spectroscopic-grade ethanol (Merck) and then added to PBS or protein-containing PBS solutions. In all samples for steady-state spectroscopy and irradiation the pigment concentration was 6 μ mol L⁻¹, and the ethanol fraction relative to PBS was 1% (vol/vol). All chemicals were used without further purification. All experiments were performed at room temperature and the samples were not degassed.

Preparation of OxyBP:BAC complexes for transient absorption spectroscopy

For the purpose of the transient absorption experiments, stock solutions of OxyBP (6.5 mmol L⁻¹) in ethanol and alpha-crystallin (α -subunit concentration: $c_{\alpha} = 1.0$ mmol L⁻¹, calculated with a molecular mass of 20 kDa for the subunits) in PBS were prepared. A final solution of OxyBP (0.3 mmol L⁻¹) and alpha-crystallin ($c_{\alpha} = 0.95$ mmol L⁻¹) in PBS, containing 5% ethanol (vol/vol), was finally made. In order to avoid protein denaturation the ethanol content of the solution must not exceed 10%. According to the dissociation constant measured in this work (see Results and discussion section), this mixture is expected to achieve 99% binding of the pigment. A sample of OxyBP complexed to alpha-crystallin (same concentrations) in a molten globule state was prepared by addition of 0.95 mol L⁻¹ guanidinium hydrochloride (Sigma-Aldrich, ref. CAS 50-01-1; noted GndHCl). This follows from an independent study of the effect of GndHCl concentration on the alpha-crystallin intrinsic tryptophan fluorescence (excitation at 280 nm and detection at 340 nm). The fluorescence intensity displays a local maximum around 1 mol L⁻¹ GndHCl before decreasing as the protein completely denatures. This effect reveals a perturbation on the folding of the protein^{31,32} and is interpreted as the occurrence of a molten globule state.²⁸ Very similar results were obtained by Das and Liang³³ and Rao *et al.*³⁴

Steady-state spectroscopic measurements

Optical absorption spectra were measured using a JASCO 7850 or Safas UV-mc2 dual-beam spectrophotometer. Corrected fluorescence emission spectra were measured with a Perkin-Elmer LS 50B or Jobin-Yvon Fluoromax-3 spectrofluorometer. The chromophore concentration was calculated on the basis of the molecular extinction coefficient at the maximum of the longest wavelength transition ($\epsilon = 22400$ mol⁻¹ L cm⁻¹ for OxyBP in ethanol (T. Matsuoka, personal communication) and $\epsilon = 15000$ mol⁻¹ L cm⁻¹ for BP in ethanol³⁵).

Steady-state irradiation

Samples were irradiated with visible light for periods of up to 30 minutes using a quartz-iodine-tungsten lamp equipped with a 400 nm cut-off filter and neutral density filters (Balzers) to set the irradiance at *ca.* 50 mW cm⁻². All visible light above 400 nm was used for both pigments.

Transient absorption spectroscopy

Femtosecond transient absorption spectra were recorded by the pump–continuum–probe technique. The source was an amplified Ti:Sapphire laser system (Tsunami + Spitfire, Spectra Physics), delivering 50 fs pulses at 810 nm and 1 kHz. Part of this beam was used to run a 405 nm pumped noncollinear optical parametric amplifier (Clark-MXR), in order to generate ~35 fs pump pulses (after compression) at 560 nm. This wavelength matches the secondary absorption maximum of the pigment:protein complex. An energy of 0.33 to 0.40 μJ of this beam was focused onto a 0.048 mm² section of the sample. Care was taken to check that this fluence lies in the linear regime and does not induce multiphotonic excitation such as those previously reported for hypericin.³⁶ The polychromatic probe beam was generated by focusing a few μJ per pulse of the 810 nm beam on a CaF₂ plate. This continuum beam was then split into a probe and a reference beam. Pump and probe beams crossed on the sample, held in a 1 mm fused-silica cuvette, at an angle of *ca.* 5°. Their linear polarizations were set at the magic angle. The probe beam was delayed with respect to the pump beam using an optical delay line. Photolysis was avoided by continuously moving the sample cuvette up and down; the steady-state absorbance of the samples was checked to remain constant during the experiments. The spectra formed by an imaging spectrograph (Acton SP300i, 150 grooves mm⁻¹) were recorded at 333 Hz on a CCD detector (Roper Scientific, 100 × 1340 pixels) and accumulated over 3000 pump shots. The differential absorbance spectra (ΔA) were corrected from the chirp of the probe beam.

The complete set of experimental data was globally fitted to a sum of exponential functions by the following method. Singular value decomposition (SVD)³⁷ was performed on the matrix containing the two-way data (wavelength and time). The first five orthogonal kinetics (weighed by their corresponding singular values) were then simultaneously fitted to a sum of exponentials, convoluted by a Gaussian function representing the response function of the apparatus. The FWHM of the latter was found to be ~100 fs. The decay-associated difference spectrum (DADS) of each time component was finally calculated over the entire experimental spectral range.³⁸ The amplitude of the residue (2D-rms) was of the order of ±0.2 mOD. Note that such a global approach was possible because the transient absorption spectra were found to display very little time-dependent shift of the bands, such as those observed in solvation dynamics or vibrational cooling phenomena.

Results and discussion

Steady-state optical spectroscopy

Fig. 1A and 1B report the optical absorption spectra of OxyBP and BP, respectively, in ethanol and in PBS (containing 1% ethanol vol/vol). An important information comes from the ratio of the lowest two absorption peaks (605 and 560 nm for OxyBP in PBS, 578 and 542 nm for BP in PBS, 590 and 547 nm for OxyBP in ethanol and 579 and 540 nm for BP in ethanol). This ratio is markedly smaller in PBS than in ethanol and the peaks are narrower and better resolved in ethanol than in PBS. In addition, the absorption peaks of both pigments are blue shifted in ethanol

as compared to PBS, the shift being larger for OxyBP (15 nm) than for BP (2 nm). On the basis of previous studies on hypericin,² these findings lead to the conclusion that in PBS both chromophores are present as polydispersed aggregates while the monomeric form prevails in ethanol.

The fluorescence spectra ($\lambda_{exc} = 550$ nm), shown in Fig. 1C and 1D, reveal that both pigments exhibit a very weak fluorescence emission in PBS, where they are in an aggregated state. In ethanol, where the molecules are in the monomeric form, two fluorescence peaks are distinctively detected for OxyBP, at 600 and 645 nm. In the case of BP, a broad emission band peaking at 605 nm appears, with a flat shoulder around 650 nm.

Binding to alpha-crystallin

Upon adding bovine alpha-crystallin (BAC) to the PBS solution (with 1% vol/vol ethanol), the absorption spectra of both chromophores are substantially modified. The peak ratios progressively increase and the overall absorption spectra shift toward the red (data not shown). The effect on the fluorescence spectra ($\lambda_{exc} = 550$ nm) is more dramatic: the fluorescence intensity of OxyBP and BP in PBS strongly increases and the emission peaks shift to the blue, by about 4–5 nm, as the protein concentration increases (see Fig. 2A and 2B). These spectroscopic changes can be explained by the formation of pigment:BAC complexes. The interaction with the protein brings the chromophore from its very poorly fluorescent aggregated state to its fluorescent monomer state. In other words, BAC solubilizes OxyBP and BP in PBS.

In order to estimate the dissociation constant (K_d) of the two complexes, we proceeded to fitting the pigment fluorescence intensity (at maximum of emission; expressed as the R ratio defined below) as a function of α -subunit concentration, with the help of a simple binding model. This model makes the hypothesis that each α -subunit bears n completely independent binding sites. For each of them it is straightforward to express the equilibrium for the 1 : 1 complex formation. The model also implies that all α -subunits of alpha-crystallin are equally accessible to binding, which may be an oversimplification. Next step is to assume that the fluorescence intensity has a linear dependence on both the unbound and bound pigment concentrations. This condition is easily satisfied as the optical density of the sample is less than ~0.1. Following a standard derivation,³⁹ one gets the following approximationless relation:

$$R = \frac{I - I_0}{I_0} = \frac{R_b}{2} \left(1 + \frac{nc_\alpha}{c_p} + \frac{K_d}{c_p} - \sqrt{\left(1 + \frac{nc_\alpha}{c_p} + \frac{K_d}{c_p} \right)^2 - 4 \frac{nc_\alpha}{c_p}} \right) \quad (1)$$

where I is the pigment fluorescence intensity in the presence of BAC, I_0 is the fluorescence intensity in the absence of BAC, c_p is the known total pigment concentration (6 μmol L⁻¹) and c_α is the variable total α -subunit concentration. R_b is the limiting value of R (defined as $(I - I_0)/I_0$) when c_α is very large (full theoretical binding).

Nonlinear fitting of $R(c_\alpha)$ with eqn (1) allows in principle one to obtain both K_d and n , without suffering from the biases of linearized plots.⁴⁰ The procedure unfortunately gave inaccurate results in the case of BP but was successful for OxyBP (data not shown). It was in particular found that the number n of binding

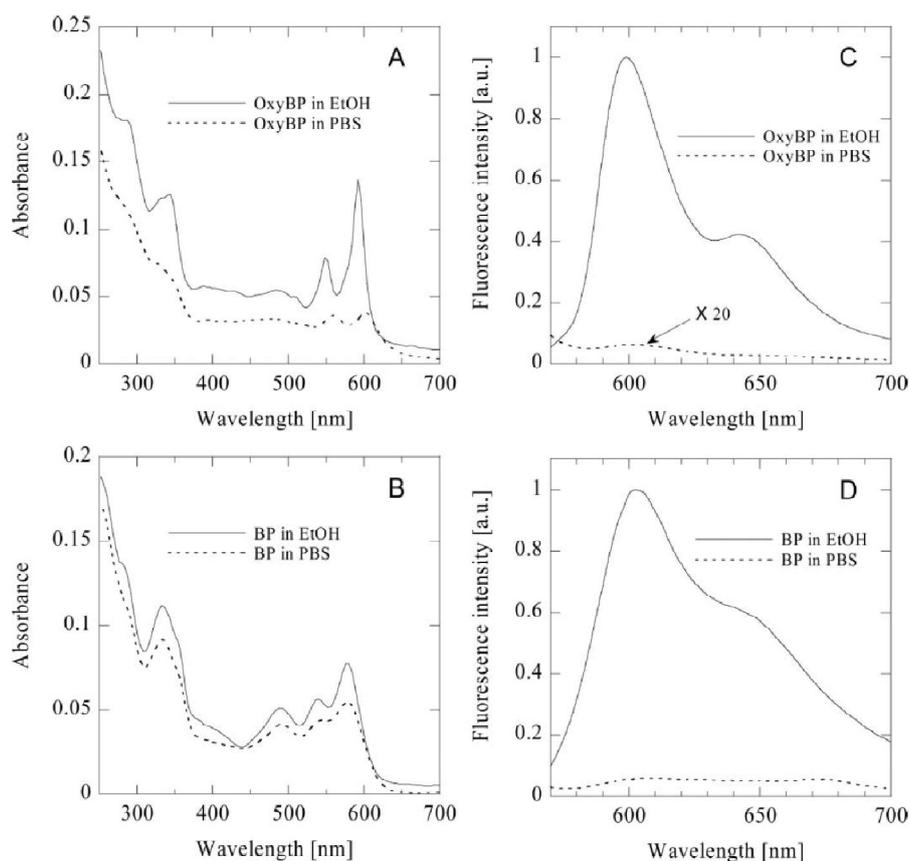


Fig. 1 Steady-state absorption spectra of OxyBP (A) and BP (B), in ethanol (plain line) and in PBS (dotted line). Fluorescence spectra of OxyBP (C) and BP (D) in the same solvents. Note that in Fig. 1C the fluorescence spectrum of BP in PBS was amplified by a factor of 20.

sites offered to OxyBP by each α -subunit is, on the average, equal to 0.8 ± 0.4 (the error is expressed as a standard error; a 95% confidence interval is obtained by multiplying it by 1.96). This number is close to 1 and may be interpreted as the presence of exactly one binding site on each α -subunit. One could also think that only 80% of the α -subunits are accessible to binding. Since previous studies on the binding of alpha-crystallin to 1-anilino-naphthalene-8-sulfonic acid (ANS), a predominantly hydrophobic probe, reported one binding site per α -subunit,⁴¹ we chose to impose $n = 1$ and run the fits again (see Fig. 3). K_d was then found to be equal to $9 \pm 4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (0.18 g L^{-1}) for BP and $6 \pm 2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (0.12 g L^{-1}) for OxyBP (K_d should in fact be a dimensionless quantity; $\mu\text{mol L}^{-1}$ here indicates that the dissociation constant is taken under standard micromolar conditions). The constants show that OxyBP binds slightly better to alpha-crystallin than BP.

In order to compare with a preceding work on the complexation of hypericin with alpha-crystallin,²³ we also obtained an approximate value by the Ehrenberg procedure.⁴² Under the additional condition that $c_a \gg c_p$, one can indeed derive the following expression:

$$R = R_b - K_d \frac{R}{nc_\alpha} \quad (2)$$

For $n = 1$, one plots R as a function of R/c_α and obtains K_d as the slope of a linear regression (not shown). This yields $K_d = 12.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (0.25 g L^{-1}) for BP and $8.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ (0.17 g L^{-1}) for OxyBP. These values are overestimated due to the breakdown of the " $c_a \gg c_p$ " condition for the low concentration part of the linearized graph.

It is interesting to note that the above dissociation constants are a bit smaller than that of hypericin with alpha-crystallin (0.3 g L^{-1}).²³ It can thus be concluded that blepharisms are potentially more harmful to the eye than hypericin, due to their better affinity to alpha-crystallin. The binding constant of hypericin with human serum albumin (HSA) is known to be large ($K_b = 750\,000 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$).⁴³ As the binding constants of blepharisms with HSA can be expected to be of the same order of magnitude (see below), it could be concluded that these pigments would probably find a good solubility in the blood serum.

Steady-state irradiation

We studied the effects of visible-light irradiation on solutions of blepharisms in the presence of alpha-crystallin. In the case of BP, this is a delicate task because it is known that BP undergoes

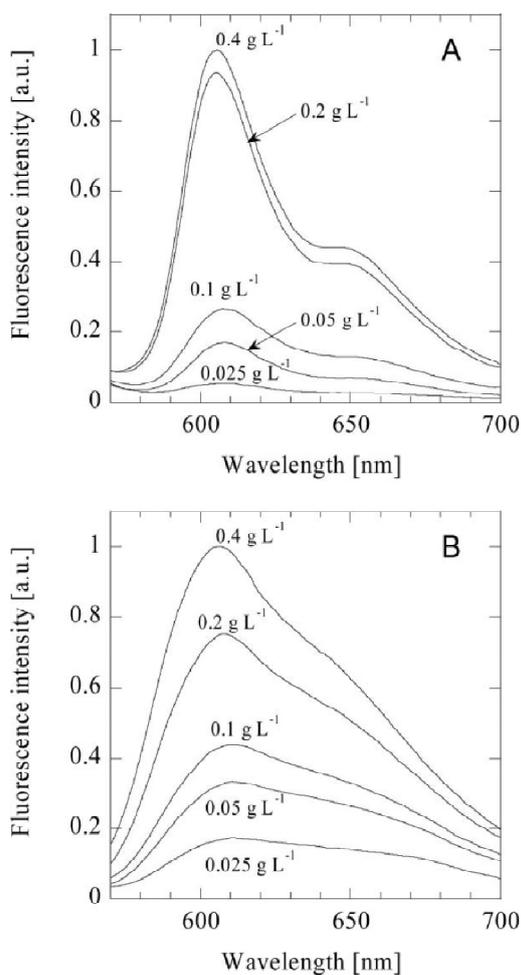


Fig. 2 Fluorescence emission spectra of oxyblepharismine (A) and blepharismine (B) in PBS, for different concentrations of alpha-crystallin.

photooxidation and converts to OxyBP.^{8,15} Consequently, light-induced modifications in the absorption and fluorescence spectra of BP may result both from photooxidation to OxyBP and specific interactions of excited BP with BAC. An intensity of *ca.* 50 mW cm⁻² was used for different periods of time, on a PBS solution containing OxyBP or BP ($c_p = 6 \mu\text{mol L}^{-1}$) in the presence of BAC (α -subunit concentration: $c_a = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$). According to the dissociation constants calculated above, the ratio of bound to total pigment concentrations (given by R/R_b in Fig. 3) was 53% for OxyBP and 45% for BP.

In the case of BP, after 10 min irradiation, the absorption spectra (Fig. 4A) exhibit a marked loss of structure and absorbance and a shift of the hardly apparent maximum toward the red. These changes are most probably due to photooxidation, the shape of the spectrum and the broad maximum close to 600 nm recalling those of OxyBP in PBS without BAC (Fig. 1A, dotted line). The fluorescence intensity of BP in irradiated samples (not shown) almost goes to zero, as if the pigments were in a polydispersed aggregated form. These light-induced modifications suggest that,

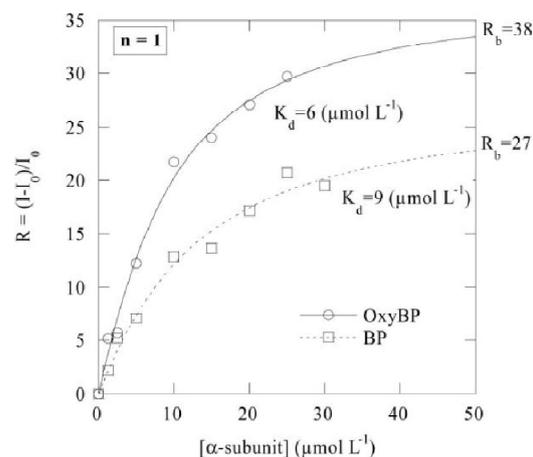


Fig. 3 Relative change of the pigment fluorescence intensity upon addition of alpha-crystallin: oxyblepharismine in plain line and blepharismine in dotted line. The dissociation constants of the complexes were determined by fitting the titration curve with eqn (1).

besides its photooxidation to OxyBP, BP undergoes a detachment from BAC.

In the case of OxyBP, irradiation only induces a 15–20% absorbance decrease at the maximum and some broadening in the red edge. The spectrum however retains the structure of OxyBP in the presence of BAC (Fig. 4B). The effects of irradiation on the fluorescence spectrum of OxyBP ($\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$) are shown in Fig. 4C. An 80% decrease of the fluorescence intensity is detected after 30 min irradiation. The small changes in the structure of the absorption spectrum and the marked ones in fluorescence intensity are not consistent with a photodetachment process, as proposed above for BP. The decrease of OxyBP fluorescence upon irradiation may be attributed to the consequences of photoinduced modifications of the local environment in which the chromophore is embedded. It has in fact been shown by Schey *et al.*,⁴⁴ and confirmed by previous results of some of us,^{23,45} that following visible irradiation of alpha-crystallin:hypericin complexes, a photosensitized polymerization and a consequent packing of proteins occur. Because of the close structural and spectroscopic similarities between hypericin and blepharismine molecules, we hypothesize that irradiation also induces OxyBP:BAC complexes to pack. If the complexes are closely packed, non-covalent weak interactions between the aromatic π -electrons of OxyBP molecules (stacking interactions) can be formed and result in a fluorescence quenching of the pigment. This would be similar to the case of flavin adenine dinucleotide (FAD), the fluorescence of which is quenched (as compared to riboflavin or flavin mononucleotide) by a stacking interaction between the flavin and the adenine moieties (see ref. 46 and references therein).

Following visible irradiation, the fluorescence spectrum of tryptophan ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$), recorded under the same conditions (Fig. 4D for OxyBP), also shows a significant decay of the fluorescence intensity after irradiation (note that the molar fraction of complexed α -subunits was 32% in this experiment). The same phenomenon was observed for BAC complexed with BP (27% of complexed α -subunits; data not shown). The blepharismine-sensitized photopolymerization hypothesis can also account for

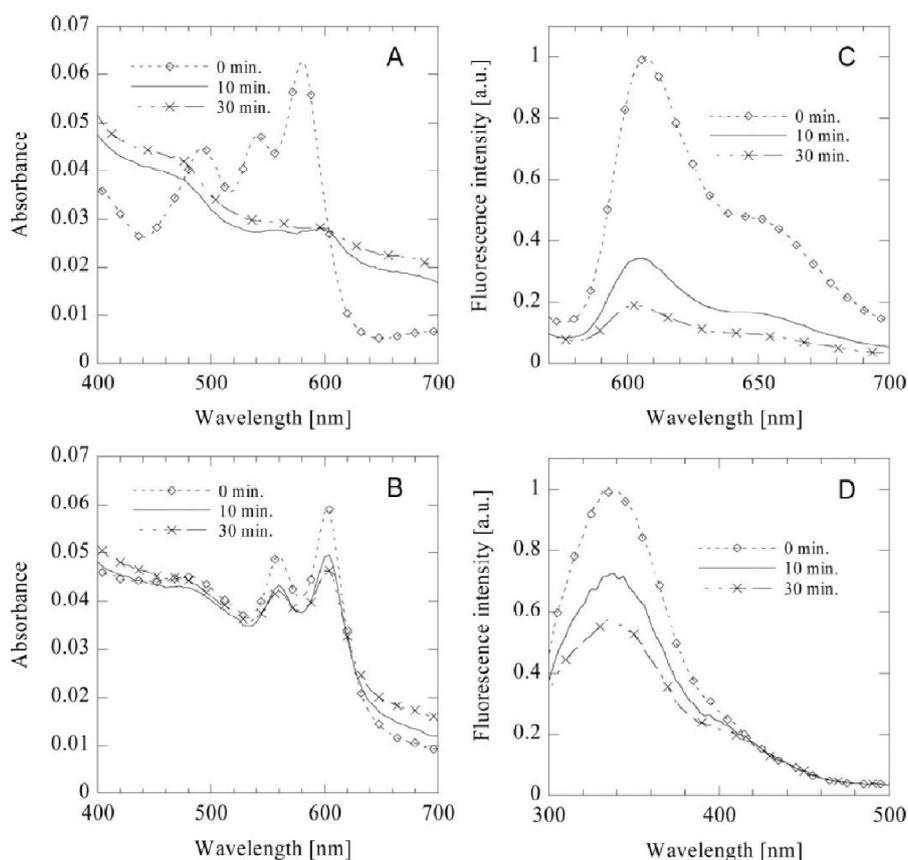


Fig. 4 Continuous visible-light irradiation of blepharismins in PBS, in the presence of alpha-crystallin. Effect on the: absorption spectrum of blepharismine (A), oxyblepharismine (B), fluorescence spectrum of oxyblepharismine (C) and fluorescence spectrum of the tryptophan residues of alpha-crystallin (D).

the Trp fluorescence reduction. The packing of alpha-crystallin might in fact cause the Trp residues from various subunits to spatially approach each other, giving rise to fluorescence quenching (see ref. 23, 45 and references therein). Trp residues might also get buried inside the core of the protein. It has indeed been shown that such a situation may quench Trp fluorescence without altering the fluorescence emission spectral distribution.^{47,48} A photoinduced electron transfer process from Trp in its first excited singlet state to an electron-accepting residue could also occur.⁴⁸ Finally, type II singlet oxygen production followed by oxidation of the protein and/or direct type I interaction of the excited blepharismine with the Trp residues of alpha-crystallin might be the cause of a blepharismine-sensitized photooxidation of Trp.^{11,12,49,50}

In the following section (Transient absorption spectroscopy of the OxyBP:BAC complex), we will examine the possibility of a type I interaction by probing the reactivity of OxyBP in its first excited singlet state.

Transient absorption spectroscopy of the OxyBP:BAC complex

Fig. 5 displays an overview of the transient absorption spectra of a PBS solution of OxyBP bound to BAC (99% binding ratio), at a few selected pump-probe delays between 0.4 ps and 1.2 ns.

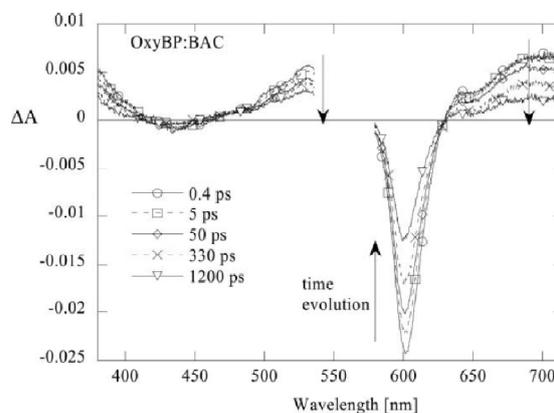


Fig. 5 Overview of the transient absorption spectra of a PBS solution of oxyblepharismine bound to alpha-crystallin (99% binding ratio), at a few selected pump-probe delays between 0.4 ps and 1.2 ns.

The amplitude of the signal is rather small because the constraint imposed on the sample was both to achieve nearly full binding and to avoid excessive scattering of the pump beam by too

large BAC concentrations. We thus chose a somewhat reduced pigment concentration (0.3 mmol L^{-1}). A narrow negative peak is observed around 600 nm. It corresponds to the overlap of the main bleaching band and the main stimulated-emission band. The secondary bleaching minimum (560 nm) is hidden in the region that was masked because of the pump beam scattering. The secondary stimulated-emission minimum is apparent as a dip on a positive background around 650 nm. Two positive maxima are identified around 530 nm and 700 nm, which arise from the overlap of the above-mentioned negative bands and a very broad transient absorption continuum, extending over most of the experimental spectral range. At first sight the evolution of the transient-absorption spectra is essentially homothetic and do not come to an end at 1.2 ns.

An interesting feature is the existence of the positive background in the 650-nm stimulated-emission region. This background is absent for free OxyBP dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO)²⁴ as well as for the OxyBP:HSA complex.²⁶ In those two cases the secondary stimulated-emission minimum appears as a net negative band around 650 nm. On the other hand, such a transient absorption background is observed when OxyBP is bound to its native protein partner (OBIP) in light-adapted *B. japonicum*.^{24,26} The important difference and specificity of this latter case is the occurrence of a fast evolution in the 640–740 nm spectral range, leading to the signature of the oxyblepharimin radical cation. We believe the observation of the transient absorption background at 650-nm reveals a particular type of interaction of the pigment in its excited-state with its protein environment. As previously proposed in the case of OBIP,²⁶ this band might be assigned to a chromophore-to-protein charge transfer transition. This conclusion does not mean that the interaction of OxyBP with BAC is stronger than that with HSA. Since OxyBP binds to BAC with a similar strength as hypericin does, it can be hypothesized that OxyBP and hypericin also bind to HSA similarly. In addition, since hypericin binds more strongly to HSA than to BAC, one may expect that the affinity of OxyBP to HSA is in fact larger than to BAC.

A global analysis of the transient absorption data could be performed with the sum of three exponentials and a step function—accounting for a long-lived signal (see Material and Methods for details on the fitting procedure). The lifetime of the three exponentials are $2.0 \pm 0.5 \text{ ps}$, $13 \pm 3 \text{ ps}$ and $480 \pm 40 \text{ ps}$. Fig. 6 displays the spectra of the preexponential factors attached to each component (DADS: decay-associated difference spectra). The two short lifetimes are rather minor components, to be tentatively interpreted as a combination of effects. The shortest lifetime might be related to some fast reorganization of the protein environment triggered by the photoinduced change of electronic distribution in OxyBP. The second lifetime could be compared to a similar weak component observed in the case of free OxyBP in DMSO (15 ps)²⁷ and previously assigned to a slight change of the nonplanar chiral conformational of the molecule in the excited state.^{2,25} Most of the overall kinetics is nevertheless accounted for by the 480-ps and step components. These components should be compared to homologous ones found for free OxyBP and the OxyBP:HSA complex. Photoexcited OxyBP in DMSO was found to decay in about 1 ns and form the triplet state with a yield of 25%.²⁷ The OxyBP:HSA complex displays a similar behaviour with an excited-state lifetime of 945 ps and a triplet yield of 65%.²⁷ The fate of the

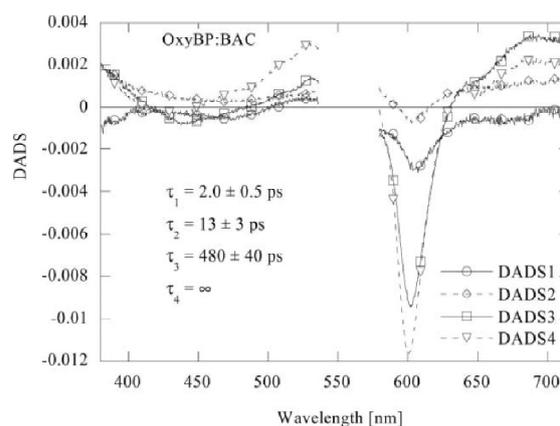


Fig. 6 Preexponential factors spectra (DADS: decay-associated difference spectra) attached to each of the four time components found in the global analysis of the transient absorption spectra of oxyblepharimin bound to alpha-crystallin.

OxyBP:BAC complex is apparently different. No signature of the triplet state (loss of the stimulated-emission structures and broad positive band peaking around 640 nm²⁶) is detected at long times in the present difference spectra. The fact that the DADS of the step component still displays stimulated-emission structures indicates that the real long-lived decay of the molecule has not been properly resolved by the fit. Its lifetime might for instance be significantly longer than 1.2 ns, the longest pump–probe delay of this experiment. Since the DADS of the 480-ps and step components have a somewhat similar shape, one may tentatively propose that the two decays correspond to two independent classes of OxyBP:BAC complexes. One of those would rather rapidly return to the ground state through an as yet unknown deactivation channel, whereas the other one would have a much longer lifetime. Since one inferred above that packing leads to the decrease in the fluorescence intensity, one might imagine that the concentrated solution used for transient absorption spectroscopy contains in part such packed complexes.

Role of the chromophore local environment: effect of partial denaturation

As described in the Material and Methods section, addition of 1 mol L^{-1} guanidinium hydrochloride to a solution of alpha-crystallin produces a partially denatured configuration we tentatively identified as a molten globule state (we shall note it mgBAC). We used partial denaturation of alpha-crystallin as a convenient way to modify the local environment around OxyBP when it is bound to alpha-crystallin. Our objective was to probe the interaction of the chromophore with this loosened protein by means of its photo-induced behaviour. Complexes of OxyBP with mgBAC, were prepared with the same concentrations (0.3 mmol L^{-1} OxyBP, 0.95 mmol L^{-1} BAC) as in the case of native BAC. We verified that the steady-state absorption spectrum of the solution bears the characteristic features of solubilized pigments (see the Steady-State Optical Spectroscopy and Binding to Alpha-Crystallin subsections), such as the ones

of the OxyBP:BAC complexes. We thus assumed that the sample solution predominantly contains OxyBP:mgBAC complexes.

Fig. 7 displays an overview of the corresponding transient absorption spectra, at a few selected pump-probe delays between 0.3 ps and 1.2 ns. They are globally very similar to those of the OxyBP:BAC complexes but a few differences may be noted. Since the spectral range of this particular experiment was extended by 30 nm toward the near UV, it is possible to locate the apparent maximum of the blue transient absorption around 375 nm. The start of a higher lying bleaching band also appears below 360 nm. In the 630–680 nm complex-sensitive region, the stimulated-emission dip at 650 nm is slightly more pronounced at long times for OxyBP:mgBAC than for OxyBP:BAC. It also seems that the main negative peak at 600 nm dissymmetrically narrows on its stimulated-emission (red) side at long times and that a faint transient absorption concomitantly rises below 630 nm.

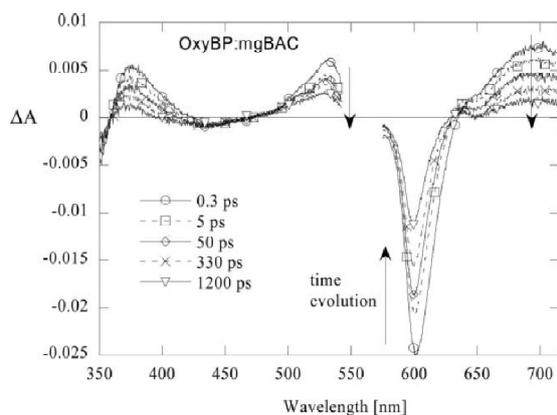


Fig. 7 Overview of the transient absorption spectra of a PBS solution of oxyblepharismine bound to partially-denatured alpha-crystallin, at a few selected pump-probe delays between 0.3 ps and 1.2 ns.

More details are revealed by a global analysis of the data. Although a sum of four exponentials accounts for most of the present photoinduced behaviour, adding a step function provides a slightly better fit. The lifetime of the four exponentials are 0.70 ± 0.04 ps, 8.0 ± 0.5 ps, 98 ± 6 ps and 2.6 ± 1 ns and Fig. 8 displays all the DADS. As for OxyBP:BAC, the shortest two time components are minor and could be assigned to a fast reorganization of the protein environment and a slight change of the pigment geometry, respectively. The 98-ps component has not been assigned but is rather minor as well. Most of the excited-state decay is described by the 2.6-ns lifetime. It seems thus that the paradoxical step component of OxyBP:HSA (non-measurable excited-state decay) has been here replaced by an observable nanosecond decay followed by a plateau, really corresponding to a long-lived species. It is quite interesting to note that the DADS of this plateau has a specific shape, characterized by a loss of the stimulated-emission structures and a positive band around 615 nm. Taking into account large errors in the determination of this spectrum, one may propose that it is the signature of the bound pigment in its triplet state.²⁶

We finally conclude that partial denaturation of BAC makes the excited-state behaviour of its complex with OxyBP somehow

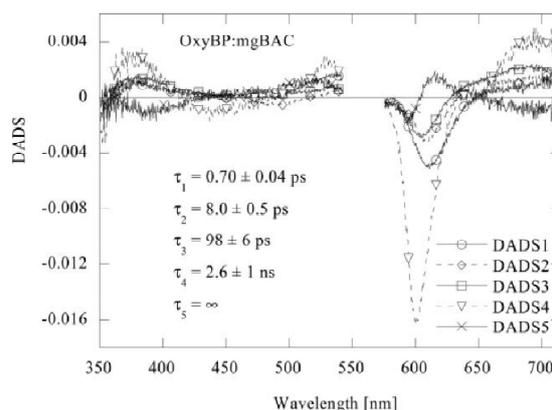


Fig. 8 DADS of the five time components found in the global analysis of the transient absorption spectra of oxyblepharismine bound to partially-denatured alpha-crystallin.

resemble that of free OxyBP in solution, with nanosecond decay and triplet formation—although the positive background absorption at 650 nm remains. Such an effect is not surprising if one think that the looser packing of the protein secondary structures found in molten globules likely allows a better access of water molecules to the binding site. Consequently, the resulting microscopic configuration of the bound pigment can be thought as being intermediate between those of OxyBP:BAC and free OxyBP. These results further confirm that the photoinduced behaviour of OxyBP strongly depends on its interaction with its close environment.

Conclusions

We have shown that both OxyBP and BP can bind to bovine alpha-crystallin (BAC) and thereby become soluble in an aqueous environment. A nonlinear fit of the fluorescence titration curve indicates that the number of binding sites offered to OxyBP per α -subunit (n) is close to 1. Under the additional constraint that n is exactly equal to 1, the dissociation constant (K_d) has been estimated to be $6 \pm 2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (0.12 g L^{-1}) for OxyBP and $9 \pm 4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (0.18 g L^{-1}) for BP. Such values indicate that blepharismins are potentially harmful to the eye, provided their structures allow them to reach and enter the eye lens. This property would have to be seriously pondered when planning the use of blepharismins as photodynamic chromophores.

We evidenced that continuous visible-light irradiation of solutions of blepharismins in the presence of BAC induces a prominent reduction of pigment fluorescence intensity. A similar quenching was observed on the tryptophan fluorescence. These photoinduced effects are interpreted differently for BP and OxyBP. For BP, the pigment is thought to photodetach from BAC and consequently returns to its polydispersed faintly fluorescent aggregated form. Photooxidation of BP to OxyBP also occurs concomitantly. For OxyBP, a photoinduced close packing of the complexes is supposed to favour stacking interactions between oxyblepharismine molecules, thereby explaining the pigment fluorescence quenching. The quenching of the tryptophan fluorescence is assigned to a modification of the protein structure.

Femtosecond transient absorption spectroscopy evidenced a specific spectral feature (positive background in the secondary stimulated-emission region) of the excited OxyBP bound to BAC, found for the natural OxyBP-binding protein (OBIP) but absent in the case of complexes of OxyBP with human serum albumin or free OxyBP in solution. This probably reveals a particular type of binding but does not necessarily imply any specific type I reactivity. The analysis of the data showed a peculiar bimodal decay of the excited state, possibly due to the existence of different types of complex, but failed to exhibit the production of any identifiable photoproduct, such as radicals, in the 0–1.2 ns timescale. It could tentatively be inferred that the photoinduced activity of OxyBP in the presence of alpha-crystallin is more likely of type II nature, but additional data on a longer timescale are in fact necessary to be in a position to conclude.

We finally used partial denaturation of BAC to modify the local environment of OxyBP within the complex. We demonstrated that the looser structure of the molten globule state induces changes of the excited-state behaviour of the chromophore, making it closely resemble that of free OxyBP in solution. This is understood by the larger accessibility of water to the binding site in the partially denaturated state of BAC.

Acknowledgements

Dr T. Youssef gratefully acknowledges the International Centre for Theoretical Physics of Trieste for providing him a 3-month fellowship at the CNR Istituto di Biofisica di Pisa, Italy. He also thanks the France–Egypt Imhotep #12456UA exchange program for granting him a 2-month stay at the Ecole Normale Supérieure (ENS) in Paris, France. The ENS group acknowledges financial support from the French ANR (national agency for research).

The authors are indebted to Mr Alberto Pietrangeli (CNR–IBF, Pisa) for his precious help in maintaining cell cultures.

References

- 1 A. C. Giese, Hypericium, in *Photochem. Photobiol. Rev.*, ed. K. C. Smith, New York, 1980, pp. 229–255.
- 2 H. Falk, From the photosensitizer hypericin to the photoreceptor stentorin - the chemistry of phenanthroperylene quinones, *Angew. Chem.*, 1999, **38**, 3116–3136.
- 3 J. Barnes, L. A. Anderson and J. D. Phillipson, St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2001, **53**, 583–600.
- 4 J. E. Roberts, Therapeutic effects of light in human, in *Photobiology for the 21st Century*, ed. T. P. Coohill and D. P. Valenzano, Overland Park, Kansas, 2001, pp. 17–29.
- 5 T. Matsuoka, S. Matsuoka, Y. Yamaoka, T. Kuriu, Y. Watanabe, M. Takayanagi, Y. Kato and K. Taneda, Action spectra for step-up photophobic response in *Blepharisma*, *J. Protozool.*, 1992, **39**, 498–502.
- 6 G. Checcucci, G. Damato, F. Ghetti and F. Lenzi, Action spectra of the photophobic response of blue and red forms of *Blepharisma japonicum*, *Photochem. Photobiol.*, 1993, **57**, 686–689.
- 7 A. Sgarbossa, G. Checcucci and F. Lenzi, Photoreception and photomovements in microorganisms, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, **1**, 459–467.
- 8 D. Spitzner, G. Höfle, I. Klein, S. Pohlan, D. Ammermann and L. Jaenicke, On the structure of oxyblepharismine and its formation from blepharismine, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 4003–4006.
- 9 G. Checcucci, R. S. Shoemaker, E. Bini, R. Cerny, N. Tao, J.-S. Hyon, D. Gioffrè, F. Ghetti, F. Lenzi and P.-S. Song, Chemical structure of blepharismine, the photosensor for *Blepharisma japonicum*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 5762–5763.
- 10 A. C. Giese, *Blepharisma: the biology of a light-sensitive protozoan*, Stanford University Press, 1973.
- 11 F. Ghetti, G. Checcucci and F. Lenzi, New trends in photobiology: photosensitized reactions as primary molecular events in photomovements of microorganisms, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1992, **15**, 185–198.
- 12 G. Checcucci, F. Lenzi, F. Ghetti and P.-S. Song, A videomicroscopic study of the effect of a singlet oxygen quencher on *Blepharisma japonicum* photobehavior, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1991, **11**, 49–55.
- 13 A. C. Giese, Some properties of a photodynamic pigment from *Blepharisma*, *J. Gen. Physiol.*, 1953, **37**, 259–269.
- 14 B. Pant, Y. Kato, T. Kumagai, T. Matsuoka and M. Sugiyama, Blepharismine produced by a protozoan *Blepharisma* functions as an antibiotic effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, **155**, 67–71.
- 15 F. Ghetti, G. Checcucci, F. Lenzi and P. F. Heelis, A laser flash photolysis study of the triplet states of the red and the blue forms of *Blepharisma japonicum* pigment, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1992, **13**, 315–321.
- 16 J. E. Roberts and J. Dillon, *In vitro* studies on the photosensitized oxidation of lens proteins by porphyrins, *Photochem. Photobiol.*, 1987, **46**, 683–688.
- 17 J. E. Roberts, Ocular phototoxicity, *Photochem. Photobiol.*, 2001, **64**, 136–143.
- 18 C. Slingsby and N. J. Clout, Structure of the crystallins, *Eye*, 1999, **13**, 395–402.
- 19 J. Horwitz, The function of alpha-crystallin in vision, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2000, **11**, 53–60.
- 20 T. H. MacRae, Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2000, **57**, 899–913.
- 21 K. Kim, R. Kim and S. H. Kim, Crystal structure of a small heat-shock protein, *Nature*, 2002, **394**, 595–599.
- 22 H. Bloemendal, W. Jong, R. Jaenicke, N. H. Lubsen, C. Slingsby and A. Tardieu, Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2004, **86**, 407–485.
- 23 A. Sgarbossa and F. Lenzi, Spectroscopic study of visible-light effects on hypericin-lens proteins systems, *Photochem. Photobiol.*, 2001, **74**, 196–200.
- 24 P. Plaza, M. Mahet, M. M. Martin, N. Angelini, M. Malatesta, G. Checcucci and F. Lenzi, Spectroscopic study of the chromophore-protein association and primary photoinduced events in the photoreceptor of *Blepharisma japonicum*, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2005, **4**, 754–761.
- 25 O. Pieroni, P. Plaza, M. Mahet, N. Angelini, G. Checcucci, M. Malatesta, M. M. Martin and F. Lenzi, Circular dichroism of the photoreceptor pigment oxyblepharismine, *Photochem. Photobiol.*, 2005, **81**, 1343–1346.
- 26 M. Mahet, P. Plaza, M. M. Martin, G. Checcucci and F. Lenzi, Primary photoprocesses in oxyblepharismine interacting with its native protein partner, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2007, **185**, 345–353.
- 27 P. Plaza, M. Mahet, M. M. Martin, G. Checcucci and F. Lenzi, Target analysis of primary photoprocesses involved in the oxyblepharismine-binding protein, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 690–696.
- 28 V. S. Pande and D. S. Rokhsar, Is the molten globule a third phase of proteins?, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 1490–1494.
- 29 D. Gioffrè, F. Ghetti, F. Lenzi, C. Paradiso, R. Dai and P.-S. Song, Isolation and characterization of the presumed photoreceptor protein of *Blepharisma japonicum*, *Photochem. Photobiol.*, 1993, **58**, 275–279.
- 30 M. Maeda, H. Naoki, T. Matsuoka, Y. Kato, H. Kotsuki, K. Utsumi and T. Tanaka, Blepharismine 1–5, novel photoreceptor from the unicellular organism *Blepharisma japonicum*, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 7411–7414.
- 31 D. R. Robinson and W. P. Jencks, The effect of compounds of the urea-guanidinium class on the activity coefficient of acetyltetraglycine ethyl ester and related compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, **87**, 2462–2470.
- 32 J. A. Gordon and W. P. Jencks, The relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for proteins, *Biochemistry*, 1963, **2**, 47–57.
- 33 B. K. Das and J.-N. Liang, Detection and characterization of alpha-crystallin intermediate with maximal chaperone-like activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, **236**, 270–374.
- 34 C. M. Rao, B. Raman, T. Ramakrishna, K. Rajaraman, D. Ghosh, S. Datta, V. D. Trivedi and M. B. Sukhaswami, Structural perturbation of alpha-crystallin and its chaperone-like activity, *Int. J. Biol. Macromol.*, 1998, **22**, 271–281.

CHAPITRE VII : Photocycle ultrarapide et état signalant du photorécepteur de *Blepharisma japonicum*

- 35 N. Angelini, A. Quaranta, G. Checcucci, P.-S. Song and F. Lenci, Electron transfer fluorescence quenching of *Blepharisma japonicum* photoreceptor pigments, *Photochem. Photobiol.*, 1998, **68**, 864–868.
- 36 P. Plaza, M. Mahet, O. N. Tchaikovskaya and M. M. Martin, Excitation energy effect on the early photophysics of hypericin in solution, *Chem. Phys. Lett.*, 2005, **408**, 96–100.
- 37 E. R. Henry and J. Hofrichter, Singular value decomposition: application to analysis of experimental data, *Methods Enzymol.*, 1992, **210**, 129–193.
- 38 N. P. Ernsting, S. A. Kovalenko, T. Senyushkina, J. Saam and V. Farztdinov, Wave-packet-assisted decomposition of femtosecond transient ultraviolet-visible absorption spectra: application to excited-state intramolecular proton transfer in solution, *J. Phys. Chem. A*, 2001, **105**, 3445–3454.
- 39 B. Valeur, Formation of a 1:1 complex (single-wavelength measurement), in *Molecular fluorescence. Principles and applications*, Weinheim, 2002, pp. 341–344.
- 40 K. Zierler, An error in interpretation of double-reciprocal plots and Scatchard plots in studies of binding of fluorescent probes to proteins, and alternative proposals for determining binding parameters, *Biophys. Struct. Mech.*, 1977, **3**, 275–289.
- 41 J. N. Liang and X. Y. Li, Interaction and aggregation of lens crystallins, *Exp. Eye Res.*, 1991, **53**, 61–66.
- 42 B. Ehrenberg, Assessment of the partitioning of probes to membranes by spectroscopic titration, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1992, **14**, 383–386.
- 43 V. Senthil, J. W. Longworth, C. A. Ghiron and L. Grossweiner, Photosensitization of aqueous model systems by hypericin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, **1115**, 192–200.
- 44 K. L. Schey, S. Patat, C. F. Chignell, M. Datillo, R. H. Wang and J. E. Roberts, Photooxidation of lens alpha-crystallin by hypericin (active ingredient of St. John's Wort), *Photochem. Photobiol.*, 2000, **72**, 200–203.
- 45 A. Sgarbossa, T. Youssef and F. Lenci, Photosensitized structural modifications of the lens protein α -crystallin: do all modifications impair chaperone-like activity?, *Photochem. Photobiol.*, 2003, **77**, 567–571.
- 46 F. Lenci, M. M. Martin, P. Plaza, G. Checcucci, N. Angelini and A. Sgarbossa, Biophysics: Fluorescent biomolecules, in *Encyclopaedia of condensed matter physics*, ed. G. F. Bassani, G. L. Liedl and P. Wyder, 2005, pp. 222–235.
- 47 Y. Chen and M. D. Barkley, Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins, *Biochemistry*, 1998, **37**, 9976–9982.
- 48 P. R. Callis, A. Petrenko, P. L. Muiño and J. R. Tusell, *Ab initio* prediction of tryptophan fluorescence quenching by protein electric field enabled electron transfer, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 10335–10339.
- 49 E. L. Finley, J. Dillon, R. K. Crouch and K. L. Schey, Identification of tryptophan oxidation products in bovine alpha-crystallin, *Protein Sci.*, 1998, **7**, 2391–2397.
- 50 C. C. Trevithick-Sutton, K. K. Chin, S. D. Contos and C. S. Foote, Lens α -crystallin and hypericin: a photophysical mechanism explains observed lens damage, *Photochem. Photobiol.*, 2004, **80**, 444–449.

3 Étude de la photophysique intrinsèque d'un dérivé de l'Hypéricine : l'*O*-hexaméthoxyhypéricine

Nous avons vu dans l'introduction de ce chapitre que l'étude du chromophore de OBIP, l'oxyblépharismine, avait amenée à s'intéresser à la photophysique de son proche parent, l'hypéricine (Hyp), un pigment rappelons-le très étudié en médecine pour la photothérapie dynamique du cancer [229]. Cet intérêt a entraîné le groupe dans une controverse au sujet de l'interprétation d'une montée retardée de ~10 ps dans les signaux d'émission stimulée de Hyp. L'interprétation du groupe Petrich (Iowa State University, États-Unis) de cette montée est une tautomérisation de Hyp à l'état excité alors que celle du groupe est un processus de relaxation vibrationnelle suivant l'excitation multiphotonique de la molécule [216].

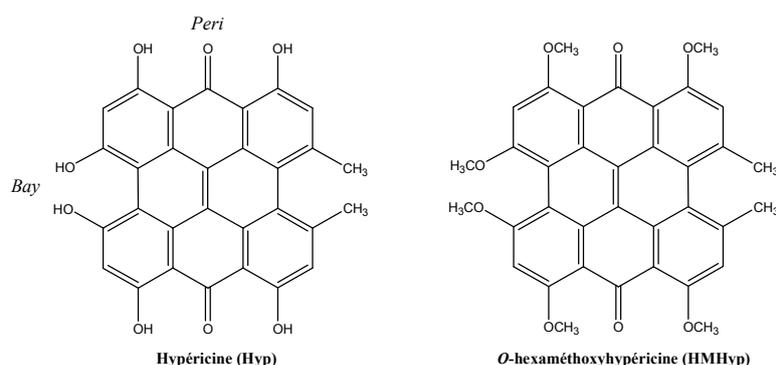


Figure 3.1 : Formules semi-développées des chromophores hypéricine (Hyp) et *O*-hexaméthoxyhypéricine (HMHyp).

Afin d'apporter des éléments de réponse à cette controverse, nous avons étudié, en collaboration avec le groupe Petrich, l'*O*-hexaméthoxyhypéricine (HMHyp) par spectroscopie d'absorption transitoire, avec une résolution temporelle inférieure à 100 fs. HMHyp présente l'avantage que le transfert d'hydrogène intramoléculaire est strictement impossible. Si une montée retardée semblable à celle de Hyp était observée pour cette molécule, cela tendrait à écarter l'hypothèse du transfert d'hydrogène intramoléculaire.

Nous avons tout d'abord repris les expériences d'absorption transitoire de Hyp en excitant la molécule dans la seconde structure vibrationnelle de la première transition électronique S_0 - S_1 (555 nm) à trois fluences différentes. La fluence est exprimée en fluence réduite, j , qui est le rapport de la fluence incidente sur la fluence de saturation F_S :

$$j = \frac{F}{F_S}, \text{ avec } F_S = \frac{1}{\sigma_a} \text{ et } \sigma_a \text{ est la section efficace d'absorption.}$$

Nous avons confirmé que la montée retardée de 10 ps n'est observée uniquement à moyenne et forte fluence (c'est-à-dire quand $j > 1$).

Pour HMHyp, à faible fluence ($j = 0,14$), l'évolution temporelle des spectres d'absorption transitoire est assez différente de celle de Hyp. Dans l'analyse cinétique, un très bon accord a été trouvé, autant sur les durées de vie que sur les amplitudes relatives, des trois premières composantes avec celles de la dynamique de solvation du DMSO (solvant utilisé) ($\tau_1 = 0,214$ ps (46%), $\tau_2 = 2,29$ ps (32%) et $\tau_3 = 10,7$ ps (9%) [237]) suggérant que l'évolution des spectres observés pendant les 20 premières picosecondes, résulte de la dynamique de solvation affectant essentiellement l'émission stimulée. Cette hypothèse a été confirmée par des simulations de la dynamique de déplacement de Stokes de la bande d'émission stimulée qui ont permis de retrouver l'évolution globale observée aux temps courts (cf. la Figure 5 de l'article donné ci-dessous). La quatrième durée de vie des ajustements paramétriques, un déclin de 540 ps est en bon accord avec le déclin de fluorescence de HMHyp [238]. Le produit de relaxation formé est attribué au triplet par croisement inter-système [239].

Nous avons analysé l'effet de la fluence d'excitation sur la cinétique à 565 nm (région spectrale où la contribution de la dynamique de solvation à la dynamique observée est minimale). Nous avons trouvé que lorsque la fluence augmente, l'ajustement cinétique doit être effectué avec deux exponentielles et une fonction plateau et une montée retardée avec un temps caractéristique de 1,6 ps apparaît.

Cette montée retardée, détectée à la fois pour Hyp et HMHyp ne peut s'expliquer par un transfert d'hydrogène intramoléculaire, impossible pour HMHyp. Comme elle n'est pas observée à basse fluence, nous supposons que la montée est liée à une absorption multiphotonique du faisceau d'excitation. Nous supposons que cette transition non linéaire produit un état singulet S_1 chaud, après conversion interne ultra-rapide (non observée) depuis un état excité plus élevé atteint à plusieurs photons. Le temps de montée observée serait la dynamique de refroidissement vibrationnel de cet état S_1 chaud. Pour expliquer que ce temps soit plus court pour HMHyp que pour Hyp, nous avons invoqué un couplage vibrationnel avec le solvant plus important dû au fait que HMHyp possède de plus nombreuses liaisons C-H que Hyp.

Ces travaux ont été publiés dans l'article reproduit ci-dessous ayant pour référence :
Ley C., Brazard J., Lacomat F., Plaza P., Martin M. M., Kraus G. A., Petrich J. W., *Chem.
Phys. Lett.*, **2008**, 457, 82-86.

Multiphotonic excitation and solvation dynamics effects on the femtosecond transient absorption of *O*-hexamethoxyhypericin

Christian Ley^{a,*}, Johanna Brazard^a, Fabien Lacomat^a, Pascal Plaza^a, Monique M. Martin^a, George A. Kraus^b, Jacob W. Petrich^b

^aUMR-CNRS 8640, Département de Chimie, Ecole Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France

^bDepartment of Chemistry, 1605 Gilman Hall, Iowa State University, Ames, IA 50011-3111, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2008

In final form 26 March 2008

Available online 31 March 2008

ABSTRACT

The hypothesis of a photoinduced intramolecular H-atom transfer in hypericin is reexamined by comparison with *O*-hexamethoxyhypericin, a derivative bearing no labile proton. In both cases, femtosecond transient absorption spectroscopy reveals an additional picosecond rising component in the kinetics under high excitation fluences. For the hexamethoxy derivative this effect is mixed with solvation dynamics but we succeeded in decoupling it. The delayed rise is ascribed to bi/multiphotonic excitation to upper excited states, followed by internal conversion to a hot S_1 state that subsequently cools down. The present observations are not consistent with the intramolecular H-atom transfer interpretation.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hypericin (Hyp, Fig. 1), a natural pigment of the phenanthroperylene quinone family, is a well-known photosensitizing agent [1] of great interest to clinical medicine, in particular to the photodynamic therapy of cancer [2–7]. Numerous studies were devoted to understanding the light-induced biological activity of Hyp, therefore its excited-state behavior, by time-resolved optical spectroscopies [8–14]. Our work deals with a controversy regarding the observation by Petrich and co-workers of a 10-ps rise in the main emission band of hypericin in polar solvents, both by femtosecond transient absorption [11] and fluorescence up-conversion spectroscopies [15]. This time component was assigned to an excited-state internal H-atom transfer (tautomerization), from a *peri* hydroxyl group to the neighboring carbonyl group [8,12,15,16], potentially relevant for the biological photoactivity of Hyp. This interpretation, however, faced a few difficulties among which the nearly perfect mirror-image symmetry (Fig. 2) between the absorption and fluorescence steady-state spectra. This rather suggests little changes of electronic and nuclear structure between the fluorescent state and the first electronic state reached by excitation. On the other hand, Plaza et al. [10] observed a similar 10-ps rising stimulated-emission signal of hypericin in dimethyl sulfoxide (DMSO), but only under high excitation fluence. They proposed that the 10-ps rise time is due to the cooling of a hot S_1 state produced by multiphotonic absorption. In order to further discriminate between these two interpretations, we examined the role of excitation fluence on the photophysics of a methoxy-substituted hypericin, *O*-hexame-

thoxyhypericin (HMHyp, Fig. 1), for which intramolecular H-atom transfer cannot occur. English et al. formerly demonstrated that no rise time of the fluorescence up-conversion signal of HMHyp is observable in the fs–ps regime [15]. The present work reports experiments carried out on HMHyp, and Hyp for comparison, in DMSO by transient absorption spectroscopy on a broad spectral range and with a sub-100 fs time resolution. Due to its particular relevance for the H-atom transfer controversy (see above), special attention has been paid to the main stimulated-emission band.

2. Materials and methods

2.1. Materials

HPLC-grade hypericin (Rotichrom) was purchased from Carl Roth GmbH and used without further purification. *O*-hexamethoxyhypericin was synthesized by G.A. Kraus as previously described [12]. Spectrophotometric-grade DMSO (Aldrich, 99.9%) was dried over molecular sieves. Around 2.3×10^{-4} mol L⁻¹ hypericin and 1.2×10^{-3} mol L⁻¹ *O*-hexamethoxyhypericin solutions ($A \sim 1$ per mm at 599 and 528 nm, respectively), were used for the transient absorption experiments. The *O*-hexamethoxyhypericin solution was kept under argon in order to prevent the sample from degrading.

2.2. Steady-state spectroscopy

Steady-state absorption spectra were measured using a Safas UV-mc² dual-beam spectrophotometer. Fluorescence emission and excitation spectra were recorded with a Jobin-Yvon Fluoro-

* Corresponding author. Fax: +33 144323325.
E-mail address: christian.ley@ens.fr (C. Ley).

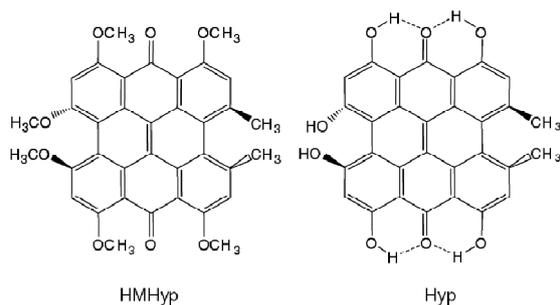


Fig. 1. Chemical structure of *O*-hexamethoxyhypericin (HMHyp, left) and hypericin (Hyp, right).

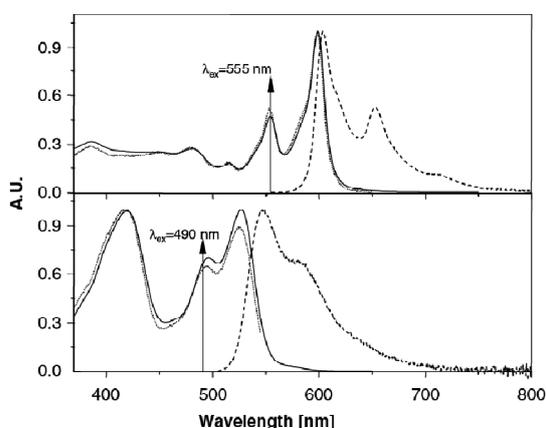


Fig. 2. Normalized absorption (plain line), excitation (dotted) and fluorescence (-dashed) spectra of hypericin (up) and *O*-hexamethoxyhypericin (down) in DMSO. The fluorescence excitation wavelengths were respectively 555 and 490 nm. For the excitation spectra, the emission wavelengths were fixed at 550 and 653 nm. The arrows indicate the excitation wavelengths used for transient-absorption spectroscopy.

max-3 spectrofluorometer. Fluorescence spectra were fully corrected for the excitation and emission transfer functions.

2.3. Femtosecond transient absorption spectroscopy

Femtosecond transient absorption spectra were obtained by the pump-continuum-probe method. The source is a Spectra-Physics laser system composed of a Tsunami Ti:Sapphire oscillator (Millennia pumped) and a spiltfire regenerative amplifier. It provides 50-fs (FWHM) pulses at 810 nm and 1 kHz. A large part of the output is used to run a Clark MXR 405-nm-pumped non-collinear optical parametric amplifier, which generates ~ 35 -fs pump pulses tuned at 555 nm for hypericin and 490 nm for *O*-hexamethoxyhypericin. The excitation wavelength was chosen in both cases at the secondary maximum (0–1) of the lowest absorption transition in order to avoid obscuring the particularly relevant stimulated-emission band (see Section 1) by scattering of the spectrally-broad pump beam. A couple μJ /pulse of the 810-nm beam are focused on a 1-mm CaF_2 window in order to generate the continuum probe (350–800 nm), which is divided into two beams: one is used as a reference while the other one crosses the pump beam in the sample cell (1 mm, fused silica), at an angle of $\sim 5^\circ$. Pump and probe beams polarizations are set at the magic angle (54.7°). Both beams are then sent onto the entrance slit of an Acton SP306i spectro-

graph and their spectra are simultaneously recorded with a Princeton Instruments CCD matrix (Spec-10 100B, 100×1340 pixels), at 333 Hz. The pump-probe delay is adjusted by a motorized translation stage. Experiments were performed at room temperature and the sample cell was continuously moved in order to renew the excited volume between two pump pulses. The differential absorbance spectra (ΔA) were corrected from group velocity dispersion in the probe beam.

Experiments were carried out at different excitation fluences (F : number of photons per cm^2), expressed here as a dimensionless reduced fluence (j = ratio of the fluence F to the saturation fluence F_s [17]):

$$j = \frac{F}{F_s} = F\sigma = 3.82 \times 10^{-21} F\epsilon$$

where σ is the ground-state absorption cross section (in cm^2) of the molecule at the excitation wavelength and ϵ is the corresponding molar extinction coefficient (15000 and $5350 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ at 555 and 490 nm for Hyp and HMHyp, respectively).

Kinetic analysis of the data was performed by independently fitting the traces at selected wavelengths to a sum of exponentials, convoluted by a 100-fs (FWHM) Gaussian function (experimental response function). No satisfactory global analysis could be obtained because of the important continuous shift of the stimulated-emission band of HMHyp (see Section 3.2). The presence of a cross-phase modulation (XPM) artifact during pump-probe overlap was empirically taken into account with the sum of the same Gaussian function and its time derivative. It may be noted that XPM cannot be avoided in DMSO with a continuum-probe setup as ours, especially at high pumping energies. This artifact is intense and obscures the molecular dynamics, say, in the $[-200 \text{ fs}, +200 \text{ fs}]$ time interval.

3. Results and discussion

Fig. 2 displays the steady-state absorption, emission and excitation spectra of Hyp and HMHyp in DMSO. One notes the good mirror-image symmetry between the absorption and fluorescence spectra of both compounds. The spectra of HMHyp are 60 nm blue shifted, and less structured, as compared to those of Hyp. A second intense transition is also observed around 420 nm.

3.1. Delayed rise of hypericin stimulated emission at high excitation fluence

We confirm here a markedly specific kinetic behavior of the stimulated-emission signal of Hyp in DMSO. At low fluence ($j = 0.3$), the rise of the signal is limited by the instrumental response function. An additional rise time (10-ps lifetime) becomes apparent when the excitation fluence is raised to $j = 3$ and is well seen at high fluence ($j = 5$). These experiments, carried out with a better time resolution and increased sensitivity ($\sim 0.1 \text{ mOD}$) definitely confirm the results previously published [10].

3.2. Transient absorption spectra of *O*-hexamethoxyhypericin at low fluence. Role of solvation dynamics

Fig. 3 shows an overview of the differential absorption spectra at very low fluence ($j = 0.14$ at 490 nm). During pump-probe overlap (Fig. 3a), the signal displays spectral artifacts originating both from cross-phase modulation [18,19] and stimulated Raman scattering, leading respectively to unwanted structures mainly in the UV part of the spectra and to a small dip around 570 nm. After the initial rise three positive maxima are identified, around 360, 462 and 555 nm, the latter being the strongest. A broader transient

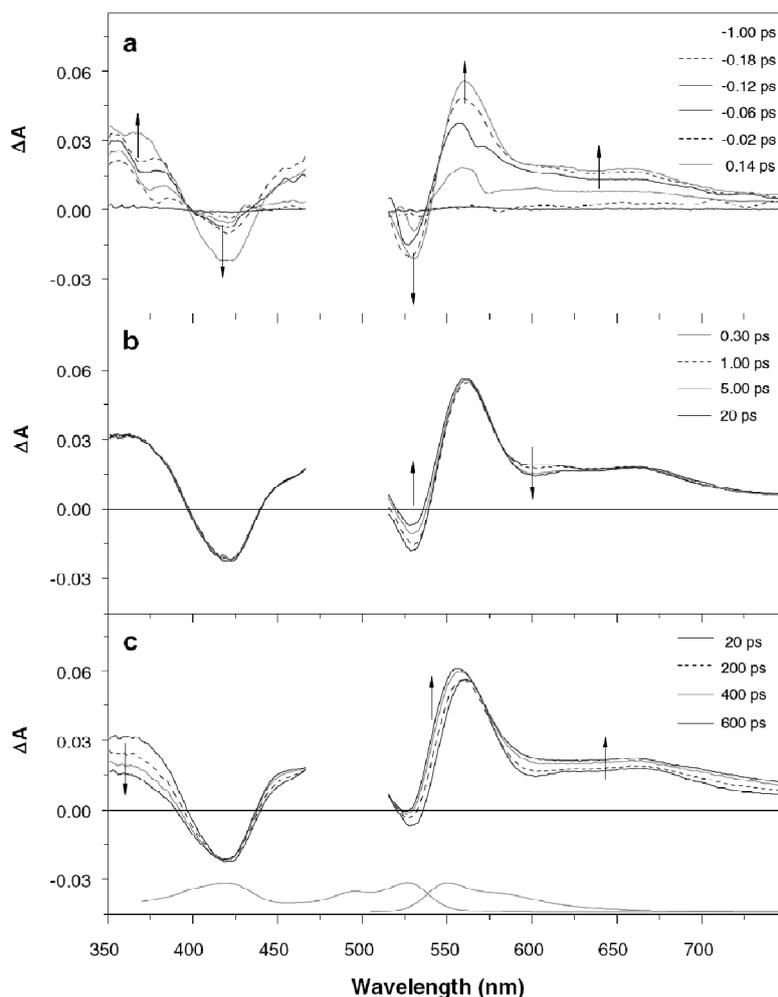


Fig. 3. Transient absorption spectra of HMHyp in DMSO under very low excitation fluence ($j = 0.14$) at 490 nm. The time evolution of the spectra between -1 and 0.14 ps is displayed in (a), the intermediate picosecond timescale in (b) and the long time behavior in (c). The steady-state absorption and fluorescence spectra are recalled in gray lines in (c).

absorption band then extends from 600 to 750 nm. The negative bands around 420 and 530 nm are ascribed to the ground-state bleaching. No net stimulated-emission signal is observed. On the intermediate-time scale (0.3–20 ps, Fig. 3b), there is very little evolution of the differential absorbance spectra below 470 nm and above 630 nm, while the small negative peak at 530 nm decays and a dip appears around 600 nm in the red broad transient absorption band. Lastly, at long times (Fig. 3c), the spectral evolution is characterized by the decrease of the UV band together with the rise of the blue (420–470 nm) and red (500–700 nm) parts of the spectra, with temporary isosbestic points seen around 420 and 565 nm.

Multieponential fits of the kinetic traces at 390 and 690 nm give, for the long-time component, the same decay or rise time of ~ 540 ps, which is in good agreement with the 490-ps fluorescence lifetime of HMHyp [13]. During this time the bleaching band at 419 nm remains constant, which indicates that the return to the ground state is negligible. The spectral changes displayed in Fig. 3c are likely due to the decay of the first excited singlet state towards

the triplet state [12]. It is indeed known that the triplet yield is high for these compounds (0.5–0.7 for Hyp [20,21]). It is likely higher for HMHyp [12], and may be closer to one in order to explain the lack of ground-state recovery during our observation time range.

The origin of the changes observed in the tens of picosecond regime (Fig. 3b) is less obvious. The kinetic traces at 528 and 601 nm, in the spectral range where these changes occur, were fitted to a sum of 4 exponentials plus a step function. The results of the fits are summarized in Table 1. It is remarkable that the three shorter components correlate well with the three solvation time components of DMSO, as do their relative amplitudes (values taken from Ref. [22] and recalled in Table 1). It is thus likely that the spectral change observed in this intermediate timescale (Fig. 3b) can be attributed to solvation dynamics in DMSO. The above very good match of the time components is explained by the fact that 528 and 601 nm lie in approximately linear regions of the stimulated-emission spectrum (see Fig. 4). Consequently the kinetic traces at these wavelengths reflect the overall Stokes shift dynamics

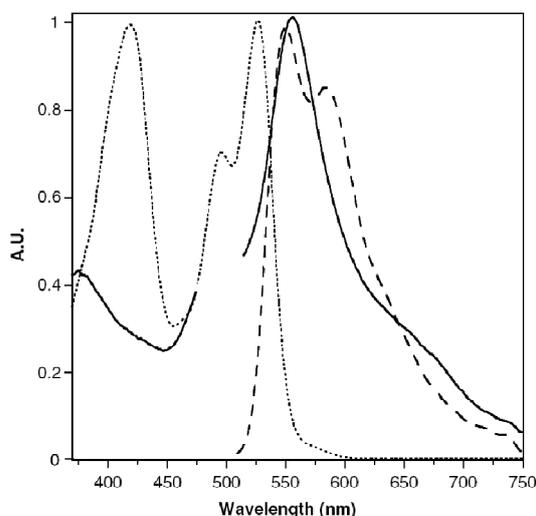


Fig. 4. Normalized $S_1 - S_n$ absorption spectrum (solid lines) extracted from the differential absorption spectrum measured at 20 ps pump-probe delay, absorption spectrum of the ground state (dotted line) and calculated stimulated-emission spectrum (dashed line) of HMHyp in DMSO.

[23,24]. We thus conclude that the observed spectral evolution is due to the overlap of the stimulated-emission band undergoing solvatochromic shift and a very intense $S_1 - S_n$ absorption band. Note that the observation of a marked solvation dynamics of HMHyp in DMSO, whereas very little of it is apparent in the transient absorption spectra of Hyp in the same solvent, implies that the photoinduced change of permanent dipole moment of HMHyp is significantly larger than that of Hyp.

To qualitatively confirm this hypothesis we simulated the effect of solvatochromic shift of the stimulated-emission band on the time-resolved differential absorbance spectra. We first roughly extracted the $S_1 - S_n$ spectrum from the differential spectra at 20 ps as follows: the observed 419 nm ground-state bleaching band was compensated by addition of a necessary fraction of the steady-state absorption spectrum, then a 'steady-state' stimulated-emission spectrum (the shape of which was calculated by multiplying the steady-state fluorescence spectrum by λ^4 , λ being the wavelength [25,26]) was used to compensate the remaining negative band at 528 nm. The resulting $S_1 - S_n$ spectrum is displayed in Fig. 4 together with the ground-state absorption and stimulated-emission spectra. The $S_1 - S_n$ spectrum shows a strong maximum at 555 nm, that is, completely overlaps the stimulated-emission band. The stimulated-emission spectra during solvation dynamics were approximated by blue-shifting the above-mentioned steady-state stimulated-emission spectrum by an amount of 10 nm (initial excited state) to 0 nm (relaxed excited state). Since the fluorescence lifetime is much longer than the solvation

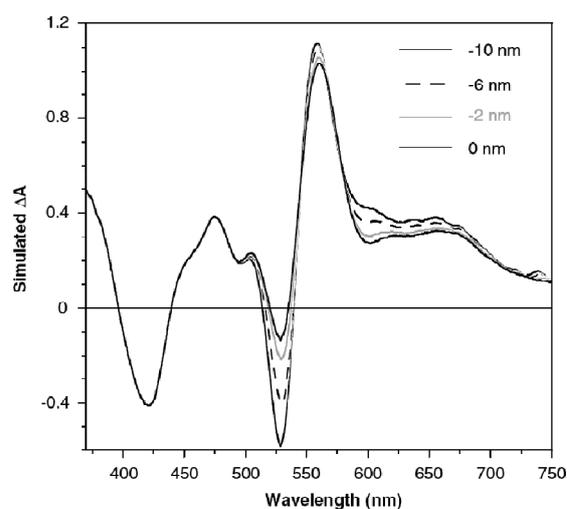


Fig. 5. Simulated differential absorbance ΔA of HMHyp: effect of the stimulated-emission shift during solvation. The maximum of the unrelaxed stimulated-emission spectrum is blue-shifted by 10 nm relative to the relaxed steady-state spectrum (0 nm shift). Time was not explicitly introduced in the simulation; it was replaced by the amplitude of the shift.

times, the stimulated-emission spectrum of the relaxed excited state can indeed be considered to be identical to the steady-state stimulated-emission spectrum. Time was not explicitly introduced in the simulation; it was replaced by the amplitude of the dynamic Stokes shift. The resulting simulated differential absorption spectra displayed in Fig. 5 reproduce quite well the essential features of the experimental spectra in Fig. 3b: the negative peak at 528 nm disappears and a dip is formed around 601 nm.

3.3. Role of the excitation fluence on the transient kinetics of *O*-hexamethoxyhypericin

Since the excited-state dynamics of HMHyp was previously probed by time-resolved fluorescence [15], we wish to focus on the spectral region where stimulated emission contributes to the transient spectra. Consequently, great care must be taken to decouple the putative fluence-related effects from solvation dynamics. This problem is solved by recalling the existence of a temporary isosbestic points at 565 nm, in the transient absorption spectra at very low fluence. This point is understood when one notes that it is located somewhere close to the local minimum between the two main maxima of the steady-state stimulated-emission spectrum (Fig. 4). Blue-shifting this spectrum by a few nanometers (which corresponds to solvation dynamics, looked backwards) almost does not change its value at 565 nm. Since no evolution was indeed found in the kinetic trace at that wavelength at very low fluence (not shown) we have selected it to isolate the effects of excitation fluence.

Table 1

Fit of the time-resolved differential absorption at 528 and 601 nm, by a sum of 4 exponentials and a step function, convoluted by a Gaussian (experimental response function)

	τ_1 (ps)	a_1	τ_2 (ps)	a_2	τ_3 (ps)	a_3	τ_4 (ps)	a_4	s
528 nm	0.236	-0.0096	2.65	-0.0067	15.15	-0.0046	481	-0.0099	0.0038
		46%		32%		22%		-	-
601 nm	0.115	0.0058	2.75	0.0036	11.57	0.0018	535	-0.0124	0.02546
		52%		32%		16%		-	-
τ_{solv} DMSO	0.214	46%	2.29	32%	10.7	9%			

τ_i are the time components, a_i the preexponential factors and s is the amplitude of the step function. The relative amplitude of the first three factors is given in percentage. The solvation time components (τ_{solv}) of DMSO and their relative amplitudes (taken from Ref. [22]) are recalled in the last row.

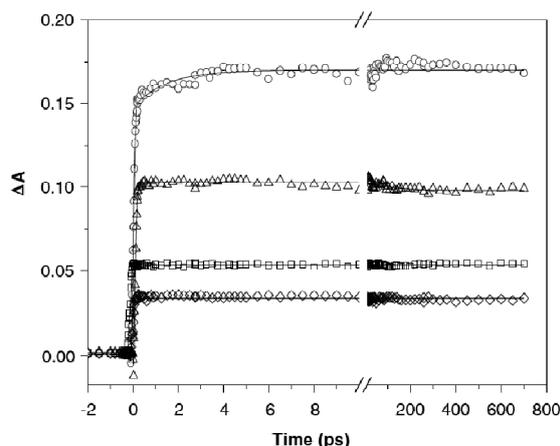


Fig. 6. Effect of the excitation fluence on the transient absorption kinetics of HMHy at 565 nm. Diamonds: very low excitation fluence ($j = 0.07$); squares: $j = 0.14$; triangles: $j = 0.30$ and circles: high excitation fluence ($j = 2.2$). Solid lines: best fit of the experimental data.

The kinetic traces of HMHy at different excitation fluences, from $j = 0.07$ to $j = 2.2$, are displayed in Fig. 6. At high fluence an additional rising component is observed. The kinetic analysis leads to a risetime of 1.6 ps. This time was also found at other wavelengths, as an additional time component appearing in kinetic traces at high excitation fluences. Experiments carried out under the same conditions in neat DMSO did not show any transient signal.

We conclude then that, for both Hyp and HMHy in DMSO, an additional delayed rising component appears at high excitation fluence when one probes the excited-state dynamics, in particular in the stimulated-emission region. A difference must however be noted. In the case of Hyp a delayed increase of the stimulated-emission signal was observed at 610 nm (where $\Delta A < 0$). For HMHy the delayed rise at 565 nm (where $\Delta A > 0$) could arise from a delayed increase of the $S_1 - S_0$ spectrum, a delayed decrease of the stimulated-emission signal or any combination of these two contributions. Whatever the detailed origin of the phenomenon, it remains that it depends in both cases on the excitation fluence. As previously stated [10], this type of dependence can be rationalized in terms of multiphotonic absorption. We propose that the higher excited singlet states populated this way undergo ultrafast internal conversion and produce a hot S_1 state. The expected ultrafast $S_0 - S_1$ (hot) dynamics could not be monitored because of the large XPM artifact obscuring the $[-200 \text{ fs}, +200 \text{ fs}]$ time interval (see Fig. 3a). The additional kinetics would correspond to the cooling process of the hot S_1 state. It is interesting to note that this cooling would be significantly faster for HMHy (1.6 ps) than for Hyp (10 ps). A tentative explanation can be found in the presence of a number of additional CH bonds in the structure of the *O*-hexamethoxyhypericin, which may indeed favor vibrational energy transfer to the solvent (DMSO) during the cooling process [27].

4. Conclusion

We have shown that high excitation fluences induce an additional picosecond rising component in the differential absorption spectra of both hypericin and its analogue *O*-hexamethoxyhypericin

in solution in DMSO. This phenomenon most likely originates from bi/multiphotonic excitation to upper excited states, possibly followed by internal conversion to a hot S_1 state that finally cools down. Since the molecular structure of *O*-hexamethoxyhypericin does not allow it to undergo intramolecular H-atom transfer, the present study supports the idea that photoinduced tautomerization is not responsible for the 10 ps delayed stimulated emission signal observed for unsubstituted hypericin. One must nevertheless recall that if the 10-ps delayed rise of hypericin observed in the stimulated-emission band by Gai et al. [11] might be assigned to a fluence effect, such a conclusion cannot be drawn for the fluorescence up-conversion experiment by English et al. [15] in which the excitation fluence was well below saturation fluence. One can propose that the key parameter in English et al.'s experiment is the excitation wavelength that was chosen at 425 nm, that is, with over 6800 cm^{-1} excess energy relative to the 0–0 transition. One may argue that it is possible that the observed risetimes reflect internal conversion from higher lying excited states to S_1 . The excitation anisotropy spectra of Das et al. [28] clearly indicate the presence of another electronic state at 425 nm. On the other hand, one of the arguments against making such assignments to the rising component is that even with blue excitation, it is absent when hypericin is complexed to human serum albumin, for example [29]. A definitive clarification of this issue must await experiments with low energy pulses at both 400 and 600 nm for these derivatives.

References

- [1] J.I. Falk, *Angew. Chem.* 38 (1999) 3116.
- [2] U. Werneke, O. Horn, D.M. Taylor, *J. Clin. Psychol.* 65 (2004) 611.
- [3] T. Mennini, M. Gobbi, *Life Sci.* 75 (2004) 1021.
- [4] A.M. Prince et al., *Photochem. Photobiol.* 71 (2000) 188.
- [5] J.M. Jacobson et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 517.
- [6] P. Agostinis, A. Vantieghem, W. Merlevede, P.A.M. de Witte, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 (2002) 221.
- [7] A. Kamuhabwa, P. Agostinis, B. Ahmed, W. Landuyt, B. van Cleynenbrugel, H. van Poppe, P.A.M. de Witte, *Photochem. Photobiol. Sci.* 3 (2004) 772.
- [8] J.W. Petrich, *Int. Rev. Phys. Chem.* 19 (2000) 479.
- [9] T. Yamazaki, N. Otha, I. Yamazaki, P.-S. Song, *J. Phys. Chem.* 103 (1999) 3323.
- [10] P. Plaza, M. Mahet, O. Tchaikovskaya, M.M. Martin, *Chem. Phys. Lett.* 408 (2005) 96.
- [11] F. Gai, M.J. Fehr, J.W. Petrich, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 5784.
- [12] D.S. English, W. Zhang, G.A. Kraus, J.W. Petrich, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 2980.
- [13] D.S. English, K. Das, J.M. Zenner, W. Zhang, G.A. Kraus, R.C. Larock, J.W. Petrich, *J. Phys. Chem. A* 101 (1997) 3235.
- [14] K. Das, D.S. English, J.W. Petrich, *J. Phys. Chem.* 98 (1997) 5784.
- [15] D.S. English, K. Das, K.D. Ashby, J. Park, J.W. Petrich, E.W. Castner Jr., *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 11585.
- [16] K. Das, A.V. Smirnov, M.D. Snyder, J.W. Petrich, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 6098.
- [17] N.J. Frigo, *IEE J. Quantum Electron.* QF-19 (1983) 511.
- [18] K. Ekvall, P. van der Meulen, C. Dholand, L.-E. Berg, S. Pommeret, R. Naskrecki, J.-C. Mialocq, *J. Appl. Phys.* 87 (2000) 2340.
- [19] S.A. Kovalenko, A.L. Dobryakov, J. Ruthmann, N.P. Enrsting, *Phys. Rev. A* 59 (1999) 2369.
- [20] P. Jardon, N. Lazortchak, R. Gautron, *J. Chim. Phys.* 83 (1986) 311.
- [21] A. Michaeli, A. Regv, Y. Mazur, J. Fietelson, H. Levanon, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 9154.
- [22] M. L. Horn, J.A. Gardecki, A. Papazyan, M. Maroncelli, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 17311.
- [23] J.A. Gardecki, M. Maroncelli, *J. Phys. Chem. A* 103 (1999) 1187.
- [24] M.A. Khalow, T.J. Kang, P.F. Barbara, *J. Chem. Phys.* 88 (1988) 2372.
- [25] O.G. Peterson, J.P. Webb, W.C. Mc Colgin, J.H. Eberly, *J. Appl. Phys.* 42 (1971) 1917.
- [26] M. Becker, V. Nagarajan, W.W. Parson, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 6840.
- [27] A. Seilmeier, W. Kaiser, in: W. Kaiser (Ed.), *Ultrashort Laser Pulses and Application*, Springer-Verlag, New York, 1988, p. 279.
- [28] K. Das, E. Dertz, J. Paterson, W. Zhang, G.A. Kraus, J.W. Petrich, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 1479.
- [29] K. Das, A.V. Smirnov, J. Wen, P. Miskovsky, J.W. Petrich, *Photochem. Photobiol.* 69 (1999) 633.

Conclusion

Nos études par spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde de la chromoprotéine OBIP nous ont permis de proposer un mécanisme original pour expliquer le photocycle rapide (en quelques centaines de picosecondes) de rOBIP (population dite réactive) du photorécepteur du protozoaire cilié *Blepharisma japonicum*. Sur la base de travaux du groupe Mataga, nous avons proposé que le chromophore OxyBP forme un complexe par liaison hydrogène avec un résidu proche non identifié et qu'après excitation un équilibre s'établit entre l'état localement excité et un état à transfert de charge intermoléculaire du complexe. Cet état à transfert de charge est caractérisé par une nette signature spectrale du radical cation de OxyBP. Nous attribuons l'affinement progressif, multiexponentiel, de cette signature spectrale à la relaxation de la protéine autour du chromophore dans l'état à transfert de charge. Comme le photocycle rapide se termine en quelques centaines de picosecondes, ce mécanisme agirait comme une protection solaire des cellules bleues de *B. japonicum* adaptées à la lumière.

Par ailleurs nous proposons que l'état signalant de la photophobie du protozoaire proviendrait d'un transfert de proton nanoseconde photoinduit au sein de la population dite non réactive (nrOBIP) du photorécepteur. Le saut de pH intracellulaire, que cette réaction produirait, serait peut-être susceptible de jouer le rôle de déclencheur de la chaîne de phototransduction sensorielle activant la réponse photophobique.

Lorsque OxyBP est complexée à l' α -cristalline, le spectre d'absorption transitoire de ce complexe présente une forte ressemblance avec celui de OBIP aux temps très courts, mais la réaction de transfert d'électron n'est pas observée, confirmant la spécificité de la complexation au sein du photorécepteur naturel. Nous avons toutefois mis en évidence un phénomène d'agglomération des complexes de l'OxyBP avec l' α -cristalline sous l'effet d'une irradiation lumineuse continue. Ceci suggère que l'utilisation de OxyBP comme photosensibilisateur dans la photothérapie du cancer doit être prise avec précaution car elle pourrait se révéler néfaste pour le cristallin des patients.

Devant la controverse sur la photophysique de l'hypéricine, molécule voisine de OxyBP et photosensibilisateur très étudié dans la photothérapie du cancer, nous avons étudié la photophysique intrinsèque de Hyp et de son dérivé l'*O*-hexaméthoxyhypéricine. La

controverse concerne l'interprétation d'une montée retardée de ~ 10 ps dans les régions spectrales dominées par de l'émission stimulée. Nous avons montré que cette montée retardée dépend de la fluence d'excitation. L'hypothèse d'un transfert d'hydrogène intramoléculaire expliquant la montée retardée a été totalement écartée au profit de celle d'un refroidissement de l'état excité singulet S_1 chaud, produit par excitation multiphotonique.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de ma thèse était, tout d'abord, de caractériser et de comprendre les processus photochimiques primaires mis en jeu dans la photoactivité de deux nouvelles protéines, appartenant à la famille des cyrptochromes et photolyases, issues de l'algue verte *Ostreococcus tauri* (OtCPF1 et OtCPF2). Nous avons plus spécifiquement ciblé l'étude par spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde de la photoréduction de leur chromophore sous sa forme oxydée, FAD_{ox}, réaction encore jamais étudiée, sous excitation femtoseconde, dans des protéines CPF lorsque nous avons commencé ce travail. Le second objectif était de poursuivre l'étude sur le photorécepteur (OBIP) de la photophobie du protozoaire cilié *Blepharisma japonicum*. Nous avons plus particulièrement étudié le photocycle ultrarapide de OBIP ainsi que déterminé l'état signalant de la photophobie de *B. japonicum*.

Nous avons entrepris l'étude des chromophores libres présents dans les protéines CPF par spectroscopie d'absorption transitoire avec une résolution sub-100 fs, afin d'obtenir des données cinétique et spectroscopique de référence utiles pour l'étude des chromoprotéines OtCPF1 et OtCPF2. Ces travaux nous ont permis en outre d'apporter des éléments de réponse à quelques controverses de la littérature. Notre étude comparative des flavines oxydées FMN_{ox} et FAD_{ox} démontre que la composante temporelle intermédiaire de ~30 ps observée dans les cinétiques est attribuable à la présence de dimères en solution concentrée. Il est important de noter que nous avons pu mettre en évidence la signature spectrale de l'état à transfert de charge photoinduit dans les spectres différentiels de la conformation fermée de FAD_{ox}, où l'adénine (donneur) et l'isoalloxazine (accepteur) sont en forte interaction. Cette analyse est totalement nouvelle. Par ailleurs nos résultats sur les formes réduites du chromophore FADH⁻ et FADH₂ ont montré que dans nos conditions expérimentales de spectroscopie transitoire il y a formation d'électron solvaté par un processus d'ionisation biphotonique. Enfin les expériences menées sur la photoantenne MTHF nous ont permis de mesurer, pour la première fois, la cinétique de désactivation bimodale (6 ps et 30 ps) de son premier état excité singulet, hypothétiquement dû à une inhomogénéité de structure.

Nous avons étudié les chromoprotéines OtCPF1 et OtCPF2, par spectroscopie d'absorption transitoire sub-100 fs et avons complété cette étude par modélisation par homologie.

Conclusion

Après avoir caractérisé la composition en chromophores (formes oxydées, semi-réduites et réduites de FAD) de OtCPF1, nous avons amélioré le protocole expérimental de purification de OtCPF1 afin d'éliminer par dialyse la présence résiduelle d'un réducteur externe, glutathion réduit. En présence de glutathion réduit et sous irradiation, des photoproduits de durée de vie longue sont accumulés dans OtCPF1.

La spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde de OtCPF1 dialysée, nous a permis de mesurer et de caractériser spectralement pour la première fois dans des protéines CPF les espèces produites lors de la photoréduction de FAD_{ox} , ainsi que les étapes suivantes. Nous avons proposé un mécanisme en nous inspirant du mécanisme proposé par les groupes Brettel et Vos pour la photoréduction de la forme semi-réduite $FADH^\bullet$ portée par EcCPD impliquant une chaîne de trois résidus tryptophanes.

L'étude structurale de OtCPF1 par homologie avec des structures connues a permis de confirmer que cette protéine appartient au groupe des photolyases (6-4) et cryptochromes animaux. Nous avons pu proposer que la photoantenne putativement présente dans OtCPF1 serait le 8-HDF et en avons conclu que ce fait pourrait se généraliser pour les photolyases (6-4). OtCPF1 modélisée par homologie a également donné des informations sur la chaîne de tryptophanes impliquée dans la photoréduction de FAD_{ox} portée par OtCPF1.

En ce qui concerne OtCPF2, la spectroscopie stationnaire, nous a permis de montrer que cette protéine contient le chromophore FAD sous différents états d'oxydo-réduction et la photoantenne MTHF. Contrairement à OtCPF1, aucune accumulation de photoproduits de durée de vie longue n'a été observée en photolyse stationnaire.

Nous avons alors étudié les processus primaires de OtCPF2 par spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde, dans trois conditions expérimentales distinctes :

- excitation à 470 nm en configuration isotrope. Dans ces conditions, l'espèce majoritairement excitée est FAD_{ox} , ce qui nous a permis d'observer la photoréduction ultrarapide de FAD_{ox} . Nous avons mis en évidence une hétérogénéité de la population fondamentale en protéine avec une population dite réactive (conduisant à des photoproduits) et une population non réactive. Nous avons pu mettre en évidence les étapes qui suivent la capture initiale d'un électron par FAD_{ox} excité, mettant en jeu un saut d'électron d'un tryptophane plus éloigné de FAD vers le radical $WH^{\bullet+}$ formé, accompagné d'une recombinaison de charge vers l'état fondamental.

- excitation à 470 nm en configuration anisotrope. Nous avons ainsi proposé que le tryptophane oxydé correspondant aux temps longs de notre mesure est le tryptophane le plus éloigné de FAD_{ox}.
- excitation à 390 nm en configuration isotrope. Nous avons étudié les processus induits par excitation de la photoantenne MTHF. Nous avons attribué les transferts d'énergie d'excitation électronique de la photoantenne vers FAD_{ox} et FADH⁻. Nous avons ensuite observé, respectivement, les photoproduits de la réduction de FAD_{ox} et le déclin de l'état excité de FADH⁻.

L'analyse structurale de OtCPF2 par homologie avec des structures connues a permis de confirmer que OtCPF2 appartient au groupe des cryptochromes DASH. La génération d'une structure tridimensionnelle de OtCPF2 par homologie sur celle de AtCry3 donne les sites de fixation de FAD et MTHF au sein de OtCPF2. La structure de la protéine a été optimisée en présence de FAD_{ox} ou FADH⁻ et MTHF. Les rapports des facteurs d'orientation ont pu être calculés dans le cadre de la théorie de Förster, lors du transfert d'énergie d'excitation électronique entre la photoantenne et l'une ou l'autre des formes, oxydée ou réduite, de la flavine photoactive. Ce rapport est bien inférieur à un, alors que les résultats expérimentaux ont montré qu'il était supérieur à un. Nous avons donc proposé qu'il y aurait un changement structural important, mal prédit par le calcul, autour du chromophore au sein de OtCPF2 selon que le chromophore est FAD_{ox} ou FADH⁻.

Les résultats obtenus ici ont permis de proposer des modèles cinétiques décrivant les étapes primaires photoinduites de la photoréduction de ces protéines, ainsi que celles impliquées dans le transfert d'énergie dans OtCPF2. Nous pouvons envisager de réaliser quelques expériences complémentaires afin d'appuyer les mécanismes proposés :

- ✓ En ce qui concerne OtCPF1, des expériences d'absorption transitoire en conditions anisotropes permettraient de préciser quel tryptophane est impliqué dans chaque étape de photoréduction.
- ✓ Pour les deux protéines, l'étude de mutants des tryptophanes, impliqués dans la photoréduction, pourrait permettre d'isoler chaque étape séparément.
- ✓ Là encore pour OtCPF1 et OtCPF2, il serait très avantageux de travailler sur des échantillons ne contenant qu'un seul état d'oxydo-réduction de FAD et, pour OtCPF2, exempts de la photoantenne MTHF. Ceci semble difficilement envisageable étant donné le manque de stabilité actuelle des échantillons. Il

faudrait envisager de trouver des conditions expérimentales qui permettent de les obtenir de manière plus stable.

Enfin ce manuscrit rapporte les études que nous avons menées par spectroscopie d'absorption transitoire sub-100 fs sur la chromoprotéine OBIP, photorecepteur supposé de la photophobie de *Blepharisma japonicum* afin de répondre aux questions ouvertes par la thèse de Mathilde Mahet. Nous avons confirmé que les chromoprotéines OBIP dites réactives (rOBIP) suivent un photocycle rapide (quelques centaines de picosecondes) mettant en jeu un transfert de charge intermoléculaire. Nous avons proposé un modèle cinétique mettant en jeu un équilibre ultrarapide entre l'état localement excité émissif et un état à transfert de charge intermoléculaire non émissif, du chromophore lié par liaison hydrogène avec un résidu proche, conjugué, non caractérisé. La description multiexponentielle de la dynamique de rOBIP est interprétée comme une évolution de l'équilibre par relaxation de l'environnement protéique. Ces travaux appuient la proposition initiale de la thèse de Mathilde Mahet que ce mécanisme traduit un fonctionnement spécifique du photorécepteur, telle une protection solaire, du protozoaire dans sa forme adaptée à la lumière.

La population dite non réactive de la chromoprotéine (nrOBIP) se comporte comme le chromophore libre en solution (l'oxyblépharismine, OxyBP). Nous avons pu mettre en évidence une déprotonation du chromophore OxyBP excité dans la population nrOBIP. Cet état, qui a une durée de vie nanoseconde et pourrait être l'état signalant de la photophobie de *B. japonicum*.

L'étude de OxyBP complexée à l' α -crystalline dans le but de tester l'intérêt de ce chromophore dérivé de l'hypéricine pour la photothérapie dynamique, a montré que la réaction photoinduite au sein de rOBIP est bien spécifique de la chromoprotéine naturelle. L'état à transfert de charge intermoléculaire photoinduit n'a pas été observé dans le complexe artificiel. Il existe en revanche une agglomération des complexes de OxyBP avec l' α -crystalline sous l'effet d'une irradiation lumineuse continue. Nous en avons déduit que des précautions devront être prises avant l'utilisation de OxyBP comme photosensibilisateur dans la photothérapie du cancer.

Conclusion

Nous avons résolu une controverse liée à l'interprétation d'une montée retardée de ~ 10 ps dans les spectres d'absorption transitoire de Hyp en étudiant HHyp. Nous avons observé cette montée retardée à la fois pour HMHyp et Hyp et que l'effet a une dépendance marquée envers la fluence d'excitation. Nous avons proposé que la montée retardée observée ne soit pas liée à un transfert d'atome d'hydrogène intramoléculaire mais à un refroidissement de l'état excité singulet S_1 chaud, produit en conséquence indirecte d'une excitation multiphotonique.

Pendant la rédaction de ma thèse le groupe Hache (Laboratoire d'Optique et de Biosciences de l'École Polytechnique), a réalisé des expériences de dichroïsme circulaire résolu en temps sur OBIP et OxyBP. Les résultats obtenus montrent une variation rapide du dichroïsme, en quelques picosecondes, dans le cas de OBIP alors qu'il est constant sur cette échelle de temps dans le cas du chromophore en solution. Cette différence suggère que l'effet observé est dû à la réaction de transfert de charge intermoléculaire, qui induit un changement de structure du chromophore ou de la structure locale de la protéine. Ce travail non encore interprété finement constitue un appui à la proposition du groupe que l'assemblage chromophore-protéine dans rOBIP possède une structure spécifique pour remplir sa fonction biologique photoactivée.

Bibliographie

- [1] Courties C., Vaquer A., Troussellier M., Lautier J., Chretiennotdinet M. J., Neveux J., Machado C., Claustre H., Smallest eukaryotic organism, *Nature*, **1994**, 370 (6487), 255-255.
- [2] Heijde M., Zabulon G., Bowler C., Brazard J., Usman A., Martin M. M., Plaza P., Purification and characterization of two members of the cryptochrome/photolyase family from the green alga *Ostreococcus tauri*, **to be submitted**.
- [3] Massey V., The chemical and biological versatility of riboflavin, *Biochem. Soc. Trans.*, **2000**, 28 (4), 283-296.
- [4] Aubert C., Vos M. H., Mathis P., Eker A. P. M., Brettel K., Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase, *Nature*, **2000**, 405 (6786), 586-590.
- [5] Byrdin M., Eker A. P. M., Vos M. H., Brettel K., Dissection of the triple tryptophan electron transfer chain in *Escherichia coli* DNA photolyase: Trp382 is the primary donor in photoactivation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **2003**, 100 (15), 8676-8681.
- [6] Byrdin M., Sartor V., Eker A. P. M., Vos M. H., Aubert C., Brettel K., Mathis P., Intraprotein electron transfer and proton dynamics during photoactivation of DNA photolyase from *E. coli*: Review and new insights from an "inverse" deuterium isotope effect, *Biochim. Biophys. Acta B.*, **2004**, 1655 (1-3), 64-70.
- [7] Byrdin M., Villette S., Eker A. P. M., Brettel K., Observation of an intermediate tryptophanyl radical in W306F mutant DNA photolyase from *Escherichia coli* supports electron hopping along the triple tryptophan chain, *Biochem.*, **2007**, 46 (35), 10072-10077.
- [8] Byrdin M., Villette S., Espagne A., Eker A. P. M., Brettel K., Polarized transient absorption to resolve electron transfer between tryptophans in DNA photolyase, *J. Phys. Chem. B*, **2008**, 112 (22), 6866-6871.
- [9] Lukacs A., Eker A. P. M., Byrdin M., Brettel K., Vos M. H., Electron hopping through the 15 Å triple tryptophan molecular wire in DNA photolyase occurs within 30 ps, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130 (44), 14394-14395.
- [10] Lukacs A., Eker A. P. M., Byrdin M., Villette S., Pan J., Brettel K., Vos M. H., Role of the middle residue in the triple tryptophan electron transfer chain of DNA photolyase: Ultrafast spectroscopy of a Trp→Phe mutant, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110 (32), 15654-15658.
- [11] Giovani B., Byrdin M., Ahmad M., Brettel K., Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor, *Nature Struct. Biol.*, **2003**, 10 (6), 489-490.
- [12] Mataga N., Chosrowjan H., Shibata Y., Tanaka F., Ultrafast fluorescence quenching dynamics of flavin chromophores in protein nanospace, *J. Phys. Chem. B*, **1998**, 102 (37), 7081-7084.
- [13] Mataga N., Chosrowjan H., Shibata Y., Tanaka F., Nishina Y., Shiga K., Dynamics and mechanisms of ultrafast fluorescence quenching reactions of flavin chromophores in protein nanospace, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104 (45), 10667-10677.

- [14] Mataga N., Chosrowjan H., Taniguchi S., Investigations into the dynamics and mechanisms of ultrafast photoinduced reactions taking place in photoresponsive protein nanospaces (PNS), *J. Photochem. Photobiol. C*, **2004**, 5 (2), 155-168.
- [15] Mataga N., Chosrowjan H., Taniguchi S., Hamada N., Tokunaga F., Imamoto Y., Kataoka M., Ultrafast photoreactions in protein nanospaces as revealed by fs fluorescence dynamics measurements on photoactive yellow protein and related systems, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2003**, 5 (11), 2454-2460.
- [16] Mataga N., Chosrowjan H., Taniguchi S., Tanaka F., Kido N., Kitamura M., Femtosecond fluorescence dynamics of flavoproteins: Comparative studies on flavodoxin, its site-directed mutants, and riboflavin binding protein regarding ultrafast electron transfer in protein nanospaces, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106 (35), 8917-8920.
- [17] Zhong D. P., Zewail A. H., Femtosecond dynamics of flavoproteins: Charge separation and recombination in riboflavine (vitamin B₂)-binding protein and in glucose oxidase enzyme, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98 (21), 11867-11872.
- [18] Briggs R., Spudich J. L., Handbook of photosensory receptors, **2005**.
- [19] Sancar A., Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors, *Chem. Rev.*, **2003**, 103 (6), 2203-2237.
- [20] Kao Y. T., Tan C., Song S. H., Ozturk N., Li J., Wang L. J., Sancar A., Zhong D. P., Ultrafast dynamics and anionic active states of the flavin cofactor in cryptochrome and photolyase, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130 (24), 7695-7701.
- [21] Banerjee R., Schleicher E., Meier S., Viana R. M., Pokorny R., Ahmad M., Bittl R., Batschauer A., The signaling state of *Arabidopsis* cryptochrome 2 contains flavin semiquinone, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282 (20), 14916-14922.
- [22] Ahmad M., Galland P., Ritz T., Wiltschko R., Wiltschko W., Magnetic intensity affects cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*, *Planta*, **2007**, 225 (3), 615-624.
- [23] Ghisla S., Massey V., Lhoste J. M., Mayhew S. G., Fluorescence and optical characteristics of reduced flavines and flavoproteins, *Biochem.*, **1974**, 13 (3), 589-597.
- [24] Heelis P. F., The photophysical and photochemical properties of flavins, **1982**.
- [25] Li G. F., Glusac K. D., Light-triggered proton and electron transfer in flavin cofactors, *J. Phys. Chem. A*, **2008**, 112 (20), 4573-4583.
- [26] Grabe B., Semiempirical calculations on lumiflavin regarding electronic-structure and spectra, *Acta Chem. Scand. Ser. A*, **1974**, A 28 (4), 363-374.
- [27] Norresta R., Kierkega P., Stenslan B., Torbjorn L., 5-acetyl-3,7,8,10-tetramethyl-1,5-dihydroalloxazine - crystal structure and extended huckel calculations for different molecular geometries, *J. Chem. Soc. D*, **1969**, 21 1250.

- [28] Eweg J. K., Muller F., Visser A., Veeger C., Beelaar D., Vanvoorst J. D. W., Molecular luminescence of some isoalloxazines in apolar solvents at various temperatures, *Photochem. Photobiol.*, **1979**, 30 (4), 463-471.
- [29] Sun M., Song P. S., Moore T. A., Molecular luminescence studies of flavins. I. Excited-states of flavins, *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94 (5), 1730-1740.
- [30] Sikorska E., Khmelinskii I. V., Koput J., Bourdelande J. L., Sikorski M., Electronic structure of isoalloxazines in their ground and excited states, *J. Mol. Struct.*, **2004**, 697 (1-3), 137-141.
- [31] Climent T., Gonzalez-Luque R., Merchan M., Serrano-Andres L., Theoretical insight into the spectroscopy and photochemistry of isoalloxazine, the flavin core ring, *J. Phys. Chem. A*, **2006**, 110 (50), 13584-13590.
- [32] Eweg J. K., Muller F., Vandam H., Terpstra A., Oskam A., He(I) and He(II) photoelectron-spectra of alloxazines and isoalloxazines, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102 (1), 51-61.
- [33] Yagi K., Ohishi N., Nishimoto K., Choi J. D., Song P. S., Effect of hydrogen bonding on electronic spectra and reactivity of flavins, *Biochem.*, **1980**, 19 (8), 1553-1557.
- [34] Weigel A., Dobryakov A. L., Veiga M., Lustres J. L. P., Photoinduced processes in riboflavin: Superposition of π_i π_i^* -n π_i^* states by vibronic coupling, transfer of vibrational coherence, and population dynamics under solvent control, *J. Phys. Chem. A*, **2008**, 112 (47), 12054-12065.
- [35] Weber G., Teale F. W. J., Determination of the absolute quantum yield of fluorescent solutions, *Trans. Fara. Soc.*, **1957**, 53 (5), 646-655.
- [36] Song P. S., Flavins and flavoproteins, **1971**.
- [37] Visser A., Muller F., Absorption and fluorescence studies on neutral and cationic isoalloxazines, *Helv. Chim. Acta*, **1979**, 62 (2), 593-608.
- [38] Weber G., Fluorescence of riboflavin and flavin adenine dinucleotide, *Biochem. J.*, **1950**, 47 (1), 114-121.
- [39] Barrio J. R., Tolman G. L., Leonard N. J., Spencer R. D., Weber G., Flavin 1,N-6 ethenoadenine dinucleotide: dynamic and static quenching of fluorescence, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1973**, 70 (3), 941-943.
- [40] Islam S. D. M., Susdorf T., Penzkofer A., Hegemann P., Fluorescence quenching of FAD in aqueous solution by pH dependant isomerisation and photo-induced electron transfer, *Chem. Phys.*, **2003**, 295 137-149.
- [41] Berg P. A. W. v. d., Feenstra K. A., Mark A. E., Berendsen M. J. C., Visser A. J. W. G., Dynamic conformations of flavin adenine dinucleotide: Simulated molecular dynamics of the flavin cofactor related to the time-resolved fluorescence characteristics, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106 (34), 8858-8869.

- [42] Chosrowjan H., Taniguchi S., Mataga N., Tanaka F., Visser A., The stacked flavin adenine dinucleotide conformation in water is fluorescent on picosecond timescale, *Chem. Phys. Lett.*, **2003**, 378 (3-4), 354-358.
- [43] Holzer W., Shirdel J., Zirak P., Penzkofer A., Hegemann P., Deutzmann R., Hochmuth E., Photo-induced degradation of some flavins in aqueous solution, *Chem. Phys.*, **2005**, 308 69-78.
- [44] Kao Y. T., Saxena C., He T. F., Guo L. J., Wang L. J., Sancar A., Zhong D. P., Ultrafast dynamics of flavins in five redox states, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130 (39), 13132-13139.
- [45] Kondo M., Nappa J., Ronayne K. L., Stelling A. L., Tonge P. J., Meech S. R., Ultrafast vibrational spectroscopy of the flavin chromophore, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110 (41), 20107-20110.
- [46] Stanley R. J., IV A. W. M., Ultrafast excited state dynamics of oxidized flavins: Direct observation of quenching by purines, *J. Phys. Chem. A*, **2000**, 104 (30), 6899-6906.
- [47] van den Berg B. J., Sancar G. B., Evidence for dinucleotide flipping by DNA photolyase, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273 (32), 20276-20284.
- [48] Leenders R., Kooijman M., Vanhoek A., Veeger C., Visser A., Flavin dynamics in reduced flavodoxins: a time-resolved polarized fluorescence study, *Euro. J. Biochem.*, **1993**, 211 (1-2), 37-45.
- [49] van den Berg P. A. W., Feenstra K. A., Mark A. E., Berendsen H. J. C., Visser A., Dynamic conformations of flavin adenine dinucleotide: Simulated molecular dynamics of the flavin cofactor related to the time-resolved fluorescence characteristics, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106 (34), 8858-8869.
- [50] Lowe H. J., Clark W. M., Studies on oxidation-reduction .24. Oxidation-reduction potentials of flavin adenine dinucleotide, *J. Biol. Chem.*, **1956**, 221 (2), 983-992.
- [51] Müller F., The flavin redox-system and its biological function, **1983**.
- [52] Song S. H., Dick B., Penzkofer A., Photo-induced reduction of flavin mononucleotide in aqueous solutions, *Chem. Phys.*, **2007**, 332 (1), 55-65.
- [53] Heelis P. F., Müller F., Chemistry and biochemistry of flavoenzymes, **1991**.
- [54] Ghisla S., Fluorescence and optical characteristics of reduced flavins and flavoproteins, *Met. Enz.*, **1980**, 66 360-373.
- [55] Enescu M., Lindqvist L., Soep B., Excited-state dynamics of fully reduced flavins and flavoenzymes studied at subpicosecond time resolution, *Photochem. Photobiol.*, **1998**, 68 (2), 150-156.
- [56] Li G. F., Sichula V., Glusac K. D., Role of adenine in thymine dimer repair by reduced flavin adenine dinucleotide, *J. Phys. Chem. B*, **2008**, 112 (34), 10758-10764.
- [57] Visser A. J. W. G., Ghisla S., Lee J., Flavins and flavoproteins, **1990**.

Bibliographie

- [58] Beukers R., Eker A. P. M., Lohman P. H. M., 50 years thymine dimer, *DNA Repair*, **2008**, 7 (3), 530-543.
- [59] Kelner A., Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus conidia* from ultraviolet irradiation injury, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1949**, 35 (2), 73-79.
- [60] Rupert C. S., Goodgal S. H., Herriott R. M., Photoreactivation *in vitro* of ultraviolet inactivated *Hemophilus influenzae* transforming factor, *J. Gen. Phys.*, **1958**, 41 (3), 451-471.
- [61] Voet D., Voet J. G., *Biochemistry*, **2004**.
- [62] Harm W., Harm H., Rupert C. S., Analysis of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by single light flashes. II. *In vivo* studies with *Escherichia coli* cells and bacteriophage, *Mut. Resear.*, **1968**, 6 (3), 371-&.
- [63] Sancar A., Rupert C. S., Penicillin selection of *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid repair mutants, *J. Bact.*, **1979**, 138 (3), 779-782.
- [64] Todo T., Takemori H., Ryo H., Ihara M., Matsunaga T., Nikaido O., Sato K., Nomura T., A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4)photoproducts, *Nature*, **1993**, 361 (6410), 371-374.
- [65] Sancar A., Rupp W. D., A novel repair enzyme - UV excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region, *Cell*, **1983**, 33 (1), 249-260.
- [66] Kim S. T., Malhotra K., Smith C. A., Taylor J. S., Sancar A., Characterization of (6-4)photoproduct DNA photolyase, *Science*, **1994**, 269 (11), 8535-8540.
- [67] Todo T., Ryo H., Yamamoto K., Toh H., Inui T., Ayaki H., Nomura T., Ikenaga M., Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family, *Science*, **1996**, 272 (5258), 109-112.
- [68] Zhao X. D., Liu J. Q., Hsu D. S., Zhao S. Y., Taylor J. S., Sancar A., Reaction mechanism of (6-4) photolyase, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272 (51), 32580-32590.
- [69] Ahmad M., Cashmore A. R., Hy4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor, *Nature*, **1993**, 366 (6451), 162-166.
- [70] Cashmore A. R., Cryptochromes: Enabling plants and animals to determine circadian time, *Cell*, **2003**, 114 537-543.
- [71] Lin C. T., Todo T., The cryptochromes, *Gen. Biol.*, **2005**, 6 (5), Article 220.
- [72] Wang H. Y., Ma L. G., Li J. M., Zhao H. Y., Deng X. W., Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with Cop1 in light control development, *Science*, **2001**, 294 (5540), 154-158.

Bibliographie

- [73] Hsu D. S., Zhao X., Kazantsev A., Wang R.-P., Todo T., Wei Y.-F., Sancar A., Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins, *Biochem.*, **1996**, 35 (44), 13871-13877.
- [74] Young M. W., Kay S. A., Time zones: A comparative genetics of circadian clocks, *Nature Rev. Gene.*, **2001**, 2 (9), 702-715.
- [75] Green C. B., How cells tell time?, *Trends Cell Biol.*, **1998**, 8 (6), 224-230.
- [76] Sancar A., Cryptochrome: The second photoactive pigment in the eye and its role in circadian photoreception, *Annu. Rev. Biochem.*, **2000**, 69, 31-67.
- [77] Sancar A., Regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279 (33), 34079-34082.
- [78] Hankins M. W., Peirson S. N., Foster R. G., Melanopsin: An exciting photopigment, *Trends Neurosci.*, **2008**, 31 (1), 27-36.
- [79] Hitomi K., Okamoto K., Daiyasu H., Miyashita H., Iwai S., Toh H., Ishiura M., Todo T., Bacterial cryptochrome and photolyase: Characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. Pcc6803, *Nucl. Ac. Res.*, **2000**, 28 (12), 2353-2362.
- [80] Brudler R., Hitomi K., Daiyasu H., Toh H., Kucho K., Ishiura M., Kanehisa M., Roberts V. A., Todo T., Tainer J. A., Getzoff E. D., Identification of a new cryptochrome class: Structure, function, and evolution, *Mol. Cell*, **2003**, 11 (1), 59-67.
- [81] Kleine T., Lockhart P., Batschauer A., An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles, *Plant J.*, **2003**, 35 (1), 93-103.
- [82] Daiyasu H., Ishikawa T., Kuma K., Iwai S., Todo T., Toh H., Identification of cryptochrome DASH from vertebrates, *Gen. Cells*, **2004**, 9 (5), 479-495.
- [83] Griffin E. A., Staknis D., Weitz C. J., Light-independent role of cry1 and cry2 in the mammalian circadian clock, *Science*, **1999**, 286 (5440), 768-771.
- [84] Selby C. P., Sancar A., A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103 (47), 17696-17700.
- [85] Park H. W., Kim S. T., Sancar A., Deisenhofer J., Crystal-structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*, *Science*, **1995**, 268 (5219), 1866-1872.
- [86] Huang Y. H., Baxter R., Smith B. S., Partch C. L., Colbert C. L., Deisenhofer J., Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103 (47), 17701-17706.
- [87] Tamada T., Kitadokoro K., Higuchi Y., Inaka K., Yasui A., deRuiter P. E., Eker A. P. M., Miki K., Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*, *Nature Struc. Biol.*, **1997**, 4 (11), 887-891.

- [88] Klar T., Pokorny R., Moldt J., Batschauer A., Essen L.-O., Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: Structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna, *J. Mol. Biol.*, **2007**, 366 954-964.
- [89] Fujihashi M., Numoto N., Kobayashi Y., Mizushima A., Tsujimura M., Nakamura A., Kawarabayasi Y., Miki K., Crystal structure of archaeal photolyase from *Sulfolobus tokodaii* with two FAD molecules: Implication of a novel light-harvesting cofactor, *J. Mol. Biol.*, **2007**, 365 (4), 903-910.
- [90] Todo T., Kim S. T., Hitomi K., Otsoshi E., Inui T., Morioka H., Kobayashi H., Ohtsuka E., Toh H., Ikenaga M., Flavin adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6-4)photolyase, *Nucl. Ac. Res.*, **1997**, 25 (4), 764-768.
- [91] Zhu H. S., Conte F., Green C. B., Nuclear localization and transcriptional repression are confined to separable domains in the circadian protein cryptochrome, *Current Biology*, **2003**, 13 (18), 1653-1658.
- [92] Maul M. J., Barends T. R. M., Glas A. F., Cryle M. J., Domratcheva T., Schneider S., Schlichting I., Carell T., Crystal structure and mechanism of a DNA (6-4) photolyase, *Angew. Chem. Inter. Ed.*, **2008**, 47 (52), 10076-10080.
- [93] Brautigam C. A., Smith B. S., Ma Z. Q., Palnitkar M., Tomchick D. R., Machius M., Deisenhofer J., Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2004**, 101 (33), 12142-12147.
- [94] Xu L., Mu W. M., Ding Y. W., Luo Z. F., Han Q. K., Bi F. Y., Wang Y. Z., Song Q. H., Active site of *Escherichia coli* DNA photolyase: Asn378 is crucial both for stabilizing the neutral flavin radical cofactor and for DNA repair, *Biochem.*, **2008**, 47 (33), 8736-8743.
- [95] Li Y. F., Sancar A., Active-site of *Escherichia coli* DNA photolyase - mutations at Trp277 alter the selectivity of the enzyme without affecting the quantum yield of photorepair, *Biochem.*, **1990**, 29 (24), 5698-5706.
- [96] Kim S. T., Heelis P. F., Sancar A., Energy-transfer (Deazaflavin \rightarrow FADH₂) and electron transfer (FADH₂ \rightarrow T \leftrightarrow T) kinetics in *Anacystis nidulans* photolyase, *Biochem.*, **1992**, 31 (45), 11244-11248.
- [97] Jorns M. S., Sancar G. B., Sancar A., Identification of oligothymidylates as new simple substrates for *Escherichia coli* DNA photolyase and their use in a rapid spectrophotometric enzyme assay, *Biochem.*, **1985**, 24 (8), 1856-1861.
- [98] Kim S.-T., Heelis P. F., Okamura T., Hirata Y., Mataga N., Sancar A., Determination of rates and yields of interchromophore (folate \rightarrow flavin) energy transfer and intermolecular (flavin \rightarrow DNA) electron transfer in *Escherichia coli* photolyase by time-resolved fluorescence and absorption spectroscopy, *Biochem.*, **1991**, 30 (47), 11262-11270.
- [99] Husain I., Sancar A., Binding of *Escherichia coli* DNA photolyase to a defined substrate containing a single T \leftrightarrow T dimer, *Nucl. Ac. Res.*, **1987**, 15 (3), 1109-1120.

- [100] Sancar G. B., Smith F. W., Heelis P. F., Purification of the yeast Phr1 photolyase from an *Escherichia coli* overproducing strain and characterization of the intrinsic chromophores of the enzyme, *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262 (32), 15457-15465.
- [101] Malhotra K., Kim S. T., Walsh C., Sancar A., Roles of FAD and 8-hydroxy-5-deazaflavin chromophores in photoreactivation by *Anacystis nidulans* DNA photolyase, *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267 (22), 15406-15411.
- [102] Payne G., Wills M., Walsh C., Sancar A., Reconstitution of *Escherichia coli* photolyase with flavins and flavin analogues, *Biochem.*, **1990**, 29, 5706-5711.
- [103] Sancar A., Structure and function of DNA photolyase, *Biochem.*, **1994**, 33 (1), 2-9.
- [104] Jordan S. P., Jorns M. S., Evidence for a singlet intermediate in catalysis by *Escherichia coli* DNA photolyase and evaluation of substrate binding determinants, *Biochem.*, **1988**, 27 (25), 8915-8923.
- [105] Heelis P. F., Electronic energy transfer in DNA photolyase: A molecular orbital study, *J. Photochem. Photobiol. B*, **1997**, 38 (1), 31-34.
- [106] Okamura T., Sancar A., Heelis P. F., Begley T. P., Hirata Y., Mataga N., Picosecond laser photolysis studies on the photorepair of pyrimidine dimers by DNA photolyase. I. Laser photolysis of photolyase-2-deoxyuridine dinucleotide photodimer complex, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113 (8), 3143-3145.
- [107] Kim S. T., Volk M., Rousseau G., Heelis P. F., Sancar A., Michelbeyerle M. E., Laser flash photolysis on an intermediate in the repair of pyrimidine dimers by DNA photolyase, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116 (7), 3115-3116.
- [108] Langenbacher T., Zhao X., Bieser G., Heelis P. F., Sancar A., Michel-Beyerle M. E., Substrate and temperature dependence of DNA photolyase repair activity examined with ultrafast spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119 (43), 10532-10536.
- [109] Butenandt J., Burgdorf L. T., Carell T., "Base flipping": Photodamaged DNA-RNA duplexes are poor substrates for photoreactivating DNA-repair enzymes, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **1999**, 38 (5), 708-711.
- [110] Kao Y. T., Saxena C., Wang L. J., Sancar A., Zhong D. P., Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2005**, 102 (45), 16128-16132.
- [111] Durbeej B., Eriksson L. A., Thermodynamics of the photoenzymic repair mechanism studied by density functional theory, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122 (41), 10126-10132.
- [112] Voityuk A. A., Rosch N., *Ab initio* study on the structure and splitting of the uracil dimer anion radical, *J. Phys. Chem. A*, **1997**, 101 (44), 8335-8338.
- [113] Hitomi K., Kim S. T., Iwai S., Harima N., Otsoshi E., Ikenaga M., Todo T., Binding and catalytic properties of *Xenopus* (6-4) photolyase, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272 (51), 32591-32598.

- [114] 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, **2008**, 6 (7), 1559-1569.
- [115] Ozturk N., Song S. H., Selby C. P., Sancar A., Animal type 1 cryptochromes - analysis of the redox state of the flavin cofactor by site-directed mutagenesis, **2008**, 283 (6), 3256-3263.
- [116] Song S. H., Ozturk N., Denaro T. R., Arat N. O., Kao Y. T., Zhu H., Zhong D., Reppert S. M., Sancar A., Formation and function of flavin anion radical in cryptochrome 1 blue-light photoreceptor of monarch butterfly, **2007**, 282 (24), 17608-17612.
- [117] Bouly J. P., Schleicher E., Dionisio-Sese M., Vandenbussche F., Van Der Straeten D., Bakrim N., Meier S., Batschauer A., Galland P., Bittl R., Ahmad M., Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282 (13), 9383-9391.
- [118] Mouritsen H., Janssen-Bienhold U., Liedvogel M., Feenders G., Stalleicken J., Dirks P., Weiler R., Cryptochromes and neuronal-activity markers colocalize in the retina of migratory birds during magnetic orientation, **2004**, 101 (39), 14294-14299.
- [119] Ritz T., Thalau P., Phillips J. B., Wiltschko R., Wiltschko W., Resonance effects indicate a radical-pair mechanism for avian magnetic compass, **2004**, 429 (6988), 177-180.
- [120] Kottke T., Batschauer A., Ahmad M., Heberle J., Blue-light-induced changes in arabidopsis cryptochrome 1 probed by ftir difference spectroscopy, *Biochem.*, **2006**, 45 (8), 2472-2479.
- [121] Payne G., Heelis P. F., Rohrs B. R., Sancar A., The active form of escherichia-coli DNA photolyase contains a fully reduced flavin and not a flavin radical, both invivo and invitro, **1987**, 26 (22), 7121-7127.
- [122] Sancar A., Sancar G. B., Escherichia-coli DNA photolyase is a flavoprotein, **1984**, 172 (2), 223-227.
- [123] Harm H., Rupert C. S., Analysis of photoenzymatic repair of uv lesions in DNA by single light-flashes .11. Light-induced activation of yeast photoreactivating enzyme, *Muta. Res.*, **1976**, 34 (1), 75-92.
- [124] Heelis P. F., Sancar A., Photochemical properties of escherichia-coli DNA photolyase - a flash-photolysis study, *Biochem.*, **1986**, 25 (25), 8163-8166.
- [125] Gindt Y. M., Vollenbroek E., Westphal K., Sackett H., Sancar A., Babcock G. T., Origin of the transient electron paramagnetic resonance signals in DNA photolyase, *Biochem.*, **1999**, 38 (13), 3857-3866.
- [126] Heelis P. F., Sancar A., Okamura T., Excited quartet states in DNA photolyase, *J. Photochem. Photobiol. B*, **1992**, 16 (3-4), 387-390.

- [127] Okamura T., Sancar A., Heelis P. F., Hirata Y., Mataga N., Doublet quartet intersystem crossing of flavin radical in DNA photolyase, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111 (15), 5967-5969.
- [128] Heelis P. F., Okamura T., Sancar A., Excited-state properties of *Escherichia coli* DNA photolyase in the picosecond to millisecond time scale, *Biochem.*, **1990**, 29 (24), 5694-5698.
- [129] Li Y. F., Heelis P. F., Sancar A., Active site of DNA photolyase Tryptophan 306 is the intrinsic hydrogen atom donor essential for flavin radical photoreduction and DNA repair *in vitro*, *Biochem.*, **1991**, 30 (25), 6322-6329.
- [130] Essenmacher C., Kim S. T., Atamian M., Babcock G. T., Sancar A., Tryptophan radical formation in DNA photolyase: electron spin polarization arising from photoexcitation of a doublet ground state, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115 (4), 1602-1603.
- [131] Kim S. T., Sancar A., Essenmacher C., Babcock G. T., Time-resolved EPR studies with DNA photolyase: excited state FADH[•] abstracts an electron from Trp306 to generate FADH⁻, the catalytically active form of the cofactor, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90 (17), 8023-8027.
- [132] Cheung M. S., Daizadeh I., Stuchebrukhov A. A., Heelis P. F., Pathways of electron transfer in *Escherichia coli* DNA photolyase: Trp(306) to FADH[•], *Biophys. J.*, **1999**, 76 (3), 1241-1249.
- [133] Saxena C., Sancar A., Zhong D. P., Femtosecond dynamics of DNA photolyase: Energy transfer of antenna initiation and electron transfer of cofactor reduction, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108 (46), 18026-18033.
- [134] Wang H. Y., Saxena C., Quan D. H., Sancar A., Zhong D. P., Femtosecond dynamics of flavin cofactor in DNA photolyase: Radical reduction, local solvation, and charge recombination, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109 (4), 1329-1333.
- [135] Weber S., Kay C. W. M., Mogling H., Mobius K., Hitomi K., Todo T., Photoactivation of the flavin cofactor in *Xenopus laevis* (6-4) photolyase: Observation of a transient tyrosyl radical by time-resolved electron paramagnetic resonance, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99 (3), 1319-1322.
- [136] Chosrowjan H., Taniguchi S., Mataga N., Tanaka F., Todoroki D., Kitamura M., Ultrafast fluorescence dynamics of FMN binding protein from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F) and its site-directed mutated proteins, *Chem. Phys. Lett.*, **2008**, 462 (183), 121-124.
- [137] Pan J., Byrdin M., Aubert C., Eker A. P. M., Brettel K., Vos M. H., Excited state properties of flavin radicals in flavoproteins: Femtosecond spectroscopy of DNA photolyase, glucose oxidase, and flavodoxin, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108 (28), 10160-10167.

- [138] Derelle E., Ferraz C., Rombauts S., Rouze P., Worden A. Z., Robbens S., Partensky F., Degroeve S., Echeynie S., Cooke R., Saeys Y., Wuyts J., Jabbari K., Bowler C., Panaud O., Piegu B., Ball S. G., Ral J. P., Bouget F. Y., Piganeau G., De Baets B., Picard A., Delseny M., Demaille J., Van de Peer Y., Moreau H., Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103 (31), 11647-11652.
- [139] Dupuy C., Vaquer A., Lam-Hoai T., Rougier C., Mazouni N., Lautier J., Collos Y., Le Gall S., Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a natural planktonic community of the mediterranean thau lagoon, *Marin. Ecol. Prog. Serear.*, **2000**, 205, 171-184.
- [140] Farinas B., Mary C., Manes C. L. D., Bhaud Y., Peaucellier G., Moreau H., Natural synchronisation for the study of cell division in the green unicellular alga *Ostreococcus tauri*, *Plant Mol. Biol.*, **2006**, 60 (2), 277-292.
- [141] Fouilland E., Descolas-Gros C., Courties C., Collos Y., Vaquer A., Gasc A., Productivity and growth of a natural population of the smallest free-living eukaryote under nitrogen deficiency and sufficiency, *Micro. Ecol.*, **2004**, 48 (1), 103-110.
- [142] Robbens S., Khadaroo B., Camasses A., Derelle E., Ferraz C., Inze D., Van de Peer Y., Moreau H., Genome wide analysis of core cell cycle genes in the unicellular green alga *Ostreococcus tauri*, *Mol. Biol. Evol.*, **2005**, 22 (3), 589-597.
- [143] Six C., Worden A. Z., Rodriguez F., Moreau H., Partensky F., New insights into the nature and phylogeny of prasinophyte antenna proteins: *Ostreococcus tauri*, a case study, *Mol. Biol. Evol.*, **2005**, 22 (11), 2217-2230.
- [144] Grajek H., Gryczynski I., Bojarski P., Gryczynski Z., Bharill S., Kulak L., Flavin mononucleotide fluorescence intensity decay in concentrated aqueous solutions, *Chem. Phys. Lett.*, **2007**, 439 (1-3), 151-156.
- [145] Lukasiewicz J., Grajek H., Frackowiak D., The influence of flavo nucleotide (FMN) dimerization on the efficiency of the FMN triplet states generation, *Dyes and Pigm.*, **2007**, 73 (3), 377-382.
- [146] Grajek H., Drabent R., Zurkowska G., Bojarski C., Absorption of the flavin dimers, *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, 801 (3), 456-460.
- [147] Vekshin N. L., Screening hypochromism of biological macromolecules and suspensions, *J. Photochem. Photobiol. B*, **1989**, 3 (4), 625-630.
- [148] Vekshin N. L., Screening hypochromism in molecular aggregates and biopolymers, *J. Biol. Phys.*, **1999**, 25 (4), 339-354.
- [149] Moore W. M., Colson S. D., Spence J. T., Raymond F. A., Photochemistry of riboflavin. I. Hydrogen transfer process in anaerobic photobleaching of flavins, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85 (21), 3367-3372.
- [150] Jimenez R., Fleming G. R., Kumar P. V., Maroncelli M., Femtosecond solvation dynamics of water, *Nature*, **1994**, 369 (6480), 471-473.

- [151] Land E. J., Swallow A. J., One electron reactions in biochemical systems as studied by pulse radiolysis. II. Riboflavin, *Biochem.*, **1969**, 8 (5), 2117-2125.
- [152] Candeias L. P., Steenken S., Electron-transfer in di(deoxy)nucleoside phosphates in aqueous-solution: rapid migration of oxidative damage (via adenine) to guanine, **1993**, *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (6), 2437-2440.
- [153] Song S. H., Dick B., Penzkofer A., Pokorny R., Batschauer A., Essen L. O., Absorption and fluorescence spectroscopic characterization of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*, *J. Photochem. Photobiol. B*, **2006**, 85 (1), 1-16.
- [154] Han Z., Katsumura Y., Lin M., He H., Muroya Y., Kudo H., Temperature and pressure dependence of the absorption spectra and decay kinetics of solvated electrons in ethanol from 22 to 250°C studied by pulse radiolysis., *Chem. Phys. Lett.*, **2005**, 404, 267-271.
- [155] Jou F. Y., Freeman G. R., Temperature and isotope effects on the shape of the optical absorption spectrum of solvated electrons in water, *J. Phys. Chem.*, **1979**, 83 (18), 2383-2387.
- [156] Michael B. D., Hart E. J., Schmidt K. H., Absorption spectrum of e_{aq}^- in temperature range -4 to 390°C, *J. Phys. Chem.*, **1971**, 75 (18), 2798-2805.
- [157] Pommeret S., Gobert F., Mostafavi A., Lampre I., Mialocq J. C., Femtochemistry of the hydrated electron at decimolar concentration, *J. Phys. Chem. A*, **2001**, 105 (51), 11400-11406.
- [158] Hart E. J., Boag J. W., Absorption spectrum of hydrated electron in water and in aqueous solutions, *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, 84 (21), 4090-4095.
- [159] Schleicher E., Hitomi K., Kay C. W. M., Getzoff E. D., Todo T., Weber S., Electron nuclear double resonance differentiates complementary roles for active site histidines in (6-4) photolyase, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282 (7), 4738-4747.
- [160] Gauduel Y., Pommeret S., Migus A., Antonetti A., Some evidence of ultrafast H₂O water molecule reaction in femtosecond photoionization of pure liquid water: influence on geminate pair recombination dynamics, *Chem. Phys.*, **1990**, 149 (1-2), 1-10.
- [161] Migus A., Gauduel Y., Martin J. L., Antonetti A., Excess electrons in liquid water: 1st evidence of a prehydrated state with femtosecond lifetime, *Phys. Rev. Lett.*, **1987**, 58 (15), 1559-1562.
- [162] Tyagi A., Penzkofer A., Batschauer A., Wolf E., Thermal degradation of (6R,S)-5,10-methenyltetrahydrofolate in aqueous solution at pH 8, *Chem. Phys.*, **2009**, 358 (1-2), 132-136.
- [163] Tanaka F., Chosrowjan H., Taniguchi S., Mataga N., Sato K., Nishina Y., Shiga K., Donor-acceptor distance-dependence of photoinduced electron transfer rate in flavoproteins, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111 (20), 5694-5699.

- [164] Chosrowjan H., Taniguchi S., Mataga N., Tanaka F., Todoroki D., Kitamura M., Comparison between ultrafast fluorescence dynamics of FMN binding protein from *Desulfovibrio vulgaris*, strain Miyazaki, in solution vs crystal phases, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111 (30), 8695-8697.
- [165] Nunthaboot N., Tanaka F., Kokpol S., Chosrowjan H., Taniguchi S., Mataga N., Simulation of ultrafast non-exponential fluorescence decay induced by electron transfer in FMN binding protein, *J. Photochem. Photobiol. A*, **2009**, 201 (2-3), 191-196.
- [166] Usman A., Brazard J., Martin M. M., Plaza P., Heijde M., Zabulon G., Bowler C., Spectroscopic characterization of a (6-4) photolyase isolated from the green alga *Ostreococcus tauri*, *J. Photochem. Photobiol. B*, **2009**, 96, 38-48.
- [167] Faeder E. J., Siegel L. M., Rapid micromethod for determination of FMN and FAD in mixtures, *Analy. Biochem.*, **1973**, 53 (1), 332-336.
- [168] Malhotra K., Kim S. T., Sancar A., Characterization of a medium wavelength type DNA photolyase: purification and properties of photolyase from *Bacillus firmus*, *Biochem.*, **1994**, 33 (29), 8712-8718.
- [169] Worthington E. N., Kavakli I. H., Berrocal-Tito G., Bondo B. E., Sancar A., Purification and characterization of three members of the photolyase/cryptochrome family blue-light photoreceptors from *Vibrio cholerae*, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278 (40), 39143-39154.
- [170] Eker A. P. M., Kooiman P., Hessels J. K. C., Yasui A., DNA photoreactivating enzyme from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*, *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265 (14), 8009-8015.
- [171] Li J., Uchida T., Ohta T., Todo T., Kitagawa T., Characteristic structure and environment in FAD cofactor of (6-4) photolyase along function revealed by resonance raman spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110 (33), 16724-16732.
- [172] MacFarlane A. W., Stanley R. J., Evidence of powerful substrate electric fields in DNA photolyase: Implications for thymidine dimer repair, *Biochem.*, **2001**, 40 (50), 15203-15214.
- [173] Berndt A., Kottke T., Breitkreuz H., Dvorsky R., Hennig S., Alexander M., Wolf E., A novel photoreaction mechanism for the circadian blue light photoreceptor *Drosophila* cryptochrome, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282 (17), 13011-13021.
- [174] Shirdel J., Zirak P., Penzkofer A., Breitkreuz H., Wolf E., Absorption and fluorescence spectroscopic characterisation of the circadian blue-light photoreceptor cryptochrome from *Drosophila melanogaster* (dcry), *Chem. Phys.*, **2008**, 352 (1-3), 35-47.
- [175] Jorns M. S., Wang B. Y., Jordan S. P., Chandekar L. P., Chromophore function and interaction in escherichia-coli DNA photolyase: reconstitution of the apoenzyme with pterin and or flavin derivatives, *Biochem.*, **1990**, 29 (2), 552-561.

- [176] Miura R., Versatility and specificity in flavoenzymes: Control mechanisms of flavin reactivity, *Chem. Rec.*, **2001**, 1 (3), 183-194.
- [177] Sancar A., Structure and function of photolyase and *in vivo* enzymology: 50th anniversary, *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283 (47), 32153-32157.
- [178] Pace C. N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T., How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein?, *Prot. Science*, **1995**, 4 (11), 2411-2423.
- [179] Demas J. N., Crosby G. A., Measurement of photoluminescence quantum yields: Review, *J. Phys. Chem.*, **1971**, 75 (8), 991-995.
- [180] Valeur B., Principes des techniques fluorimétriques. Fluorescence moléculaire., **2004**.
- [181] Zeugner A., Byrdin M., Bouly J. P., Bakrim N., Giovani B., Brettel K., Ahmad M., Light induced electron transfer in *Arabidopsis* cryptochrome 1 correlates with *in vivo* function, *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280 (20), 19437-19440.
- [182] Heelis P. F., Payne G., Sancar A., Photochemical properties of *Escherichia coli* DNA photolyase: selective photodecomposition of the 2nd chromophore, *Biochem.*, **1987**, 26 (15), 4634-4640.
- [183] Aubert C., Mathis P., Eker A. P. M., Brettel K., Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from *Anacystis nidulans*, *Biochem.*, **1999**, 96, 5423-5427.
- [184] Solar S., Getoff N., Surdhar P. S., Armstrong D. A., Singh A., Oxidation of tryptophan and N-methylindole by N₃, Br₂⁻, and (SCN)²⁻ radicals in light water and heavy water solutions. A pulse radiolysis study, *J. Phys. Chem.*, **1991**, 95 (9), 3639-3643.
- [185] Gerken S., Brettel K., Schlodder E., Witt H. T., Optical characterization of the immediate electron-donor to chlorophyll A²⁺ in O₂ evolving photosystem II complexes - tyrosine as possible electron carrier between chlorophyll A²⁺ and the water-oxidizing manganese complex, *Febs Lett.*, **1988**, 237 (1-2), 69-75.
- [186] Wohlfahrt G., Witt S., Hendle J., Schomburg D., Kalisz H. M., Hecht H. J., 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the penicillium *Amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes, *Acta Cryst. Sect. D*, **1999**, 55, 969-977.
- [187] Saxena C., Wang H. Y., Kavakli I. H., Sancar A., Zhong D. P., Ultrafast dynamics of resonance energy transfer in cryptochrome, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127 (22), 7984-7985.
- [188] Hamm-Alvarez S., Sancar A., Rajagopalan K. V., Role of enzyme-bound 5,10-methenyltetrahydropteroylpolyglutamate in catalysis by *Escherichia coli* DNA photolyase, *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264 (16), 9649-9656.

- [189] Jorns M. S., Wang B., Jordan S. P., DNA repair catalyzed by *Escherichia coli* DNA photolyase containing only reduced flavin: elimination of the enzymes 2nd chromophore by reduction with sodium borohydride, *Biochem.*, **1987**, 26 (21), 6810-6816.
- [190] Kay L. D., Osborn M. J., Hatefi Y., Huennekens F. M., Folic acid coenzymes and active one carbon units. VIII. Enzymatic conversion of N-5-formyl tetrahydrofolic acid (folinic acid) to N-10-formyl tetrahydrofolic acid, *J. Biol. Chem.*, **1960**, 235 (1), 195-201.
- [191] May M., Bardos T. J., Barger F. L., Lansford M., Ravel J. M., Sutherland G. L., Shive W., Synthetic and degradative investigations of the structure of folinic acid, *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73 (7), 3067-3075.
- [192] Valeur B., Molecular fluorescence: Principles and application, **2002**.
- [193] Matsuoka Y., Norden B., Linear dichroism studies of nucleic-acids. III. Reduced dichroism curves of DNA in ethanol-water and in poly(vinyl alcohol) films, *Biopoly.*, **1983**, 22 (7), 1731-1746.
- [194] Salim M., Siddiqui U., Kodali G., Stanley R. J., Electronic transition dipole moment directions of reduced anionic flavin in stretched poly(vinyl alcohol) films, *J. Phys. Chem. B*, **2008**, 112 (1), 119-126.
- [195] Takao M., Oikawa A., Eker A. P. M., Yasui A., Expression of an *Anacystis nidulans* photolyase gene in *Escherichia coli*: functional complementation and modified action spectrum of photoreactivation, *Photochem. Photobiol.*, **1989**, 50 (5), 633-637.
- [196] Lukacs A., Eker A. P. M., Byrdin M., Brettel K., Vos M. H., Electron hopping through the 15 Å triple tryptophan molecular wire in DNA photolyase occurs within 30 ps, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130 (44), 14394-14395.
- [197] Zewail A. H., Femtochemistry: Atomic scale dynamics of the chemical bond using ultrafast lasers (nobel lecture), *Angew. Chem. Internat. Ed.*, **2000**, 39 (15), 2587-2631.
- [198] Moulton P. F., Spectroscopic and laser characteristics of Ti:Al₂O₃, *J. Opt. Soc. Am. B*, **1986**, 3 (1), 125-133.
- [199] Ekvall K., van der Meulen P., Dhollande C., Berg L. E., Pommeret S., Naskrecki R., Mialocq J. C., Cross phase modulation artifact in liquid phase transient absorption spectroscopy, *J. Appl. Phys.*, **2000**, 87 (5), 2340-2352.
- [200] Kovalenko S. A., Dobryakov A. L., Ruthmann J., Ernsting N. P., Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing, *Phys. Rev. A*, **1999**, 59 (3), 2369-2384.
- [201] Ernsting N. P., Kovalenko S. A., Senyushkina T., Saam J., Farztdinov V., Wave-packet assisted decomposition of femtosecond transient ultraviolet-visible absorption spectra: Application to excited-state intramolecular proton transfer in solution, *J. Phys. Chem. A*, **2001**, 105 (14), 3443-3453.
- [202] Forster T., Energiewanderung und fluoreszenz, *Naturwiss.*, **1946**, 33 (6), 166-175.

- [203] Braslavsky S. E., Fron E., Rodriguez H. B., Roman E. S., Scholes G. D., Schweitzer G., Valeur B., Wirz J., Pitfalls and limitations in the practical use of forster's theory of resonance energy transfer, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, 7 (12), 1444-1448.
- [204] Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., Clustal w: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice., *Nuc. Aci. Res.*, **1994**, 22 4673-4680.
- [205] Rost B., Sander C., Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy., *J. Mol. Biol.*, **1993**, 232 584-599.
- [206] Rost B., Yachdav G., Liu J. F., The predictprotein server, *Nucl. Aci. Res.*, **2004**, 32, 321-326.
- [207] Sali A., Blundell T. L., Definition of general topological equivalence in protein structures: A procedure involving comparison of properties and relationships through simulated annealing and dynamic programming, *J. Mol. Biol.*, **1990**, 212, 403-428.
- [208] Brooks B. R., Bruccoleri R. E., Olafson B. D., States D. J., Swaminathan S., Karplus M., Charmm: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations, *J. Comput. Chem.*, **1983**, 4 (2), 187-217.
- [209] Kraml M., Marwan W., Photomovement responses of the heterotrichous ciliate *Blepharisma japonicum*, *Photochem. Photobiol.*, **1983**, 37 (3), 313-319.
- [210] Fabczak S., Fabczak H., Song P. S., Photosensory transduction in ciliates. III. The temporal relation between membrane-potentials and phototile responses in *Blepharisma japonicum*, *Photochem. Photobiol.*, **1993**, 57 (5), 872-876.
- [211] Giese A. C., Grainger R. M., Studies on red and blue forms of pigment of *Blepharisma*, *Photochem. Photobiol.*, **1970**, 12 (6), 489-492.
- [212] Ghetti F., Checcucci G., Lenci F., Heelis P. F., A laser flash-photolysis study of the triplet states of the red and the blue forms of *Blepharisma japonicum* pigment, *J. Photochem. Photobiol. B*, **1992**, 13 (3-4), 315-321.
- [213] Scevoli P., Bisi F., Colombetti G., Ghetti F., Lenci F., Passarelli V., Phototile responses of *Blepharisma japonicum*. I. Action spectra determination and time-resolved fluorescence of photoreceptor pigments, *J. Photochem. Photobiol. B*, **1987**, 1 (1), 75-84.
- [214] Matsuoka T., Matsuoka S., Yamaoka Y., Kuriu T., Watanabe Y., Takayanagi M., Kato Y., Taneda K., Action spectra for step-up photophobic response in *Blepharisma*, **1992**, 39 (4), 498-502.
- [215] Checcucci G., Damato G., Ghetti F., Lenci F., Action spectra of the photophobic response of blue and red forms of *Blepharisma japonicum*, *Photochem. Photobiol.*, **1993**, 57 (4), 686-689.

- [216] Plaza P., Mahet M., Tchaikovskaya O. N., Martin M. M., Excitation energy effect on the early photophysics of hypericin in solution, *Chem. Phys. Lett.*, **2005**, 408 (1-3), 96-100.
- [217] Plaza P., Mahet M., Martin M. M., Angelini N., Malatesta M., Checcucci G., Lenci F., Spectroscopic study of the chromophore-protein association and primary photoinduced events in the photoreceptor of *Blepharisma japonicum*, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2005**, 4 (9), 754-761.
- [218] Plaza P., Mahet M., Martin M. M., Checcucci G., Lenci F., Target analysis of primary photoprocesses involved in the oxyblepharismine binding protein, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111 (4), 690-696.
- [219] Mahet M., Plaza P., Martin M. M., Checcucci G., Lenci F., Primary photoprocesses in oxyblepharismine interacting with its native protein partner, *J. Photochem. Photobiol. A*, **2007**, 185 (2-3), 345-353.
- [220] Mahet M., Processus photochimiques primaires de la photophobie du protozoaire cilié *Blepharisma japonicum*. Étude par spectroscopie ultrarapide, Thèse de Chimie Physique et Chimie analytique. Biologie de l'évolution, Université de Paris 6. Université de Pise, Paris/ Pisa, 2005, p. 262.
- [221] Mataga N., Photochemical charge transfer phenomena: picosecond laser photolysis studies, *Pure Appl. Chem.*, **1984**, 56 (9), 1255-1268.
- [222] Mataga N., Miyasaka H., Electron transfer and exciplex chemistry, *Elec. Trans.*, **1999**, 107, 431-496.
- [223] Martin M. M., Ikeda N., Okada T., Mataga N., Picosecond laser photolysis studies of deactivation processes of excited hydrogen-bonding complexes. II. Dibenzocarbazole pyridine systems, *J. Phys. Chem.*, **1982**, 86 (21), 4148-4156.
- [224] Miyasaka H., Tabata A., Ojima S., Ikeda N., Mataga N., Femtosecond picosecond laser photolysis studies on the mechanisms of fluorescence quenching induced by hydrogen-bonding interactions: 1-pyrenol-pyridine systems, *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97 (31), 8222-8228.
- [225] Tanaka H., Nishimoto K., *Ab initio* molecular orbital study on the electronic structure of some excited hydrogen bonding systems, *J. Phys. Chem.*, **1984**, 88 (6), 1052-1055.
- [226] Fabczak H., Fabczak S., Song P. S., Checcucci G., Ghetti F., Lenci F., Photosensory transduction in ciliates: role of intracellular pH and comparison between *Stentor coeruleus* and *Blepharisma japonicum*, *J. Photochem. Photobiol. B*, **1993**, 21 (1), 47-52.
- [227] Matsuoka T., Kotsuki H., Photosensory transduction in unicellular eukaryote blepharisma, *J. Exp. Zool.*, **2001**, 289 (7), 467-471.
- [228] Matsuoka T., Murakami Y., Furukohri T., Ishida M., Taneda K., Photoreceptor pigment in *Blepharisma*: H⁺ release from red pigment, *Photochem. Photobiol.*, **1992**, 56 (3), 399-402.

- [229] Roberts J. E., Photobiology for the 21st century, **2001**.
- [230] Giese A. C., Some properties of a photodynamic pigment from *Blepharisma*, *J. Gene. Physiol.*, **1953**, 37 (2), 259-269.
- [231] Pant B., Kato Y., Kumagai T., Matsuoka T., Sugiyama M., Blepharismin produced by a protozoan *Blepharisma* functions as an antibiotic effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **1997**, 155 (1), 67-71.
- [232] Schey K. L., Patat S., Chignell C. F., Datillo M., Wang R. H., Roberts J. E., Photooxidation of lens alpha-crystallin by hypericin (active ingredient in St john's wort), *Photochem. Photobiol.*, **2000**, 72 (2), 200-203.
- [233] Sgarbossa A., Lenci F., Spectroscopic study of visible-light effects on hypericin lens proteins systems, *Photochem. Photobiol.*, **2001**, 74 (2), 196-200.
- [234] Sgarbossa A., Youssef T., Lenci F., Photosensitized structural modifications of the lens protein alpha-crystallin: Do all modifications impair chaperone-like activity?, *Photochem. Photobiol.*, **2003**, 77 (5), 567-571.
- [235] Callis P. R., Petrenko A., Muino P. L., Tusell J. R., *Ab initio* prediction of tryptophan fluorescence quenching by protein electric field enabled electron transfer, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111 (35), 10335-10339.
- [236] Chen Y., Barkley M. D., Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins, *Biochem.*, **1998**, 37 (28), 9976-9982.
- [237] Horng M. L., Gardecki J. A., Papazyan A., Maroncelli M., Subpicosecond measurements of polar solvation dynamics: coumarin 153 revisited, *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99 (48), 17311-17337.
- [238] English D. S., Das K., Zenner J. M., Zhang W., Kraus G. A., Larock R. C., Petrick J. W., Hypericin, hypocrellin, and model compounds: Primary photoprocesses of light induced antiviral agents, *J. Phys. Chem. A*, **1997**, 101 (18), 3235-3240.
- [239] English D. S., Zhang W., Kraus G. A., Petrick J. W., Excited-state photophysics of hypericin and its hexamethoxy analog: Intramolecular proton transfer as a nonradiative process in hypericin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119 (13), 2980-2986.

Titre : i) Photoactivation femtoseconde de deux nouvelles protéines de la famille cryptochrome/photolyase, issues de l'algue verte *Ostreococcus tauri*.
ii) Photocycle ultrarapide et état signalant de la photophobie du protozoaire *Blepharisma japonicum*.

Résumé : i) Ce travail concerne la photoactivité de deux nouvelles flavoprotéines (OtPCF1 et OtCPF2) de l'algue verte *Ostreococcus tauri*, appartenant à la famille des cryptochromes et photolyases (CPF). Nous avons mis en évidence, dans les deux cas, un transfert d'électron ultrarapide (OtCPF1 : 390 fs ; OtCPF2 : 590 fs) après excitation du chromophore flavine adénine dinucléotide (FAD) sous forme oxydée. Nous avons caractérisé un résidu tryptophane comme donneur d'électron. Nous expliquons les étapes ultérieures par des transferts d'électron le long d'une chaîne de trois résidus tryptophanes, conservés au sein des protéines CPF. Par ailleurs nous avons analysé le transfert d'énergie de la photoantenne de OtCPF2 vers FAD oxydée et réduite. Des analyses structurales, obtenues par modélisation par homologie, nous ont permis de rationaliser les résultats obtenus par spectroscopie transitoire ultrarapide.
ii) Pour expliquer le photocycle ultrarapide observé pour OBIP, le photorécepteur supposé du protozoaire cilié *Blepharisma japonicum*, nous avons proposé un modèle original mettant en jeu un équilibre entre l'état localement excité du chromophore (Oxyblépharismine) en interaction par liaison hydrogène avec un résidu proche et un état à transfert de charge intermoléculaire. Nous avons également proposé que l'état signalant de la photophobie serait la forme déprotonée du chromophore.

Mots-clés : *Ostreococcus tauri*, FAD, spectroscopie UV-vis femtoseconde, transfert d'électron photoninduit, transfert d'énergie, *Blepharisma japonicum*, photomouvement, Oxyblépharismine, α -cristalline, *O*-hexaméthoxyhypéricine.

Title: i) Femtosecond Photoactivation of Two New Proteins belonging to the Cryptochrome/Photolyase Family, extracted from the Green Alga *Ostreococcus Tauri*.
ii) Ultrafast Photocycle and Signaling State of the Photophobic Response of the Protozoan *Blepharisma Japonicum*.

Summary: i) This work deals with the photoactivity of two new flavoproteins (OtCPF1 and OtCPF2) of the green alga *Ostreococcus tauri*, belonging to the Cryptochrome Photolyase Family (CPF). In both cases, we observed an ultrafast electron transfer (OtCPF1: 390fs ; OtCPF2: 590fs) after excitation of the chromophore flavin adenine dinucleotide (FAD) in its oxidized form. We characterized a tryptophan residue as the electron donor. We explain the subsequent kinetics by electron transfer steps along a chain of three tryptophan residues, a well conserved structure among the CPF proteins. We also analyzed the energy transfer from the photoantenna of OtCPF2 to FAD in its oxidized and reduced form. The structural analysis, done by homology modeling, allowed us to rationalize the spectroscopic results.
ii) To explain the very short-lived photocycle observed for OBIP, the putative photoreceptor of the protozoan *Blepharisma japonicum*, we proposed an original model involving an ultrafast equilibrium between the locally excited state of the chromophore (Oxyblepharimin) hydrogen bonded to a closely lying residue and an intermolecular charge transfer state. We have also proposed that the signaling state of the photophobic response could be the deprotonated Oxyblepharimin chromophore.

Keywords: *Ostreococcus tauri*, FAD, UV-vis femtosecond spectroscopy, photoinduced electron transfer, energy transfer, *Blepharisma japonicum*, photomovement, Oxyblepharimin, α -crystallin, *O*-hexamethoxyhypericin.