

ECOLE DOCTORALE PHYSIQUE ET CHIMIE-PHYSIQUE
Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg et
Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies

THESE présentée par :

Pauline GOSSET

soutenue le : **23 octobre 2020**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Physique

ETUDE DES PROPRIETES OPTIQUES DE L'OXYLUCIFERINE ET DE SES ANALOGUES

THESE dirigée par :

M. DORKENOO Kokou-Dodzi

M. DIDIER Pascal

Professeur, IPCMS, Université de Strasbourg

Professeur, LBP, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. MEALLET-RENAULT Rachel Professeure, Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay

M. SLIWA Michel Directeur de recherche, LASIRE

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. ULRICH Gilles

M. GUSTAVSSON Thomas

Directeur de recherche, ICPEES

Directeur de recherche, LIDYL

S'il n'y a pas de solution c'est qu'il n'y a pas de problème.

Jacques Roussel

Remerciements

J'ai réalisé ma thèse en cotutelle au sein des laboratoires IPCMS (Instituts de Physique Chimie des Matériaux de Strasbourg) dans l'équipe du DON (Département d'Optique Non-linéaire) et LBP (Laboratoire bioimagerie et Pathologie) dans l'équipe Biophotonique des interactions moléculaires et cellulaires. J'aimerais remercier les directeurs d'équipe pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et les deux équipes avec lesquelles j'ai travaillé et beaucoup appris pendant ces trois années de thèse.

Je remercie les membres du jury, Mme. Rachel MEALLET-RENAULT, M. Michel SLIWA, M. Gilles ULRICH et M. Thomas GUSTAVSSON, pour avoir accepté d'en faire partie.

J'aimerais particulièrement remercier mes directeurs de thèse, Honorat DORKENOO pour avoir bien voulu me garder après mon stage de fin d'étude et pour m'avoir aidé à mener à bien mon projet. Et je souhaiterais accorder toute ma gratitude et ma reconnaissance envers Pascal DIDIER qui a su me soutenir et m'encourager tout au long de ces trois années et qui a toujours répondu à mes questions (plus ou moins pertinentes) avec le sourire. Tu étais toujours disponible et je te remercie pour cela. Ce fut un grand plaisir de travailler avec toi.

Je remercie aussi Eléonore REAL pour m'avoir aidé et formée sur la partie biologie de ma thèse. Cela n'a pas toujours été facile étant donné mon niveau novice en biologie, mais tu m'as fait énormément progresser, et je t'en remercie. Tu m'as beaucoup appris d'un point de vue expérimental et théorique, mais aussi sur toute la rigueur que nécessite la biologie. Merci pour ta patience. J'adresse aussi mes remerciements à Nicolas HUMBERT et Thiebault LEQUEU pour m'avoir donné vos conseils et votre aide pour réussir mes expériences. Merci pour votre gentillesse.

Grégory TAUPIER pour m'avoir formée et appris tous les secrets de la manip pompe-sonde, je te remercie pour cela. Ton absence pendant les 2 dernières années c'est fait cruellement ressentir (notamment sur le rangement de la salle de manip !). C'était un plaisir de travailler avec toi et j'espère avoir gardé un minimum de la rigueur que tu apportes à ton travail (ce qui n'est pas une mince affaire...).

Je tiens également à remercier Olivier CREGUT de m'avoir transmis son savoir sur l'optique non-linéaire et le montage pompe-sonde. Toujours disponible pour répondre à mes questions,

tu m'as aussi énormément aidé pour optimiser mes expériences mais aussi à résoudre les mystères des lasers femtosecondes. Un grand merci aussi à Michi (Michelangelo ROMEO), qui s'est occupé de toute la partie informatique pour l'acquisition de mes données pompe-sonde.

Je souhaiterais remercier tous les collaborateurs de l'équipe ANR, pour nos discussions et nos échanges sur le sujet. Nous m'avez apporté d'autres points de vue (essentiellement théoriques) ce qui m'a été très formateur et très intéressant. C'était une joie de travailler avec vous, et la collaboration fut très enrichissante. J'adresse particulièrement mes remerciements à Jérémie LEONARD avec qui j'ai travaillé sur mes résultats pompe-sonde, tu m'as appris toute la méthode d'analyse et tu as toujours su apporter des questions ou remarques pertinentes pour faire avancer ou débloquent le projet. Je te remercie sincèrement pour cela.

Il me faut aussi remercier la « Team fromagère » (Anne, Mary, Sophie et Sylvie) pour le soutien qu'elles m'ont apporté tout au long de mes 3 années de thèses mais aussi pour ses moments de décompression et de lâcher prise à se raconter des potins autour d'une bonne tasse de thé ! Et bien sûr, le « morning coffee crew » (Damien, Marc et Mathieu) ainsi que mon voisin de bureau Kévin, pour ces bons moments pause-café (plus ou moins longs) à discuter de tout et de rien, pour m'avoir motivée à reprendre la natation et surtout à gagner la coupe du tournoi de pétanque de l'IPCMS ! Merci à vous tous.

Enfin je remercie toute ma famille qui m'a toujours soutenue, même dans les moments les plus difficiles, et Nicolas pour m'avoir supportée et encouragée pendant ces trois années. Tu as su me redonner confiance dans les moments de doute et me rebooster quand je perdais ma motivation. Merci pour tout.

Table des matières

Partie I - Introduction

I.1	La bioluminescence - Généralités.....	10
I.2	L'oxyluciférine et ses analogues	14
I.3	Propriétés de l'oxyluciférine et de ses analogues en solution aqueuse	16
I.4	La luciférase	20
I.4.1	Généralités.....	20
I.4.2	Structure de la luciférase <i>Photinus pyralis</i>	20
I.4.3	Site actif de la luciférase <i>Photinus pyralis</i> ⁷⁷	22
I.5	Complexe enzymatique - variation de la couleur de la bioluminescence	23
I.5.1	Dépendance au pH.....	24
I.5.2	Impact de la polarité sur l'émission.....	25
I.5.3	Géométrie rotationnelle de l'oxyluciférine dans son environnement.....	27
I.5.4	Rôle de l'AMP	28
I.6	Le transfert de proton à l'état excité (ESPT).....	31
I.7	Le véritable émetteur au sein du complexe	34
I.8	Plan du mémoire - motivations de la thèse	37

Partie II - Matériels et Méthodes

II.1	Préparation des échantillons	42
II.2	Mesures à l'état stationnaire.....	42
II.3	Mesures de fluorescence résolue en temps	42
II.4	Production et purification de la luciférase de <i>Photinus pyralis</i>	44
II.5	Mesure d'anisotropie de fluorescence	46
II.5.1	Fluorescence à l'état stationnaire	46
II.5.2	Fluorescence résolue en temps	47
II.5.3	Constante de dissociation.....	48
II.6	Dichroïsme circulaire.....	49
II.7	Logiciels utilisés.....	50

Partie III - Spectroscopie pompe-sonde

III.1	Principe	52
III.2	Source laser.....	52
III.2.1	Laser femtoseconde	52
III.2.2	Amplificateur.....	57
III.3	Impulsions pompe et sonde	58

III.3.1	Impulsion pompe – Doublage de fréquence	58
III.3.2	Impulsion sonde – Auto-modulation de phase.....	59
III.4	Montage pompe-sonde	60
III.4.1	Ligne à retard.....	61
III.4.2	Superposition des impulsions – mesure du signal.....	61
III.4.3	Mise en place de l'échantillon - Cellule tournante	62
III.4.4	Détection.....	63
III.5	Résolution temporelle de l'expérience pompe sonde.....	64
III.6	Traitement et analyse des données.....	65
III.6.1	Correction du solvant	66
III.6.2	Correction du <i>chirp</i>	66
III.6.3	Analyse des données pompe-sonde	67
III.6.4	<i>Singular Value Decomposition</i> - SVD	68
III.6.5	Analyse globale.....	69
III.6.6	<i>Decay Associated Spectra</i> (DAS)	70

Partie IV - Etude des propriétés optiques de l'oxyluciférine en solution aqueuse

IV.1	Introduction.....	74
IV.2	Propriétés de la forme kéto	76
IV.2.1	Analyse à l'état stationnaire et résolue en temps.....	76
IV.2.2	Analyse à l'état excité – spectroscopie pompe-sonde	79
IV.3	Propriétés de la forme énol	85
IV.3.1	Analyse à l'état stationnaire et résolue en temps.....	85
IV.3.2	Analyse à l'état excité – spectroscopie pompe-sonde	87
IV.4	Etude du dérivé 6'MeOxyLH.....	92
IV.4.1	Analyse à l'état stationnaire et résolue en temps.....	92
IV.4.2	Analyse à l'état excité – spectroscopie pompe-sonde	94
IV.4.3	Tautomérisation.....	97
IV.4.3.1	Détermination des concentrations relatives de la formes phénol-kéto et phénol-énolate.....	99
IV.4.3.2	Détermination du taux de conversion kéto-énol – méthode n°1.....	101
IV.4.3.3	Détermination du taux de conversion kéto-énol – méthode n°2.....	102
IV.5	Oxyluciférine	105
IV.5.1	Analyse à l'état stationnaire et résolue en temps.....	105
IV.5.2	Analyse à l'état excité – spectroscopie pompe-sonde	107
IV.5.3	Tautomérisation.....	110

IV.5.3.1	Détermination des concentrations relatives de la formes phénolate-kéto et phénol-énolate.....	111
IV.1.1.1	Détermination du taux de conversion kéto-énol – méthode n°1.....	113
IV.1.1.2	Détermination du taux de conversion kéto-énol – méthode n°2.....	114
IV.2	Conclusion.....	116

Partie V - Etude des propriétés optiques de l'oxyluciférine en présence de la luciférase

V.1	La bioluminescence.....	119
V.2	Formation du complexe enzymatique	122
V.2.1	Nécessité de l'AMP.....	122
V.2.2	Mutations de la luciférase.....	125
V.2.3	Spectres d'émission.....	128
V.2.4	Constante de dissociation – anisotropie de fluorescence résolue en temps 132	
V.3	Discussion – quelle est la nature de l'émetteur ?.....	136
V.3.1	Résultats à l'état stationnaire.....	137
V.3.2	Mesures de temps de vie	143
V.3.3	Spectroscopie pompe-sonde.....	148
V.4	Conclusion.....	149

Partie VI - Conclusions et Perspectives

VI.1	Conclusion générale.....	152
VI.2	Perspectives.....	154

Annexes.....	158
---------------------	------------

Partie VII - Références

Bibliographies.....	161
---------------------	-----

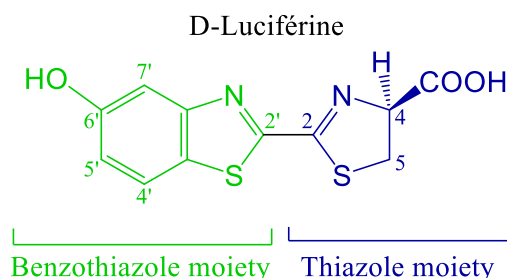
Partie I

Introduction

I.1 La bioluminescence - Généralités

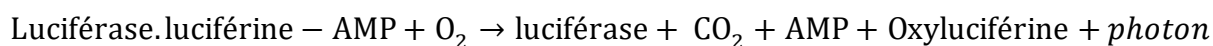
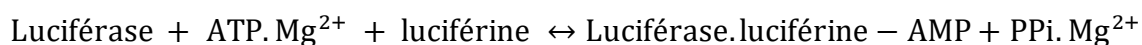
La bioluminescence est un phénomène fascinant, par lequel, des êtres vivants convertissent de l'énergie chimique en lumière^{1,2}. Une grande majorité de ces êtres vivants sont présents dans les océans, comme certaines méduses³, requins⁴, ou dinoflagellés^{3,5}. Mais beaucoup vivent aussi sur terre, comme des bactéries^{3,6}, des champignons⁷ ou encore, les lucioles⁷⁻⁹ qui sont à l'heure actuelle, les organismes chez lesquels ce phénomène est le plus étudié. La bioluminescence permet à ces êtres vivants de se camoufler ou de repousser leurs prédateurs, de se nourrir en attirant leurs proies, d'éclairer leur chemin, ou encore, comme c'est le cas pour les lucioles, d'avertir de leur présence afin d'être repérées par un potentiel partenaire¹⁰.

Les premières études sur la bioluminescence ont débuté par les travaux du physiologiste français Raphael Dubois qui s'est intéressé au cas particulier du coléoptère¹¹. En 1885, il émet l'hypothèse selon laquelle deux composés sont indispensables pour créer la bioluminescence : la luciférine et la luciférase. La luciférine (lucis : lumière, ferre : porteur, ine : un composé organique) est considérée comme étant le substrat responsable de l'émission et la luciférase (lucis-ferre : porteur de lumière, -ase : une enzyme) est l'enzyme de la réaction. La luciférine est composée de deux groupements chimiques, le premier est un groupe benzothiazole et la second est un groupe thiazole.



En 1947, McElroy *et al.* poursuivent les recherches de Dubois avec Harvey et soulignent l'importance de l'oxygène dans la réaction. En étudiant la luciole commune d'Amérique du Nord, *photinus pyralis*¹¹, ils constatent que l'intensité d'émission est proportionnelle à la concentration en Adénosine TriPhosphate (ATP). Puis, McElroy *et al.* décrivent l'influence du pH et de la température sur la réaction de bioluminescence. Finalement, en 1953, ils proposent un premier schéma décrivant le principe de bioluminescence chez la luciole selon un modèle en deux étapes : la réaction entre la luciférine, la luciférase, l'ATP et des ions magnésium suivie d'une oxydation de la luciférine¹¹.

A partir des années 1950, l'étude de la bioluminescence prend de l'ampleur. Green et McElroy mettent en évidence la formation de Pyrophosphate (PPi) et d'Adénosine MonoPhosphate (AMP) pendant la réaction, et identifient le photoproduit : l'oxyluciférine. Ils complètent alors, les deux réactions décrites précédemment et proposent le schéma réactionnel suivant :



Dans les années 1960, Seliger et McElroy étudient l'oxydation ainsi que les propriétés d'émission en variant la nature du solvant, ils identifient notamment la fonction de l'ATP. Selon ces études, l'ATP modifie le pKa de la luciférine permettant ainsi d'augmenter l'acidité du proton C4 du cycle thiazole afin d'empêcher la déprotonation et la formation de carbanions¹². Quelques années après, White et McCapra proposent leur mécanisme de réaction de bioluminescence. Ils s'accordent sur le fait, que l'adénylation, c'est-à-dire la liaison de l'AMP à la luciférine, est suivie d'une déprotonation et entraîne la formation d'un peroxyde par oxydation, créant alors un cycle dioxétane¹³⁻¹⁶. Lorsque ce cycle se rompt, il y a libération de CO₂ qui conduit à la formation de l'oxyluciférine dans son premier état électronique excité qui relaxe en émettant des photons.

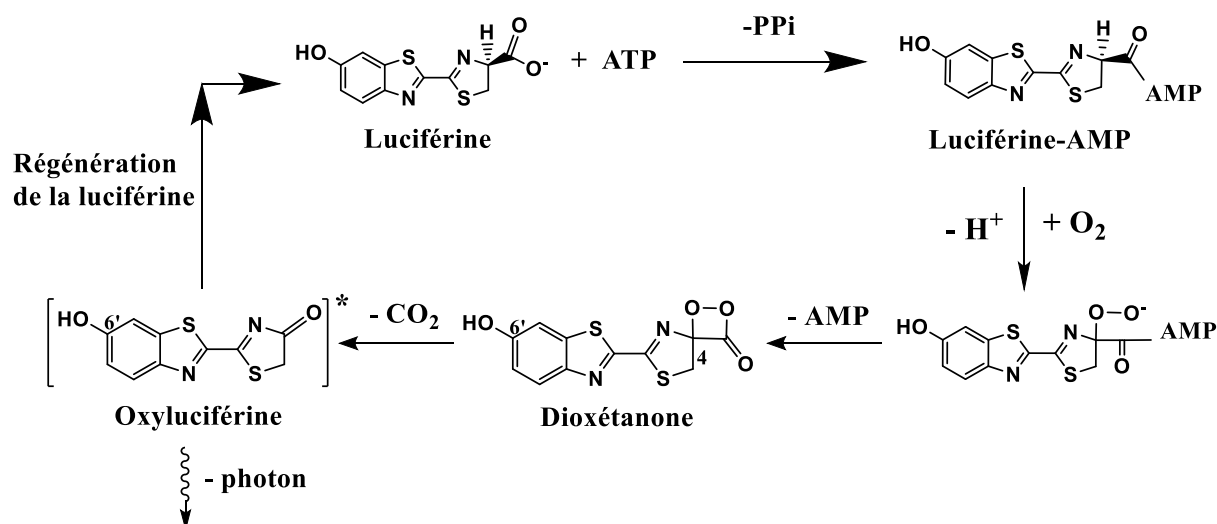


Schéma 1 : Mécanisme de la réaction de bioluminescence de la luciole¹³. Cette réaction a lieu à l'intérieur de la luciférase et fait intervenir la luciférine qui forme un complexe avec l'AMP. Le produit de la réaction est l'oxyluciférine qui est l'espèce émettrice

Lorsque l'oxyluciférine se retrouve dans son état fondamental, un processus de régénération en luciférine se met en place. Ce processus se déroule en deux étapes. La première est une

réaction enzymatique impliquant la Luciferin Regenerating Enzyme (LRE) qui transforme l'oxyluciférine en 2-cyano-6-hydroxybenzothizole, en libérant un acide thioglycolique. La seconde étape est non enzymatique, la molécule créée se lie avec de la cystéine en libérant du NH_3 pour ainsi reformer la luciférine^{17,18}. Encore maintenant, ces deux étapes restent hypothétiques car elles n'ont toujours pas été observées *in vivo*.

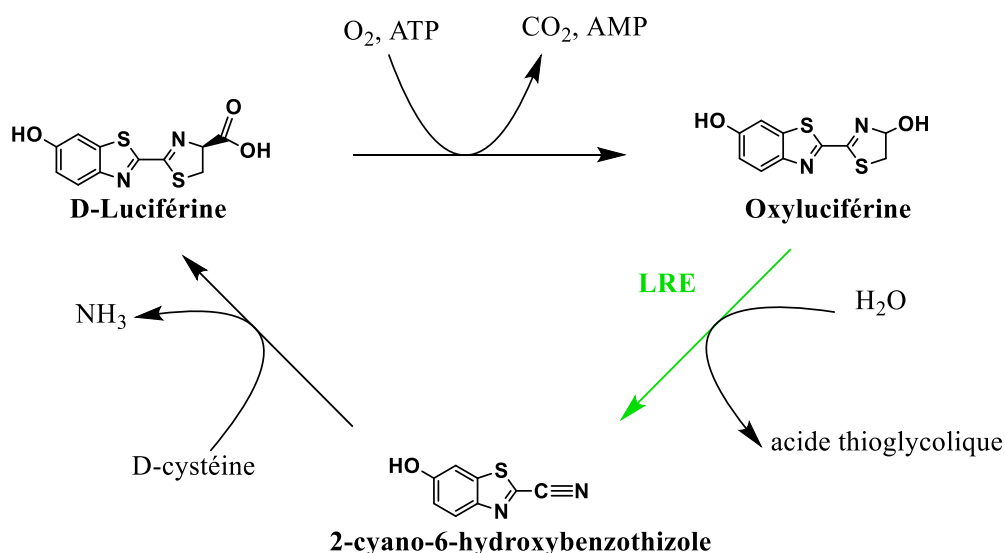


Schéma 2 : Mécanisme supposé de régénération de la luciférine à partir de l'oxyluciférine¹⁷

Les premières expériences de spectroscopie menées sur le complexe bioluminescent (1960), ont été réalisées *in vitro* et ont permis de montrer que l'émission présente un maximum centré à 562 nm pour un pH de 7-8¹¹. En variant différents facteurs, comme la température ou le pH, il est possible de décaler spectralement le maximum d'émission dans une gamme allant de 500 à 610 nm^{1,13}. Une première hypothèse qui explique cette variation provient des modifications de la structure de la luciférase¹⁹. White *et al.* supposent que cette variation résulte de la présence d'analogue de l'oxyluciférine. Ils expliquent que l'émission rouge résulte de la forme kéto de l'oxyluciférine, tandis que l'émission verte est associée à la forme éno²⁰, en supposant que des résidus basiques du site actif de la luciférase favoriseraient cette tautomérisation. Ils définissent alors 6 formes de l'oxyluciférine provenant de la tautomérisation, ainsi que des déprotonations des groupes hydroxyles (Figure 1). Cette hypothèse amène plusieurs groupes de recherche, à créer des analogues de l'oxyluciférine pour stabiliser ces différentes formes. C'est le cas de l'équipe Branchini²¹, qui produit le composé 5,5-diméthylloxyluciferin, en remplaçant les deux atomes d'hydrogène situés sur l'atome de carbone C5 par deux groupements méthyles, permettant ainsi de stabiliser la

forme kéto et donc, d'empêcher la tautomérisation. Ce composé confirme l'hypothèse de White *et al.*: la forme kéto émet dans le rouge²⁰.

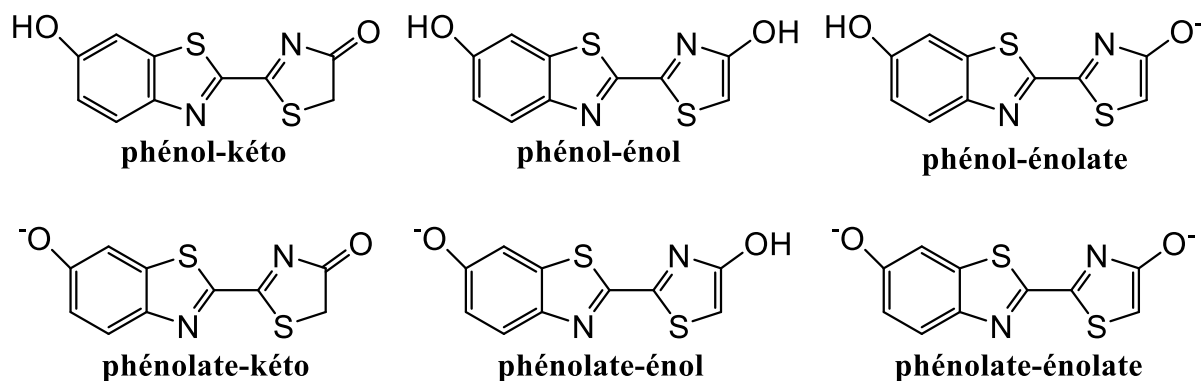


Figure 1 : Six formes chimiques possibles de l'oxyluciférine

En parallèle des recherches portant sur l'étude des spectres d'émission, des expériences ont été menées afin de déterminer le rendement quantique de la réaction de bioluminescence ; la première valeur mesurée en 1960 était de $88 \pm 12 \%$ ¹¹. Pour cela, les auteurs ont utilisé de fortes concentrations de luciférase et d'ATP pour que toute la luciférine soit consommée. Le rendement est alors défini comme le rapport du nombre de photons émis par le nombre de molécules oxydées. Cette valeur traduit l'efficacité de la réaction, et est remarquablement élevée par rapport à d'autres réactions bioluminescentes. Elle fut malgré tout, réévaluée à $41 \pm 7.4 \%$ par Ando *et al.* en 2008 en utilisant une méthode plus précise²², avec la luciférase *Photinus pyralis*. Bien qu'il soit diminué de moitié, le rendement quantique de la réaction de bioluminescence de la luciole reste tout de même élevé.

Grâce à l'efficacité de ce processus, le complexe luciférine/luciférase est devenu très populaire dans de nombreuses applications. En effet, les applications analytiques reposaient jusqu'alors sur l'utilisation de réactions chimiluminescentes dont les rendements étaient généralement inférieurs à 5%-10%²³, elles seront rapidement remplacées par la bioluminescence, qui est beaucoup plus efficace. La bioluminescence est par exemple utilisée comme sonde lumineuse^{21,24-26} pour des tests biologiques²⁷⁻³⁰ ou encore pour l'imagerie in vivo et in vitro³¹⁻³⁹. En effet, l'émission rouge produite par le complexe présente un intérêt pour l'imagerie médicale in vivo, de par sa faible absorption par les tissus. La bioluminescence est

également utilisée dans l'industrie alimentaire afin de détecter d'éventuelles contaminations bactériennes^{40,41}.

En raison de son instabilité chimique en solution^{42,43}, l'oxyluciférine reste, malgré tout, peu étudiée. Bien qu'elle présente un intérêt croissant grâce aux nombreuses applications basées sur la bioluminescence, le mécanisme d'émission du photoproduit est encore mal appréhendé de par la sensibilité de ses propriétés optiques à l'environnement.

I.2 L'oxyluciférine et ses analogues

D'après White *et al.*, l'ouverture du cycle dioxetane produit la molécule oxyluciférine à l'état excité⁴³ sous sa forme kéto et peut rapidement se convertir en son tautomère énol en transférant le proton situé sur l'atome de carbone C5 du cycle thiazole. Après cette tautomérisation, plusieurs réactions de déprotonation peuvent avoir lieu à l'état excité, Schéma 3.

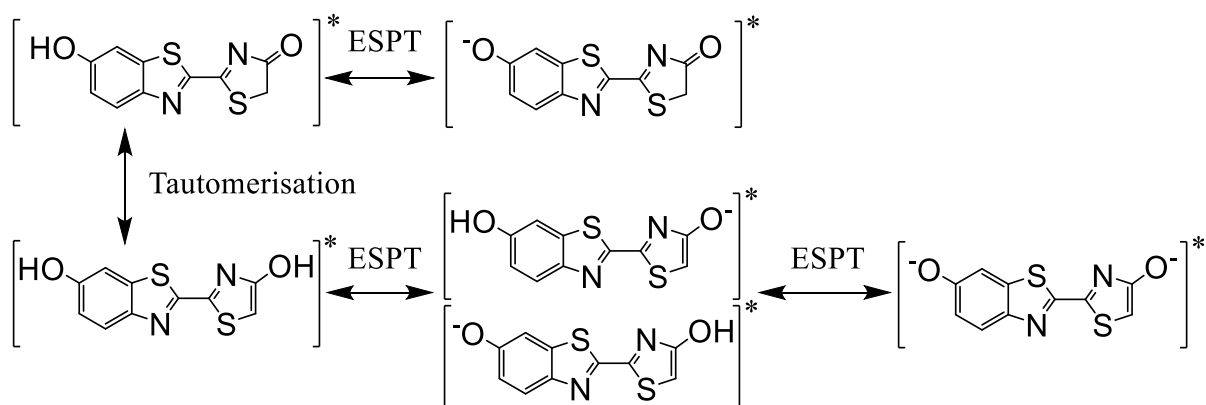


Schéma 3 : Réactions pouvant avoir lieu à l'état excité, après la production de l'oxyluciférine sous la forme kéto, par la réaction enzymatique

Ces différents équilibres à l'état excité, sont des obstacles qui limitent la compréhension du mécanisme d'émission de l'oxyluciférine. Cette complexité a amené les études spectroscopiques à être effectuées sur la luciférine en l'absence de luciférase⁴⁴⁻⁴⁷. C'est seulement à partir des années 2010 que les recherches sur l'oxyluciférine commencent à prendre de l'ampleur. Elle fait ainsi, l'objet de recherches théoriques⁴⁸⁻⁵¹ et expérimentales^{23,52-54}. Pour ce faire, des dérivés sont synthétisés pour sélectionner la forme souhaitée de l'oxyluciférine et en étudier toutes ses caractéristiques. Il existe à ce jour, trois types de structures de dérivés utilisés dans la littérature (Figure 2) permettant d'étudier les caractéristiques d'émission de l'oxyluciférine : les formes qualifiées de « classiques », les

amino-oxyluciférines où la fonction alcool est remplacée par une fonction amine⁵⁵⁻⁵⁷ et les glycine-amino-oxyluciférines où la fonction alcool est remplacée par une fonction amine-glycine⁴⁸. Pour ces trois types de structures, des modifications sont encore possibles (représentées en rouge dans la Figure 2) : des substitutions d'atomes d'hydrogène par des groupements méthyles, ajout de cycles benzènes, thiazoles et benzothiazoles ou encore un remplacement des atomes de soufre ou d'azote par des groupements amines.

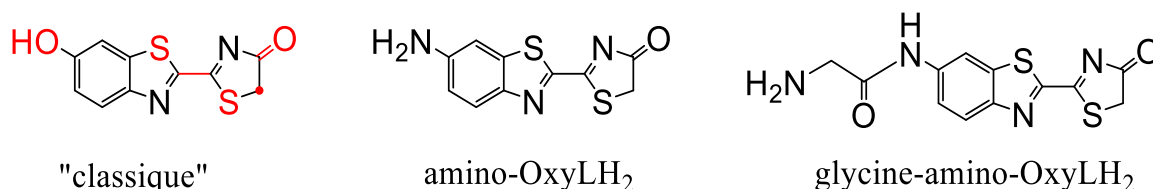


Figure 2 : Trois types de structures analogues à l'oxyluciférine. Les liaisons ou atomes représentés en rouge sur la forme « classique » ont la possibilité d'être substitués par d'autres atomes ou groupements d'atomes.

Ces analogues peuvent aussi être utilisés pour étudier la luciférine, en remplaçant la fonction cétone par une fonction carboxyle (COOH).

Les dérivés possédant des fonctions amines sont principalement utilisés pour des applications nécessitant une émission proche de l'infrarouge⁵⁸⁻⁶⁰, comme par exemple, en imagerie médicale. Min *et al.* s'intéressent eux, aux diodes électroluminescentes organiques⁶¹⁻⁶³. Ils utilisent pour cela des analogues de l'oxyluciférine avec des fonctions amines cycliques qui leur permettent de conserver un rendement quantique élevé d'environ 25%.

La caractérisation du mécanisme d'émission de l'oxyluciférine se fait, pour la plupart des études, avec les dérivés « classiques » (Figure 2). La forme émol est identifiable avec la double liaison C4=C5 du cycle thiazole, tandis que la forme kéto ne possède pas cette double liaison. Ainsi, pour bloquer l'une ou l'autre forme, il est nécessaire de stabiliser soit la double liaison ou la liaison simple. Pour imiter la forme kéto, un premier groupe de chercheurs a choisi de substituer les deux hydrogènes en position C5 par deux groupes méthyles, mais ce dérivé s'avère peu stable en solution^{23,47}. Un deuxième groupe de chercheurs a opté pour le remplacement par un cycle cyclopropyle afin d'empêcher la tautomérisation⁵².

Pour bloquer la forme phénol (groupement hydroxyle sur la partie benzothiazole) et empêcher une déprotonation, le groupe hydroxyle peut être remplacé par un groupement méthoxy. Quant à la forme émol, celle-ci est stabilisée de la même façon que la forme phénol,

en substituant le groupe hydroxyle en position C4 par un groupe méthoxy, empêchant ainsi la déprotonation, aussi bien à l'état fondamental qu'à l'état excité.

I.3 Propriétés de l'oxyluciférine et de ses analogues en solution aqueuse

L'émission de l'oxyluciférine (OxyLH₂) peut varier du vert au rouge¹³ (Schéma 4), des recherches visant à déterminer les facteurs responsables de cette modulation ont donc été menées. Trois facteurs ont été identifiés : la température, le pH du solvant et sa polarité. Que ce soit pour la D-luciférine ou l'OxyLH₂ et leurs analogues, il a été prouvé que pour la grande majorité des molécules, l'augmentation de la température, de l'acidité ou de la polarité du solvant entraîne un décalage spectral vers le rouge^{13,45,52,64}.

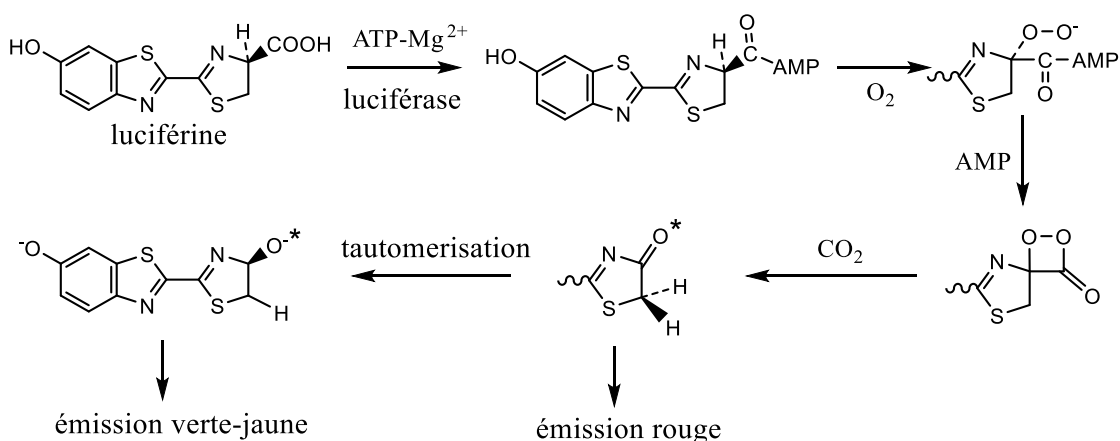


Schéma 4 : Transformation de la luciférine en oxyluciférine par la réaction enzymatique. L'oxyluciférine, sous sa forme kéto, émet dans le rouge, et sous sa forme énol provenant de la tautomérisation, émet une lumière verte¹³

L'espèce identifiée comme ayant la plus basse énergie, est le phénolate-kéto avec une émission en solution aqueuse centrée à 640 nm. L'étude théorique menée par Ran *et al.* démontre que suivant l'analogue utilisé, la position du pic d'émission peut varier de 440 nm à 770 nm⁴⁸. En effet, une amine ou un groupe méthoxy en position C6', ou encore les groupes CH₃, NH₂ ou CH₂F en position C5, entraînent un décalage spectral vers le rouge. Tandis que l'absence d'un groupe OH sur le carbone 6' entraîne un décalage spectral vers le bleu⁶⁵.

Une étude réalisée en 2012, décrit des expériences menées avec des dérivés de l'OxyLH₂ en faisant varier la polarité du solvant. Solntsev *et al.* prouvent que le groupe enol est plus acide que le groupe phénol à l'état excité en déterminant les pKa* des différentes espèces⁴⁷. Ils mettent de plus en évidence, l'existence d'une tautomérisation à l'état excité ainsi que des

réactions de déprotonations qui conduisent à l'émission des formes phénolate-kéto et phénolate-énolate.

Récemment, deux équipes ont mené une étude détaillée, sur les équilibres entre les différentes formes de l'oxyluciférine, à l'état fondamental^{52,66}. Les auteurs ont déterminé pour la première fois, un profil de concentration des formes de l'OxyLH₂ en fonction du pH à l'état fondamental (Figure 3). Pour cela, ils ont réalisé des expériences en solution aqueuse avec six analogues qui miment chacun une forme de l'OxyLH₂. Des spectres d'absorption et d'émission ont été obtenus dans une gamme de pH variant de 5 à 11. Ainsi, pour chaque pH, il est possible de connaître la concentration relative des formes de l'OxyLH₂ présentes à l'état fondamental et le pourcentage de lumière absorbée. De plus, les pKa caractérisant les équilibres entre les formes protonées et déprotonées à l'état fondamental et à l'état excité ont été déterminés. Le pKa* du dérivé mimant la forme phénolate-kéto est estimé à -2.6, ce qui le place dans le groupe de « super-photoacide ». En utilisant la méthode MCR-ALS (multivariate curve resolution-alternating least squares) sur les spectres d'absorption de l'OxyLH₂ et ses dérivés, ils déterminent pour la première fois, les deux pKa de l'OxyLH₂. Le premier à 7,4 qui caractérise la conversion entre la forme phénol-énol et phénol-énolate, et le deuxième à 9,1 entre la forme phénol-énolate et phénolate-énolate.

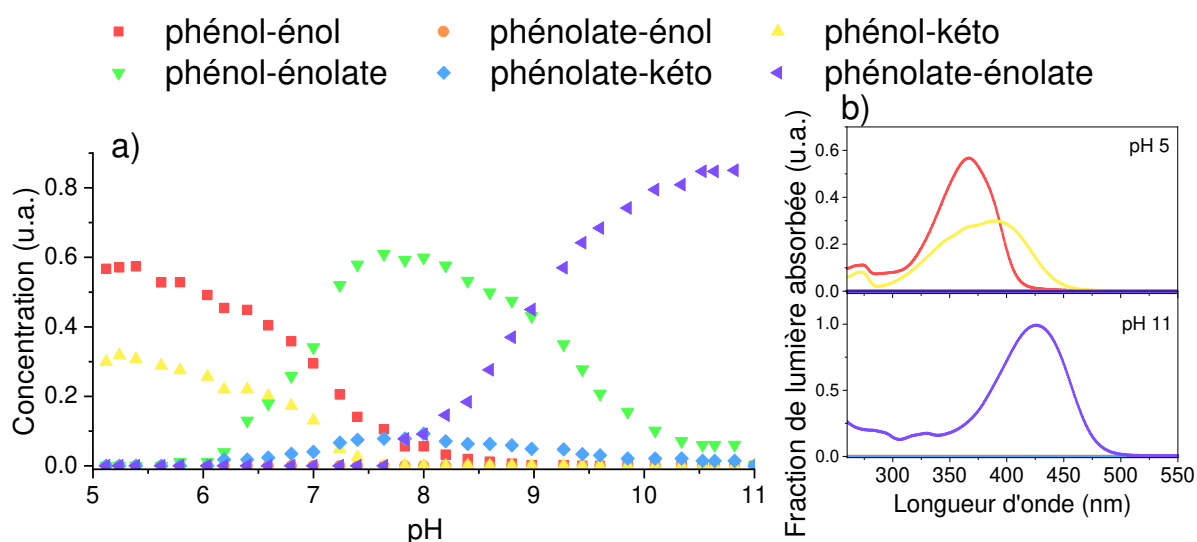


Figure 3 : a) Profil des concentrations des formes de l'oxyluciférine en fonction du pH, b) Spectres d'absorption à pH = 5 et pH = 11.

Ils démontrent, de plus, que la forme phénolate-énol n'est pas présente à l'état fondamental pour l'OxyLH₂ en solution aqueuse, avec l'obtention du profil de concentration des différentes formes de l'OxyLH₂ (Figure 3). Avec des mesures de déclin de fluorescence, Ghose *et al.* montrent, qu'en solution aqueuse à pH acide, deux formes émettent de la lumière : l'espèce phénolate-kéto et phénol-énolate. Comme seules les espèces phénol-kéto et phénol-énol sont présentes à l'état fondamental, les auteurs émettent l'hypothèse d'un transfert de proton à l'état excité qui génèrent les formes déprotonées. Ces travaux ont permis à Ghose *et al.* de déterminer pour la première fois, le cycle de photoluminescence de l'OxyLH₂ en solution aqueuse, Schéma 5. Ils définissent un équilibre à l'état fondamental entre la forme kéto-énol qui n'existerait pas à l'état excité.

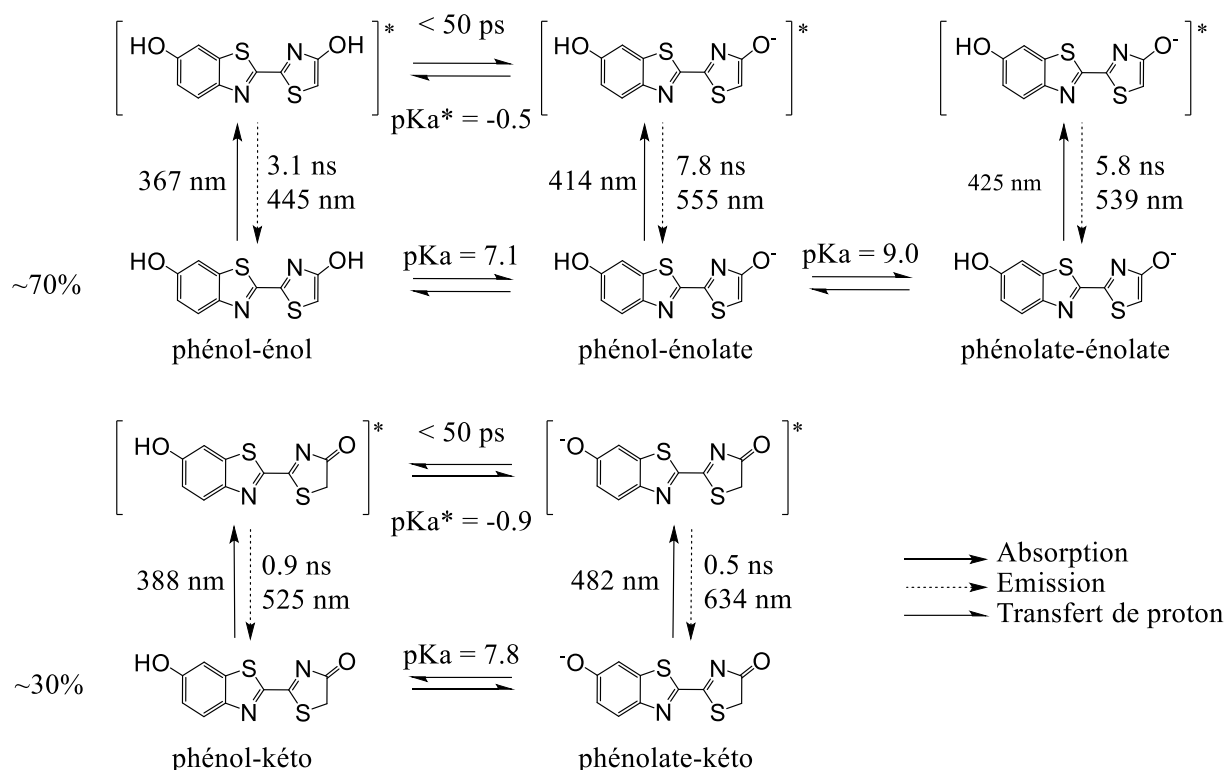


Schéma 5 : Cycle de photoluminescence de l'oxyluciférine en solution aqueuse proposé par Ghose *et al.*⁵²

Ces deux études contredisent les résultats de Solntsev *et al.* qui militaient en faveur d'une émission de la forme phénolate-énolate⁴⁷. Bien que leurs mesures n'aient pas été réalisées avec le même solvant, les auteurs ont tout de même détecté une constante de temps de 7.9 ns qui avait été identifiée pour l'oxyluciférine (7,97 ns) par Ghose *et al.* Cette erreur d'interprétation s'explique par l'utilisation de seulement deux dérivés, qui complique

l'attribution des durées de vie aux différentes formes possibles de l'OxyLH₂. Comme Ghose *et al.* ont utilisé un analogue synthétique par forme naturelle, ils ont pu associer à chaque espèce de l'OxyLH₂ une durée de vie de fluorescence et montrer que la constante de temps de 7,9 ns correspond à la forme phénol-énolate.

Des études théoriques ont également été menées en parallèle. Par exemple, Garcia Iriepa *et al.* ont simulé les spectres d'absorption et d'émission des formes naturelles de l'OxyLH₂ en solution aqueuse en utilisant des simulations MD (molecular dynamics) et la méthode QM/MM (quantum mechanics/molecular mechanics)⁴⁹. En comparant les spectres d'absorption et d'émission théoriques des espèces naturelles avec ceux obtenus expérimentalement avec les analogues, une grande similitude est retrouvée leur permettant de conclure que les différents analogues utilisés miment parfaitement les différentes formes naturelles de l'OxyLH₂. De plus, ils présentent une analyse détaillée, sur la nature électronique des transitions impliquées, non seulement vers le premier état excité ($S_0 \rightarrow S_1$) mais aussi pour les états excités de plus haute énergie (S_2 , S_3). Enfin, ils émettent l'hypothèse d'un transfert de proton ultra rapide à l'état excité bien qu'il ne soit pas résolu temporellement par leurs simulations.

Malgré les maigres résultats expérimentaux, des équipes de théoriciens peuvent tout de même s'appuyer sur les spectres d'émission réalisés pour valider les méthodes de calcul théorique. Bien que la plupart des simulations soient faites en reproduisant le microenvironnement naturel de l'OxyLH₂, certains groupes se sont tout de même intéressés au mécanisme d'émission de l'OxyLH₂ en solution aqueuse. Noguchi *et al.* comparent trois méthodes de simulation pour calculer des spectres d'absorption à l'état stationnaire⁶⁷. Ils concluent que la méthode QM(CAM) permet d'obtenir des spectres très proches de ceux obtenus expérimentalement. Quant à Hiyama *et al.*⁶⁸⁻⁷⁰, ils se basent sur les pKa de l'OxyLH₂ qu'ils calculent théoriquement et s'intéressent au chemin de photoluminescence de l'OxyLH₂ à deux longueurs d'onde d'excitation (350 et 400 nm) et à différents pH. Ils constatent que l'émission de la forme verte diminue avec le pH, et pour des pH inférieurs à 3, la couleur d'émission est décalée vers le rouge. D'après leurs calculs, pour les pH supérieurs à 8, l'espèce émettrice est le phénolate-énolate, résultat qui a été confirmé par Ghose et Rebarz^{52,66}. En revanche, pour une émission à pH inférieur, ils ne mentionnent que les espèces phénolate-énolate et phénol-énolate tandis que les deux groupes précédents observent aussi le

phénolate-kéto. Mais ces résultats sont en désaccords avec ceux, plus anciens, de Chen *et al.* qui excluent la forme énolate du mécanisme d'émission de l'oxyluciférine⁷¹. Cette contradiction peut s'expliquer par la différence de solvant utilisé dans la simulation, Chen *et al.* se sont placés dans le DMSO ou dans le vide, tandis qu'Hiyama *et al.* ont mené leur étude solution aqueuse.

I.4 La luciférase

I.4.1 Généralités

La luciférase est l'enzyme catalysant la réaction de bioluminescence. On dénombre à ce jour huit luciférases de luciole qui présentent toutes une bioluminescence sensible au pH. Les plus étudiées proviennent de la *Photinus pyralis* (luciole d'Amérique du Nord) et de la *Luciola cruciata* (luciole du Japon). La luciférase *Photinus pyralis* a été pour la première fois extraite et purifiée en 1978⁷², c'est une protéine dont le poids moléculaire vaut 62 kDa. C'est celle que nous avons choisie d'étudier par la suite.

En effectuant la réaction de bioluminescence in vitro, un flash de lumière dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de luciférase est observable, lorsque la luciférine et l'ATP sont en excès⁷³. Son pic d'émission, centré à 550 nm, décroît ensuite rapidement. Les deux inhibiteurs de la réaction sont l'OxyLH₂ et le dehydroluciferyl-adenylate (L-AMP – résultant de l'oxydation de la luciférine liée à l'AMP ; LH₂-AMP)^{11,74,75}. En ajoutant le coenzyme A (CoA) à L-AMP, la molécule L-CoA (dehydroluciferyl-coenzyme A) est créée et engendre un effet inhibiteur moins important que celui induit par L-AMP⁷⁴. Il est donc possible de transformer ce flash bref, en un signal lumineux d'une intensité plus faible mais qui perdure dans le temps, en ajoutant le coenzyme A à la solution⁷⁶. Bien qu'il ne participe pas à la réaction de bioluminescence naturelle, le coenzyme A est utilisé dans beaucoup de kit commerciaux pour son effet stimulant sur la production de lumière⁷⁴.

I.4.2 Structure de la luciférase *Photinus pyralis*

La luciférase *Photinus pyralis* (EC 1.13.12.7) est une oxygénase d'un poids moléculaire de 62 kDa. Elle est constituée d'une séquence de 550 acides aminés :

10	20	30	40	50
MEDAKNIKKG	PAPFYPLEDG	TAGEQLHKAM	KRYALVPGTI	AFTDAHIEVN
60	70	80	90	100
ITYAEYFEMS	VRLAEAMKRY	GLNTNHRIVV	CSENSLQFFM	PVLGALFIGV
110	120	130	140	150
AVAPANDIYN	ERELLSMNI	SQPTVVFVSK	KGLQKILNVQ	KKLPPIQKII
160	170	180	190	200
IMDSKTDYQG	FQSMYTFVTS	HLPPGFNEYD	FVPESFDRDK	TIALIMNSSG
210	220	230	240	250
STGSPKGVAL	PHRTACVRF	HARDPIFGNQ	IIPDTAILSV	VPFHHGFGMF
260	270	280	290	300
TTLGYLICGF	RVVLMYRFEE	ELFLRSLQDY	KIQSALLVPT	LFSFFAKSTL
310	320	330	340	350
IDKYDLSNLH	EIASGGAPLS	KEVGEAVAKR	FHLPGIRQGY	GLTETTSAIL
360	370	380	390	400
ITPEGDDKPG	AVGKVVPFFE	AKVVDLDTGK	TLGVNQRGEL	CVRGPMIMSG
410	420	430	440	450
YVNDPEATNA	LIDKDGWLHS	GDIAYWDEDE	HFIVDRLKS	LIKYKGCQVA
460	470	480	490	500
PAELESILLQ	HPNIFDAGVA	GLPGDDAGEL	PAVVVLEHG	KTMTEKEIVD
510	520	530	540	550
YVASQVTTAK	KLRGGVVFVD	EVPKGLTGKL	DARKIREILI	KAKKGGKSKL

La structure déterminée par cristallographie en 1996 par Conti *et al.* à une résolution de 2 Å, montre que cette protéine est composée de deux domaines distincts : le N-terminal et le C-terminal⁷⁷. Le domaine N-terminal contient les acides aminés 4 à 436 et porte le site actif. Il s'agit d'un domaine compact composé de trois sous-domaines, un tonneau constitué de feuillets bêta antiparallèles et deux feuillets bêta qui sont flanqués d'hélices alpha sur un côté. Le domaine C-terminal, contient les résidus 440 à 544 et est composé d'hélices alpha et de feuillets beta séparées du reste de la protéine. Ces deux domaines, reliés par un peptide de liaison flexible, se font faces et laissent une large fente entre eux. Cette fente est normalement, trop large pour y bloquer un substrat, mais pendant la réaction enzymatique, les deux domaines se rejoignent emprisonnant le substrat à l'intérieur d'une poche hydrophobe. Le substrat est alors dans le site actif de la protéine. Ne pouvant plus interagir avec les molécules d'eau, ce sont les acides aminés composant le site actif, qui seront à l'origine d'une quelconque réaction du substrat, comme par exemple, un transfert de proton. Ainsi, la plupart des mutations permettant de changer la couleur d'émission, se réalisent sur les feuillets bêta du sous-domaine B, qui composent le site actif de la luciférase.



Figure 4 : Structure de la luciférase de *Photinus Pyralis*. Les trois sous-domaines de la partie N-terminal sont en violet, vert et bleu, la partie C-terminal est représentée en rouge. Images provenant du Site ncbi (national center for biotechnology information) structure 5KYT.

Les luciférases de coléoptères comportent en général, de 542 à 550 acides aminés^{77,78}. Malgré une grande similitude structurale avec les luciférases de lucioles, les longueurs d'onde d'émission peuvent varier de 538 nm (*Photuris pennsylvaniaca* – luciole) à 623 nm (*Phrixothrix hirtus* – ver chemin de fer).

I.4.3 Site actif de la luciférase *Photinus pyralis*⁷⁷

Les acides aminés constituant le site actif de la luciférase *Photinus pyralis* se trouvent pour la plupart, dans la partie N-terminale. C'est dans le site actif de la protéine, que la réaction de bioluminescence a lieu. Deux groupes d'acides aminés qui interagissent entre eux et modifient la structure de la protéine permettent la réaction enzymatique (Figure 5). Le premier groupe d'acides aminés comprend la sérine 198 qui en se liant à la glutamine 344 entraîne la rotation de la tyrosine 401 l'exposant au solvant et permettant la liaison de la molécule d'ATP. Le deuxième groupe d'acides aminés composants le site actif fait intervenir l'acide aspartique 422 (exposé au solvant) qui interagit avec la tyrosine 340, entraînant la rotation de la sérine 420 interagissant avec la glycine 421. Lors de la réaction enzymatique, ces acides aminés forment une cage hydrophobe, bloquant ainsi l'entrée des molécules d'eau et permettant la formation de l'oxyluciférine à l'état excité.

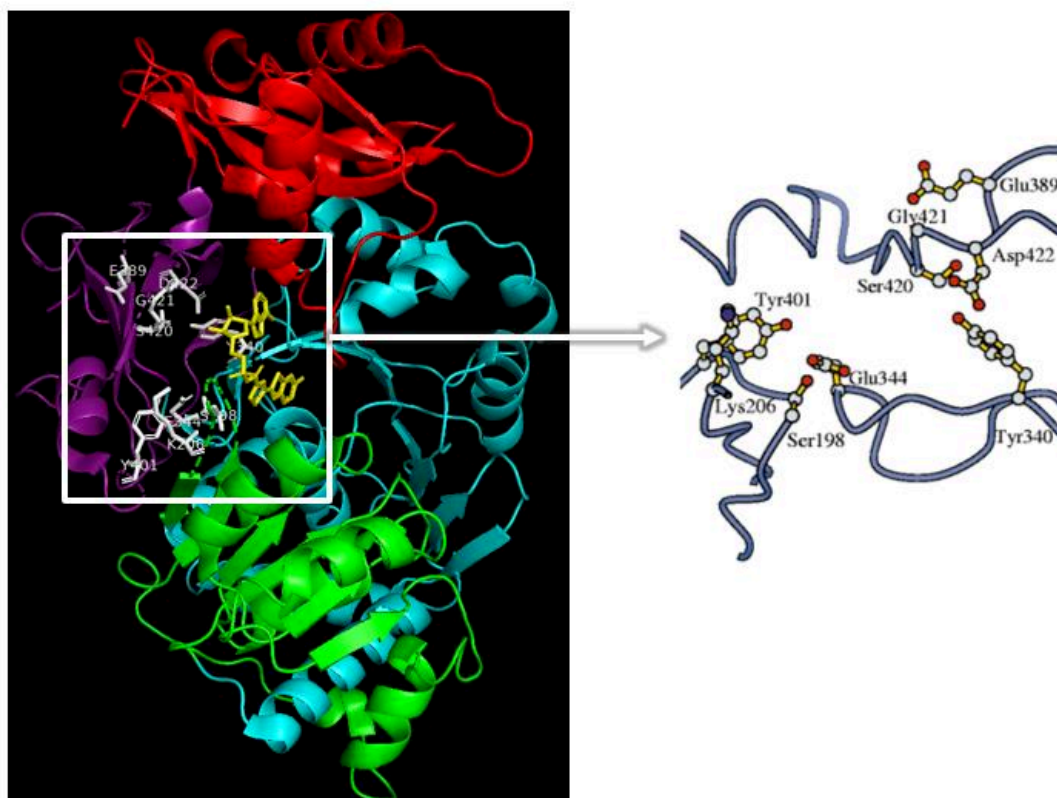


Figure 5 : Représentation du site actif de la luciférase, d'après Conti et al.⁷⁷

I.5 Complexe enzymatique – variation de la couleur de la bioluminescence

Nous avons vu dans la partie 3 de ce chapitre, que l'émission à pH neutre, en solution aqueuse provient principalement de la forme phénol-énolate. Mais, lorsque l'oxyluciférine est liée à l'enzyme, la forme chimique émettrice peut varier. Deux hypothèses défendues dans la littérature se font faces ; une première qui affirme que l'émission ne provient que d'une seule forme, qui serait le phénolate-kéto⁷⁹ et une seconde qui implique plusieurs espèces pour expliquer le mécanisme d'émission⁸⁰. C'est le cas pour White et al.⁴³ qui proposent un équilibre kéto-énol, ou encore Ran et al.⁴⁸ qui proposent un modèle selon lequel toutes les formes chimiques peuvent intervenir et que leurs contributions relatives sont modulées par la luciférase. Mais pour ces deux groupes, ce sont les mêmes facteurs qui peuvent influencer la longueur d'onde de la bioluminescence : le pH, la polarité de l'environnement ou encore les interactions entre l'émetteur et son environnement (molécules d'eau, résidus du site actif ou AMP)^{81,82}.

I.5.1 Dépendance au pH

Le premier facteur qui influence l'émission à l'état stationnaire est le pH. En effet, celui-ci impacte le mécanisme d'émission en jouant un rôle sur les transferts de proton à l'état fondamental ou à l'état excité. A pH basique (> 9), en solution aqueuse, l'oxyluciférine est déprotonée et l'émission détectée est celle du dianion (phénolate-énolate) alors qu'à pH acide (< 6), les deux tautomères déprotonés, phénolate-kéto et phénol-énolate contribuent à l'émission. La caractérisation du mécanisme d'émission du complexe bioluminescent repose généralement sur l'utilisation des luciférases *Photinus pyralis* ou *Luciola cruciata*. Ces deux protéines présentent une sensibilité au pH. En effet, la bioluminescence à pH > 9 présente un maximum centré à 557 nm, alors qu'à pH < 6 , celui-ci est décalé à 612 nm. Cette variation de la longueur d'onde d'émission peut s'expliquer par une flexibilité structurale du site actif. En complexe avec l'enzyme, le produit n'étant pas en contact avec les molécules du solvant, ce sont les charges des acides aminés¹ qui stabilisent l'une ou l'autre forme de l'oxyluciférine : protonée/déprotonée et kéto/énol. Viviani *et al.* suggèrent l'existence d'un pont salin entre l'acide aminé Glu311 et Arg337 et entre His310 et Glu354 de *photinus pyralis* qui permet de maintenir la conformation fermée du site actif⁸³ (Figure 6). Les auteurs indiquent que Glu311 joue un rôle clé dans la couleur de bioluminescence. En effet, des mutations de cet acide aminé éliminant la charge négative, entraînent un décalage spectral vers le rouge et une perte de sensibilité au pH. Cela indique que la charge négative portée par Glu311 est essentielle pour générer une bioluminescence autour de 560 nm ainsi que pour la dépendance au pH, car elle permet de contrebalancer la charge positive de l'Arg337. Lorsque le pH du solvant diminue, les charges positives augmentent la polarité de la poche protéique et crée une coque d'hydratation autour d'Arg337. Ne pouvant plus former le pont salin avec Glu311, la protéine s'ouvre pour laisser entrer des molécules d'eau qui déprotonnent la forme phénol-kéto et génèrent une émission dans le rouge. Cette hypothèse est corroborée par Carrasco-Lopez *et al.* qui met en évidence l'importance des interactions avec le résidu Arg337 produisant une émission de couleur verte⁸⁴.

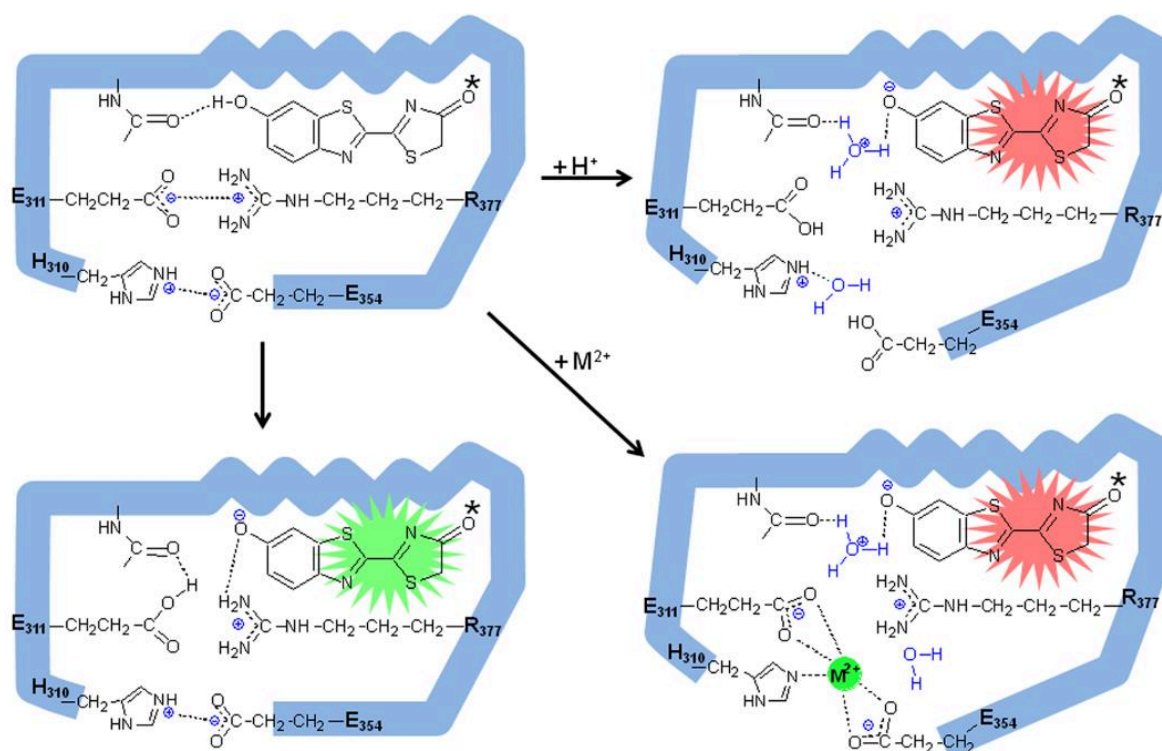


Figure 6 : Mécanisme de la modulation de la couleur de bioluminescence proposé par Viviani *et al.* impliquant l'ouverture du site actif de la luciférase à pH acide⁸³. La conformation ouverte de la protéine entraîne une lumière rouge tandis que la conformation fermée entraîne une émission dans le vert

1.5.2 Impact de la polarité sur l'émission

Nous avons vu en solution aqueuse, que la polarité du solvant pouvait modifier les propriétés d'émission de l'oxyluciférine. En effet, dans un solvant polaire, le spectre est décalé vers le rouge. A l'inverse, dans un solvant non polaire, un décalage vers le bleu est observé⁸⁵. Dans le complexe protéique, c'est la polarisation du site actif de l'enzyme et l'interaction de l'émetteur avec les résidus de la protéine qui permet de moduler la longueur d'onde d'émission du photoproduit⁸⁶⁻⁹¹. En effet, les conclusions de travaux expérimentaux ou théoriques, tendent à montrer que l'émission provient uniquement de la forme phénolate-kéto et que la modulation de la longueur d'onde d'émission serait une conséquence des modifications de son microenvironnement. D'après G. Orlova *et al.* qui utilisent la méthode TDDFT⁹² (Time-dependent Density Functional Theory), la modulation ne provient pas de la rigidité du site actif mais dépend de la polarisation de l'oxyluciférine dans le microenvironnement du complexe enzymatique. En effet, les interactions des résidus du site actif de la luciférase avec les groupes hydroxyles de l'OxylH₂, peuvent provoquer un décalage

spectral de l'émission. Hirano *et al.* confirment cette hypothèse par leurs travaux expérimentaux en utilisant un dérivé de la forme kéto⁶⁴. Ils montrent que l'émission du dérivé varie entre 541 et 640 nm en fonction de la polarité du solvant et couvre donc tout l'intervalle d'émission associé à la bioluminescence. Ils concluent que les propriétés d'émission de la luciole dépendent de la forme phénolate-kéto et que sa longueur d'onde d'émission est modulée par la polarité du site actif de la luciférase ainsi que le degré d'interaction entre la forme phénolate-kéto et un résidu basique protoné (Ser316) du site actif. Ils confortent leur interprétation grâce à une nouvelle étude réalisée en 2014⁹³ dans laquelle ils caractérisent l'émission de dérivés de la forme kéto de l'OxyLH₂ dans plusieurs luciférases et constatent qu'à nouveau, l'émission peut se décaler sur l'ensemble de la gamme d'émission associée à la bioluminescence chez la luciole. Le décalage dépend alors de la polarité du site actif. Ils mettent de plus en évidence, l'existence des conformations ouverte ou fermée de la protéine. L'émission rouge provient d'un environnement polaire où la luciférase est dans sa forme ouverte et, à l'inverse, l'émission verte se produit dans un environnement apolaire, lorsque la luciférase est dans sa position fermée. Ils expliquent que la présence de résidus acides ou basiques est essentielle pour lier la luciférine au site actif mais aussi pour établir des ponts salins, par exemple entre R337 (résidu basique) et E309 (résidu acide), permettant la formation fermée de la luciférase (Figure 7).

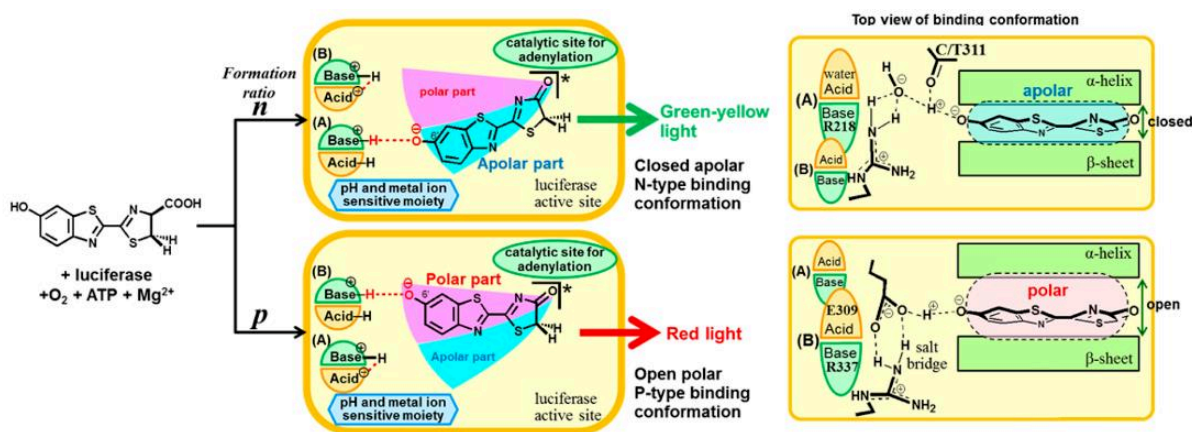


Figure 7 : Schéma de l'environnement du site actif. La conformation de la luciférase change la polarité de l'environnement et modifie la couleur d'émission de la bioluminescence. Proposé par Viviani *et al.*⁹³

Naumov *et al.*^{23,94}, quant à eux, observent un triple équilibre dans leurs études cristallographiques et concluent en indiquant que la forme kéto n'est peut-être pas la seule forme responsable de l'émission. De plus, ils affirment que l'émetteur a une plus grande

liberté de mouvement à l'intérieur de la poche protéique, comparativement à d'autres protéines comme la GFP (green fluorescent protein), ce qui implique de devoir prendre en compte les aspects dynamiques de l'interaction OxyLH₂/enzyme pour comprendre le mécanisme d'émission. Ces études expérimentales sont soutenues par des études théoriques qui utilisent la méthode QM/MM⁷⁹. Elles soutiennent l'hypothèse selon laquelle la couleur de bioluminescence dépend de la polarisation de l'environnement autour de l'OxyLH₂ et mettent en avant l'importance des liaisons hydrogènes formées entre les molécules d'eau, la partie benzothiazole de la forme phénolate-kéto, et les résidus impliqués dans la formation de la poche protéique. En simulant les interactions entre la forme phénolate-kéto et les résidus du site actif, elles démontrent que les deux configurations de la protéine, ouverte ou fermée, peuvent influencer drastiquement la différence d'énergie S_1-S_0 de la forme phénolate-kéto. Les molécules du solvant sont également susceptibles d'influencer cette différence d'énergie permettant ainsi de simuler l'ensemble du spectre d'émission de bioluminescence de la luciole.

I.5.3 Géométrie rotationnelle de l'oxyluciférine dans son environnement

Un dernier facteur pouvant expliquer l'origine de la modulation de la longueur d'onde de la bioluminescence est relié à la rotation de la partie thiazole de l'oxyluciférine par rapport au site actif de la luciférase. En effet, McCapra *et al.* proposent que la variation de couleur provient de conformations différentes de l'OxyLH₂ associées à différents angles entre les groupes benzothiazole et thiazole¹¹. Un angle de 90° correspond à un minimum d'énergie qui produit une émission rouge alors qu'une géométrie plane (angle de 0°) est associée à une émission verte. En présence de la protéine, l'angle que font les deux groupes est déterminé par la structure du site actif. Orlova⁹² *et al.* s'intéressent alors au mécanisme réactionnel qui conduit à la formation de la forme phénolate-kéto et discutent de la rotation de la liaison C2-C2' qui relie le groupe thiazole au benzothiazole dans l'état excité S_1 . Finalement l'hypothèse émise par McCapra *et al.* sera rapidement écartée car en simulant la surface d'énergie potentielle de l'état S_1 avec la méthode DFT (Density Functional Theory), ils concluent que les structures torsadées ne sont pas énergétiquement stables. En effet, la méthode utilisée considère d'autres paramètres que ceux des modèles semi-empirique (AM1) utilisés par McCapra *et al.* rendant la rotation interne plus difficile que celle prédite par les autres

modèles. Ils fournissent des preuves indiquant que les formes planes de l'OxyLH₂ correspondent à des minimums d'énergie tandis que la forme kéto torsadée n'en est pas un.

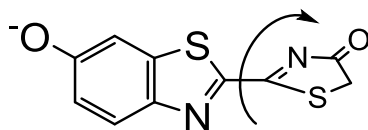


Schéma 6 : Schéma de l'oxyluciférine sous sa forme phénolate-kéto, avec la partie thiazole faisant un angle non nul, avec la partie benzothiazole

Liu⁹⁵ *et al.* ainsi que Nakatani⁹⁶ *et al.* confirment cette observation. Les énergies potentielles des structures torsadées sont plus élevées (12,6 kcal/mol) que celles des structures planes (moins de 4 kcal/mol) au premier état excité. Les structures torsadées sont donc beaucoup moins stables que les planes. Leurs résultats prouvent, de plus, que même si l'OxyLH₂ est excitée sous une forme torsadée, elle se relaxerait vers une structure plane en raison de la faible barrière énergétique séparant ces deux conformations. De plus, les structures planes sont suffisantes pour expliquer la variation de la longueur d'onde de la bioluminescence chez la luciole ce qui confirme qu'une torsion n'est pas nécessairement requise pour expliquer cette modulation.

I.5.4 Rôle de l'AMP

En 2007, Nakatani *et al.*⁹⁶ mettent en évidence l'importance de l'AMP dans le mécanisme de modification de la longueur d'onde associée à la bioluminescence. L'AMP, de concert avec d'autres résidus protéiques (Arg218 et His245), modulent les propriétés électrostatiques de l'environnement à l'intérieur de la luciférase. En effet, lorsque l'OxyLH₂ est créée dans son premier état excité, sa distribution de charges est modifiée et va donc modifier l'interaction de l'OxyLH₂ avec son environnement proche. L'atome O6' du groupe thiazole devient plus négatif tandis que celui du groupe benzothiazole l'est moins (O4), car O4 est très proche du résidu His245 qui comporte une charge positive et de l'AMP qui comporte deux charges négatives. L'atome O6' est lui, lié au résidu Arg218 qui est chargé positivement. En calculant l'énergie d'interaction des différents résidus de la luciférase et de l'AMP, Nakatani *et al.* mettent en évidence trois contributions électrostatiques majeures : deux positives avec Arg218 et l'AMP entraînant un décalage vers le bleu, et une négative due à l'His245 entraînant un décalage vers le rouge (Figure 8). La somme des trois, conduit à une contribution positive.

Ainsi les interactions entre l'OxyLH₂, l'AMP et les résidus contribuent à un décalage spectral vers le bleu.

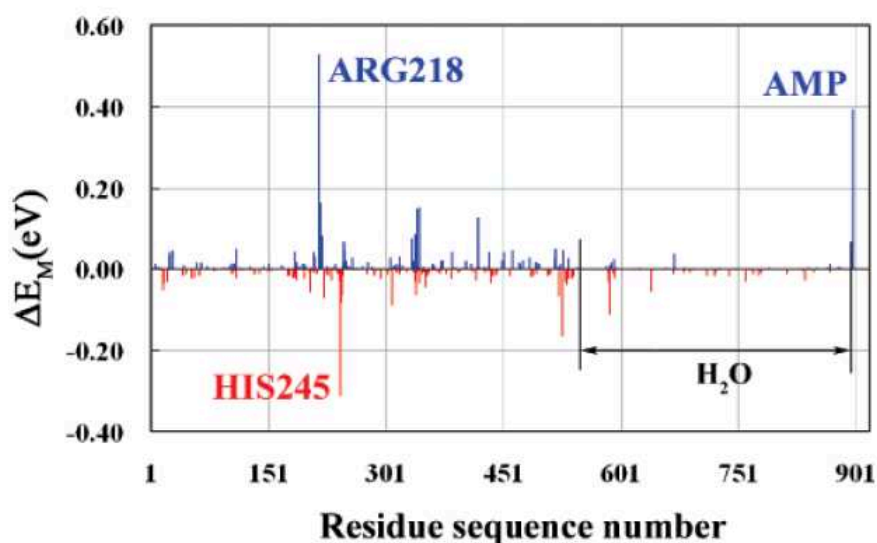


Figure 8 : décomposition de l'énergie électrostatique en fonction des contributions des résidus de la protéine et de l'AMP. Les contributions positives ou négatives entraînent un décalage spectral de l'émission vers le bleu ou le rouge respectivement.

A la suite de ces travaux, beaucoup d'études théoriques se sont succédées. Min *et al.* ont travaillé sur la luciférase *luciola cruciata* en phases aqueuse et gazeuse⁹⁷. Ils constatent que l'AMP peut être impliqué dans l'énolisation de la forme phénolate-kéto. En effet, lorsqu'une molécule d'eau est incluse dans le modèle, la forme phénolate-kéto peut se transformer en phénol-énolate grâce à la migration conjointe d'atomes d'hydrogène de la position C5 vers l'AMP et de l'Arg220 vers l'atome d'oxygène du cycle benzothiazole (Schéma 7).

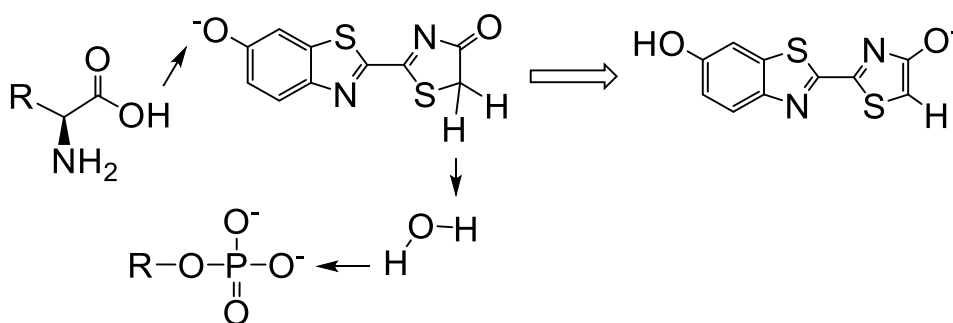


Schéma 7 : transferts de proton de la forme phénolate-kéto conduisant à la forme phénol-énolate faisant intervenir l'AMP et l'Arg220

Ces observations ont amené d'autres chercheurs à s'intéresser à l'état de protonation de l'AMP qui possède un pKa de 6,2⁹⁸. Comme la longueur d'onde d'émission associée à la

bioluminescence se décale pour une valeur de pH proche de 6,5, l'AMP serait un bon candidat pour expliquer cette modification. A pH basique ($> 6,2$), l'AMP est déprotonée et porte deux charges négatives, tandis qu'à pH acide ($< 6,2$), l'AMP est protonée et ne porte plus qu'une seule charge négative. Milne⁹⁸ *et al.* s'intéressent aux énergies d'interaction entre les différentes formes de l'OxyLH₂ et de l'AMP aux pH inférieurs ou supérieurs à 6,5. Lorsque l'AMP est déprotonée, l'énergie d'interaction devient très élevée pour les espèces anioniques de l'OxyLH₂, en revanche pour les deux formes phénol-kéto et phénol-énol, les énergies d'interaction deviennent négatives, ces formes sont donc plus stables. En particulier pour l'espèce énol pour laquelle une liaison d'hydrogène entre la molécule et l'AMP se forme. La protonation de l'AMP réduit l'énergie d'interaction mais reste cependant défavorable pour la plupart des dérivés. Mais les auteurs précisent que l'AMP peut également donner lieu à une influence plus complexe, sur le mécanisme d'émission, qu'un simple effet électrostatique. De plus, l'AMP peut jouer le rôle d'accepteur de protons contribuant ainsi à une baisse du pH effectif au sein de la cavité. La protonation de l'AMP produit également un changement de polarisation dans la cage protéique. La combinaison de ces deux phénomènes expliquerait la dépendance au pH de la longueur d'onde d'émission. En accord avec ces résultats, Pinto da Silva *et al.*⁹⁹ confirment qu'un décalage vers le rouge proviendrait d'une diminution d'interactions intermoléculaires entre l'espèce phénolate-kéto à l'état excité et l'AMP ainsi qu'un renforcement de l'interaction de l'émetteur avec une molécule d'eau. Ils montrent que la modulation des interactions intermoléculaires entre les résidus de la luciférase et l'espèce phénolate-kéto est à l'origine de la variation de la longueur d'onde d'émission associée à la bioluminescence⁵¹. Cette modulation provoque également des changements de conformation du site actif, empêchant l'entrée du solvant dans le site actif ainsi que des changements de l'état de protonation de l'AMP et de certains résidus. Sakai¹⁰⁰ *et al.* s'intéressent, quant à eux, à l'absorption de l'OxyLH₂ en complexe avec la protéine. Ils utilisent une simulation pour calculer les maximums d'absorption de l'OxyLH₂ en tenant compte des résidus de la luciférase, de l'AMP ou encore de la présence des molécules d'eau. En se focalisant sur l'état de protonation de l'AMP : 0, -1 ou -2. Ils démontrent que les pics d'absorption se décalent vers des longueurs d'onde plus grandes quand la charge de l'AMP diminue. Puis Garcia-Iriepa *et al.* étudient l'influence de l'état de protonation de l'AMP et de la conformation protéique (cage ouverte et fermée) sur l'émission de la forme phénolate-kéto et phénolate-énol¹⁰¹. En plus d'observer un décalage spectral vers le bleu lorsque la protéine est « fermée », ils démontrent

que ce décalage est d'autant plus important lorsque l'AMP est déprotonée (AMP^{2-}) que lorsque l'AMP n'a qu'une charge négative (AMP^-).

Les résultats montrent que le pH modifie l'état de protonation de l'AMP et donc le maximum d'émission. Un pH élevé (> 9) entraîne la déprotonation de l'AMP et un décalage spectral de l'émission vers le bleu mais n'a pas d'influence sur la conformation de la protéine ou la nature chimique de l'OxyLH₂ lorsque celle-ci est dans une conformation fermée. La différence des maximums d'émission est expliquée par la formation de liaisons d'hydrogène entre l'OxyLH₂ et l'environnement (protéine, AMP et molécules d'eau).

Enfin Manuel de Almeida¹⁰² *et al.* confrontent leurs résultats théoriques et expérimentaux pour déterminer l'influence du pH sur l'OxyLH₂ et des analogues en présence d'AMP en solution aqueuse (sans protéine). Leur modèle de calcul (CpHMD : Constant pH Molecular Dynamics et QM/MM) est capable de reproduire la dépendance au pH des spectres d'absorption et permet aux auteurs de démontrer qu'en variant le pH de 5 à 11, aucun changement significatif n'est observé sur les spectres d'absorption de l'OxyLH₂ et des dérivés. L'état de protonation de l'AMP n'impacterait donc pas l'absorption de l'OxyLH₂ en solution aqueuse.

I.6 Le transfert de proton à l'état excité (ESPT)

Comme nous l'avons vu dans la partie I.3, il existe des équilibres entre les formes protonées et déprotonées de l'OxyLH₂ à l'état fondamental en solution aqueuse, ainsi qu'un équilibre kéto-énol pour les pH acides (< 6). Ces transferts de proton, qui peuvent aussi exister à l'état excité, font l'objet d'études théoriques et expérimentales afin d'en déterminer les constantes cinétiques et d'étudier l'influence de l'environnement. Naumov⁵⁴ *et al.* ont réalisé des expériences de fluorescence résolue en temps afin de déterminer le temps caractéristique associé à l'ESPT. Bien qu'ayant une résolution temporelle limitée à 50 ps, les auteurs ont néanmoins pu mesurer, dans différents solvants, la constante cinétique associée à l'ESPT ($k_{ESPT} = 1.1 \text{ ns}^{-1}$ dans le toluène/DBU). Kuchlyan *et al.* ont également étudié la dynamique de l'ESPT dans le cas de la D-luciférine dans des mélanges de proportions variables eau/DMSO.¹⁰³ Ils observent plusieurs pics d'émission et les attribuent aux formes protonée et déprotonée de la D-luciférine. Ils constatent que l'ESPT est moins efficace quand la proportion de DMSO augmente car l'intensité du pic associé à l'espèce protonée augmente quand la

proportion de DMSO augmente. En 1999, la dynamique d'émission de la luciférine a été étudiée à l'aide de la méthode d'absorption transitoire avec une résolution temporelle de l'ordre de 1 ps. Les résultats obtenus ont permis de montrer que deux formes de la luciférine existent à l'état excité et deux constantes de temps sont identifiées, 40 ps et 480 ps¹⁰⁴. Les auteurs émettent alors l'hypothèse que les deux formes proviennent de la dissociation du produit au cours de la réaction de bioluminescence, mais n'émettent aucune hypothèse quant à la nature des formes présentes. A ce jour, le groupe de recherche de D. Huppert¹⁰⁵⁻¹⁰⁹ est le seul à avoir déterminé expérimentalement le temps caractéristique associé au transfert de proton de la D-luciférine et de la déhydroluciférine par la méthode *d'up conversion* (génération de somme des fréquences), avec une résolution temporelle de 100 fs. Un travail approfondi a été réalisé avec ces deux molécules afin de déterminer la dépendance de l'ESPT par rapport au pH et à la nature du solvant (polaire protique ou aprotique). En solution aqueuse, la constante cinétique de l'ESPT est de $k_{ESPT} = 3.3 * 10^{10} s^{-1}$ pour la D-luciférine¹⁰⁵ et $k_{ESPT} = 1.1 * 10^{10} s^{-1}$ pour la déhydroluciférine¹¹⁰. L'observation d'un déclin de fluorescence non-exponentiel conduit les auteurs à postuler l'existence d'une recombinaison à l'état excité de la forme protonée (*geminate recombination*). De plus, ils remarquent qu'en variant la proportion de méthanol dans le solvant aqueux¹⁰⁶, la constante k_{ESPT} diminue (dans le méthanol pur : $k_{ESPT} \leq 2 * 10^8 s^{-1}$) mais l'ESPT reste tout de même efficace classant la D-luciférine dans le groupe des super-photoacides. De plus, ils trouvent un pK_a^* proche de 0 en utilisant le formalisme du cycle de Förster. La D-luciférine est donc un photoacide fort, mais pas un super-photoacide car son pK_a^* n'est pas inférieur à -1. En poursuivant leur étude sur l'ESPT, les auteurs évaluent la dépendance au pH et à la température¹⁰⁷. Deux bandes d'émission sont observées, une émission à 440 nm provenant de la forme protonée RNOH* et une émission à 530 nm provenant de la forme déprotonée NRO-*. A pH neutre, ils constatent, en augmentant l'acidité de la solution, l'apparition d'une nouvelle bande d'émission décalée spectralement vers le rouge qui est attribuée à l'espèce zwitterionique +HNRO-. Ces deux bandes d'émission diminuent plus fortement dans la glace qu'en phase liquide à cause de la mobilité du proton qui est quatre fois plus faible que dans l'eau.

Le groupe de D. Huppert complète son étude avec l'OxyLH₂⁵³ et affirme que le produit de la réaction enzymatique est, comme le substrat, un photoacide. En effet son pK_a , à l'état fondamental qu'ils estiment être égal à 7, diminue à l'état excité à 0,5. La photoacidité des

molécules provient du groupe hydroxyle situé en position C6. Ils définissent un taux d'ESPT de $k_{ESPT} = 2.1 * 10^{10} s^{-1}$, légèrement plus faible que pour la D-luciférine. Le déclin de fluorescence de NRO-* a une composante courte de 100 ps et une longue de 3,8 ns pour la D-luciférine. Dans le cas de l'OxylH₂, la composante longue vaut 5,2 ns et le déclin de fluorescence devient mono-exponentiel à pH > 11. Grâce à ces mesures, les auteurs proposent un cycle photoprotolytique de la D-luciférine et de l'OxylH₂ (Schéma 8).

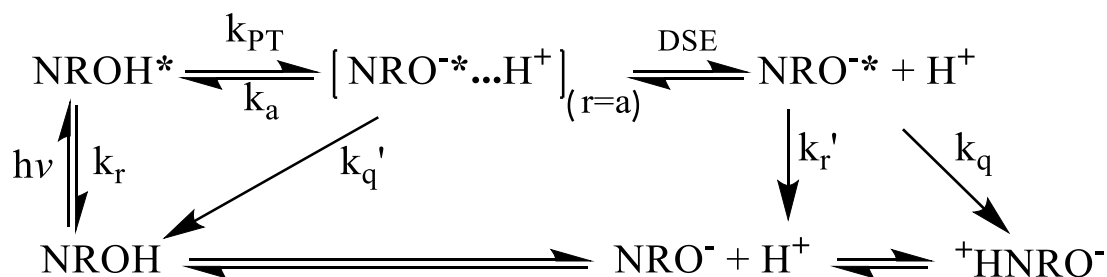


Schéma 8 : Cycle photoprotolytique de la D-luciférine et de l'oxyluciférine proposé par Erez et al.⁵³

Ce transfert de proton à l'état excité a également été largement étudié d'un point de vue théorique en solution aqueuse ainsi que dans le contexte protéique. Chung¹¹¹ et al. utilisent le modèle de simulation QM/MM pour étudier le transfert de proton intramoléculaire et intermoléculaire. Ils considèrent deux réactions possibles dans la luciférase, un ESPT provenant d'un ion hydronium allant sur l'oxygène de la partie benzothiazole et un autre, du carbone C5 de la partie thiazole à une molécule d'eau qui transfère à son tour un proton à l'AMP, Schéma 9. Ce dernier entraîne la conversion de la forme kéto vers la forme énol.

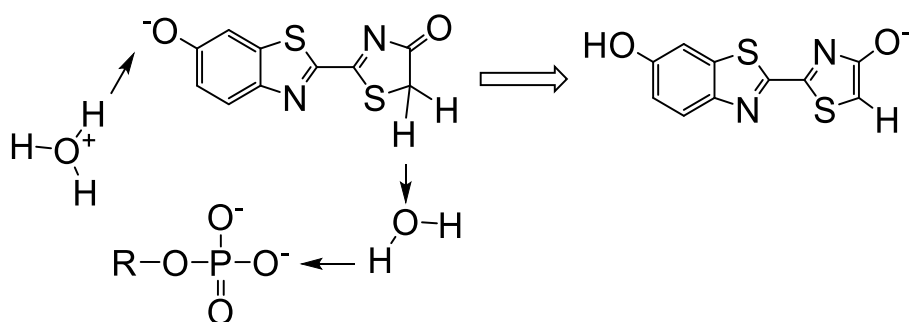


Schéma 9 : transferts de proton de la forme phénolate-kéto conduisant à la forme phénol-énolate faisant intervenir l'AMP et un ion hydronium

Pour ces deux réactions, les énergies libres ainsi que les barrières de potentiel sont calculées. Les résultats de leur simulation montrent que la forme phénolate-kéto est plus stable que les

formes phénol-kéto, phénol-énol et phénolate-énol. Ils démontrent aussi que le profil d'énergie libre des transformations dépend largement des états de protonation du groupe phénol de l'OxyLH₂. Ainsi la tautomérisation kéto-énol serait facilitée lorsque le groupe phénol de la partie benzothiazole est protoné car la barrière d'énergie vaut 25 kcal/mol contre 37 kcal/mol lorsqu'il est déprotoné. Néanmoins, cette réaction reste peu probable car la forme kéto possède une stabilité plus élevée. Mais Chung *et al.* rappellent que l'hypothèse de la forme énolate n'est pas à exclure car l'environnement qui l'entoure peut modifier les énergies libres. En effet, la protéine peut abaisser ces énergies rendant possible la réaction. Esteves da Silva *et al.* soutiennent cette hypothèse et proposent un scénario dans lequel l'OxyLH₂ peut directement être reliée à l'AMP sans molécule d'eau intermédiaire¹¹² et où l'émission proviendrait de la forme énolate bien que ce soit la forme phénol-kéto qui est excitée. Dans ce contexte, la barrière d'énergie de la conversion est de 6,3 kcal/mol. Malgré tout, ils concluent que la forme kéto reste l'émetteur le plus probable de la bioluminescence, mais l'étude révèle l'importance des différents facteurs à prendre en compte, comme le nombre de molécules d'eau autour du groupe phénol.

I.7 Le véritable émetteur au sein du complexe

Un grand débat concernant l'émetteur de bioluminescence a débuté il y a plusieurs dizaines d'années¹¹³⁻¹¹⁵. Avant 2010, les études théoriques faites à ce sujet, proposent un modèle dans lequel l'émission ne provient que de la forme phénolate-kéto en bon accord avec les résultats expérimentaux obtenus jusqu'alors. La déprotonation de la partie benzothiazole (6'OH) aurait lieu pendant la formation du dioxétanone dans le complexe enzymatique à pH 7-8, tandis qu'à pH plus élevé, la D-luciférine se trouve déjà dans un état déprotoné^{116,117}. Il en découle que l'émission verte-jaune proviendrait de la forme phénolate-kéto piégée au sein de la luciférase adoptant une structure fermée. Alors que l'émission rouge serait celle de la même espèce mais cette fois-ci piégée dans une structure ouverte. Nakatsu¹⁹ *et al.* proposent un modèle dans lequel un seul acide aminé de la cage protéique est nécessaire à la modulation de la longueur d'onde d'émission du complexe bioluminescent. La rigidité à l'état excité de l'OxyLH₂ est contrôlée par le mouvement de l'Ile288 de la *luciola cruciata* qui lui-même est contrôlé par le changement de conformation de la protéine. Jusqu'à ce que Naumov²³ *et al.* déterminent pour la première fois la structure cristalline de la forme énol de l'oxyluciférine.

Cette étude combinée à des mesures de spectroscopie a permis de montrer que l'émission dans le jaune est associée à la forme phénol-énolate alors que l'émission dans le rouge est associée à la forme phénolate-kéto. Les auteurs émettent alors l'hypothèse que l'émetteur du complexe enzymatique le plus probable, est l'espèce phénol-énolate.

Dans une autre série d'études théoriques, Song⁵⁰ *et al.* utilisent différentes approches pour évaluer les interactions du chromophore avec son environnement. En reproduisant les conditions physiologiques avec des modèles réalistes de l'OxyLH₂ de la luciférase *luciola cruciata* et des molécules d'eau, ils constatent que le chromophore se lie avec sa partie thiazole au résidu Lys531 protoné par une liaison hydrogène, permettant la formation d'une paire d'ions et stabilisant la charge négative sur la partie phénol du chromophore, à l'état excité. Le transfert de proton de la Lys531 à l'OxyLH₂ n'est pas possible d'après le profil énergétique, donc la tautomérisation ne peut pas avoir lieu, faisant de la forme kéto le seul émetteur possible. La modulation de la longueur d'onde d'émission sur une large gamme spectrale, se fait alors, grâce aux fluctuations structurelles des groupes chargés, par interactions électrostatiques. Pinto da Silva *et al.* arrivent à la même conclusion en caractérisant le rôle du pH sur l'émission associée à la bioluminescence^{99,118–121}. Ils émettent l'hypothèse que si le pH induit des variations de la longueur d'onde d'émission, cela est dû à des changements de la structure du site actif de l'enzyme. Pour cela, ils étudient le rôle des formes ouverte et fermée dans le cas de la luciférase *luciola cruciata*. Comme Song *et al.* ont montré l'importance du microenvironnement, ils prennent alors en compte dans leurs simulations, l'AMP, des résidus de la luciférase, ainsi que des molécules d'eau. Le résultat de leurs simulations décrit un décalage vers le rouge, dû à une diminution de l'interaction intermoléculaire de l'OxyLH₂ avec l'AMP, en revanche ils remarquent une augmentation de l'interaction intermoléculaire avec une molécule d'eau et un acide aminé du site actif. Ils affirment alors, que suivant les interactions que réalise l'OxyLH₂ avec ces résidus, l'émission peut être décalée vers le rouge ou vers le bleu, mais leurs calculs démontrent que les différentes longueurs d'onde d'émission peuvent provenir de la même forme de l'OxyLH₂, le phénolate-kéto. En 2013, Kim¹²² *et al.* confirment l'hypothèse de départ de Pinto da Silva, relative à l'influence du pH sur les propriétés d'émission. En effet, grâce à des simulations de dynamique moléculaire, ils trouvent que la structure de la protéine est généralement résistante à la variation du pH alors que celle du site actif y est très sensible. Ils se concentrent

alors sur la dynamique du site actif qui pourrait affecter la modulation de la longueur d'onde d'émission en adoptant différent état de protonation au sein de la poche protéique. En mettant en commun plusieurs résultats, ils concluent qu'une conformation de protéine ouverte permet la diffusion de molécules d'eau dans le site actif et émettent l'hypothèse que dans des conditions acides, la présence d'une molécule d'eau dans le site actif peut engendrer des mouvements de groupements flexibles et modifier les propriétés d'émission. Ils décident alors de tester les états protonés et déprotonés des acides aminés du site actif et observent un décalage vers le rouge lorsque le nombre de protons augmente dans le site actif. Ce décalage est aussi affecté par des molécules d'eau qui garantissent le couplage ionique entre la Lys531 et l'OxyLH₂ (sous sa forme kéto) ou la Lys531 et l'AMP. Ces groupes ioniques peuvent fluctuer avec une grande flexibilité dans le site actif et conduisent à des mouvements compensateurs des espèces cationiques ou anioniques diminuant ainsi le décalage spectral induit par le proton ajouté. Mais lorsque la poche protéique est « sèche », c'est-à-dire sans molécule d'eau, les groupes ioniques formés autour de l'OxyLH₂ sont rigides et les effets de compensation ne peuvent plus avoir lieu donc ce sont les interactions électrostatiques de l'AMP protonée qui affectent directement l'énergie d'émission. Ainsi, ils arrivent à la même conclusion : la forme kéto de l'OxyLH₂ pourrait être la seule forme impliquée dans le mécanisme d'émission. De plus, ils suggèrent de considérer avec soin l'aspect dynamique et la polarisation du site actif de la luciférase qui pourraient jouer un rôle important dans le mécanisme d'émission associé à la bioluminescence.

Les études théoriques arrivent donc toujours à la même conclusion, la forme phénolate-kéto est le produit directement formé par la réaction enzymatique et serait le seul émetteur car il permet d'expliquer la modulation de la longueur d'onde d'émission associée à la bioluminescence. Mais en 2014, Wang *et al.* réalisent des mesures de spectroscopie en reproduisant la réaction de bioluminescence avec la luciférase *photinus pyralis* à trois pH : 6,3, 7,4 et 7,9¹²³. Ils mesurent les spectres de bioluminescence ainsi que ceux d'absorption et d'émission lorsque la réaction est terminée. Ils observent un léger décalage du maximum d'absorption, vers des longueurs d'onde plus élevées (378 nm à 392 nm) quand le pH augmente ainsi qu'un épaulement autour de 430 nm. Ils associent le premier pic à l'espèce protonée de la forme énol de l'OxyLH₂ et le deuxième à la forme déprotonée. L'émission présente également deux pics, le premier à 450 nm, qui diminue quand le pH augmente et qui

est associé à la forme énol protonée et le second à 558 nm qui augmente avec le pH et qui est associé à la forme déprotonée. En décalant l'excitation à 510 nm une faible émission est observée à 610 nm et pourrait provenir de la forme kéto mais sa contribution n'est pas retrouvée dans les spectres d'absorption. Ils concluent alors que la forme présente dans la luciférase est la forme énol. En 2015, Ghose⁵² *et al.* soutiennent l'hypothèse d'une émission qui proviendrait d'un mélange des formes phénol-énolate et phénolate-kéto, d'après une étude spectroscopique en solution aqueuse. Leur conclusion est supportée par les travaux de Pinto da Silva^{112,124} *et al.* qui sont en contradiction avec leurs précédentes études. En effet, cette fois-ci ils s'intéressent à l'ESPT intermoléculaire et intramoléculaire, en ne prenant en compte que la contribution de l'AMP et concluent que l'unique forme émettrice est la forme énolate. Ils démontrent, de plus, que la forme énolate est plus stable que la forme phénolate en comparant les ESPT entre l'eau et les deux groupes thiazole et benzothiazole. Ainsi, ces recherches affirment que c'est la forme phénol-énolate qui est stabilisé dans l'état excité^{125,126}. Bien que ces deux études soient réalisées sans la protéine, leurs résultats sont proches de ceux de Wang *et al.* obtenus en présence de luciférase. Ces nouvelles études expérimentales contredisent la plupart des précédentes hypothèses, selon lesquelles seule la forme phénolate-kéto participerait au mécanisme d'émission. Le débat reste ouvert et continu d'intéresser un grand nombre de chercheurs. Ran⁴⁸ *et al.* ont par exemple utilisé des amino-dérivés de l'OxyLH₂ et afin d'expliquer la variation de la longueur d'onde d'émission en modélisant la contribution du site actif. Bien que les résidus n'affectent pas les structures à l'état fondamental, ils présentent une contribution importante à l'état excité et influencent donc le spectre d'émission. Ils montrent de plus, que l'absence du groupe hydroxyle de la partie phénol entraîne un décalage spectral vers le bleu et soutiennent l'hypothèse qu'un mélange kéto/énol peut expliquer les propriétés d'émission associées à la bioluminescence. Ainsi, considérer les résidus de la luciférase devient primordial pour les études théoriques qui se poursuivent mais qui, finalement, continuent d'affirmer que l'émission est celle de la forme phénolate-kéto^{127,128}.

I.8 Plan du mémoire – motivations de la thèse

Bien que la réaction de bioluminescence soit, à ce jour, bien définie, l'origine moléculaire du produit responsable de l'émission demeure énigmatique. La bioluminescence est un phénomène que beaucoup d'êtres vivants produisent, nécessitant un substrat, la luciférine,

une enzyme, la luciférase ainsi que de l'ATP et des ions magnésiums. Suite à une réaction d'oxydation le photoproduit, oxyluciférine est créé à l'état excité. Suivant l'espèce qui la produit, l'oxyluciférine peut émettre de la couleur vert-jaune au rouge lors de sa relaxation. Six formes différentes du photoproduit sont alors relevées, pouvant provenir d'une conversion en la forme kéto et la forme énole ou de différentes réactions de déprotonations. Bien que les applications utilisant la bioluminescence soient grandissantes grâce à son rendement quantique élevé, le mécanisme d'émission du complexe luciférase/oxyluciférine reste toujours en débat.

Deux types de recherches peuvent alors se distinguer. Celles qui travaillent avec la luciférase, et celles qui travaillent sans, c'est-à-dire en solution aqueuse.

En l'absence de la protéine, les études prouvent que l'émission dépend du pH, de la température, et de la polarité du solvant. En effet, lorsque ces trois facteurs augmentent, l'émission se décale spectralement vers le rouge. Un profil des concentrations des espèces de l'oxyluciférine à l'état fondamental, dépendant du pH, a été totalement déterminé en solution aqueuse. À pH 5, un équilibre entre la forme phénol-kéto et phénol-énol existe, alors qu'à pH 11, seulement la forme phénolate-énolate est présente. L'émission à pH acide est de 555 nm, et provient d'un mélange de la forme phénolate-kéto et phénol-énolate qui sont créées suite à un transfert de proton à l'état excité, alors qu'à pH basique, l'émission se situe à 539 nm et est celle du phénolate-énolate. Ainsi, deux pKa sont déterminés, le premier à 7,4 caractérise la conversion entre les formes phénol-énol et phénolate-énolate, et le second à 9,1 entre les formes phénol-énolate et phénolate-énolate. Bien que l'état fondamental de l'oxyluciférine soit maintenant bien compris, la dynamique à l'état excité n'est toujours pas caractérisée.

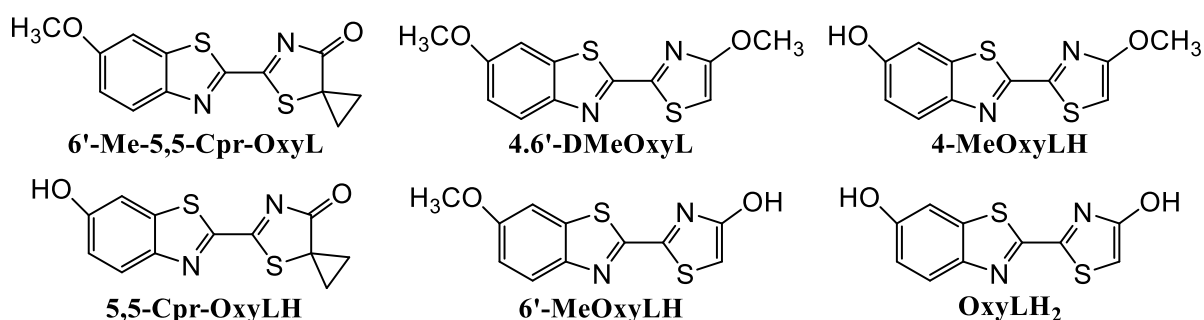


Figure 9 : Analogues synthétiques des différentes formes de l'oxyluciférine utilisés dans la thèse

Le but de la première partie de la thèse est de caractériser toute la dynamique de l'OxyLH₂ en solution aqueuse en fonction du pH. L'OxyLH₂ pouvant exister sous six formes chimiques différentes, nous commencerons par caractériser leurs propriétés spectrales séparément en utilisant les mêmes analogues que ceux utilisés par Ghose *et al.* qui permettent de mimer chacune des formes naturelles de l'OxyLH₂ (Figure 9). En utilisant la spectroscopie pompe-sonde, nous accéderons à des temps relativement courts (200 fs) pour suivre et caractériser la cinétique des ESPT entre les différentes formes (phénol/phénolate et éno/éno/late) ainsi que la conversion kéto/éno. Cette analyse permettant de sélectionner et d'étudier les formes chimiques souhaitées sera utile pour reconnaître leurs signatures lorsque nous étudierons l'OxyLH₂. Ainsi, il sera possible de reconstruire entièrement le cycle de photoluminescence de l'oxyluciférine en solution aqueuse.

En l'absence de luciférase, les molécules ne peuvent interagir qu'avec le solvant, mais lorsque l'oxyluciférine est en complexe avec la protéine, son émission dépendra du microenvironnement, c'est-à-dire, des acides aminés proches de la molécule, des molécules d'eau pouvant entrer dans le site actif ou encore de l'AMP. D'autres facteurs impactant l'émission rentrent ainsi en jeu, la polarité du site actif, sa rigidité, l'état de protonation des acides aminés le constituant ou de l'AMP, etc... La grande majorité des études ont conclu que l'émission de la bioluminescence provient de la forme phénolate-kéto car, à elle seule, elle permet de recouvrir toute la gamme spectrale de la bioluminescence observée, en fonction principalement de la polarité du site actif. Il a été démontré, que lorsque le pH du solvant est basique, un pont salin se forme entre deux paires de résidus, maintenant la luciférase dans sa forme fermée. Le site actif devient rigide et ne permet plus aux molécules d'eau d'entrer, entraînant une émission verte. A l'inverse, lorsque le pH est acide, les attractions entre les acides aminés sont en compétition avec les molécules d'eau, ne pouvant plus maintenir la luciférase en conformation fermée. Des molécules d'eau rentrent alors dans le site actif, rendant le milieu polaire, et décalant l'émission dans le rouge.

La dernière partie de cette thèse consistera alors à étudier expérimentalement l'émission du complexe enzymatique. Pour ce faire, la luciférase sera produite et purifiée par nos soins. La réaction de bioluminescence sera ensuite reproduite avec la d-luciférine et l'ATP pour s'assurer de l'activité de la luciférase. Puis, comme l'analyse en solution aqueuse, nous utiliserons les mêmes dérivés auxquels nous ajouterons la luciférase et l'AMP pour permettre

leur liaison. Il sera alors crucial de déterminer leur constante de dissociation pour connaître la concentration de luciférase à utiliser afin que la proportion de molécules encore libres soit négligeable devant la proportion de molécules liées. Nous discuterons ensuite de la localisation des dérivés dans la protéine. Finalement, en comparant les résultats de l'OxyLH₂ obtenus par la réaction de bioluminescence, avec ceux des complexes reformés dérivés/luciférase avec l'AMP, nous pourrons émettre des hypothèses quant à la nature de l'émetteur de la bioluminescence et ainsi participer au débat qui a commencé il y a déjà plusieurs années.

Partie II

Matériels et Méthodes

II.1 Préparation des échantillons

L'oxyluciférine ainsi que ses analogues ont été synthétisés par le Professeur Lukas HINTERMANN (Université technique de Munich, TUM). Les solutions stocks sont préparées en dissolvant les dérivés dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) et sont stockées à 4°C. Dans le but d'étudier la dépendance du pH, trois solutions tampons sont préparées à différents pH : 5, 7.4 et 11. Le tampon à pH 5 est composé de : NaCl (75 mM), KH_2PO_4 (20 mM) et MgCl_2 (0.2 mM). Celui à pH 11 est composé de : NaCl (75 mM), Tris (25 mM) et MgCl_2 (0.2 mM). Le pH est ensuite ajusté avec des solution d'HCl à 250 mM ou de NaOH à 250 mM. Le tampon à pH 7.4 sera du phosphate salin (PBS, phosphate buffered saline). Les différents tampons sont stockés à 4°C.

II.2 Mesures à l'état stationnaire

Les spectres d'absorption sont réalisés avec un spectrophotomètre à double faisceaux (Cary 4000 – Agilent Technologies). Une ligne de base, air contre air, est enregistrée avant de mesurer les spectres d'absorption. Les spectres de fluorescence et d'excitation sont réalisés avec un spectrofluorimètre (Fluorolog ou Fluoromax – Jobin Yvon), ces derniers sont corrigés par la réponse de l'instrument. Les largeurs de fente sont de 1,5 nm pour l'excitation et de 2 nm pour l'émission pour des faibles concentrations. Pour des concentrations plus élevées, qui sont requises pour la spectroscopie pompe-sonde, les largeurs de fente seront de 1 et 1,5 pour l'excitation et l'émission. L'ajustement des largeurs de fentes permet de ne pas saturer nos mesures lorsque l'échantillon est plus concentré.

II.3 Mesures de fluorescence résolue en temps

Les déclins de fluorescence de tous les composés sont mesurés à l'aide de la technique de comptage de photons uniques corrélés en temps (TCSPC). Cette méthode consiste à exciter l'échantillon par une impulsion laser. Celui-ci va par la suite, émettre un photon qui sera recueilli par un détecteur rapide tel qu'une photodiode à avalanche ou un photomultiplicateur. Ce dispositif mesure le temps écoulé entre l'excitation produite par l'impulsion et la détection du photon de fluorescence unique. En générale, la méthode TCSPC a besoin de définir un « start » qui provient de l'impulsion laser, et un « stop » provenant de la détection du photon unique. Ici, nous utiliserons la méthode du start/stop inversé afin

d'éviter de trop solliciter le compteur. C'est donc le photon de fluorescence qui déclenchera le start, et l'impulsion laser suivante le stop. La probabilité de détection du photon dépend de l'intensité d'émission de fluorescence et obéit à une loi de Poisson. En accumulant un assez grand nombre de mesures, il est possible de construire un histogramme (reconstruction statique) et de l'ajuster à une fonction exponentielle décroissante, qui permet d'obtenir les temps caractéristiques associés au déclin de fluorescence, comme le décrit sur la Figure 10.

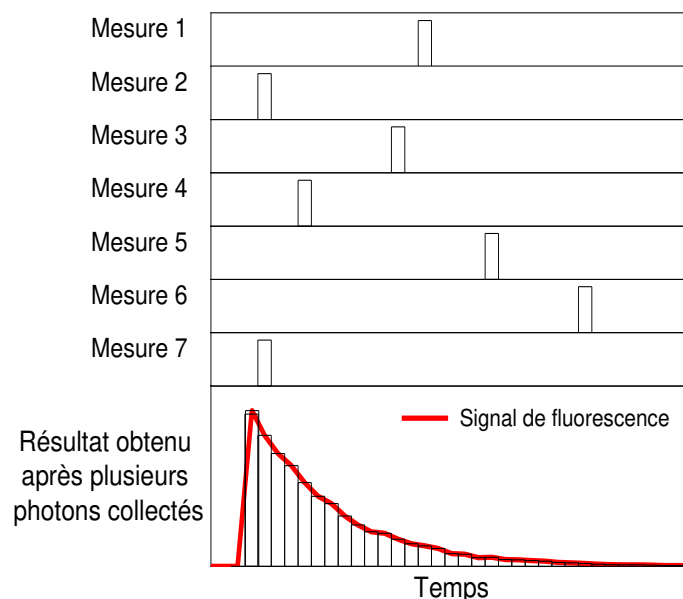


Figure 10 : Principe de la technique TCSPC : la détection de photons uniques permet de mesurer le temps séparant le photon émis de l'impulsion excitatrice. La distribution des temps d'arrivée est utilisée pour reconstruire le déclin de fluorescence de la molécule

Les impulsions d'excitation sont générées par un supercontinuum (NKT Photonics SuperK Extreme) avec un taux de répétition de 10 MHz. Nous ferons varier cette longueur d'excitation de 370 nm à 430 nm. L'émission passe ensuite dans un polariseur réglé à l'angle magique (54,7°) ainsi qu'un monochromateur dont la bande passante est de 16 nm (Jobin Yvon). Le réglage à l'angle magique permet de s'affranchir de la polarisation résiduelle et de rendre l'intensité mesurée indépendante de la polarisation de l'émission de fluorescence. Le photon unique est collecté avec un photomultiplicateur (R3809U Hamamatsu) couplé avec un préamplificateur d'impulsion HFAC (Becker-Hickl GmbH). Il est ensuite enregistré par une carte de comptage de photons uniques corrélée dans le temps SPC-130 (Becker-Hickl GmbH).

Cette technique est limitée par la largeur de la réponse impulsionnelle du détecteur (IRF – Instrumental Response Function). Elle est mesurée avec un réflecteur en aluminium poli, pour chaque longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Les IRF mesurées sont ajustées par une fonction Gaussienne dont la largeur à mi-hauteur vaut environ 40 ps.

Il est possible de remonter aux durées de vie τ , en utilisant une somme de fonctions multi-exponentielles convoluées par l'IRF associée à une fonction gaussienne :

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \cdot \exp\left(\frac{-(t - t_0)}{\tau_i}\right) * \frac{1}{\sigma\sqrt{2}} e^{-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}}$$

avec α_i : l'amplitude associée au τ_i correspondant au déclin de fluorescence du composé étudié, et t représente le temps.

II.4 Production et purification de la luciférase de *Photinus pyralis*

La production de l'enzyme se fait en plusieurs étapes :

- Transformation thermique de bactéries E.coli BL21(DE3) codon + par le plasmide pET26b-6His-SUMOtag-Luciferase. Le plasmide utilisé permet l'expression de la luciférase en fusion N-terminale avec un tag His et un tag SUMO sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase du phage T7. Il porte, de plus, un gène de résistance à la kanamycine. La souche de bactéries utilisée ici permet un fort niveau d'expression de la protéine produite et sont également optimisées pour exprimer fortement des ARNt rares dans la bactérie mais fréquemment utilisés dans les protéines non bactériennes et sont résistantes au chloramphénicol.
- Après transformation, les bactéries sont étalées sur des boîtes de milieu LB-Agar (Lysogeny Broth, 10 g/L tryptone, 10 g/L NaCl, 5 g/L extrait de levures, 15 g/L agar) supplémenté en chloramphénicol (34 µg/L) et kanamycine (50 µg/L) et incubées à 37°C pendant une nuit.
- Une pré-culture est alors réalisée par inoculation d'une colonie isolée dans 100 mL de milieu LB liquide (sans agar) supplémenté en antibiotiques à 37°C sous agitation sur la nuit.
- Pour la production, 50 mL de pré-culture sont introduites dans 5 L de milieu LB supplémentés en antibiotiques à 28°C. Lorsque la densité optique à 600 nm atteint 0,3-0,4 ; 0,1 mM d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) sont ajoutés une fois la

culture placée à 15°C sous agitation, pour permettre l'induction de l'expression de la protéine sur la nuit.

- Le culot bactérien est récolté par centrifugation à 4500 tpm (2 000 g) pendant 30 min à 4°C et est re-suspendu dans du tampon lyse (100 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 % glycérol pH 7,8) contenant un mélange d'inhibiteur de protéases (Roche complete mini EDTA free protease inhibitor) ainsi que de la Benzonase Nucléase (25 U/mL) qui permet de dégrader les acides nucléiques bactériens et du β -mercaptoéthanol (3 mM) comme agent réducteur. Le culot est lysé par sonication (10s ON-30sec sur glace, puissance 100 %, 10 répétitions) qui permet la lyse cellulaire et la libération du contenu cellulaire retrouvé dans le surnageant après centrifugation à 15 000 tpm (34 430 g) pendant 1 h à 4°C. Le surnageant est filtré sur filtre 0,45 μ m.

La luciférase est purifiée par la méthode de chromatographie d'affinité sur une colonne de Nickel. Le surnageant filtré est appliqué sur la colonne de Nickel (colonne His-Trap de 5 mL, GE healthcare) à un débit de 2 mL/min où la protéine va s'y attacher grâce à l'affinité du tag Histidine pour le Nickel. La colonne est lavée par un tampon A (100 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 % glycérol pH 7,8, 3 mM β -mercaptoéthanol, 30 mM imidazole) afin d'éliminer les composés liés de manière non-spécifique. L'élution est réalisée par application d'un gradient linéaire de tampons A + B avec passage de 0 à 100 % de tampon B (100 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 % glycérol pH 7,8, 3 mM β -mercaptoéthanol, 500 mM imidazole) à un débit de 2 mL/min. Des fractions de 1 mL sont collectées en sortie de colonne et analysées par électrophorèse SDS-PAGE sur un gel d'acrylamide 10 %. Les fractions sélectionnées sont poolées et placées sur glace pendant la nuit avec de la peptidase Ulp1 afin de cliver le tag His-SUMO. L'imidazole est par la suite, éliminé à l'aide de colonne de dessalage de type PD-10 ce qui permet de récupérer le mélange luciférase et His-SUMO dans un tampon 100 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 % glycérol pH 7,8, 3 mM β -mercaptoéthanol). Le mélange est passé sur une seconde colonne de Nickel de 1 mL à laquelle seul le tag His-SUMO est capable de se lier, la luciférase étant récupérée dans le *flow-through*. De nouveau des fractions sont collectées, analysées sur gel SDS-PAGE pour la présence de la protéine et les fractions sélectionnées poolées. La protéine est concentrée par passage sur des filtres à centrifuger capables de ne retenir que les molécules ayant une masse supérieure à 30 kDa (Amicon Ultra-15 30 kD) ce qui permet de

les concentrer jusqu'à une concentration supérieure à 100 µM. Après avoir ajouté 10 % de glycérol, des aliquots de 20 µL sont congelés par congélation rapide dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

II.5 Mesure d'anisotropie de fluorescence

II.5.1 Fluorescence à l'état stationnaire

L'anisotropie de fluorescence sera utilisée pour s'assurer que l'oxyluciférine et ses analogues se lient à la luciférase. En effet, cette technique permet de mesurer la dépolariation de l'émission d'un fluorophore lorsque ce dernier est excité par une onde lumineuse polarisée verticalement, elle dépend de la diffusion rotationnelle du dipôle (D) associé au fluorophore excité et donc de sa masse, comme le décrit l'équation de Perrin¹²⁹ :

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau}{\theta_{rot}}$$

où θ_{rot} , la constante du temps de corrélation rotationnel est reliée au volume V de la molécule d'après l'équation de Stokes-Einstein-Debye¹²⁹ :

$$\theta_{rot} = \frac{\eta V}{k_B T}$$

Avec r l'anisotropie de fluorescence, r_0 l'anisotropie fondamentale, T la température, τ le temps de vie de fluorescence et k_B la constante de Boltzmann.

Lorsqu'un fluorophore est excité avec une lumière polarisée linéairement, la lumière émise par celui-ci sera aussi polarisée et son orientation dépendra de l'orientation du dipôle associé à la molécule. L'émission de fluorescence est alors mesurée à travers un polariseur. Dans ce cas, l'intensité émise par le fluorophore dépend de l'orientation de l'analyseur par rapport à la direction de polarisation du faisceau exciteur. Le montage utilisé ici, est un « T-format polarization », représenté figure 2. Dans ce cas, le coefficient d'anisotropie est noté¹²⁹ :

$$r = \frac{I_{VV} - g I_{VH}}{I_{VV} + 2 * g I_{VH}}$$

où le facteur g , correspondant au facteur de correction de l'appareil, vaut $\frac{I_{HV}}{I_{HH}}$, avec I_{HH} polarisation d'excitation et d'émission horizontale, I_{VH} polarisation d'excitation verticale et

polarisation d'émission horizontale, I_{VV} polarisation d'excitation et d'émission verticale, I_{HV} polarisation d'excitation horizontale et polarisation d'émission verticale.

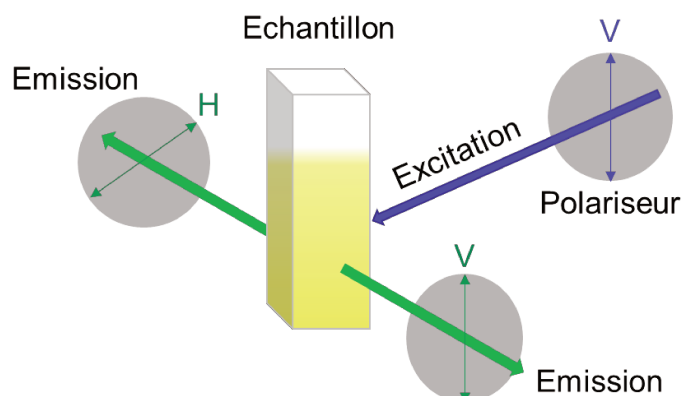


Figure 11 : Schéma d'un T-format polarization, l'excitation est polarisée verticalement et l'appareil recueille d'un côté l'émission horizontale et de l'autre l'émission verticale

L'anisotropie de fluorescence dépend du mouvement du fluorophore, en effet, si son mouvement rotationnel est rapide, il y aura une forte dépolarisation de sa fluorescence. Plus la taille du fluorophore est petite, plus son mouvement rotationnel sera rapide. Etant donné que la luciférase a une masse (58 000 g/mol) significativement plus grande que les dérivés utilisés (~250 g/mol), le mouvement rotationnel du dérivé sera beaucoup plus lent, lorsqu'il formera un complexe avec la protéine que lorsqu'il diffusera librement en solution aqueuse. La dépolarisation sera alors, plus faible, ce qui augmentera l'anisotropie. Cette technique nous permet donc de suivre la formation du complexe entre l'analogue et la protéine. Cette étape est indispensable pour déterminer la proportion de protéine à utiliser afin de s'assurer de l'absence de fluorophores libres en solution.

II.5.2 Fluorescence résolue en temps

Lorsque qu'un composé se lie à la protéine, son rendement quantique peut évoluer à cause des perturbations induites par l'environnement au sein de la poche protéique qui peut moduler les mécanismes de relaxations non-radiatifs, et donc modifier la durée de vie de fluorescence. Afin de tenir compte de cette possible modification, nous avons entrepris de mesurer les déclin de fluorescence, parallèle $I_{//}$, perpendiculaire $I_{\perp}$, et à l'angle magique I_{MA} , où le faisceau d'émission est mesuré avec une polarisation faisant un angle de 54.7° par rapport à la direction de polarisation du faisceau d'excitation (verticale). Une analyse globale est réalisée sur les trois déclin pour retrouver l'anisotropie de fluorescence, nous utilisons les équations suivantes¹²⁹ :

$$I_{//}(t) = I_{MA} * (1 + 2r(t))$$

$$I_{\perp}(t) = I_{MA} * (1 - r(t))$$

I_{MA} est une somme de trois exponentielles, convoluées avec une gaussienne, représentant l'IRF :

$$I_{MA} = \sum_{i=1}^3 A_i e^{-\frac{t-t_0}{\tau_i}} * \frac{1}{\sigma\sqrt{2}} e^{-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}}$$

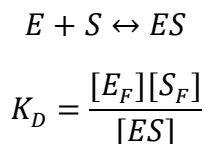
$r(t)$ est une somme de deux exponentielles :

$$r(t) = r_0 \cdot ((1 - B)A_1 e^{-\frac{t-t_0}{\tau_1}} + BA_2 e^{-\frac{t-t_0}{\tau_2}})$$

Deux types de mesures seront réalisées : la première se fait avec le dérivé en solution aqueuse, $r(t)$ ne contient donc qu'un terme exponentiel. Le fit global sur les 3 courbes, détermine la première constante de temps d'anisotropie courte, τ_1 , associée à la rotation du dérivé libre en solution. La deuxième mesure est réalisée en augmentant la concentration de la luciférase. Ces mesures se feront en présence d'AMP, j'ai en effet pu montrer (Partie V) que l'AMP favorise la formation du complexe. Cette fois-ci, τ_1 est fixée par la valeur trouvée précédemment, et τ_2 est la constante de temps associée au complexe dérivé/ luciférase. Etant donné que cette constante de temps croît d'une nanoseconde par tranche de 2 400 daltons, à 20°C, avec une protéine d'une masse de 58 kDa, τ_2 vaut 24 ns. L'amplitude B correspond alors à la proportion relative des composés liés à la protéine. Lorsque B vaut 1, nous considérons que tous les dérivés présents dans la solution, sont liés à la protéine.

II.5.3 Constante de dissociation

La formation du complexe protéine (E) – analogue (S) est modélisée par l'équation suivante¹²⁹ :



Où K_D est la constante de dissociation du complexe. La fraction d'analogue lié à la protéine est donnée par la relation suivante¹³⁰ :

$$[ES] = \frac{r - r_s}{R(r_s - r) + (r - r_f)} = \frac{K_D + E + S - \sqrt{(E + S + K_D)^2 - 4ES}}{2S} = f_s$$

Avec K_D la constante de dissociation, S la concentration totale de l'analogue, r_s l'anisotropie de l'analogue en solution aqueuse, r_f l'anisotropie à saturation en protéine, $R = \frac{I_0}{I_1}$ le rapport de l'intensité de la forme libre sur la forme liée, E la concentration totale en protéine.

Nous représentons l'anisotropie statique en fonction de la concentration en protéine, notre fonction de fit est donc de la forme :

$$r = \frac{r_s + f_s(Rr_f - r_s)}{1 + (R - 1)f_s}$$

Tous les paramètres sont connus, excepté K_D qui est déterminé à l'aide du fit

II.6 Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (DC) repose sur l'utilisation d'un faisceau de lumière polarisé circulairement. Les mesures seront réalisées à partir de l'absorption de l'onde polarisée circulaire gauche et de l'onde polarisée circulaire droite. L'absorption s'écrit, d'après la loi de Beer-Lambert, de la manière suivante : $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$ avec c la concentration, exprimée en mol/L, l l'épaisseur de l'échantillon traversé en cm et ε le coefficient d'extinction molaire en L/mol/cm

En faisant intervenir les deux polarisations circulaires, nous obtenons : $\Delta A = A_G - A_D$. Ainsi la loi de Beer-Lambert devient : $\Delta A = (\varepsilon_G - \varepsilon_D) \cdot c \cdot l$ où $\varepsilon_G - \varepsilon_D$ correspond au DC.

Le DC apparaît lorsque le système est chiral. La chiralité est une propriété d'asymétrie : un système est dit chiral lorsque l'image d'un objet par un miroir ne se confond pas avec l'objet lui-même. Cette manipulation est donc très utilisée en biologie, en particulier pour les protéines de par leur chiralité. En effet, leur structure secondaire, hélice α , feuillet β ou structures aléatoires, présentent des caractéristiques de dichroïsme circulaire particulières. Ainsi, en mesurant un spectre d'absorption de 250 nm à 200 nm, correspondant à l'absorption des liaisons peptidiques, il est possible d'obtenir des informations qualitatives sur la structure secondaire de la protéine (Figure 12).

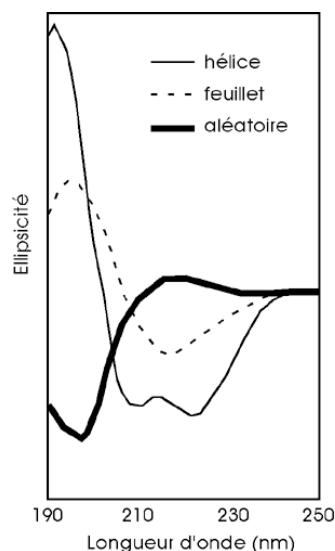


Figure 12 : Dichroïsme circulaire des structures secondaires d'une protéine, en trait plein : hélice alpha, courbe en tiret : feuillet bêta, courbe en gras : structure aléatoire

Le DC est donc très utilisé pour étudier les modifications des structures secondaires comme par exemple le repliement de la protéine, ou à l'inverse la dénaturation de celle-ci, en faisant varier plusieurs paramètres, température, pH etc ... Dans notre cas, nous utiliserons cette méthode pour obtenir des informations qualitatives sur la structure de la protéine utilisée et ainsi s'assurer qu'elle n'est pas dénaturée.

II.7 Logiciels utilisés

- L'acquisition des données pompe-sonde se fait avec le logiciel LabView.
- Le traitement de données (soustraction du solvant, correction du chirp, SVD) se fait à l'aide d'une procédure codée en python sur le logiciel Anaconda-Spyder.
- Les différents fits ainsi que les figures sont réalisés et tracés sur le logiciel OriginLab 2018 ou matlab.
- Les structures chimiques sont dessinées avec le logiciel ChemDraw

Partie III

Spectroscopie pompe-sonde

III.1 Principe

La dynamique d'émission de l'OxyLH₂ fait intervenir des transferts de proton à l'état excité. Pour caractériser ce phénomène et comprendre la dynamique d'émission de l'OxyLH₂, nous avons utilisé la spectroscopie pompe-sonde. Cette technique a une résolution temporelle suffisamment courte (~150 fs) pour observer des phénomènes physiques dont les temps caractéristiques sont de l'ordre de la picoseconde.

La technique pompe-sonde nécessite deux impulsions : une impulsion pompe et une impulsion sonde. L'impulsion pompe est utilisée pour exciter, à 400 nm, les molécules présentes dans l'échantillon. D'après le principe de Franck-Codon, l'absorption d'un photon par une molécule se traduit par une transition verticale de l'état fondamental vers le premier état excité S₁. La deuxième impulsion, impulsion sonde, est un continuum spectral qui s'étend de 440 nm à 700 nm. Celle-ci peut être temporellement décalée par rapport à l'impulsion pompe. Ce décalage est contrôlé par une ligne à retard. Les deux impulsions sont ensuite focalisées à l'intérieur de l'échantillon et le signal mesuré correspond aux variations de la transmission de la sonde.

III.2 Source laser

III.2.1 Laser femtoseconde

Trois éléments vont permettre à la source laser de fonctionner : une source extérieure utilisée pour obtenir l'inversion de population, le milieu de gain qui va permettre d'amplifier l'émission stimulée, ainsi qu'une cavité résonnante. Le passage répété dans la cavité amplifie le nombre de photons par émission stimulée et crée ainsi une onde cohérente. La cavité réalise ensuite une sélection spectrale. En effet, les modes ne peuvent être transmis seulement lorsque le gain G est supérieur aux pertes de la cavité, comme le montre la Figure 13 où seulement 3 modes longitudinaux peuvent osciller.

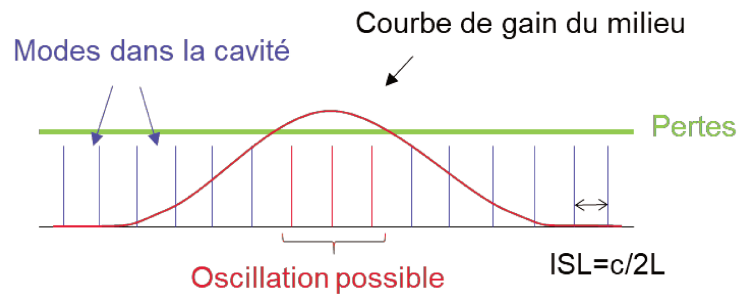


Figure 13 : L'oscillation laser correspond aux modes sélectionnés dans la cavité, lorsque la courbe de gain est supérieure aux pertes, ici, 3 modes longitudinaux peuvent osciller

Pour des lasers de type femtoseconde, un grand nombre de modes doit interférer dans la cavité afin d'obtenir une impulsion courte, d'après la relation de Fourier :

$$\Delta t \Delta \nu \geq \frac{1}{2} \text{ soit } \Delta t = \frac{\lambda_0^2}{2c\Delta\lambda}$$

Plus la largeur spectrale de l'impulsion ($\Delta\lambda$) augmente, plus sa largeur temporelle (Δt) diminue. Le champ électrique total $E(t)$ étant une superposition des modes ayant chacun une phase ϕ_n , il devient nécessaire de synchroniser et verrouiller les phases afin d'obtenir une impulsion courte, comme le décrit la Figure 14:

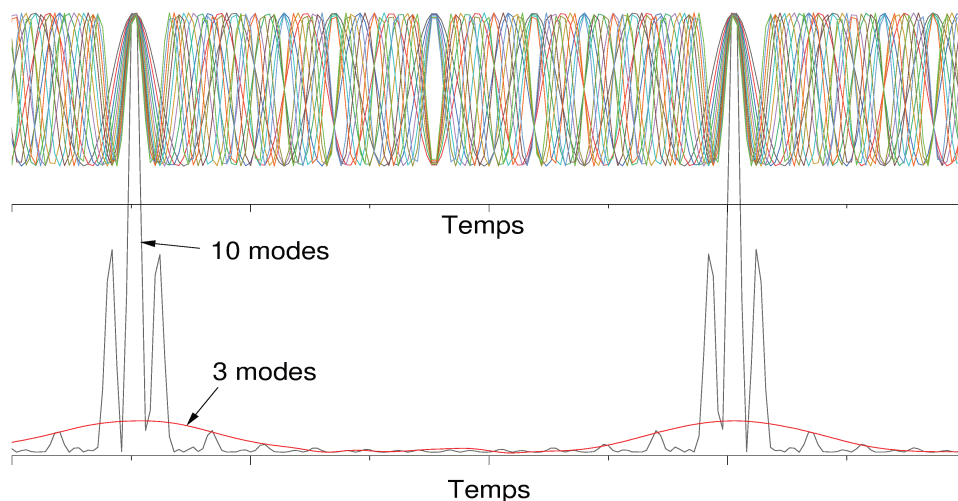


Figure 14 : représentation du blocage de modes, la durée d'impulsion est plus courte avec 10 modes qu'avec 3 modes

Pour ce faire, on peut utiliser un blocage de modes actif ou passif. Le blocage de modes actif correspond à l'utilisation d'un élément externe, par exemple un modulateur acousto-optique, qui bloque la phase entre les différents modes. Quant au blocage de modes passif, il résulte

d'un phénomène d'optique non-linéaire d'autofocalisation dans le milieu amplificateur. Lors de la propagation dans le milieu de gain, par exemple un milieu Kerr qui est un milieu dont l'indice dépend de l'intensité de l'impulsion le traversant, l'autofocalisation va conduire à l'augmentation de la densité de puissance de l'impulsion. Au-delà d'une valeur seuil, l'indice du milieu n'est plus considéré comme étant constant et dépend de l'intensité de l'impulsion : $n(t) = n_0 + n_2 I(z, t)$. Si nous considérons un faisceau gaussien, l'indice de réfraction au centre de l'impulsion, sera plus élevé que celui vu par les bords. Le faisceau traversant un milieu Kerr devient convergent et voit sa phase modulée, Figure 15 :

$$\Delta\phi = \frac{2\pi}{\lambda_0} \Delta n(I) L = 2\pi \frac{n_2 L}{\lambda_0 S} P$$

Avec S représentant la surface et P la puissance du faisceau incident et L la longueur de la cavité

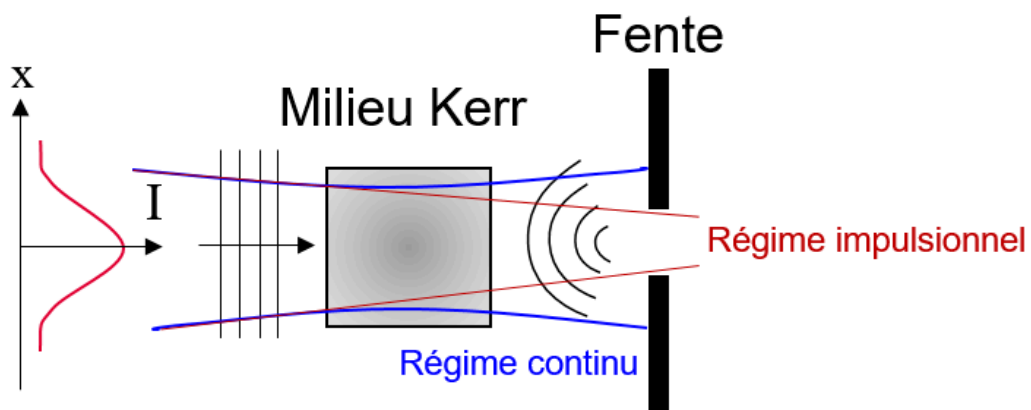


Figure 15 : représentation schématique de l'autofocalisation avec une impulsion gaussienne dans un milieu Kerr favorisant le régime impulsionnel

Dans ce cas, le milieu peut être assimilé à une lentille convergente dont la focale équivalente dépend de l'intensité de l'impulsion. Plus l'intensité crête est grande, plus le phénomène autofocalisation est important. La fente placée à la sortie de la cavité favorise le fonctionnement impulsionnel plutôt que celui continu.

De plus, la dépendance spectrale de l'indice du milieu génère une différence de vitesse de propagation et donc une séparation temporelle entre les fréquences. Nous définissons la relation de dispersion suivante¹³¹ :

$$k(\omega) = k(\omega_0) + k'(\omega - \omega_0) + \frac{k''}{2}(\omega - \omega_0)^2$$

Pour des impulsions brèves, donc avec un large spectre, le terme $\frac{k''}{2}(\omega - \omega_0)^2$ n'est pas négligeable après le passage de l'impulsion dans un milieu dispersif suffisamment épais. Il est possible de déterminer analytiquement le terme k'' :

$$\frac{\omega}{k} = \frac{c}{n(\omega)} \text{ correspond à la vitesse de phase}$$

$$\frac{d\omega}{dk} = \frac{c}{n + \frac{\omega dn}{d\omega}} = \frac{c}{n - \frac{\lambda^2 dn}{2\pi c d\lambda}} = v_g \text{ correspond à la vitesse de groupe}$$

$$\frac{d^2k}{d\omega^2} = -\frac{\lambda^3}{2\pi c^2} \frac{d^2n}{d\lambda^2} = -\frac{1}{v_g^2} \frac{dv_g}{d\omega} \text{ est la dispersion de la vitesse de groupe}$$

Pour une dispersion de vitesse de groupe positive, les basses fréquences (rouges), se propagent plus vite que les hautes fréquences (bleues). Cet effet est donc plus prononcé pour des impulsions courtes à cause de leur grande largeur spectrale.

Pour notre expérience pompe-sonde, le faisceau provient d'un oscillateur titane:saphir (Tsunami, Spectra-Physics - Figure 16) qui délivre des impulsions laser de 80 fs avec un taux de répétition de 80 MHz et une puissance moyenne de 600 mW soit 7.5 nJ/pulse. Le milieu de gain est constitué d'un barreau de saphir dopé aux ions de titane. Ce milieu est pompé par un laser doublé et continu (Millennia, Spectra-Physics) avec comme milieu de gain l'orthovanadate d'yttrium dopé au néodyme (Nd:YVO4), il émet un faisceau de 5 W à 532 nm. L'oscillateur Ti:saphir est accordable de 700 nm à 900 nm. Il est composé d'un modulateur acousto-optique qui déclenche l'effet Kerr qui permettra par la suite un blocage de mode passif. Le choix de la longueur d'onde se fait à l'aide d'une fente placée entre la paire de prismes Pr2 et Pr3 (voir Figure 16).

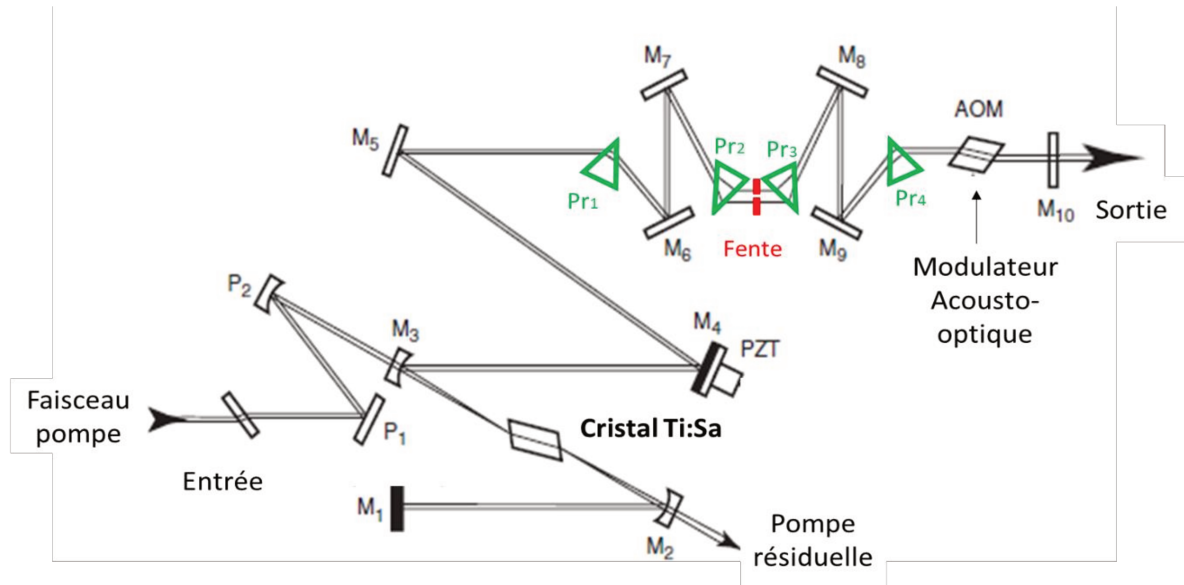


Figure 16 : Oscillateur Tsunami, Spectra-Physics, la fente en rouge sert à ajuster la longueur d'onde de l'oscillateur, les prismes en vert ajustent la largeur de l'impulsion

La dispersion de la vitesse de groupe ainsi que l'automodulation de phase induisent un 'chirp' positif sur l'impulsion, c'est-à-dire une modulation temporelle. Ainsi, plus l'impulsion se propage dans la cavité, plus elle s'élargie. La double paire de prismes de Pr1 à Pr4 (vert sur la Figure 16) permet de compenser cet effet en ajoutant une dispersion de vitesse de groupe négative. En effet, le phénomène de dispersion de la lumière avec les prismes, sépare spatialement l'impulsion en fonction de la longueur d'onde. Ainsi, les plus grandes longueurs d'onde (rouges) traverseront une épaisseur de verre plus grande à l'intérieur des prismes Pr2 et Pr3 (Figure 17). Elles se verront ainsi retardées par rapport aux longueurs d'onde plus faibles (bleues), ce qui permet de compenser la dispersion de la vitesse de groupe et réduire la largeur temporelle de l'impulsion¹³².

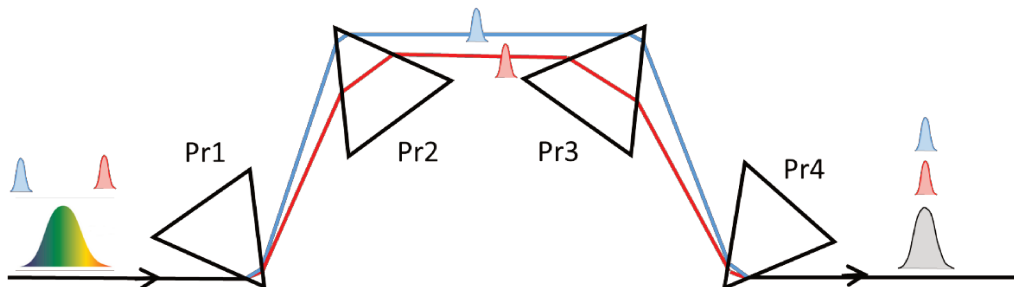


Figure 17 : compensation de la vitesse de groupe avec une double paire de prismes. L'impulsion 'rouge' en avance par rapport à la 'bleue' parcourt plus de distance dans les prismes et voit son avance diminuer pour se superposer à la bleue

III.2.2 Amplificateur

Les impulsions générées par l'oscillateur entrent ensuite dans un amplificateur (Spifire, Spectra-Physics) pour atteindre une puissance crête suffisante, afin de produire des effets non-linéaires pour la génération des longueurs d'onde requise pour nos expériences. Trois étapes sont nécessaires pour l'amplification d'une impulsion : un élargissement temporel, une amplification puis une compression temporelle de l'impulsion¹³³, comme le décrit la Figure 18.

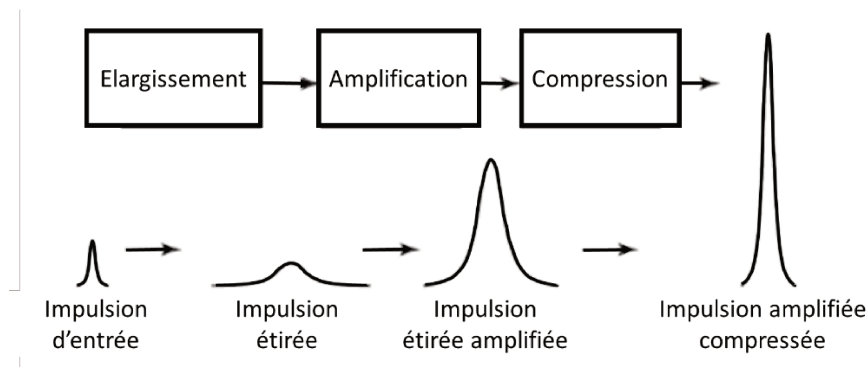


Figure 18 : Schématisation de l'amplification d'une impulsion – élargissement de l'impulsion et réduction de son intensité crête, amplification de l'intensité de l'impulsion étirée puis compression de l'impulsion avec augmentation de son intensité crête

L'impulsion de l'oscillateur entre dans l'amplificateur et est élargie par un système de réseaux. Cet élargissement évite d'endommager le milieu actif en réduisant l'intensité crête des impulsions. L'impulsion est ensuite amplifiée en passant dans un milieu de gain constitué d'un barreau de saphir dopé aux ions de titane. Le milieu de gain est pompé par un laser doublé et pulsé (Empower, Spectra-Physics) avec comme milieu de gain le fluorure de lithium d'yttrium dopé au néodyme (Nd:YLF), il émet un faisceau de 10 W à 527 nm, les impulsions sont délivrées avec un taux de répétition de 5 kHz (9 mJ/pulse). L'amplification dépend du nombre de passages dans la cavité, ce paramètre est contrôlé par deux cellules de Pockels en modifiant la polarisation de l'impulsion. Un compresseur à réseaux est utilisé en sortie de cavité pour réduire la durée temporelle et ré-augmenter l'intensité crête de l'impulsion. Ainsi, à la sortie de l'amplificateur, la durée des impulsions centrées à 800 nm est de 150 fs avec une énergie par impulsion de 200 μ J soit 26 000 fois supérieur à celles produites par l'oscillateur.

III.3 Impulsions pompe et sonde

III.3.1 Impulsion pompe – Doublage de fréquence

Les échantillons seront excités avec une impulsion pompe de longueur d'onde 400 nm. Pour obtenir cette longueur d'onde, le faisceau pompe passe à travers un cristal biréfringent, le BBO (bêta borate de baryum) d'une épaisseur de 1 mm. Ce cristal est utilisé pour la génération de seconde harmonique qui est un effet non linéaire du deuxième ordre où deux photons à une fréquence donnée permettent de générer un photon à la fréquence double, Figure 19.

Pour comprendre ce phénomène, il faut établir les équations d'évolution d'ondes se propageant dans un milieu non-linéaire d'ordre deux. Dans ce cas, le milieu n'est caractérisé que par sa susceptibilité d'ordre deux : $\chi^{(2)}$, ainsi, trois ondes qui se propagent suivant la direction z peuvent interagir entre elles. Leur interaction se décrit de la manière suivante¹³¹ :

$$\begin{cases} \omega_1 = \omega_3 - \omega_2 \leftrightarrow \frac{\partial E_1}{\partial z} = \frac{i\omega_1}{2n_1c} 2\chi^{(2)}(\omega_1; \omega_3, -\omega_2) E_3 E_2 e^{i\Delta kz} \\ \omega_2 = \omega_3 - \omega_1 \leftrightarrow \frac{\partial E_2}{\partial z} = \frac{i\omega_2}{2n_2c} 2\chi^{(2)}(\omega_2; \omega_3, -\omega_1) E_3 E_1 e^{i\Delta kz} \\ \omega_3 = \omega_1 + \omega_2 \leftrightarrow \frac{\partial E_3}{\partial z} = \frac{i\omega_3}{2n_3c} 2\chi^{(2)}(\omega_3; \omega_1, \omega_2) E_1 E_2 e^{i\Delta kz} \end{cases}$$

Avec $\Delta k = k_3 - k_2 - k_1 = \frac{n_3\omega_3 - n_2\omega_2 - n_1\omega_1}{c}$ correspondant au désaccord de phase.

Dans le cas d'un doublement de fréquence, on pose $\omega_1 = \omega_2 = \omega$, $\omega_3 = 2\omega$ et $I_1 = I_2 = I_\omega(0)$.

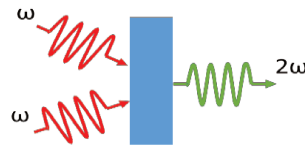


Figure 19 : représentation du doublage de fréquence

On obtient $E_{2\omega}(L) = \frac{i2\omega}{n_{2\omega}c} \chi_e^{(2)} E_\omega^2 e^{-i\Delta kL/2} \frac{e^{i\Delta kL/2} - e^{-i\Delta kL/2}}{i\Delta k}$ par intégration de $\frac{\partial E_3}{\partial z}$ sur

l'intervalle $[0, L]$, L étant la longueur du milieu et en supposant qu'à l'entrée du milieu $E_{2\omega}(0) = 0$

L'intensité vaut alors : $I_{2\omega}(L) = \frac{1}{2} n_{2\omega} c \epsilon_0 |E_{2\omega}(L)|^2 = \frac{2L^2 |\chi_e^{(2)}|^2 \omega^2}{n_\omega^2 n_{2\omega} c^3 \epsilon_0} \sin^2\left(\frac{\Delta kL}{2}\right) I_\omega^2(0)$

On constate alors que l'intensité de la seconde harmonique est proportionnelle au carré de l'intensité du fondamental.

L'intensité est maximale lorsqu'il y a accord de phase, c'est-à-dire $\Delta k = k(2\omega) - 2k(\omega) = 0$, alors :

$$k(2\omega) = 2k(\omega) \leftrightarrow n(2\omega) = n(\omega)$$

Cette condition est satisfaite en utilisant un cristal biréfringent pour lequel $n_o(\omega) = n_e(2\omega, \theta)$. n_o représente l'indice de l'onde ordinaire à la fréquence ω et n_e est l'indice de l'onde extraordinaire à la fréquence 2ω . L'indice extraordinaire dépend de l'angle entre la direction de propagation et l'axe optique du cristal. Il est donc nécessaire d'ajuster cet angle θ pour optimiser l'efficacité du processus de génération de seconde harmonique.

III.3.2 Impulsion sonde – Auto-modulation de phase

Le faisceau sonde nous permet de suivre l'évolution temporelle des chemins de relaxation du chromophore. C'est un continuum de lumière blanche qui est généré par auto-modulation de phase obtenu en focalisant le faisceau amplifié à 800 nm dans un saphir de 2 mm d'épaisseur. La focalisation dans le cristal a pour but d'élargir spectralement l'impulsion par effet Kerr, qui est un effet non-linéaire du troisième ordre¹³⁴.

Comme nous l'avons expliqué ci-dessus, l'effet Kerr se caractérise par un indice de réfraction qui dépend de l'intensité du l'onde s'y propageant¹³¹ :

$$n(t) = n_0 + \frac{1}{2} n' |E(z, t)|^2 = n_0 + n_2 I(z, t)$$

avec n_0 la partie linéaire de l'indice de réfraction, $n_2 = \frac{n'(z, t)}{n_0 c \epsilon_0}$ la partie non-linéaire de l'indice de réfraction. L'indice du milieu dépend donc de l'intensité du faisceau incident. De plus, sachant que :

$$k = \frac{\omega_0}{c} n(t) = \frac{\omega_0}{c} (n_0 + n_2 I(z, t))$$

Et que la fréquence à l'instant t correspond à la dérivée temporelle de la phase :

$$\omega(t) = \frac{\delta}{\delta t} \varphi(t) = \omega_0 - \frac{\omega_0}{c} L \frac{\delta}{\delta t} n(t) \quad \text{avec : } \varphi(t) = \omega_0 t - kL = \omega_0 t - \frac{\omega_0}{c} L n(t)$$

La variation de la fréquence vaut :

$$\Delta\omega(t) = \omega(t) - \omega_0 = -\frac{\omega_0}{c}Ln_2\Delta I(t)$$

L'élargissement spectral est alors proportionnel à l'épaisseur du cristal, à l'intensité et la fréquence centrale des impulsions. En augmentant l'intensité, il est possible d'optimiser l'élargissement spectral, mais le risque de détériorer le cristal est alors plus important. De plus, lorsque l'intensité du faisceau est trop élevée, des filaments sont créés dans le continuum¹³⁵, ces derniers peuvent alors interférer entre eux. Ce qui réduit considérablement la stabilité du continuum et rend l'impulsion inutilisable pour les mesures. Il est donc important d'ajuster l'intensité des impulsions, avec une densité variable et un diaphragme pour ne créer qu'un seul filament qui soit le plus stable possible.

Mais la génération de lumière blanche ne provient pas seulement de l'auto-modulation de phase. D'autres phénomènes rentrent aussi en jeu, comme par exemple, l'auto-focalisation, la diffusion Brillouin ou Raman stimulée, ou encore un mélange paramétrique à quatre photons^{136,137}. Ces phénomènes d'ordre supérieur rendent le continuum instable et ne permettent pas d'avoir un continuum identique d'une expérience à l'autre.

III.4 Montage pompe-sonde

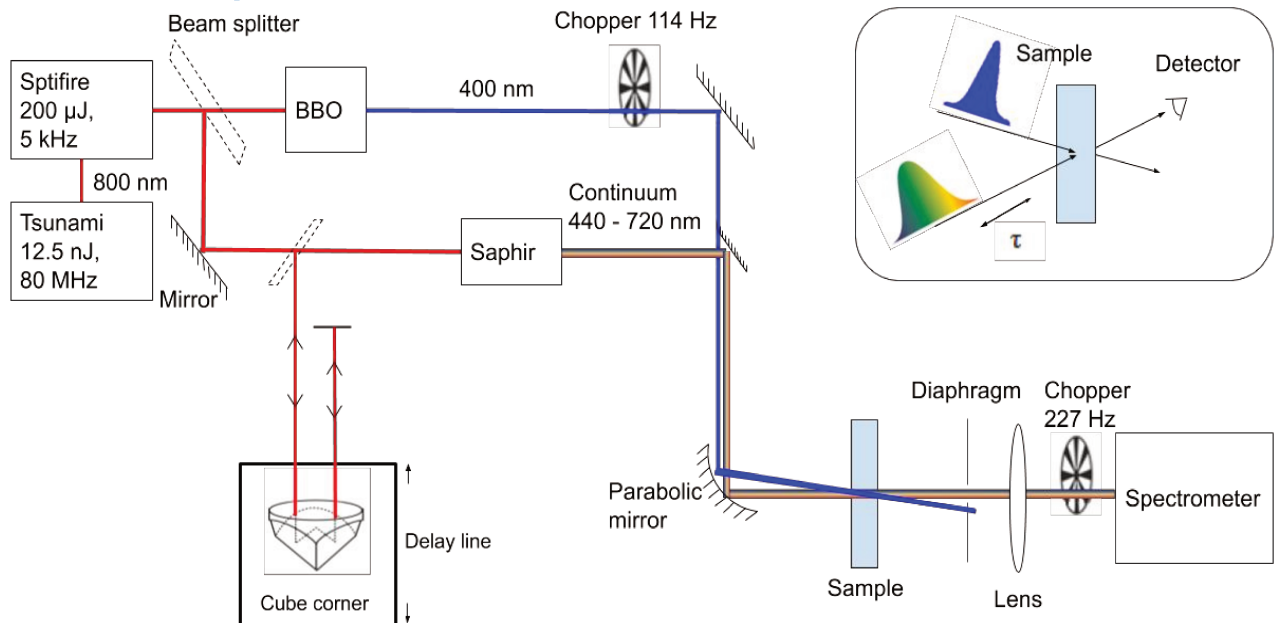


Figure 20 : Schéma du montage pompe sonde utilisé

Le montage pompe-sonde (Figure 20) est constitué d'un oscillateur qui délivre des impulsions à 800 nm qui sont par la suite, amplifiées dans le but d'engendrer des phénomènes non-linéaires tels que la génération de la seconde harmonique ou l'auto-modulation de phase. Les impulsions amplifiées sont séparées en deux pour former le faisceau pompe et le faisceau sonde. Le faisceau pompe est doublé pour exciter l'échantillon à 400 nm et le faisceau sonde est focalisé dans un saphir pour créer un continuum après avoir parcouru le trajet de la ligne à retard. Les deux faisceaux sont ensuite focalisés et superposés spatialement dans l'échantillon. La transmission du faisceau sonde est collectée avec une caméra CCD à la sortie du spectrophotomètre.

III.4.1 Ligne à retard

Dans notre montage, nous avons fait le choix de placer la ligne à retard sur le trajet du faisceau sonde. Pour éviter tout éventuel défaut de cette ligne à retard qui conduirait à des dérives du continuum, et donc, une perte du signal due au désalignement du faisceau sonde, nous y avons placé un coin de cube. Il permet de renvoyer le faisceau réfléchi, dans la même direction que celui incident. En plaçant un miroir plan à l'autre bout de la ligne à retard, le faisceau est renvoyé sur lui-même ce qui permet à la fois, d'augmenter la distance de la sonde en faisant un double aller-retour, et de s'affranchir de tous types de défauts.

III.4.2 Superposition des impulsions – mesure du signal

Afin d'obtenir un signal, nous devons régler la superposition spatiale, pour que les impulsions pompes et sondes soient focalisées à l'entrée de la cuve en un même point. La superposition temporelle s'effectue en modifiant la position de la ligne à retard où la sonde arrive sans retard par rapport à la pompe, dans l'échantillon. Cette position de la platine correspondra au 'zéro temporel'.

Le signal mesuré doit varier linéairement en fonction de l'intensité du signal de la pompe. Il est donc indispensable de régler l'intensité de pompe pour ne pas qu'elle soit trop élevée. Pour se faire, nous avons placé une lame $\lambda/2$ devant le BBO. En effet, le faisceau incident étant polarisé verticalement et le BBO étant sensible à la polarisation de celui-ci, l'angle de la lame $\lambda/2$ permet d'ajuster l'intensité du faisceau pompe en sortie du BBO.

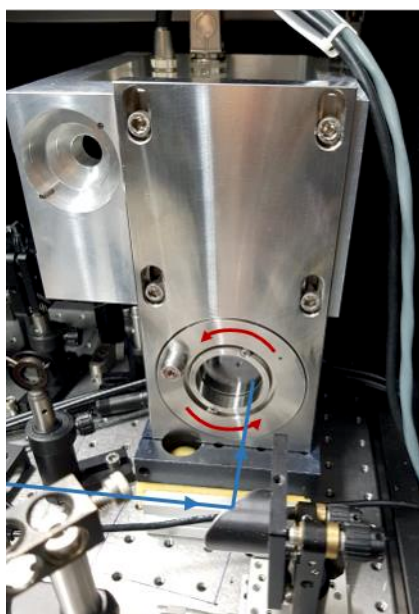
De plus, les mesures ne feront à angle magique, c'est-à-dire, un angle de 54.7° entre la polarisation de la pompe et celle de la sonde, pour les mêmes raisons que celles vues

précédemment, dans le paragraphe II.3. L'angle magique est réglé avec une lame $\lambda/2$ sur le trajet de la pompe.

III.4.3 Mise en place de l'échantillon - Cellule tournante

Pour étudier la dynamique d'émission des molécules, celles-ci doivent se trouver à l'état fondamental avant l'excitation. Il devient alors nécessaire de renouveler le volume excité à chaque nouvelle impulsion pompe pour éviter de sonder des molécules photodégradées. Nous avons testé trois types de cuves : une cuve tenue par un support vibrant effectuant une translation verticale, une cuve à circulation pour renouveler l'échantillon ainsi qu'une cellule tournante. Cette dernière nous a donné les meilleurs résultats. En effet, les deux premières ne convenaient pas à tous nos dérivés car un dépôt blanc se fixait sur le bord de la cuve sur le chemin du faisceau laser. Ce dépôt réduisait alors le signal jusqu'à le faire disparaître. Le dépôt est interprété comme étant dû à la photodégradation, bien que nous ayons vérifié que la puissance de la pompe n'était pas trop élevée. Avec la cellule tournante, le faisceau laser décrit un cercle sur la cuve empêchant ainsi le dépôt de s'y accumuler. Elle est constituée de 2 lames de verres séparées par un joint EPDM d'1 mm d'épaisseur, Figure 21.

a)



b)



Figure 21 : a) cellule tournante montée sur son support, les flèches rouges indiquent le sens de rotation de la cellule et les bleues la trajectoire des faisceaux pompe et sonde b) cellule tournante démontée, composée de deux lames de verre, d'un joint EPDM, et d'un support métallique pour serrer les lames entre elles et éviter des fuites de l'échantillon

Elle tourne à une vitesse de 500 tr/min, cette vitesse est un compromis pour ne pas diminuer le signal par photoblanchiment tout en conservant une température inférieure à 25°C. En effet, plus on augmente la vitesse, plus la cellule chauffe à cause des frottements engendrés par le roulement à bille. Des mesures d'absorbance sont réalisées avant et après l'acquisition afin de vérifier que la solution ne s'est pas dégradée.

III.4.4 Détection

Après avoir traversé l'échantillon, l'impulsion sonde est focalisée sur la fente d'entrée d'un spectrophotomètre. L'intensité de cette impulsion est ensuite mesurée avec une caméra CCD. Afin de pouvoir distinguer le signal sonde sans pompe et avec pompe, la caméra doit être synchronisée avec les *choppers*. Nous mesurons l'intensité de la sonde en absence et en présence du faisceau pompe :

$$I_s = I_0 \cdot 10^{-A_s} \text{ et } I_{p+s} = I_0 \cdot 10^{-A_{p+s}}$$

$$\text{On obtient alors } \Delta A = A_{p+s} - A_s = \log\left(\frac{I_s}{I_0}\right) - \log\left(\frac{I_{p+s}}{I_0}\right) = \log\left(\frac{I_s}{I_{p+s}}\right)$$

$$\text{Or le signal mesuré est de la forme : } \ln\left(\frac{I_{p+s}}{I_s}\right) = \frac{\Delta T}{T}$$

$$\text{Le passage de } \frac{\Delta T}{T} \text{ à } \Delta A \text{ se fait par la relation suivante : } \Delta A = -\frac{1}{\ln(10)} \ln\left(\frac{I_s}{I_{p+s}}\right) = -\frac{1}{\ln(10)} \frac{\Delta T}{T}$$

Trois types de contributions, illustrées sur la Figure 22, peuvent être observées. L'émission stimulée (SE : Stimulated Emission), le blanchiment (GSB : Ground State Bleach) et l'absorption photoinduite (ESA : Excited State Absorption) ou l'absorption du photoproduit (PA : Photoproduct Absorption). Le premier phénomène, SE, correspond à la désexcitation d'une molécule qui revient dans son état fondamental par émission stimulée de photons. Cette émission entraîne une amplification de l'intensité de l'impulsion sonde et se traduit par un signal ΔA négatif. Le deuxième phénomène, GSB, s'explique par une dépopulation de l'état fondamental après le passage de la pompe, il y a donc moins de molécules capables d'effectuer une transition vers S_1 , ce qui réduit l'absorption de l'échantillon. Ce phénomène correspond à un signal ΔA négatif et est observé pour les mêmes longueurs d'onde que celles associées au spectre d'absorption à l'état stationnaire. L'ESA et l'absorption du photoproduit sont des phénomènes induits par la pompe. Les molécules portées à l'état excité S_1 par la

pompe peuvent effectuer des transitions vers des états d'énergie supérieurs via l'absorption des photons de la sonde. Ces signaux se traduisent par un signal ΔA positif.

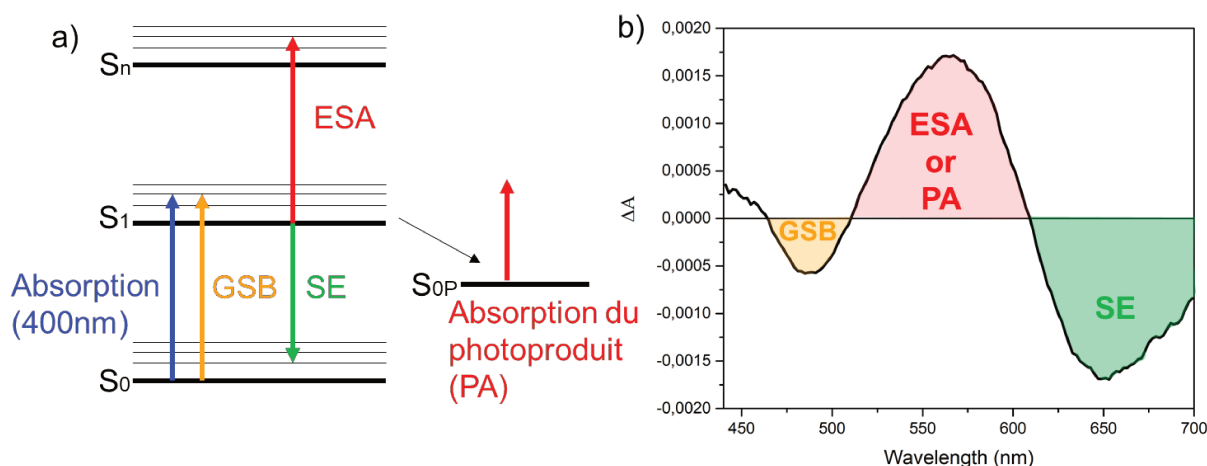


Figure 22. Contributions observables en spectroscopie pompe-sonde, jaune : Ground State Bleach, rouge : Excited-State Absorption, vert : Stimulated Emission. La figure a) représente leur transition électronique et la figure b) est un signal ΔA illustrant les 3 contributions

Pour minimiser le bruit, nous enregistrons une ligne de base que nous soustrairons aux mesures. De plus, une sonde de référence est enregistrée. Nous partageons alors la caméra CCD en deux, les 100 premières lignes lisent le signal de la sonde I et les 100 suivantes lisent le signal de référence R .

Le signal devient alors : $\log \left(\frac{I_s - Bk_s}{R_s - Bk_s} \cdot \frac{R_{p+s} - Bk_{p+s}}{I_{p+s} - Bk_{p+s}} \right)$

Avec I_s l'intensité de la sonde seule, R_s la référence, Bk_s la ligne de base de la sonde.

Les indices $p+s$ indiquent que l'intensité de la sonde est mesurée après une impulsion pompe.

III.5 Résolution temporelle de l'expérience pompe sonde

Pour mesurer la durée de l'impulsion pompe, nous avons utilisé un cristal de ZnS, d'épaisseur 100 μm . Ce semi-conducteur permet de caractériser la durée de l'impulsion grâce au phénomène d'absorption à deux photons. En effet, son énergie de gap étant grande ($E_g = 3.6 \text{ eV}$), les photons de la pompe seule ou de la sonde, ne possèdent pas une énergie suffisante pour que l'électron puisse passer de la bande de valence à la bande de conduction. Lorsque

que les deux faisceaux, pompe et sonde, coïncident temporellement, c'est-à-dire qu'il n'existe aucun retard entre les deux impulsions, un électron de valence peut absorber un photon de la sonde et un de la pompe pour franchir cette bande interdite, Figure 23.

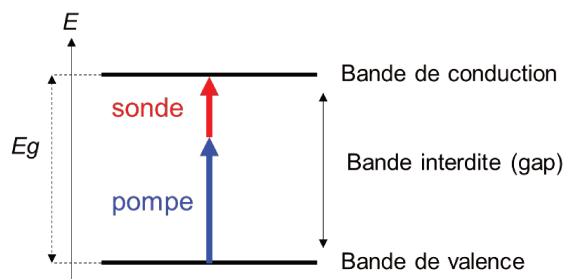


Figure 23 : schéma de l'absorption à deux photons dans le semi-conducteur ZnS

En effet, l'énergie du photon pompe (à 400 nm) est de 3.06 eV et celle de la sonde varie entre 1,75 eV et 2,9 eV d'après la formule $E(eV) = \frac{hc}{\lambda * 1,6 * 10^{-19}}$. En enregistrant la transmission du faisceau sonde traversant le ZnS, nous obtenons le signal 2D, Figure 24. En procédant à une coupe temporelle à la longueur d'onde 550 nm, nous pouvons effectuer un fit gaussien pour déterminer la largeur de l'impulsion du faisceau pompe, qui est ici 170 fs.

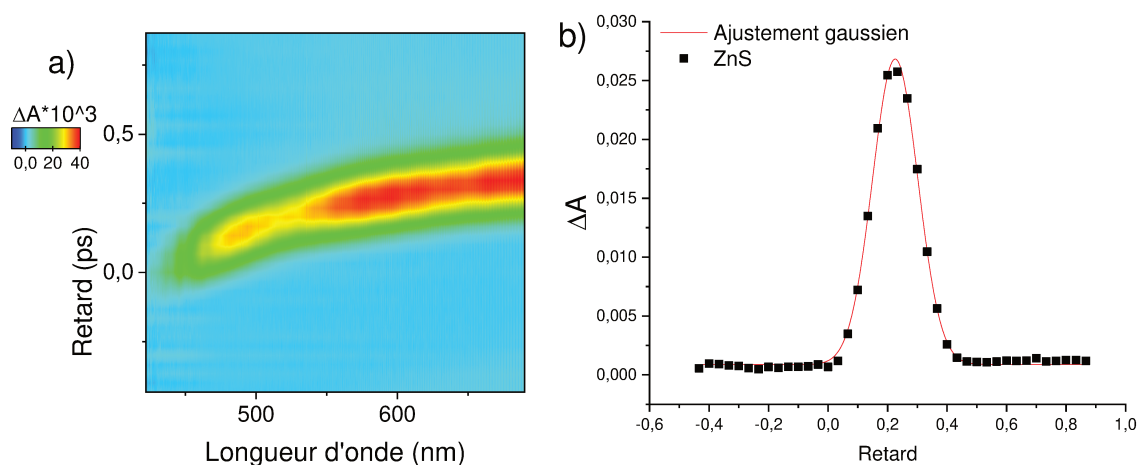


Figure 24 : a) signal 2D du signal ΔA du ZnS et b) coupe à la longueur d'onde 550 nm avec un fit gaussien d'une largeur de 170 fs

La résolution temporelle de l'expérience ne dépendant que de la largeur du faisceau pompe, nous pouvons en déduire que la résolution de notre manipulation pompe sonde est de 170 fs.

III.6 Traitement et analyse des données

Avant d'analyser les données, plusieurs traitements en amont sont nécessaires. Tout d'abord, il est important de retrancher le signal du solvant aux signaux bruts. Ensuite, les données doivent être redressées du chirp, induit principalement par le saphir. Et enfin, nous

procéderons à une analyse globale à l'aide de la décomposition en valeur singulière (SVD – Singular Value Decomposition) qui permet de filtrer le bruit des données, et d'extraire les différentes constantes de temps des contributions. Ensuite, les Decay Associated Spectra (DAS) seront utilisés pour associer un spectre à chaque constante de temps.

III.6.1 Correction du solvant

Pour soustraire au mieux le signal du solvant aux données, nous faisons une acquisition avec le solvant seul, après chaque mesure pour être dans les mêmes conditions expérimentales. En effet, la contribution du solvant n'étant pas nulle, celle-ci doit être soustraite afin d'enlever cette composante à nos résultats. De plus, les conditions expérimentales ne sont pas exactement les mêmes d'un jour à l'autre, d'où l'importance de mesurer les deux signaux (molécule – solvant) l'un après l'autre.

La correction se fait avec la formule suivante : $\Delta A = \Delta A - k * \Delta A_{\text{solvant}}$

Le facteur k est utilisé pour moduler le signal du solvant qui peut être plus ou moins faible d'une acquisition à l'autre, Figure 25.

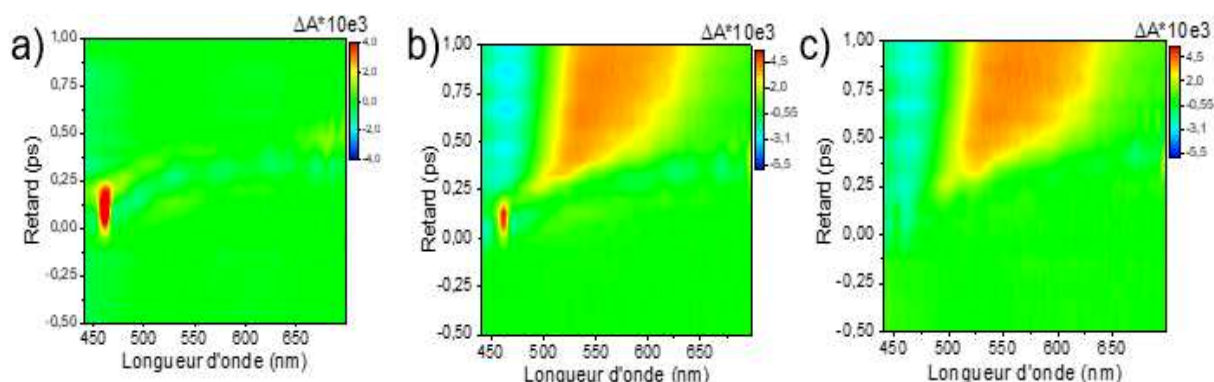


Figure 25 : a) représente le signal de solvant b) représente les données brutes, c) correspond aux données après soustraction du signal de solvant

III.6.2 Correction du chirp

Le saphir, générant le continuum par auto-modulation de phase, introduit un *chirp*. C'est-à-dire qu'il retarde les longueurs d'onde bleues par rapport aux rouges, de quelques centaines de femtosecondes. Le chirp est corrigé manuellement, à la fin d'une acquisition. Nous plaçons des points en suivant le signal du solvant et une procédure informatique détermine une fonction polynomiale $P(\lambda, t)$ dépendant du temps et des longueurs d'onde passant par ses

différents points. Avec une interpolation, nous pouvons finalement corriger le chirp des données (voir Figure 26) :

$$\Delta A(\lambda, t_{corr}) = \Delta A(\lambda, t + P(\lambda, t))$$

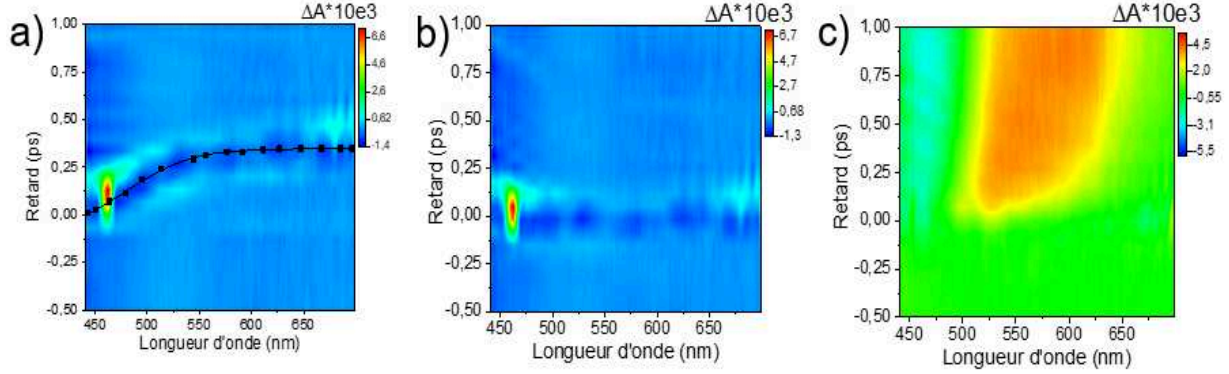


Figure 26 : a) représente le signal du solvant avec les points relevés pour le redressement des données avec la fonction polynomiale passant par ces points. B) et c) correspondent respectivement au signal de solvant puis de la molécule corrigé du chirp

III.6.3 Analyse des données pompe-sonde

Tout comme le déclin de fluorescence mesuré par TCPSC, le signal ΔA correspond à une somme de fonctions exponentielles d'amplitude associée A décrit de la façon suivante : $\Delta A = \sum_{i=1}^N A_i e^{-(t-t_0)/\tau_i}$ où τ_i est la durée de vie de l'état i et où t_0 représente le zéro temporel du signal. De plus, le signal est aussi convolué avec l'IRF de notre expérience. Cette IRF est définie par une fonction gaussienne, on obtient alors : $\Delta A = \sum_{i=1}^N A_i e^{-(t-t_0)/\tau_i} * \frac{1}{\sigma\sqrt{2}} e^{-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}}$, σ représentant l'écart type de la fonction gaussienne et qui est mesuré avec le ZnS (6. Résolution temporelle de l'expérience pompe sonde).

Le signal ΔA est défini par une acquisition enregistrant un signal dépendant du temps pour toutes les longueurs d'onde comprises entre 440 nm et 700 nm. Pour chacune des longueurs d'onde, il existe une fonction de fit, comme décrit ci-dessus. Le fit permet de retrouver les temps caractéristiques associés aux contributions à une longueur d'onde donnée. Afin de suivre toute la dynamique d'émission de la molécule sans sélectionner une longueur d'onde particulière, nous procédons à une analyse globale. Celle-ci consiste en une décomposition de la matrice d'acquisition en valeurs singulières qui permettent de retrouver les spectres de décroissance associés.

III.6.4 Singular Value Decomposition - SVD

Les résultats de la spectroscopie résolue en temps sont rangés dans une matrice en fonction des longueurs d'onde et du retard : $Data_{i,j} = D(\lambda_i, t_j)$. La décomposition en valeurs singulières est un outil mathématique qui décompose la matrice de la façon suivante :

$$Data_{i,j} = \sum_{mn} U_{im} S_{mn} W_{nj} = \sum_n U_n(\lambda_i) s_n W_n(t_j)$$

S_{mn} est une matrice diagonale comportant les valeurs singulières s_n . U_{im} est une matrice qui contient les n spectres singuliers, associés aux valeurs singulières. Et enfin, W_{nj} contient n cinétiques singuliers, Figure 27.

Les valeurs singulières sont rangées dans l'ordre décroissant ainsi les premières valeurs représentent les composantes principales du signal, puis, plus les valeurs sont faibles, moins elles impacteront le produit final. Nous pouvons donc, à partir d'un nombre de valeurs singulières réduit, obtenir une approximation du signal original, dont la similarité augmentera avec le nombre de valeurs conservées. Ainsi, pour ne conserver que le signal et filtrer le bruit, il est nécessaire de définir le nombre réduit de valeur singulières à conserver. Ce choix dépendra des fits réalisés sur les vecteurs singuliers, décrits dans le paragraphe suivant, Figure 28, il est en général entre 2 et 5.

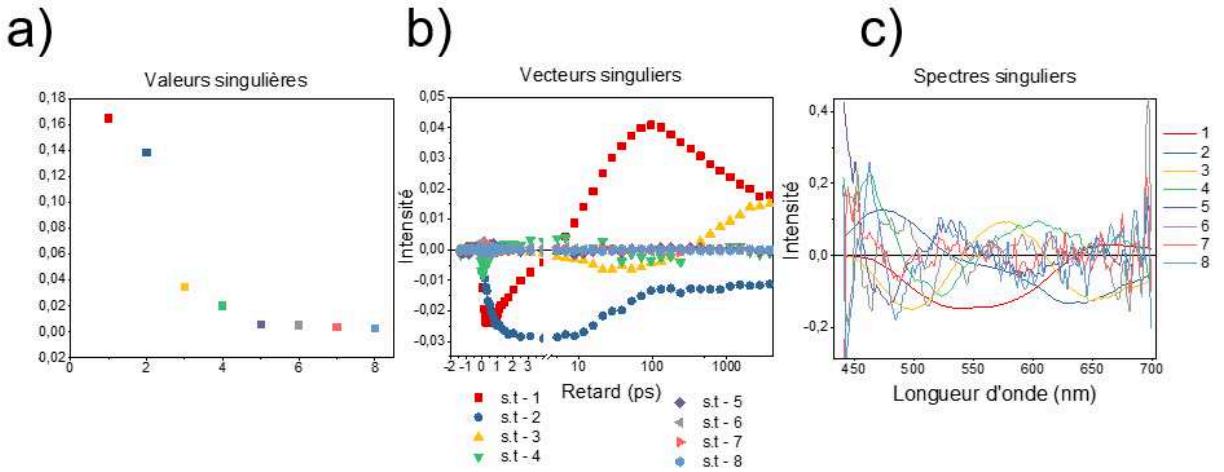


Figure 27 : les trois figures représentent a) les valeurs singulières, b) les vecteurs singuliers et c) les spectres singuliers déterminés après l'analyse globale

III.6.5 Analyse globale

L'analyse globale est utilisée pour retrouver les constantes de temps des contributions du signal. Pour ce faire, les premiers vecteurs singuliers sont ajustés simultanément, avec une fonction multi-exponentielle :

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \cdot \exp\left(\frac{-(t - t_0)}{\tau_i}\right) * \frac{1}{\sigma\sqrt{2}} e^{-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}}$$

Les amplitudes α_i sont 'libres', c'est-à-dire qu'elles sont calculées pour chaque vecteur singulier, alors les constantes de temps τ_i sont 'partagées' dans le but de chercher les mêmes constantes de temps dans toutes les cinétiques singulières.

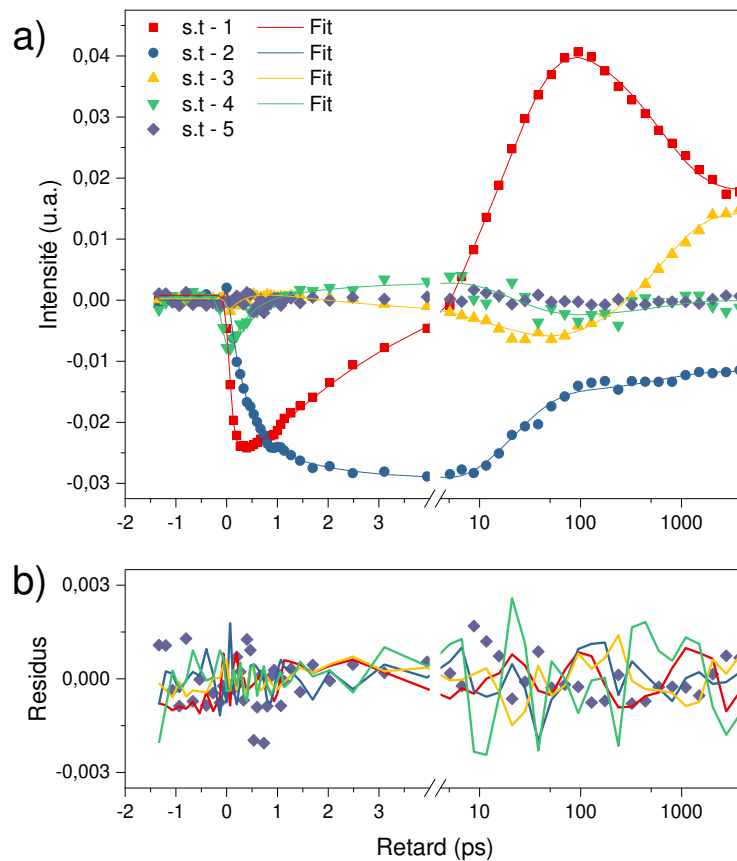


Figure 28 : a) correspond aux vecteurs singuliers ainsi que leur fit associé. Les résidus sont tracés sur la figure b) avec le 5^{ème} vecteur singulier, son amplitude est du même ordre de grandeur que celle des résidus des fits

Sur la Figure 28a, les cinq premiers vecteurs singuliers sont représentés avec des symboles, et les fits des 4 premiers sont tracés avec une courbe pleine. La Figure 28b représente les résidus des fits. Nous pouvons constater que l'amplitude du 5^{ème} vecteur singulier est du même ordre

de grandeur que les résidus. Il n'est donc pas pertinent d'ajouter cette courbe à notre analyse. Ainsi, dans cet exemple, seul les 4 premiers vecteurs singuliers sont retenus.

III.6.6 *Decay Associated Spectra (DAS)*

L'analyse globale des vecteurs singuliers permet d'extraire les différentes constantes de temps ainsi que leurs amplitudes associées. La dernière étape du traitement de données consiste à construire les DAS. Pour chaque constante de temps obtenue, correspond un DAS qui décrit l'évolution spectrale du facteur pré-exponentiel correspondant.

Nous pouvons réécrire les vecteurs singuliers de la sorte :

$$s_n W_n(t_j) = \sum_{\alpha=1,N} A_{n\alpha} e^{-\frac{t_j}{\tau_\alpha}}$$

Et ainsi réécrire les données :

$$Data_{i,j} = \sum_n U_{in} * \sum_{\alpha=1,N} A_{n\alpha} e^{-\frac{t_j}{\tau_\alpha}} = \sum_{\alpha=1,N} \left[\sum_n U_{in} A_{n\alpha} \right] e^{-\frac{t_j}{\tau_\alpha}} = \sum_{\alpha=1,N} [DAS_{i\alpha}] e^{-\frac{t_j}{\tau_\alpha}}$$

$$DAS_{i\alpha} = \sum_n U_{in} A_{n\alpha} = \sum_n U_n(\lambda_i) A_{n\alpha}$$

La matrice A contient n lignes, où n correspond au nombre de vecteurs singuliers qui ont été pris en compte, et α colonnes, où α est le nombre de fonctions exponentielles utilisées pour modéliser entièrement la dépendance temporelle.

La Figure 29 est un exemple contenant en a), les données pompe-sonde ($Data_{i,j}$) et en b), les DAS qui permettent d'interpréter la dynamique de la molécule. Une amplitude positive d'un DAS est associée à une diminution du signal ΔA , donc soit d'un déclin d'un signal positif (ESA) ou soit d'une croissance d'un signal négatif (SE ou GSB) et inversement pour une amplitude négative.

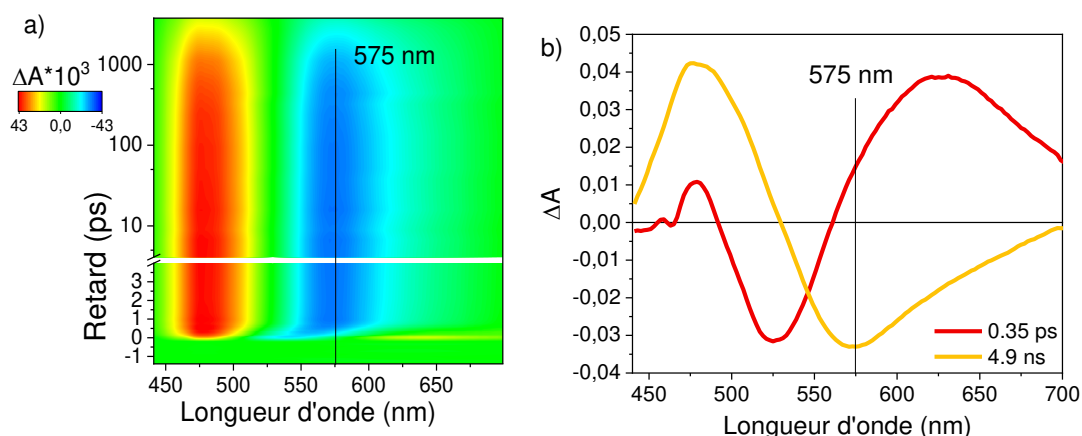


Figure 29: a) représente l'acquisition 2D d'un signal obtenu avec un dérivé (4-MeOxyLH) constitué de trois contributions, deux positives et une négative, b) correspond au DAS de l'analyse globale l'ESA et la SE sont ici des contributions ayant une cinétique bi-exponentielle

Sur l'exemple de la Figure 29b, à la longueur d'onde 575 nm, l'amplitude du DAS associé à 0.3 ps (rouge) est positive, or comme la contribution du signal ΔA est négative (Figure 29a), le DAS est associé à la croissance de cette contribution. La deuxième constante à 4.9 ns (jaune) a une amplitude de DAS négative, qui s'explique sur nos données, comme une décroissance de la contribution négative.

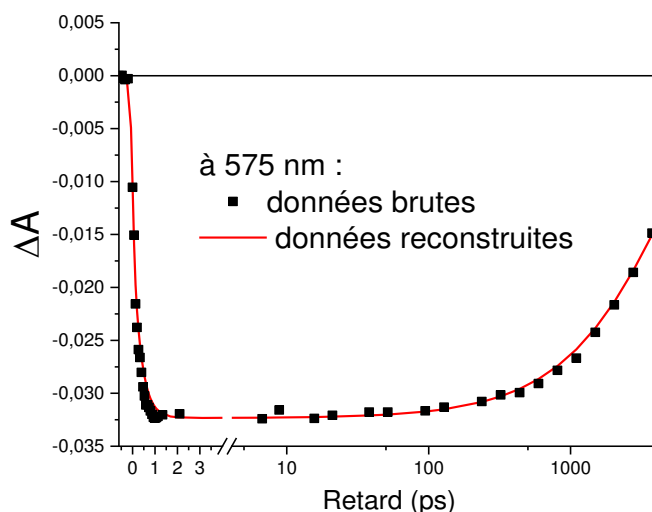


Figure 30 : la courbe en pointillé représente le signal brut mesuré à 575 nm, la courbe pleine est le signal reconstruit par l'analyse globale

Pour finir, afin de vérifier que la matrice de données reconstruite par l'analyse globale ($Data_{i,j}$) avec 4 valeurs propres, conserve le signal majeur et réduit le bruit, il suffit de vérifier pour quelques longueurs d'onde que la coupe temporelle de la nouvelle matrice s'ajuste avec celle des données brutes. La Figure 30 est un exemple pris à la longueur d'onde 575 nm. Les

données reconstruites (courbe pleine) s'ajustent parfaitement avec les données brutes (courbe avec symboles) et ne contiennent plus de bruit.

Partie IV

Etude des propriétés optiques de l'oxyluciférine en solution aqueuse

IV.1 Introduction

La bioluminescence créée par les êtres vivants peut varier de la couleur verte (536 nm) à rouge (638 nm)⁸⁰, principalement sous l'action de paramètres environnementaux comme la température ou le pH. Pour comprendre ce phénomène, un grand nombre d'études se sont penchées sur cette question, démontrant que l'OxyLH₂, produit de la réaction, peut exister sous six formes chimiques différentes, Figure 31. Ces formes résultent d'une tautomérisation entre la forme kéto et énol, et de la déprotonation des groupes phénols ou énols. Ces différents équilibres ou interconversions compliquent considérablement l'étude et la compréhension du mécanisme d'émission de la bioluminescence de l'OxyLH₂. Afin d'étudier les propriétés optiques de ces différentes espèces, des dérivés de l'OxyLH₂ ont été synthétisés.

Par abus de langage, nous utiliserons par la suite les termes phénol pour nommer la partie benzothiazole et énol pour nommer la partie thiazole de l'oxyluciférine. Le but de cette partie, est de déterminer le chemin de photoluminescence de l'oxyluciférine en solution aqueuse. Nous nous intéresserons principalement aux équilibres existants dans l'état excité à l'aide de la spectroscopie pompe-sonde. Nous étudierons tout d'abord les deux composés imitant la forme kéto, 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL et 5,5-Cpr-OxyLH grâce au groupe cyclopropyle qui stabilise la forme kéto, Figure 31. Puis ceux imitant les formes énol 4,6'-DMeOxyL et 4-MeOxyLH. Certains groupes hydroxyles ont été remplacés par des groupes méthoxyles (représentés en rouge sur la Figure 31) empêchant une ionisation dans l'état S₀ ou dans l'état S₁. Cela signifie qu'aucun transfert de proton n'est possible, même à pH élevé. Le 4-MeOxyLH et 5,5-Cpr-OxyLH portent un groupe hydroxyle (représentés en vert sur la Figure 31) sur la partie phénol, ils ont donc la possibilité de transférer un proton au solvant. Ces deux dérivés permettent de suivre et de caractériser la déprotonation de la forme phénol qui produit alors l'ion phénolate. L'analyse séparée des deux formes, avec la spectroscopie pompe-sonde, va servir à relever les différentes contributions associées à chacune des espèces et servira de base à l'étude du 6'MeOxyLH et de l'OxyLH₂, où les deux formes phénol-énol et phénol-kéto sont en équilibre à l'état fondamental.

Le 5^{ème} dérivé, 6'MeOxyLH, contient un groupe hydroxyle sur la partie énol, ce composé nous sera donc utile pour caractériser la déprotonation énol/énolate mais aussi une éventuelle interconversion kéto/énol à l'état excité. Quant au produit de la réaction, l'oxyluciférine, celui-ci a aussi été synthétisé, avec deux groupes hydroxyles et peut donc subir toutes les réactions

déjà vues avec les dérivés précédents en plus d'une déprotonation totale qui génère le di-anion (phénolate-énolate).

Afin de simplifier la lecture nous noterons **R** la forme phénol-énol, et **R⁻** la forme phénol-kéto (= note la double liaison) puis nous ajouterons ⁻ pour noter la déprotonation, par exemple : **⁻R⁻** pour phénolate-kéto.

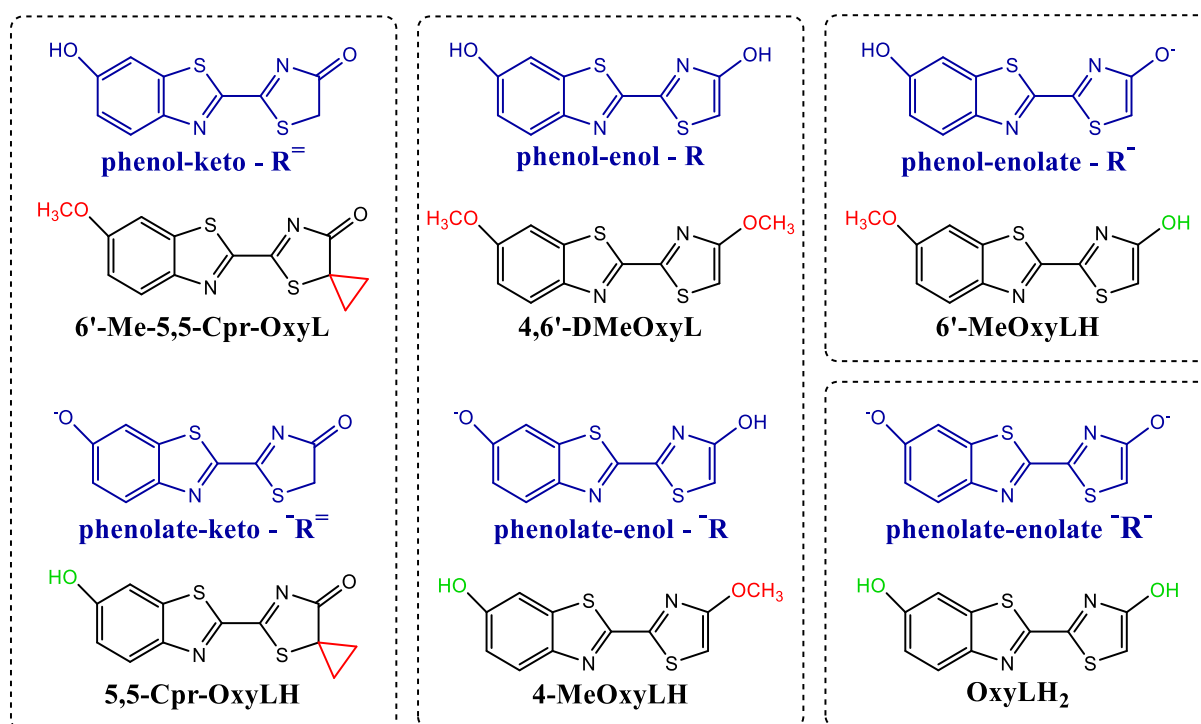


Figure 31 : formes chimiques en bleu et dérivés synthétiques en noir. Les groupes hydroxyles en vert, sur les dérivés synthétiques, peuvent subir une déprotonation tandis que les groupes méthoxy ou le cycle cyclopropyle représentés en rouge ont pour but de bloquer respectivement la forme protonée ou la forme kéto

Ainsi nous commencerons ce chapitre en étudiant la forme kéto de l'OxyLH₂ en utilisant les dérivés 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL et 5,5-Cpr-OxyLH à pH 5 et pH 11. L'intérêt d'utiliser les deux composés et les deux pH, est de pouvoir étudier les différentes formes, phénol-kéto/phénolate-kéto. En effet, le 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL imite la forme phénol-kéto quel que soit son pH et le 5,5-Cpr-OxyLH imite la forme phénolate-kéto à pH 11 (pK_a = 7,8), Figure 32a. Ainsi, en attribuant les bonnes signatures à ces deux formes, nous pourrions interpréter plus facilement le transfert de proton à l'état excité (ESPT) de la forme phénol-kéto à la forme phénolate-kéto se produisant à pH 5(Figure 32b).

La deuxième partie concernera l'espèce énol. Nous utiliserons la même méthode que précédemment pour caractériser les contributions de la forme phénol-énol avec le 4,6'-

DMeOxyL pour tout pH et phénolate-énol avec le 4-MeOxyLH à pH 11. Enfin le transfert de proton pourra être observé avec ce même dérivé à pH 5.

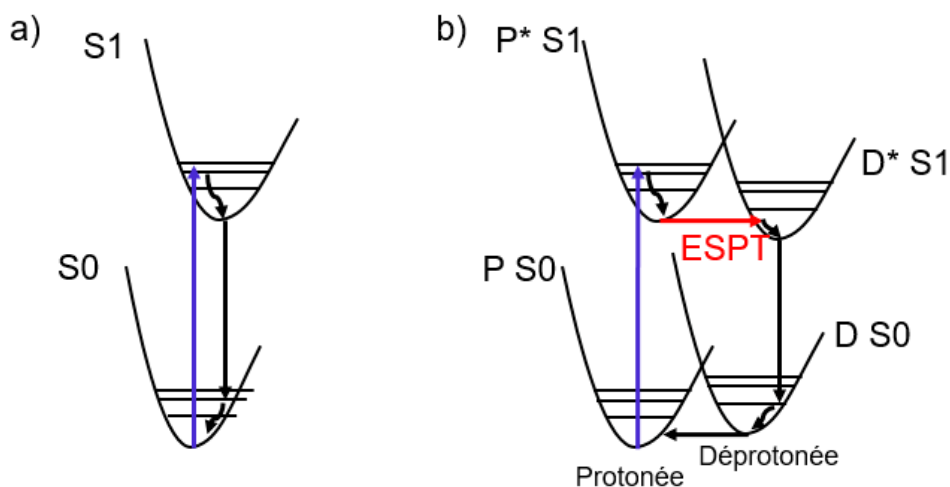


Figure 32 : Schéma des réactions à l'état excité, a) désexcitation pour un composé n'ayant pas de réaction à l'état excité (composés bloqués ou à pH 11), b) transfert de proton à l'état excité se produisant pour des composés à pH 5.

La troisième partie portera sur le dérivé 6'MeOxyLH qui, en plus d'une déprotonation, peut subir une interconversion aussi bien à l'état fondamental qu'à l'état excité entre les formes énol et kéto. Son étude sera très proche de celle de l'OxyLH₂ qui fera l'objet de la dernière partie de ce chapitre. En effet, la seule différence entre ces deux dérivés, est le groupe hydroxyle remplacé par un groupe méthoxy sur la partie phénol qui bloque sa déprotonation pour le dérivé 6'MeOxyLH.

IV.2 Propriétés de la forme kéto

IV.2.1 Analyse à l'état stationnaire et résolue en temps

Le premier dérivé, 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL, composé d'un groupe méthoxy et d'un groupe cyclopropyle, ne donne lieu à aucune réaction ni à l'état fondamental ni à l'état excité et ce quel que soit le pH. Son spectre d'absorption et d'émission ainsi que son déclin de fluorescence sont représentés sur la Figure 33 et représentent les caractéristiques de la forme phénol-kéto.

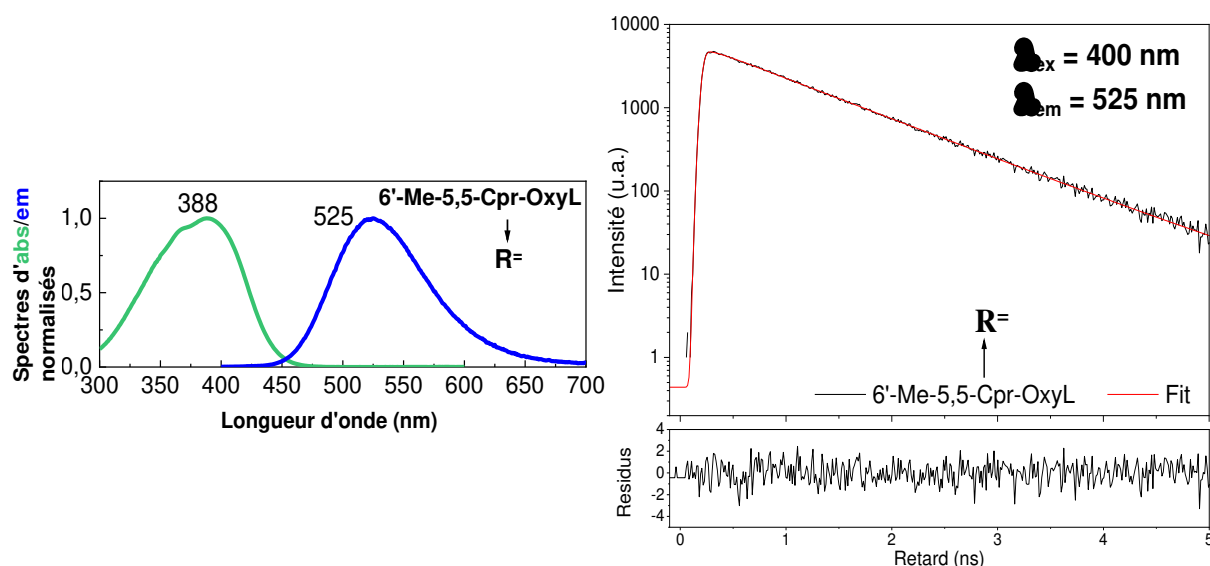


Figure 33 : spectres d'absorption et d'émission normalisés du 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL à gauche. Déclin de fluorescence (courbe noire) et son fit (courbe rouge) ainsi que les résidus du même composé, à droite.

L'absorption présente un maximum centré à 388 nm qui est associé à la transition S0-S1. Un épaulement est également visible autour de 360 nm, ce dernier correspond à la transition S0-S2⁴⁹. Le maximum d'émission se situe, quant à lui, autour de 525 nm. Le déclin de fluorescence est mesuré avec l'expérience de TCSPC, l'excitation est à 400 nm et l'émission est mesurée à 525 nm. Le déclin de fluorescence est mono-exponentiel et la durée de fluorescence de la forme phénol-kéto est de 930 ps. Ce temps de vie est retrouvé à partir du fit du déclin par une fonction mono-exponentielle décrite dans la partie II.3.

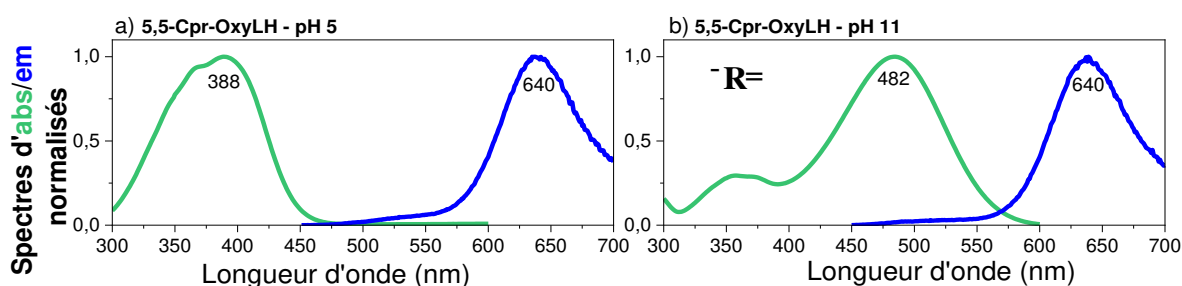


Figure 34 : Spectres d'absorption et d'émission normalisés du dérivé 5,5-Cpr-OxyLH à pH 5 (a) et pH 11 (b)

Le dérivé composé 5,5-Cpr-OxyLH contient lui, un groupe hydroxyle pouvant se déprotoner sur la partie phénol. Nous pourrions ainsi étudier l'ESPT entre la forme phénol-kéto et phénolate-kéto. De même que précédemment, nous mesurons son spectre d'absorption et d'émission, mais cette fois-ci à deux pH : 5 et 11 (Figure 34). L'intérêt d'utiliser ces deux pH est de

comparer la forme protonée à celle déprotonée. En effet, le pKa étant de 7,8, à pH 5, le composé se trouve à l'état fondamental, sous la forme phénol-kéto et à pH 11, sous la forme phénolate-kéto. Ainsi, à pH 5, le maximum d'absorption de la forme phénol-kéto est situé à 388 nm (comme pour le 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL, Figure 33). Un épaulement est également visible à 360 nm ce dernier est associé à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du groupe kéto et à la transition $n \rightarrow \pi^*$ associée à la liaison OH du groupe benzothiazole. Le spectre d'absorption de la forme phénolate-kéto est centré à 482 nm avec un épaulement à 360 nm. Cet effet bathochromique, c'est-à-dire un décalage dans le rouge, provient de la diminution de l'écart entre le niveau fondamental et le niveau excité due à la déprotonation de la partie phénol. Les spectres d'émission à pH 5 et pH 11 présentent un maximum centré à 640 nm. L'émission à 525 nm, caractéristique de la forme phénol-kéto (Figure 33) n'est observée que par un léger épaulement, sur ce dérivé à pH 5.

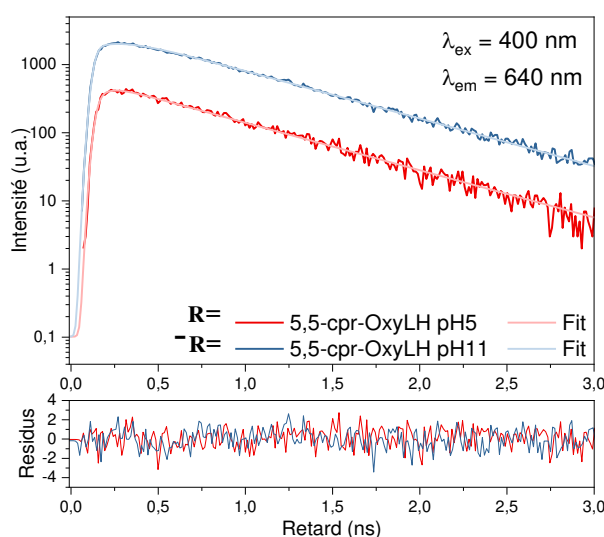


Figure 35 : Déclin de fluorescence du dérivé 5,5-Cpr-OxyLH à pH 5 (courbe rouge) et pH 11 (courbe bleue) avec leur fit, et les résidus

Les mesures de fluorescence résolue en temps, réalisées à pH 5 et pH 11, sont représentées sur la Figure 35. A pH 5, les données expérimentales sont ajustées par un modèle bi-exponentiel. La première constante de temps vaut 0,62 ns, cette dernière est également retrouvée à pH 11. La seconde, qui est de l'ordre de 60 ps, correspond à la limite de la résolution temporelle du montage, elle peut donc être inférieure à cette mesure. Nous pouvons donc facilement identifier la constante de 620 ps comme étant la durée de vie de la forme phénolate-kéto. A pH 5, la constante de temps courte présente une amplitude négative qui

correspond à un temps de montée associé à la formation de l'espèce déprotonée. Cette constante courte, non résolue, peut être due à l'ESPT.

IV.2.2 Analyse à l'état excité – spectroscopie pompe-sonde

La spectroscopie pompe-sonde nous permet d'accéder à des temps beaucoup plus courts que l'expérience de TCSPC. Elle est donc utilisée pour déterminer la constante non résolue du déclin à pH 5 du dérivé 5,5-Cpr-OxyLH. Pour commencer, nous allons tout d'abord caractériser les contributions de la forme phénol-kéto avec le dérivé 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL (Figure 36).

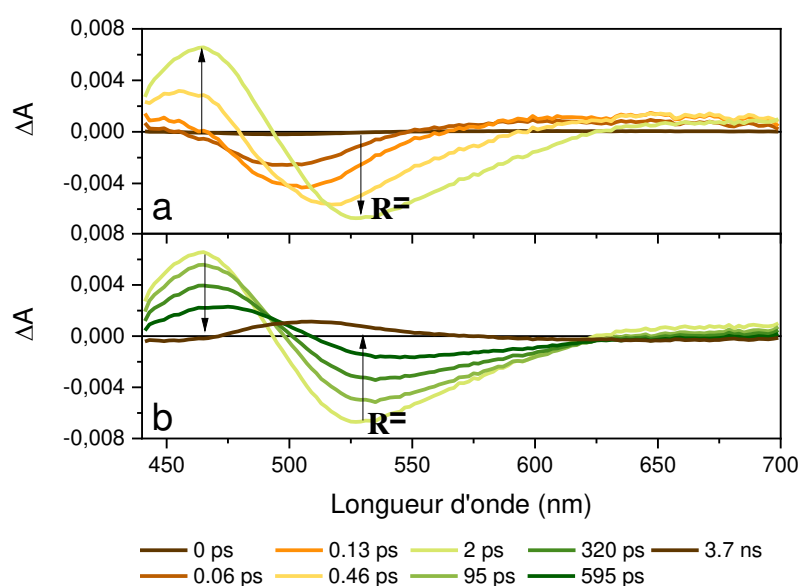


Figure 36 : Signal ΔA du dérivé 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL en fonction des longueurs d'onde, mesuré à plusieurs retards

La mesure pompe-sonde révèle deux contributions, une positive à 470 nm correspondant à une ESA (*Excited State Absorption*), et une négative à 525 nm, correspond à la SE (*Stimulated Emission*) associée à l'émission de fluorescence observée à l'état stationnaire. Ces deux contributions évoluent de manière conjointe au court du temps. Elles croissent en quelques picosecondes (Figure 36a), avec un léger décalage spectral pour la SE qui est dû à la relaxation vibrationnelle ou de la solvation, puis l'ESA et la SE diminuent avec le même temps caractéristique (Figure 36b).

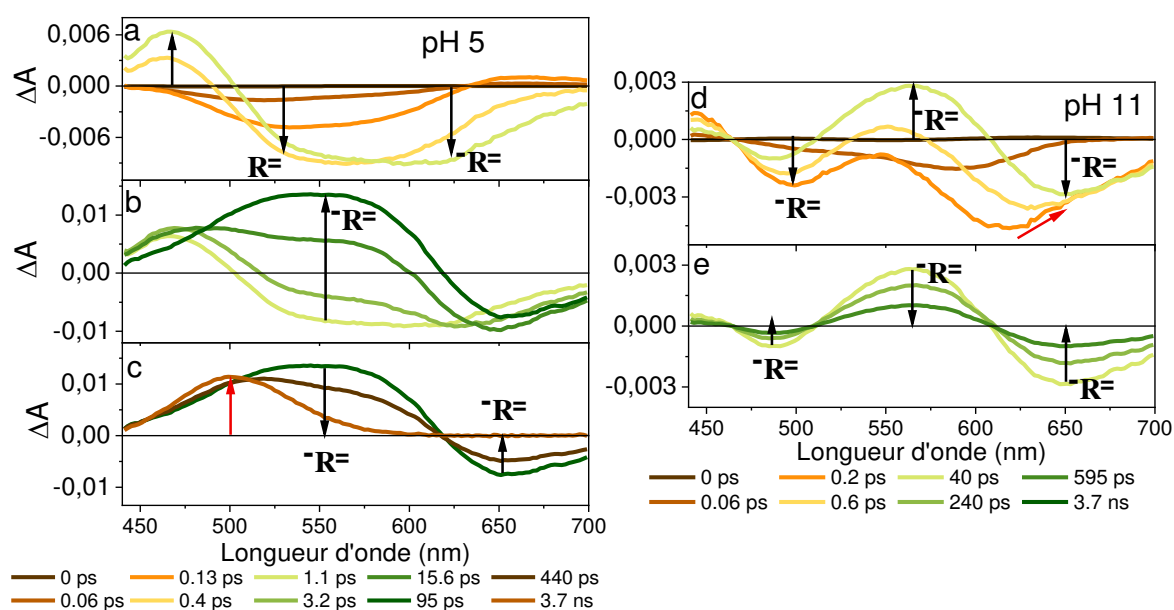


Figure 37 : Signal ΔA du dérivé 5,5-Cpr-OxyLH en fonction des longueurs d'onde, mesuré à plusieurs retards à pH 5 (gauche) et pH 11 (droite)

La même expérience est réalisée avec le dérivé 5,5-Cpr-OxyLH aux deux pH. Des spectres à différents retards sont tracés à pH 5 et à pH 11 sur la Figure 37. A pH basique, trois contributions de la forme phénolate-kéto, sont facilement identifiables, la première est négative et se situe autour de 480 nm. Cette longueur d'onde coïncide avec l'absorption à l'état stationnaire du dérivé, cette contribution est donc un GSB (*Ground State Bleach*). La deuxième autour de 550 nm est positive et correspond à une ESA, et enfin la dernière, négative à 640 nm, est une SE conforme au signal de fluorescence à l'état stationnaire. Les deux dernières contributions croissent en se décalant spectralement vers le rouge à cause de la relaxation vibrationnelle ou de la solvation (Figure 37d). Les trois contributions diminuent ensuite avec le même temps caractéristique (Figure 37e). A pH acide, un premier signal observé à 475 nm est présent tout au long de l'acquisition. Il persiste encore à la fin de l'acquisition avec un léger décalage vers 500 nm. Il correspond tout d'abord à une ESA, puis après le décalage spectral, le signal persistant à la fin de l'acquisition correspond à l'absorption du photoproduit. En effet la reconversion vers la forme protonée étant plus lente que 3,7 ns (la limite temporelle de notre expérience), nous observons donc un signal positif à la longueur d'onde d'absorption de la forme déprotonée (dérivé à pH 11). En plus de l'ESA, deux contributions négatives sont aussi identifiables. Une première qui croît dès 0.04 ps à 525 nm.

C'est une SE qui correspond à l'émission de la forme protonée, en accord avec l'émission à l'état stationnaire représentée sur la Figure 33. La deuxième SE croît avec un léger décalage temporel par rapport à la première, elle se situe à 640 nm, et correspond à l'émission de la forme déprotonée, aussi présente à pH 11 (Figure 37a). Ensuite, la SE à 525 nm décroît pour laisser apparaître une ESA, centrée autour de 550 nm. Au bout de 95 ps, nous pouvons distinguer l'ESA à 550 nm et la SE à 640 nm (Figure 37b), deux contributions aussi retrouvées à pH 11 (Figure 37d) et associées à la forme déprotonée, phénolate-kéto. Le déclin de la SE protonée ainsi que la montée de la SE et de l'ESA déprotonées sont les signatures caractéristiques d'un ESPT. Nous observons ici la décroissance de la forme phénol-kéto qui se transforme en phénolate-kéto par transfert de proton au solvant.

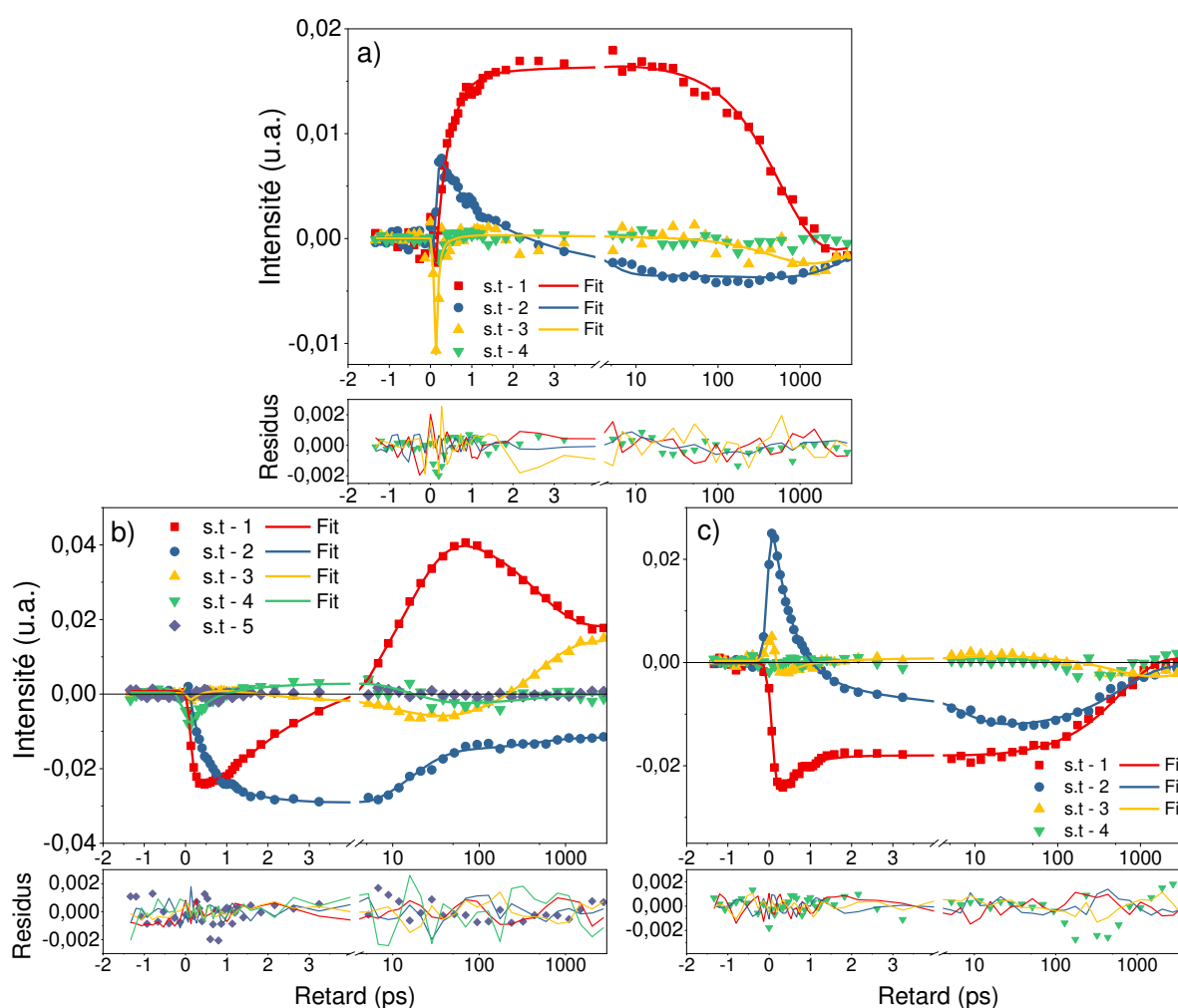


Figure 38 : a) correspond aux quatre premiers vecteurs singuliers (S.T) du 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL, les trois premiers sont ajustés avec une fonction multi exponentielle. b) correspond aux cinq premiers S.T du 5,5-Cpr-OxyLH à pH 5, les quatre premiers sont ajustés avec une fonction multi exponentielle. c) correspond aux quatre premiers S.T du 5,5-Cpr-OxyLH à pH 11, les trois premiers sont ajustés avec une fonction multi exponentielle.

Pour caractériser plus précisément la dynamique de la forme phénol-kéto, nous procédons à une analyse globale. Les vecteurs singuliers (S.T Singular Transient) sont représentés sur la Figure 38 . Pour le 6'-Me-5,5-Cpr-Oxyl et 5,5-Cpr-OxylH à pH 11, seulement les trois premiers S.T. sont nécessaire pour caractériser l'intégralité de la dynamique d'émission et toutes les constantes de temps. En effet, comme l'amplitude du 4^{ème} S.T ne dépassant pas celle des résidus, ajouter cette courbe à l'analyse globale n'apportera pas plus de précision. De plus, nous pouvons remarquer pour le 6'-Me-5,5-Cpr-Oxyl, l'existence d'une constante de temps très courte. Celle-ci est ajustée à l'aide d'un 'Atau' dans la fonction de fit, c'est-à-dire une amplitude multipliée par un temps. En général, ces constantes de temps non résolues, proviennent du signal de solvant qui n'est pas parfaitement retranché au signal de la molécule. Cette dynamique n'appartient donc pas à celle de l'émission du dérivé. Pour le 5,5-Cpr-OxylH à pH 5, nous avons besoin des quatre premiers S.T. En effet, sa dynamique d'émission étant plus complexe que les deux précédents, nous avons besoin de plus de valeurs propres pour reconstruire correctement sa dynamique.

Pour les trois mesures, l'analyse globale a obtenu les constantes détaillées dans le Tableau 1 :

Tableau 1 : temps caractéristiques de l'espèce kéto

Dérivés	Relaxation vibrationnelle	ESPT	Temps de vie
6'-Me-5,5-Cpr-Oxyl	0,60 ± 0,05 ps 2,2 ± 0,4 ps		930 ± 10 ps
5,5-Cpr-OxylH à pH 11	0,5 ± 0,03 ps 4,25 ± 0,90 ps		620 ± 10 ps
5,5-Cpr-OxylH à pH 5	0,43 ± 0,01ps	3,0 ± 0,1 ps 22 ± 0,7 ps	620 ± 10 ps Inf

Les temps de vie déterminés ont été déterminés à l'aide de la technique de comptage de photons (TCSPC) et sont fixés pour le fit des S.T. En effet, l'expérience de comptage de photons est plus précise pour mesurer des temps longs (> 0,5 ns) que l'expérience pompe-sonde.

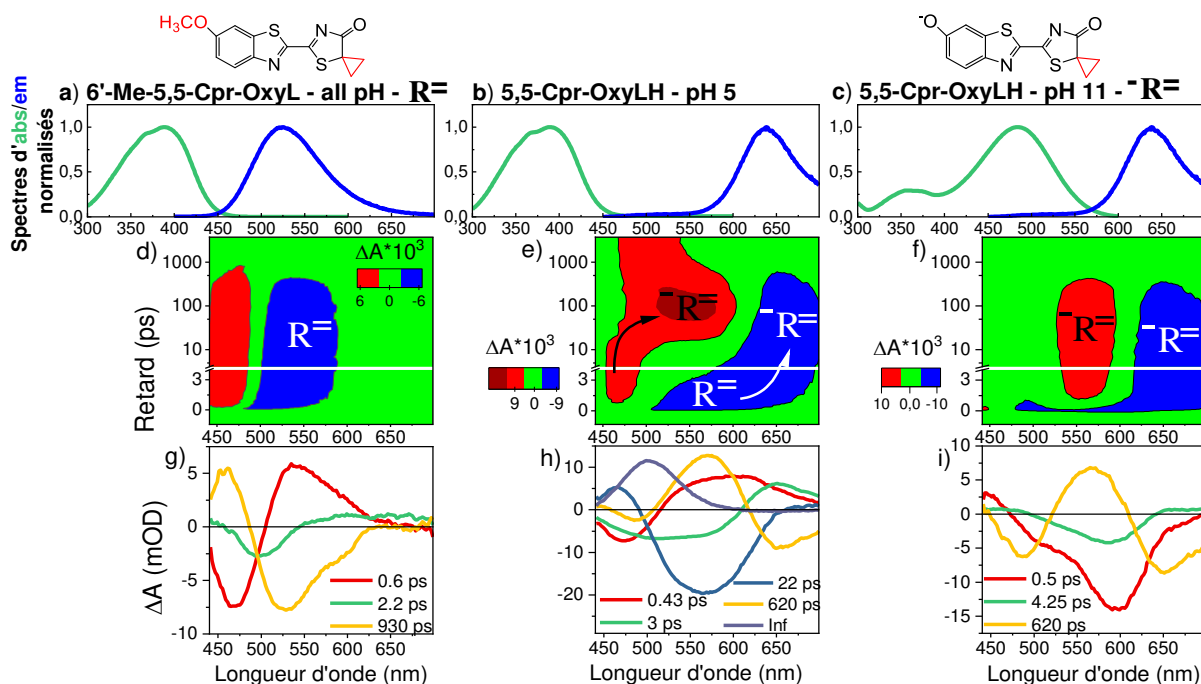


Figure 39 : a), b) et c) sont les spectres d'absorption et d'émission du 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL, du 5,5-Cpr-OxyLH à pH 5 et du 5,5-Cpr-OxyLH à pH 11 respectivement, d), e) et f) représente les résultats 2D de la manipulation pompe sonde, reconstruits avec l'analyse globale, g), h), i) sont les DAS des dérivés.

Les résultats de l'analyse globale des données pompe-sonde pour les trois composés, sont représentés sur la Figure 39. Cette figure regroupe aussi les spectres d'émission et d'absorption, ainsi que les données pompe-sonde reconstruites avec l'analyse globale. L'assemblage des différentes figures rend plus facile la compréhension des résultats. Par exemple, pour le dérivé 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL, son émission localisée à 525 nm, Figure 39a est retrouvé dans les données pompe-sonde Figure 39b, avec la contribution négative (bleue). Son temps de montée est de 0,6 ps (amplitude positive du DAS rouge) et son temps de vie est 930 ps (amplitude négative du DAS jaune sur la Figure 39c).

Les constantes de temps longues, représentant les durées de vie, sont tracées en jaune. Il est évident qu'à pH 5 et 11, la durée de vie est associée à la même forme, phénolate-kéto avec la forte similitude spectrale entre les deux courbes. Elle décrit le déclin du GSB à 500 nm, de l'ESA à 550 nm et de la SE à 640 nm. Tandis que pour le 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL, la courbe à 930 ps correspond au déclin de la forme phénol-kéto. Les constantes de temps courtes, 0,6 ps et 2,2 ps pour la Figure 39g, 0,43 ps pour la Figure 39h et 0,5 ps et 4,25 ps pour la Figure 39i, comme nous l'avons précisé ci-dessus, correspondent à la relaxation spectrale due à la relaxation vibrationnelle et/ou à la solvation.

Trois autres constantes à pH 5 restent encore à analyser : 3 ps, 22 ps et une constante infinie. La constante infinie à pH 5 possède une forme spectrale proche du spectre d'absorption à l'état stationnaire du dérivé à pH 11. Cela signifie que la reprotonation est significativement plus lente que 4 ns car à la fin de notre acquisition, nous observons encore un signal du photoproduit. La constante de temps de 3 ps est de l'ordre de grandeur de la relaxation spectrale, 2,2 ps pour 6'-Me-5,5-Cpr-Oxyl ou encore 4,25 ps pour 5,5-Cpr-OxylH à pH 11. En revanche, un signal positif autour de 640 ps est clairement identifiable. Celui-ci peut s'expliquer par la montée du signal de SE à cette longueur d'onde, et donc la montée de l'émission de la forme déprotonée. Enfin, le DAS associé à 22 ps est très similaire au DAS représentant le déclin de la phénol-kéto (Figure 39g). Il décrit la décroissance de la SE initiale, à 525 nm, de l'ESA à 475 nm ainsi que l'augmentation de l'ESA autour de 550 nm. Ainsi, les deux constantes de temps 3 ps et 22 ps correspondent au transfert de proton de la forme phénol-kéto à la forme phénolate-kéto qui s'identifie par un décalage spectral de l'ESA – de 475 nm à 550 nm- et de la SE – de 525 nm à 640 nm. L'ESPT est donc multi-exponentiel.

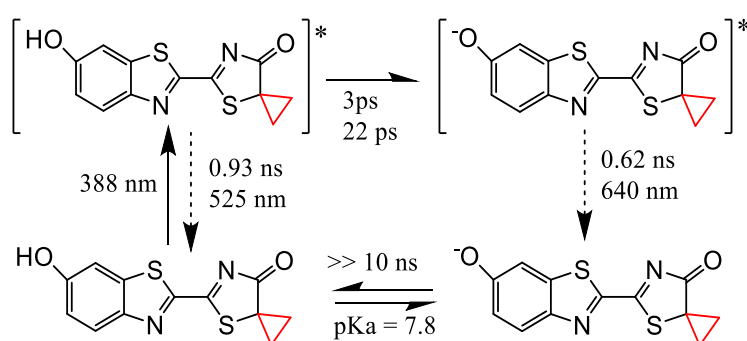


Schéma 10 : cycle de photoluminescence de l'espèce phénol-kéto

Le Schéma 10 résume le chemin de photoluminescence de la forme phénol-kéto avec les temps caractéristiques associés à la réaction de l'ESPT associée à la conversion de la forme phénol-kéto vers la forme phénolate-kéto déterminés par la spectroscopie pompe-sonde.

IV.3 Propriétés de la forme énol

Dans cette partie, nous étudierons les composés suivants : 4,6'-DMeOxyL et 4-MeOxyLH. Avec ces deux groupes méthoxyles, le 4,6'-DMeOxyL est un analogue de la forme phénol-énol à l'état fondamental comme à l'état excité. En revanche, le 4-MeOxyLH contient un groupe hydroxyle sur la partie phénol qui, comme le 5,5-Cpr-OxyLH étudié dans la partie précédente, peut transférer un proton au solvant. Il permet donc de caractériser l'ESPT de la forme phénol-énol à la forme phénolate-énol.

IV.3.1 Analyse à l'état stationnaire et résolue en temps

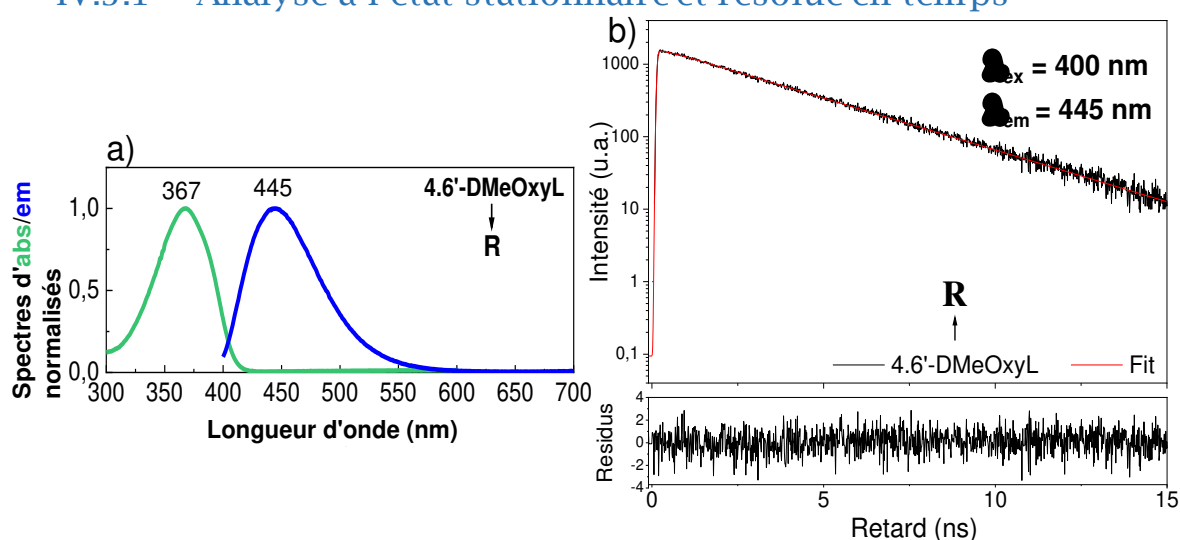


Figure 40 : a) spectres d'absorption et d'émission normalisés du 4,6'-DMeOxyL. b) Déclin de fluorescence (courbe noire) et son fit (courbe rouge) ainsi que les résidus du même composé.

Le spectre d'absorption et d'émission du 4,6'-DMeOxyL sont représentés sur la Figure 40, ces derniers ne dépendent pas du pH. En effet, ne pouvant pas subir de réaction de déprotonation, le composé ne change pas de forme en fonction du pH. La forme phénol-énol a donc pour caractéristiques, d'absorber à 367 nm et d'émettre à 445 nm. D'après une étude théorique⁴⁹, le maximum d'absorption à 367 nm est associé à la transition S_0-S_1 , la transition S_0-S_2 est autour de 325 nm est dissimulée dans la queue du spectre. Le déclin de fluorescence du 4,6'-DMeOxyL, qui mime la forme phénol-énol, est mesuré par l'expérience de TCSPC. Il est excité à 400 nm et l'émission est mesurée à 445 nm. Il décroît mono-exponentiellement avec un temps caractéristique de 3,05 ns.

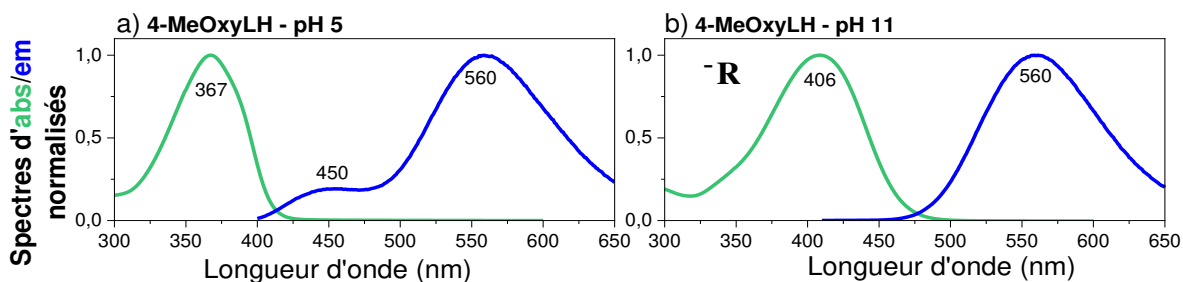


Figure 41 : Spectres d'absorption et d'émission normalisés du dérivé 4-MeOxyLH à pH 5 (a) et pH 11 (b)

La Figure 41 représente les spectres d'absorption et d'émission du 4-MeOxyLH, à pH 5 et à pH 11. A pH acide, le composé se trouve à l'état fondamental, sous sa forme phénol-énol, tandis qu'à pH basique la déprotonation entraîne la formation de l'ion phénolate-énol. Cette conversion est caractérisée par un pKa de 8,7. A pH 5, le spectre de fluorescence comprend une émission présentant deux maxima : la contribution centrée à 445 nm est associée à l'émission de la forme phénol-énol et celle centrée à 560 nm correspond quant à elle à l'émission de l'espèce phénolate-énol. A pH 11, l'absorption se situe autour de 410 nm et le maximum d'émission est à 560 nm comme pour le pH 5, ces deux valeurs sont des caractéristiques de la forme phénolate-énol.

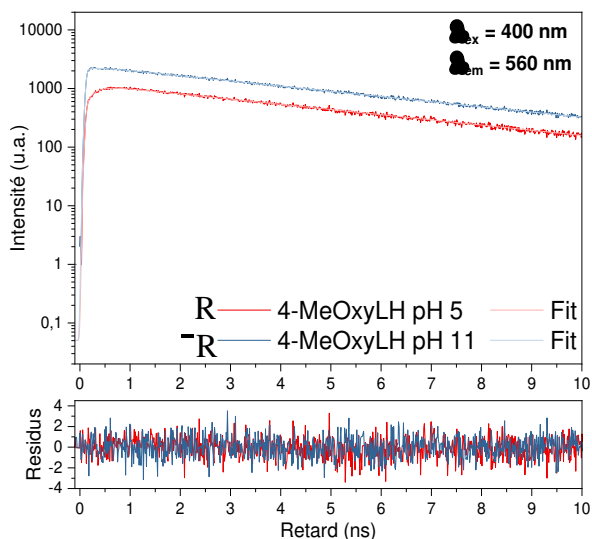


Figure 42 : Déclin de fluorescence du dérivé 4-MeOxyLH à pH 5 (courbe rouge) et pH 11 (courbe bleue) avec leur fit, et les résidus

Les mesures de fluorescence résolues en temps (Figure 42) révèlent la présence de deux constantes de temps à pH 5, et une seule à pH 11. La plus longue à pH 5 correspond aussi à celle mesurée à pH 11 et est de 4,91 ns. Cette constante de temps est associée à la durée de

vie de la forme phénolate-énol. La deuxième constante de temps mesurée à pH 5 possède une amplitude négative correspondant à un temps de montée du signal de fluorescence. Cette contribution est associée à la formation de la forme phénolate-énol qui s'effectue sur une échelle de temps de 210 ps. Cette constante est également retrouvée sur le déclin de fluorescence mesuré à pH 5 à 445 nm avec une amplitude positive. La constante de temps mesurée sur le déclin de la forme protonée étant la même pour le temps de montée de la forme déprotonée, traduit un ESPT de la forme phénol-énol à phénolate-énol.

IV.3.2 Analyse à l'état excité – spectroscopie pompe-sonde

Nous allons maintenant détailler l'étude de ces composés avec la spectroscopie pompe sonde.

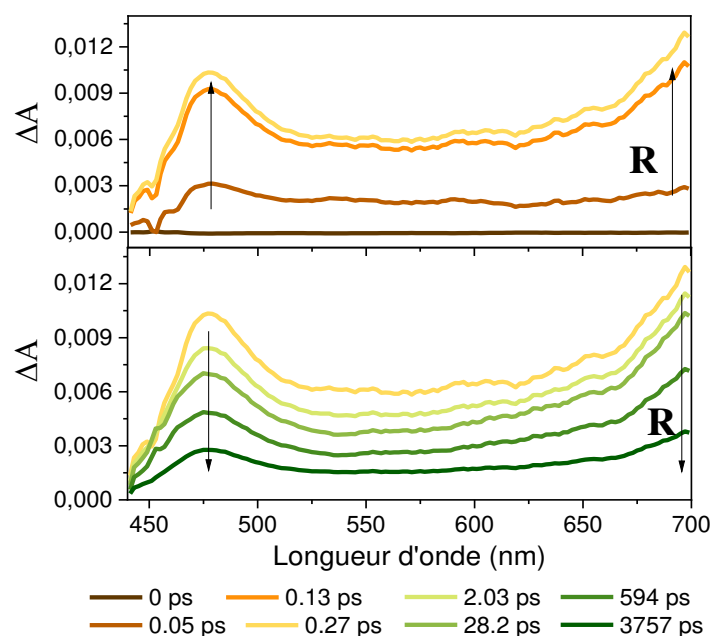


Figure 43 : Signal ΔA du dérivé 4,6'-DMeOxyl en fonction des longueurs d'onde, mesuré à plusieurs retards

Pour le 4,6'-DMeOxyl quel que soit le pH, deux signaux positifs sont facilement différenciables, le premier autour de 475 nm et le second à des longueurs d'onde supérieures à 700 nm (Figure 43). Ils correspondent à deux ESA. Tous deux évoluent avec la même cinétique, c'est-à-dire qu'ils croissent et décroissent sur la même échelle de temps. L'ESA à 475 nm a déjà été observée avec les deux premiers dérivés, et n'est donc pas une caractéristique spécifique d'une espèce donnée. L'émission observée à l'état stationnaire à 445 nm n'est pas retrouvée avec l'expérience pompe-sonde. La SE associée est donc moins intense que l'ESA avec laquelle

elle se superpose, de plus, le continuum ne commence qu'à partir de 440 nm, empêchant d'observer la queue de la SE qui pourrait s'y trouver.

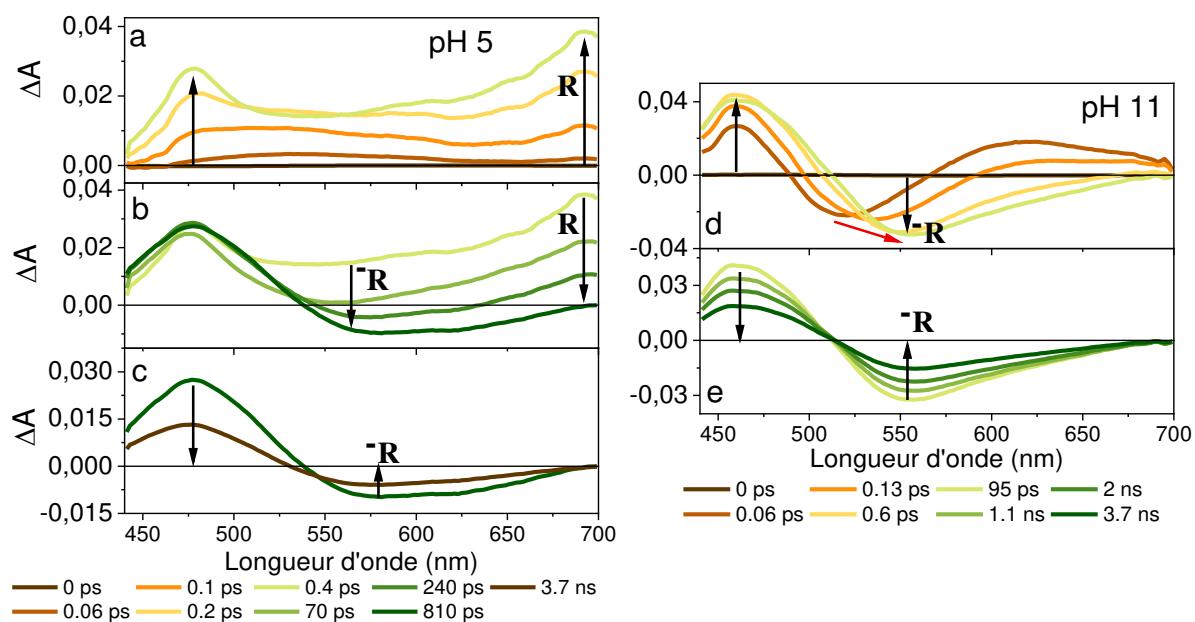


Figure 44: Signal ΔA du dérivé 4-MeOxyLH en fonction des longueurs d'onde, mesuré à plusieurs retards à pH 5 (a, b et c) et pH 11 (d et e)

La Figure 44 représente les résultats obtenus avec l'expérience pompe-sonde pour le dérivé 4-MeOxyLH. A pH 5, elle révèle après quelques centaines de femtoseconde, deux signaux positifs associés à deux ESA, l'une étant centrée autour de 475 nm et l'autre apparaissant à des longueurs d'onde supérieures à 700 nm (Figure 44a). Ces deux signaux ont été observés pour le précédent dérivé, le 4,6'-DMeOxyl, et correspondent aux signatures de la forme phénol-énol. Après 240 ps, le signal à 700 nm décroît jusqu'à devenir nul et, dans le même intervalle de temps, un signal négatif (SE) apparaît autour de 575 nm (Figure 44b). Ce signal correspond à l'émission de la forme phénolate-énol, qui est retrouvée sur les coupes temporelles à pH 11. La décroissance de la forme protonée et la croissance de la forme déprotonée se fait donc avec une même constante de temps et s'explique par un transfert de proton à l'état excité. A pH 11, deux signaux sont présents, une ESA à 475 nm et une SE autour de 575 nm. Cette SE correspond à l'émission de la forme phénolate-énol. Aux temps longs (>100 ps), les signaux d'absorption transitoires mesurés à pH 5 et pH 11 (Figure 44 c et e) sont identiques et possèdent la même dynamique caractéristique du déclin de la forme phénolate-énol.

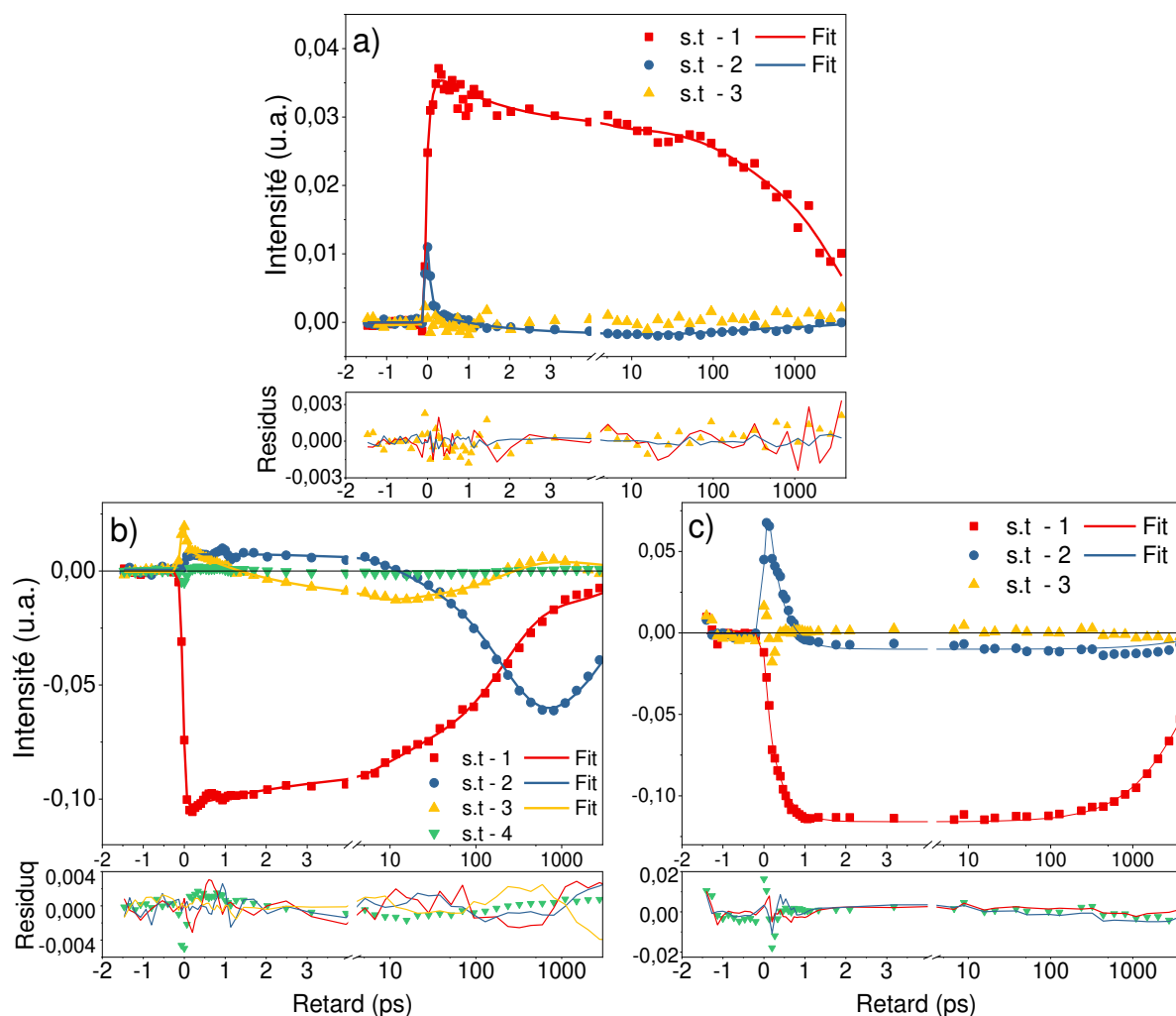


Figure 45 : a) correspond aux trois premiers vecteurs singuliers (S.T) du 4,6'-DMeOxyl, les deux premiers sont ajustés avec une fonction multi exponentielle. b) correspond aux cinq quatre S.T du 4-MeOxylH à pH 5, les trois premiers sont ajustés avec une fonction multi exponentielle. c) correspond aux trois premiers S.T du 4-MeOxylH à pH 11, les deux premiers sont ajustés avec une fonction multi exponentielle.

Afin de déterminer la dynamique de ces composés, une analyse globale est accomplie et les vecteurs singuliers (S.T) ainsi que leur fit et les résidus sont représentés sur la Figure 45. Pour le dérivé 4,6'-DMeOxyl et le 4-MeOxylH à pH 11, seulement deux S.T sont nécessaires, comme nous le montrent les résidus, pour retrouver les différentes cinétiques qui permettent de reconstruire le signal pompe sonde. Les S.T suivants n'apportent pas d'information supplémentaire sur le signal. Le composé 4,6'-DMeOxyl étant très peu soluble, sa concentration a dû être diminuée par rapport aux autres dérivés, cela a entraîné une baisse du signal pompe-sonde ce qui explique les données bruitées dans l'analyse globale, Figure 45a. Pour ce composé, deux constantes de temps ressortent de cette analyse, 1,6 ps et 3,05

ns. 3,05 ns est fixée par la mesure de TCSPC. Les DAS associés à ces deux constantes sont représentés sur la Figure 46g.

Le fit global est appliqué sur les trois premiers S.T pour le 4-MeOxyLH à pH 5. En effet, le signal enregistré étant plus complexe à ce pH, les S.T à prendre en compte sont plus nombreux. Les constantes de temps longues trouvées avec la mesure TCSPC, soit 4.9 ns, seront fixées pour l'ajustement des données au deux pH. Cette analyse globale attribue trois constantes de temps pour les données à pH 5 : 3,3 ps, 196 ps et 4,9 ns, et deux à pH 11 : 0,35 ps et 4,9 ns. Pour chacune de ces constantes est associé un DAS qui sont représentés sur la Figure 46h et Figure 46i.

Tableau 2 : temps caractéristiques de l'espèce énoI

Dérivés	Relaxation vibrationnelle	ESPT	Temps de vie
4,6'-DMeOxyL	$1,6 \pm 0,4$ ps		$3,05 \pm 0,01$ ns
4-MeOxyLH à pH 11	$0,35 \pm 0,02$ ps		$4,90 \pm 0,01$ ns
4-MeOxyLH à pH 5	$3,3 \pm 0,3$ ps	196 ± 6 ps	$4,90 \pm 0,01$ ns

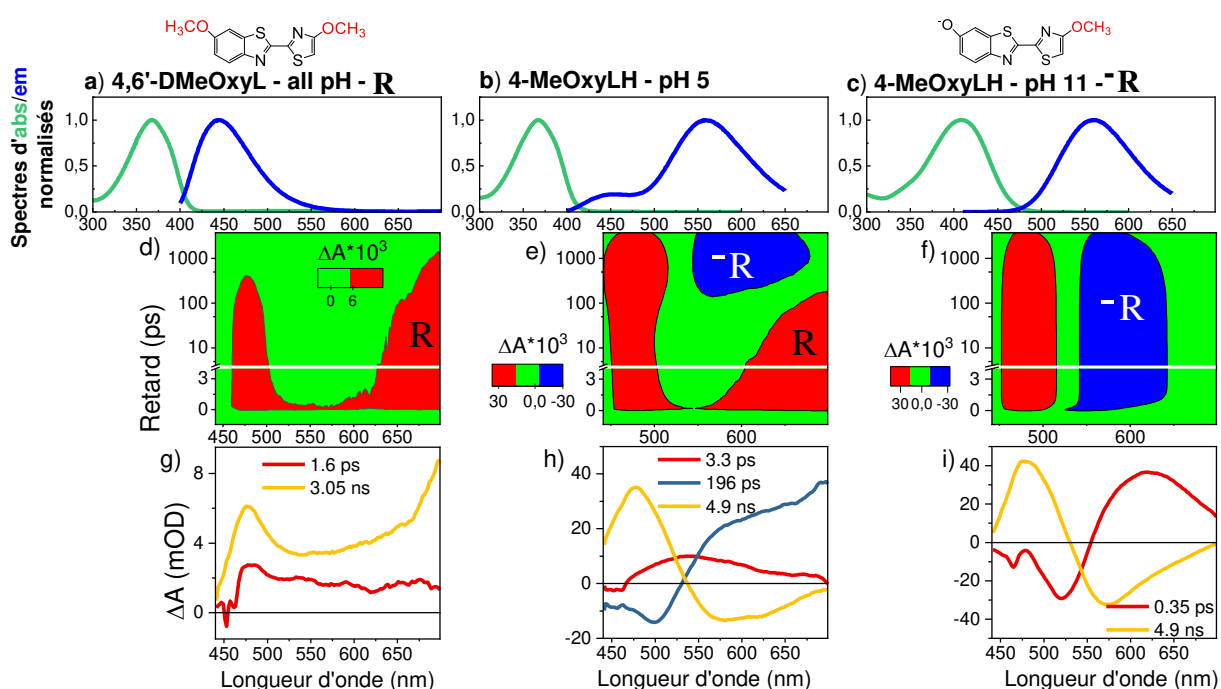


Figure 46 : a), b) et c) sont les spectres d'absorption et d'émission du 4,6'-DMeOxyL, du 4-MeOxyLH à pH 5 et du 4-MeOxyLH à pH 11 respectivement, d), e) et f) représente les résultats 2D de la manipulation pompe sonde, reconstruits avec l'analyse globale, g), h), i) sont les DAS des dérivés

De même que précédemment les DAS associés aux durées de vie sont représentés en jaune sur la Figure 46a, h et i. Les deux DAS obtenus pour le 4,6'-DMeOxyl, ont des amplitudes positives pour toutes les longueurs d'onde qui caractérise la décroissance de ces deux contributions. Le DAS associé à 1,6 ps est interprété comme étant une signature de la solvation et/ou de la relaxation vibrationnelle. La composante de 3,05 ns représente le déclin de fluorescence de la forme phénol-énol. Pour le dérivé 4-MeOxylH, les deux constantes de temps courtes, 3,3 ps à pH 5 et 0,35 ps à pH 11 sont associées à la relaxation vibrationnelle et/ou à la relaxation du solvant. De plus, un décalage spectral de la SE à pH 11 est clairement identifiable dans la carte 2D des données pompe-sonde et contribue au DAS de 0,4 ps, il s'explique par la relaxation vibrationnelle et/ou la solvation. La composante de 4,9 ns correspond au déclin de la forme phénolate-énol. La courbe est spectralement similaire pour les deux pH. Tout d'abord positive, représentant le déclin de l'ESA à 475 nm, puis négative pour le déclin de la SE à 575 nm. La SE est légèrement décalée spectralement par rapport aux données à l'état stationnaire (560 nm), du fait de la superposition spectrale avec l'ESA à 475 nm qui est plus intense. Enfin, pour le DAS à 196 ps, la courbe est de signe opposé par rapport au déclin de fluorescence (jaune) et correspond à la montée du signal associé à la contribution de la forme phénolate-kéto. A 700 nm, le signal reste positif, ce qui s'explique par le déclin de la deuxième ESA associée à la forme phénol-énol. La courbe associée à la constante de temps de 196 ps, décrit à la fois, la croissance de la forme déprotonée et le déclin de l'espèce protonée. Cette contribution traduit donc la présence d'un ESPT entre les formes phénol-énol et phénolate-énol. Cette constante est en parfait accord avec la valeur trouvée en fluorescence résolue en temps (210 ps).

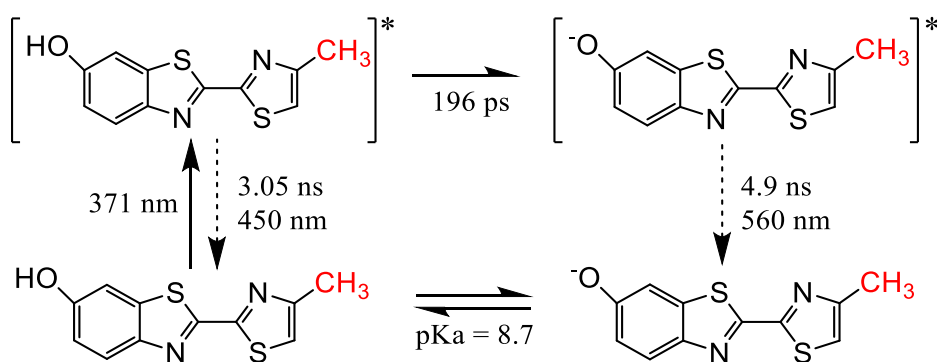


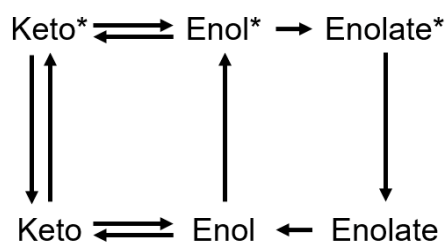
Schéma 11: cycle de photoluminescence de l'espèce phénol-énol

Le Schéma 11 résume le chemin de photoluminescence de la forme phénol-énol avec les temps caractéristiques associés à la réaction de l'ESPT de la forme phénol-énol à la forme phénolate-énol déterminés par la spectroscopie pompe-sonde.

IV.4 Etude du dérivé 6'MeOxyLH

IV.4.1 Analyse à l'état stationnaire et résolue en temps

Ce cinquième composé est plus complexe que les quatre autres car deux espèces coexistent déjà à l'état fondamental, les tautomères phénol-énol et phénol-kéto. Il est composé d'un groupe méthyle sur la partie phénol et un groupe hydroxyle sur la partie énonol. Le transfert de proton ne pourra donc se faire qu'à partir de ce dernier groupement pour donner la forme phénol-énolate. Pour l'espèce phénol-kéto, aucun transfert de proton ne peut avoir lieu. En revanche, une tautomérisation est aussi susceptible de se produire à l'état fondamental comme à l'état excité. Les différentes transitions possibles pour ce dérivé sont représentées ci-dessous.



D'après les résultats de Rebarz *et al.*⁶⁶, la forme phénol-énol est présente à 70% tandis que la forme phénol-kéto l'est à 30% à l'état fondamental à pH 5. Le spectre d'absorption est alors un mélange de celui de la forme phénol-énol à 70% et de la forme phénol-kéto à 30%. La Figure 52 confirme les résultats.

Le 6'-MeOxyLH a un maximum d'absorption centré à 371 nm à pH 5. A pH 11, seule l'espèce phénol-énolate subsiste à l'état fondamental (pKa de 7,3, Figure 47). Celle-ci absorbe à 414 nm. Les spectres d'émission montrent tous les deux, à pH 5 et pH 11, un maximum à 555 nm. En revanche, il est possible de distinguer un très léger épaulement à pH 5 à 450 nm provenant de l'émission de la forme phénol-kéto.

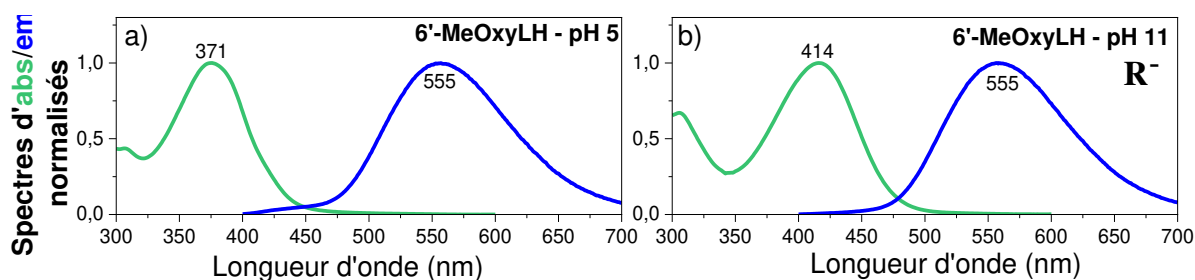


Figure 47 : Spectres d'absorption et d'émission normalisés du dérivé 6'-MeOxyLH à pH 5 (a) et pH 11 (b)

Le temps de vie de la forme phénol-énolate est de 7,92 ns, cette valeur est retrouvée pour les deux mesures de TCSPC, à pH 5 et pH 11 comme indiqué sur la Figure 48. A pH 5, nous observons une deuxième constante de temps de 0.63 ns. Etant donné que la forme phénol-kéto est présente à l'état fondamental, elle est donc aussi excitée, à 400 nm, et cette constante de temps est donc associée à sa durée de vie de fluorescence. Cette constante étant très inférieure à celle caractérisée avec le dérivé 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL (0,93 ns), elle nous amène à nous demander si une conversion kéto-énol interviendrait à l'état excité, comme c'est le cas à l'état fondamental. Cette question sera traitée par la suite dans la partie IV.4.3.

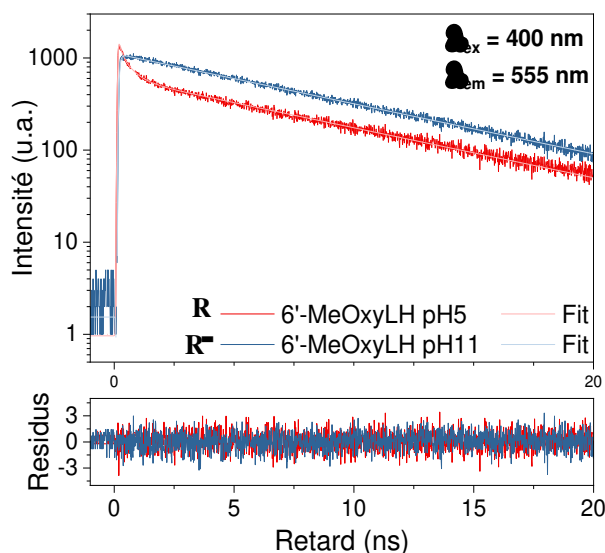


Figure 48 : Déclin de fluorescence du dérivé 6'-MeOxyLH à pH 5 (courbe rouge) et pH 11 (courbe bleue) avec leur fit, et les résidus

Contrairement au 4-MeOxyLH et au 5,5-Cpr-oxyLH, le dérivé 6'-MeOxyLH a la possibilité de se déprotoner sur la partie énol et non la partie phénol. Avec la spectroscopie pompe-sonde nous avons la possibilité de caractériser ce phénomène

IV.4.2 Analyse à l'état excité – spectroscopie pompe-sonde

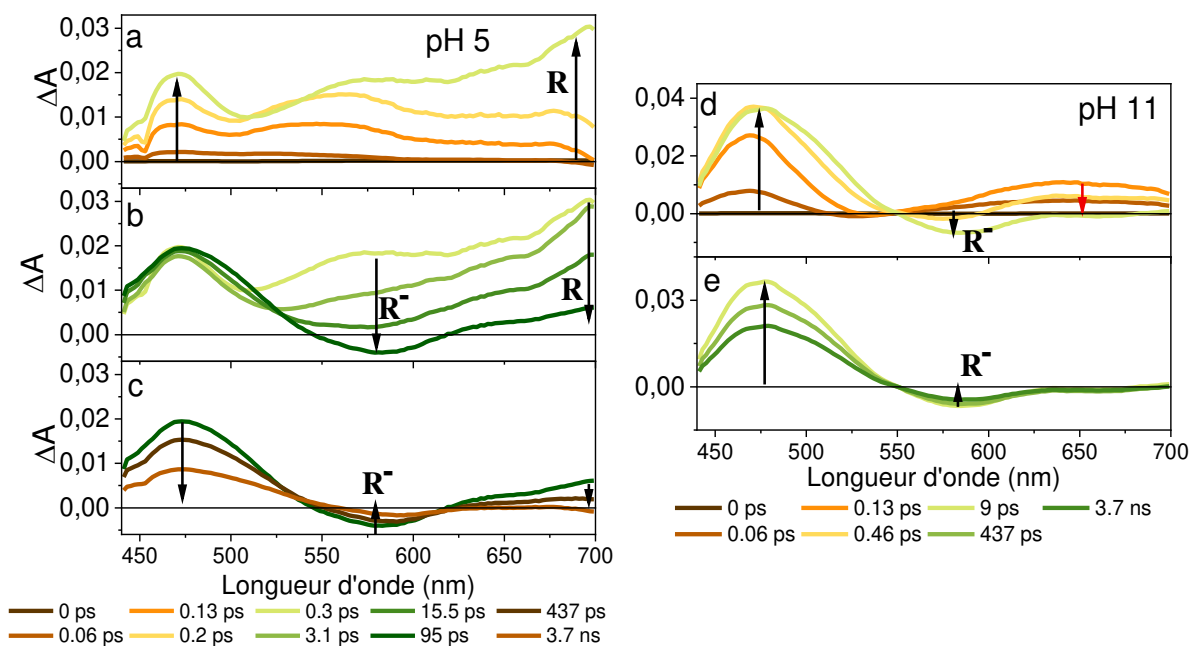


Figure 49 : Signal ΔA du dérivé 6'-MeOxylH en fonction des longueurs d'onde, mesuré à plusieurs retards à pH 5 (a, b et c) et pH 11 (d et e)

La Figure 49 représente les résultats pompe sonde, du dérivé à pH 5 et pH 11. A pH 5, après l'excitation, deux ESA sont visibles, la première à 475 nm et la deuxième au-delà de 700 nm (Figure 49a). Nous pouvons reconnaître ici, les contributions de la forme phénol-énol. La SE de la forme phénol-kéto, à 525 nm, est superposée avec une ESA plus intense ce qui nous empêche de la distinguer. Après 300 fs, la deuxième ESA s'atténue et une légère SE croît autour de 580 nm (Figure 49b). Les trois contributions décroissent ensuite sur la même échelle de temps (Figure 49c). A pH 11, après l'excitation, une ESA apparaît à 475 nm, similaire à celle observée à pH 5 pour ce dérivé et d'autres comme le 4,6-DMeOxyl ou le 6'-Me-5,5-CprOxyl, et une SE à 580 nm. Cette SE est aussi observable à pH 5 mais seulement après 300 fs. A pH 11, il n'y a pas de réaction à l'état excité. Nous observons donc la montée du signal, puis le déclin des deux contributions avec le même temps caractéristique. Aux temps longs, le signal à pH 5 présente une grande similarité avec celui à pH 11, ce qui s'explique par la contribution de la forme phénol-énolate. Comme précédemment, l'ESPT s'explique par le déclin, à pH 5, de l'ESA situé après 700 nm de la forme phénol-énol, qui se produit à la même échelle de temps que la montée de la SE de la forme phénol-énolate.

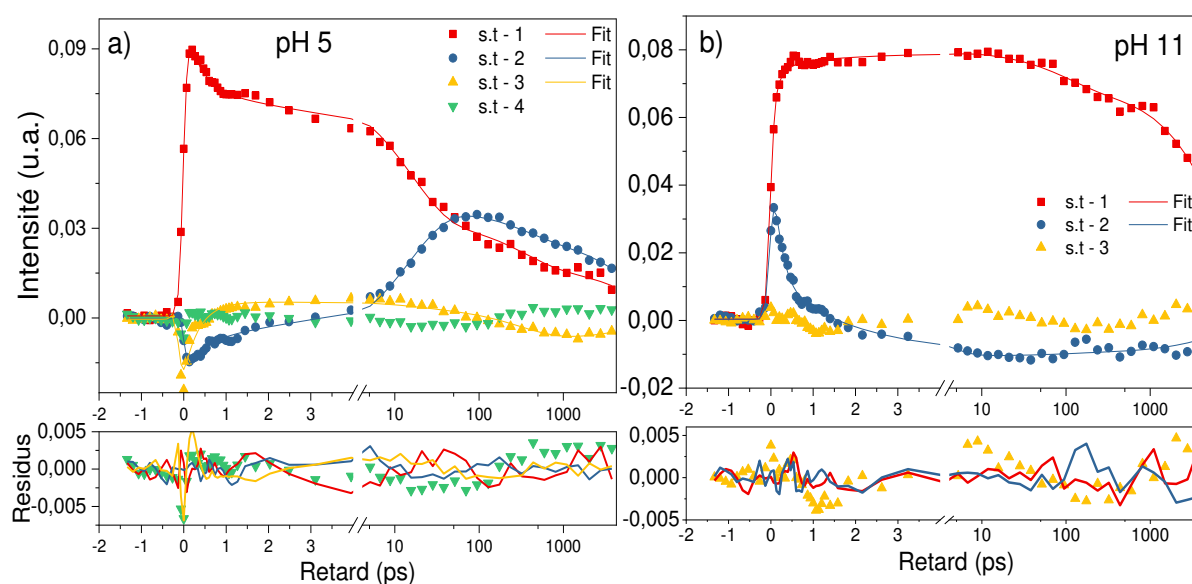


Figure 50 : courbes avec symboles - vecteurs singuliers (S.T) du 6'-MeOxyLH à pH 5 à gauche et du 6'-MeOxyLH à pH 11 à droite. La courbe pleine correspond au fits des S.T et leurs résidus sont tracés en dessous de chaque graphes des S.T

Les différentes constantes de temps sont obtenues grâce aux vecteurs propres provenant de l'analyse globale (Figure 50). A pH 5, seulement les trois premiers vecteurs propres sont utilisés et nous avons besoin d'une fonction de fit comportant 4 exponentielles pour reconstruire correctement les courbes. Quatre constantes de temps sont donc nécessaires : 0,3 ps, 15 ps, 630 ps et 7,9 ns. La dernière est fixée par les mesures de fluorescence résolue en temps. A pH 11, Nous avons besoin de seulement deux vecteurs propres qui seront ajustés avec une fonction tri-exponentielle. Les constantes de temps relevées sont 0,2 ps, 2,1 ps et 7,9 ns, de même que précédemment, cette dernière constante a été fixée.

Les différentes constantes de temps sont répertoriées dans le Tableau 3. Les constantes en rouge correspondent à la durée de vie de la forme phénol-kéto, et celles en bleues à celle de la forme phénol-énolate.

Tableau 3 : Temps caractéristiques des dérivés 4,6'-DMeOxyl, 6'-Me-5,5-Cpr-Oxyl et 6'-MeOxylH

Dérivés	Relaxation vibrationnelle	ESPT	Temps de vie
4,6'-DMeOxyl	$1,6 \pm 0,4$ ps		$3,05 \pm 0,01$ ns
6'-Me-5,5-Cpr-Oxyl	$0,60 \pm 0,05$ ps $2,2 \pm 0,4$ ps		930 ± 10 ps
6'-MeOxylH à pH 11	$0,20 \pm 0,03$ ps $2,1 \pm 0,3$ ps		$7,9 \pm 0,01$ ns
6'-MeOxylH à pH 5	$0,30 \pm 0,07$ ps	$15,3 \pm 0,8$ ps	$0,63 \pm 10$ ps $7,9 \pm 0,01$ ns

Les résultats des fits réalisés sur les vecteurs propres sont ensuite utilisés pour calculer les DAS (Figure 51g, h et i). L'ajout des résultats du 4,6'-DMeOxyl permet de rendre plus facile l'analogie avec la forme phénol-énol qui est présente majoritairement à l'état fondamental du dérivé 6'-MeOxylH.

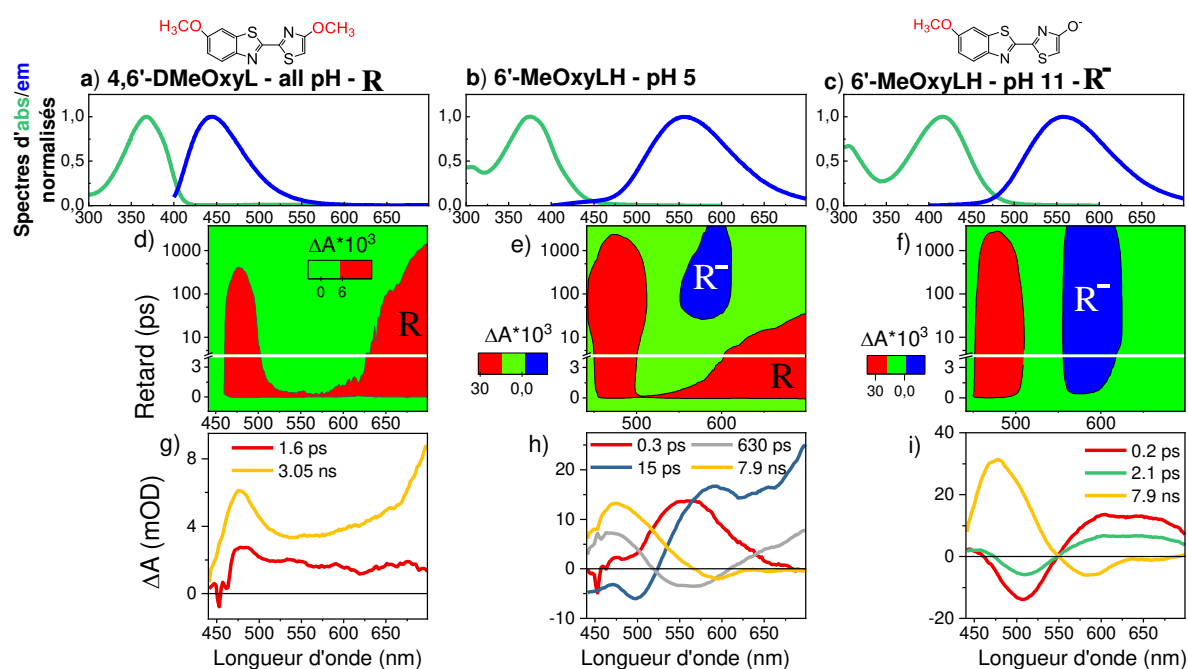


Figure 51 : a), b) et c) sont les spectres d'absorption et d'émission du 4,6'-DMeOxyl, du 6'-MeOxylH à pH 5 et du 6'-MeOxylH à pH 11 respectivement, d), e) et f) représente les résultats 2D de la manipulation pompe sonde, reconstruits avec l'analyse globale, g), h), i) sont les DAS des dérivés.

Les trois constantes de temps courtes, 0,3 ps pour le pH 5 et 0,2 ps et 2,1 ps pour le pH 11 sont associées à la relaxation vibrationnelle et/ou solvation. Les spectres pour 7,9 ns (courbe jaune) correspondent à la durée de vie de la forme phénol-énolate. Pour les deux pHs nous

observons une allure similaire, positive à 475 nm et négative à 575 nm. Elles décrivent donc le déclin de l'ESA à 475 nm et de la SE. A pH 5, la courbe représentant le DAS à 0,63 ns, temps fixé par l'expérience de TCSPC, à la même allure que le DAS à 0,93 ns du dérivé 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL représentant la forme phénol-kéto (Figure 39g), pour des longueurs d'onde inférieures à 600 nm. Cela confirme l'attribution de cette constante de temps au déclin de la forme phénol-kéto mais comprend aussi le déclin de l'ESA autour de 700 nm. La courbe associée à la dernière constante de temps à 15 ps inclut une partie négative pour des longueurs d'onde inférieure à 525 nm puis positive au-delà de 525 nm. La partie négative correspond à une montée de l'ESA à 475 nm. Cette ESA est présente pour la forme phénol-énol mais est plus intense pour la forme phénol-énolate, ce qui traduit une augmentation de la contribution de la forme phénol-énolate. Dans la deuxième partie de la courbe, nous observons une première bosse autour de 575 nm, celle-ci est clairement identifiée comme une croissance de la SE de la forme phénol-énolate. Et enfin, la courbe finit par une croissance du signal à 700 nm, qui correspond à un déclin de l'ESA associée. La forme spectrale de ce DAS est donc associée à un ESPT possédant un temps caractéristique de 15 ps correspondant à la conversion phénol-énol → phénol-énolate.

IV.4.3 Tautomérisation

Ce dérivé est plus complexe que les précédents, car à pH 5, à l'état fondamental, la forme phénol-énol et phénol-kéto sont en équilibre. Après avoir caractérisé la cinétique de l'ESPT, nous nous demandons si cette conversion est également possible à l'état excité. Pour commencer, nous devons connaître exactement la proportion de chacune des espèces à l'état fondamental. Pour ce faire, nous réalisons des spectres d'absorption du dérivé, mais aussi du 4,6'DMeOxyL pour avoir la référence de la forme phénol-énol, puis du 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL pour avoir celle de la forme phénol-kéto. Pour connaître la proportion des espèces, il suffit de reconstruire le spectre d'absorption du 6'-MeOxyLH avec une combinaison linéaire des deux autres spectres. Comme le montre la Figure 52, nous obtenons 70% de la forme phénol-énol et 30% de la forme phénol-kéto. Ce qui est en accord avec l'étude de Rebarz *et al.*⁶⁶

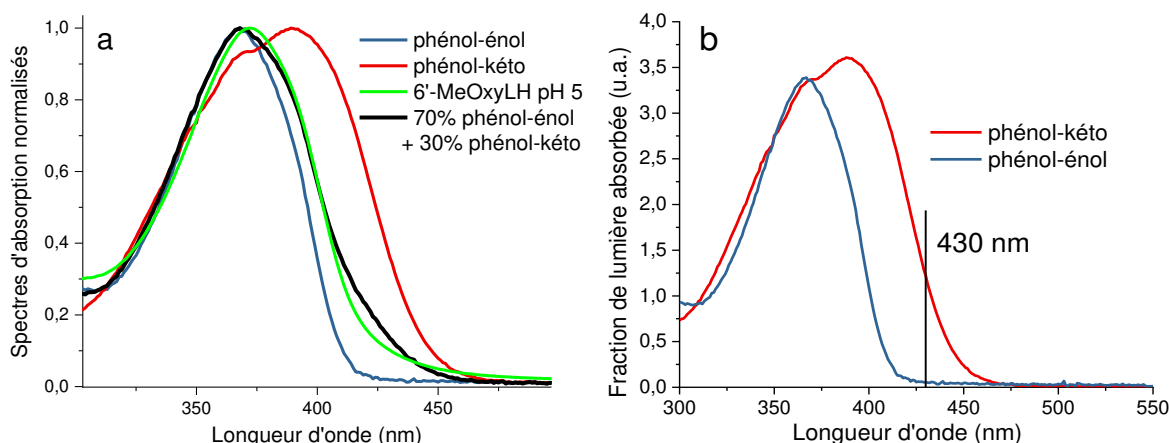


Figure 52 : a) représente le spectre du 6'-MeOxyLH (courbe verte) reconstruit (courbe noire) avec 70% du spectre du phénol-énol (courbe bleue) et 30% du spectre phénol-kéto (courbe rouge). b) représente la fraction de lumière absorbée à pH 5 par les deux formes (phénol-kéto – rouge et phénol-énol – bleu), à la longueur d'excitation 430 nm, seulement la population de phénol-kéto absorbe la lumière.

Grâce à ces résultats, nous pouvons connaître la quantité de lumière absorbée pour chacune des espèces à l'état fondamentale, pour toutes les longueurs d'onde d'excitation, et nous pouvons constater, qu'à 430 nm, il est possible d'exciter spécifiquement la forme phénol-kéto (Figure 52b).

Afin de calculer le taux de conversion à l'état excité, nous allons tout d'abord chercher à connaître les concentrations relatives à l'état excité, des formes émettrices, c'est-à-dire pour ce composé, la forme phénol-kéto et phénol-énolate. Pour ce faire, nous utiliserons les données de l'expérience de TCSPC ainsi que les spectres d'émission. En comparant la proportion relative des espèces à l'état fondamentale, avec celle à l'état excité, il est déjà possible d'émettre une hypothèse sur l'existence d'une interconversion entre les formes énol et kéto. Pour calculer plus précisément la constante de conversion kéto $\rightarrow$ énol, nous utiliserons les constantes de temps des espèces propres, ainsi que celles trouvées avec le dérivé 6'-MeOxyLH. Et enfin, pour confirmer nos résultats, nous utiliserons une dernière méthode qui consiste à ajuster une courbe de déclin de fluorescence avec la résolution du système d'équations différentielles couplées du photocycle du dérivé.

IV.4.3.1 Détermination des concentrations relatives de la formes phénol-kéto et phénol-énolate

IV.4.3.1.1. D'après les déclins de fluorescence

Afin de n'exciter que la forme phénol-kéto, nous sélectionnons la longueur d'onde d'excitation à 430 nm. Les déclins de fluorescence sont mesurés à l'aide de l'expérience de TCSPC, aux longueurs d'onde d'émission suivantes : 500, 525 et 555 nm.

Le signal de fluorescence étant de la forme :

$$S(\nu, t) = N_1(0) F_1(\nu) e^{-\frac{t}{\tau_1}} + N_2(0) F_2(\nu) e^{-\frac{t}{\tau_2}} = A_1(\nu) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2(\nu) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} \quad \text{Eq (1)}$$

nous pouvons retrouver la concentration de l'espèce phénol-kéto $N_1(0)$ et phénol-énolate $N_2(0)$ juste après la conversion kéto $\rightarrow$ énol en fonction des amplitudes associées à leur déclin de fluorescence, 0.63 ns pour phénol-kéto et 7.9 ns pour phénol-énolate :

$$N_i(0) = \frac{A_i(\nu)}{F_i(\nu)} = \frac{A_i(\nu)}{k_{rad} \cdot I_i(\nu)} \quad \text{Eq (2)}$$

k_{rad} est calculé avec la formule de Strickler & Berg¹³⁸:

$$k_{rad} = \frac{8 * 2303 \cdot \pi \cdot n^2}{c^2 \cdot \Re} \frac{\int I(\nu) d\nu}{\int \nu^{-3} I(\nu) d\nu} \int \epsilon \cdot d \cdot \ln(\nu)$$

Avec un k_{rad} pour l'espèce phénol-kéto qui vaut $k_{rad} = 18.6e7 \text{ s}^{-1}$ et pour l'espèce phénol-énolate qui vaut $k_{rad} = 9.9e7 \text{ s}^{-1}$

$I(\nu)$ correspond à l'intensité du spectre d'émission des espèces propres en fonction de la fréquence : $I(\lambda) d\lambda = I(\nu) d\nu = I(\nu) \cdot \frac{c}{\lambda^2} d\lambda$ et est normalisé pour que son aire soit égale à 1, $\int I(\nu) d\nu = 1$.

Pour chacune des longueurs d'onde d'émission, nous déterminons les amplitudes associées à chaque composante du déclin de fluorescence (Figure 53).

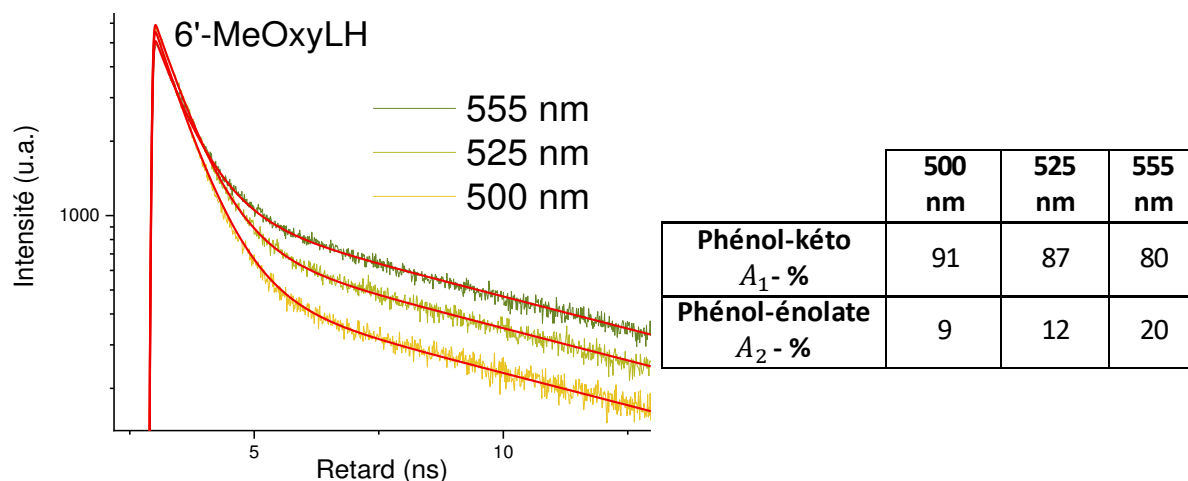


Figure 53 : Déclins de fluorescence du 6'-MeOxyLH à $\lambda_{ex} = 430$ nm et $\lambda_{em} = 500, 525$ et 555 nm, les courbes correspondent au fit bi-exponentiel avec $\tau_1 = 0,63$ ns et $\tau_2 = 7,92$ ns

A l'aide de l'équation (2), nous pouvons alors retrouver la concentration des formes phénol-kéto $N_1(0)$ et phénol-énolate $N_2(0)$:

	500 nm	525 nm	555 nm
Phénol-kéto N1 - %	68	72	70
Phénol-énolate N2 - %	32	28	30

Etant donné que nous observons une contribution de l'espèce phénol-énolate à 30% (déprotonation de la forme phénol-énol) alors que seule la forme phénol-kéto a été excitée, nous pouvons en conclure qu'une conversion de la forme kéto vers la forme énol se produit à l'état excité.

IV.4.3.1.2. D'après les spectres d'émission à l'état stationnaire

Le même type d'analyse est ensuite réalisée avec des spectres d'émission pour confirmer nos résultats. Le signal observé correspond à l'intégration du signal $S(\nu, t)$, équation (1), en fonction du temps :

$$\begin{aligned} \int S(\nu, t) dt &= N_1(0) \cdot k_{rad1} \cdot I_1(\nu) \cdot \tau_1 + N_2(0) \cdot k_{rad2} \cdot I_2(\nu) \cdot \tau_2 \\ &= N_1(0) \cdot A_1(\nu) + N_2(0) \cdot A_2(\nu) \end{aligned}$$

Le spectre d'émission du 6'-MeOxyLH est reconstruit en fonction des spectres d'émission du phénol-kéto — A_1 et phénol-énolate — A_2 qui ont été, au préalable, multipliés par leur k_{rad}

et leur temps de vie de fluorescence respectifs. Le facteur multiplicatif pour reconstruire correctement la courbe correspond alors, à la concentration relative de chaque espèce $N_1(0)$ et $N_2(0)$.

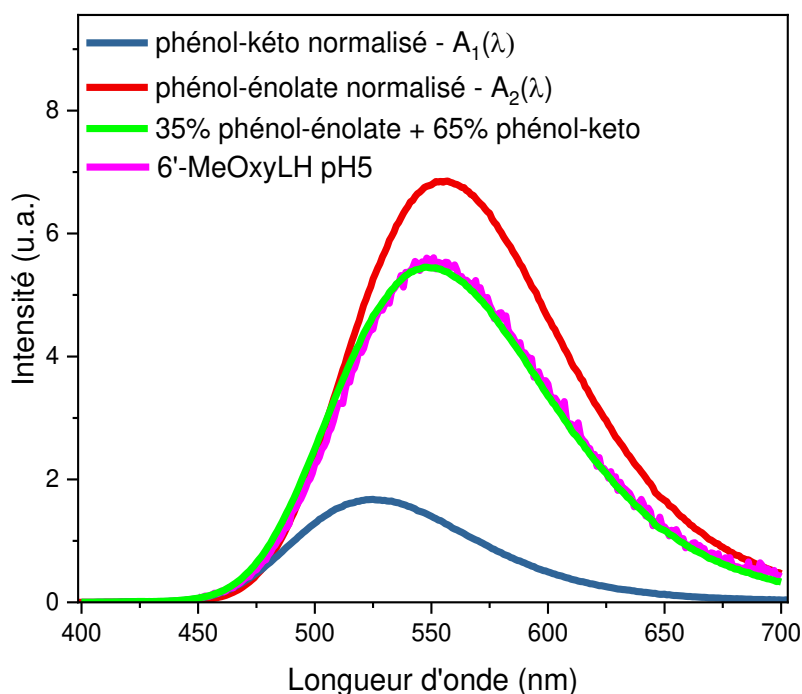


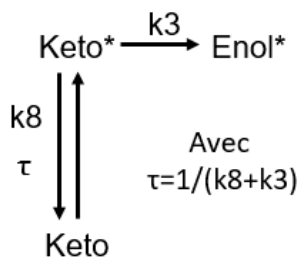
Figure 54 : Spectres d'émission normalisés du 6'-MeOxyLH (magenta), phénol-kéto (bleu), phénol-énolate (rouge). Le spectre d'émission calculé (vert) est obtenu avec une combinaison linéaire des deux spectres phénol-kéto et phénol-énolate.

Nous obtenons les mêmes conclusions qu'avec les mesures de TCSPC. L'émission du composé 6-MeOxyLH est composée de 65% de phénol-kéto et 35% de phénol-énolate alors que seule l'espèce phénol-kéto est excitée (Figure 54) et confirme donc la conversion kéto-énol à l'état excité.

IV.4.3.2 Détermination du taux de conversion kéto-énol – méthode n°1

Après avoir calculé les concentrations relatives des deux formes, nous allons maintenant chercher à déterminer la constante cinétique de cette conversion. Nous remarquons que le temps de vie de 630 ps, associée à la forme phénol-kéto est significativement plus faible que celle mesurée pour le composé 6'-Me-5,5-CprOxyL qui est de 930 ps. Cette diminution du temps de vie est expliquée par une conversion de la forme kéto vers la forme énol, à l'état

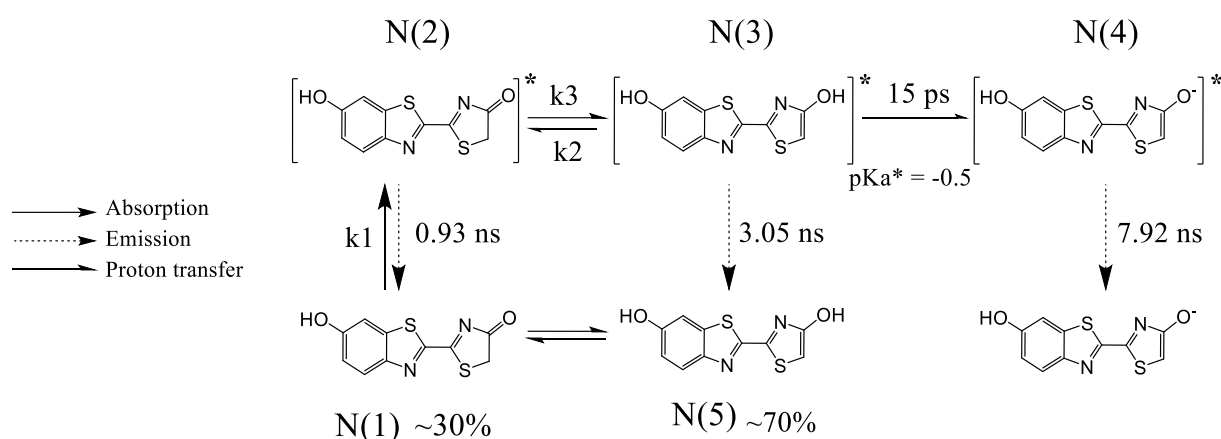
excité. Il est alors possible de retrouver la cinétique de la conversion avec l'équation ci-dessous :



$$\tau = \frac{1}{k_8 + k_3} = \frac{1}{1/0.93 + k_3} = 0.63 \text{ ns} \rightarrow k_3 = \frac{0.301}{0.63} = 0.47 \text{ ns}^{-1} \sim 2 \text{ ns}$$

IV.4.3.3 Détermination du taux de conversion kéto-énol - méthode n°2

Afin de confirmer ces résultats, nous utilisons un modèle numérique basé sur le système des équations différentielles couplées défini ci-dessous, le but sera d'ajuster les courbes de déclin de fluorescence avec les solutions de ce système d'équations différentielles couplées. Afin de réduire l'incertitude sur les constantes de conversion nous répétons l'expérience avec trois longueurs d'onde d'émission, 500, 525 et 555 nm, pour une longueur d'onde d'excitation de 430 nm.



Les équations sont les suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[\text{phénol} - \text{kéto}]}{dt} = -k_1 e^{-\left(\frac{t-t_0}{\tau_0}\right)^2} [\text{phénol} - \text{kéto}] + \frac{[\text{phénol} - \text{kéto}^*]}{0.93} \\ \frac{d[\text{phénol} - \text{kéto}^*]}{dt} = k_1 e^{-\left(\frac{t-t_0}{\tau_0}\right)^2} [\text{phénol} - \text{kéto}] - \frac{[\text{phénol} - \text{kéto}^*]}{0.93} - k_3 [\text{phénol} - \text{kéto}^*] + k_2 [\text{phénol} - \text{énol}^*] \\ \frac{d[\text{phénol} - \text{énol}]}{dt} = \frac{[\text{phénol} - \text{énol}^*]}{3.05} \\ \frac{d[\text{phénol} - \text{énol}^*]}{dt} = k_3 [\text{phénol} - \text{kéto}^*] - k_2 [\text{phénol} - \text{énol}^*] - \frac{[\text{phénol} - \text{énol}^*]}{0.015} - \frac{[\text{phénol} - \text{énol}^*]}{3.05} \\ \frac{d[\text{phénol} - \text{énolate}^*]}{dt} = \frac{[\text{phénol} - \text{énol}^*]}{0.015} - \frac{[\text{phénol} - \text{énolate}^*]}{7.92} \end{array} \right.$$

Nous définissons des conditions initiales :

A l'état fondamental, la forme phénol-énol est présente à 30% et la forme phénol-kéto à 70% mais à la longueur d'onde d'excitation 430 nm, seule la forme phénol-kéto est excitée. Toutes les constantes cinétiques sont fixées et déterminées par les mesures de déclin de fluorescence ou par la spectroscopie pompe sonde, mis à part k_2 et k_3 qui correspondent aux constantes associées à la conversion kéto/énol.

Le déclin de fluorescence du dérivé contient les contributions des formes phénol-énolate, phénol-énol et phénol-kéto et dépend donc de leurs constantes radiative k_{rad} :

$$F(t) = k_{rad,\lambda}^{phénol-énolate} * [phénol - énolate]^*(t) + k_{rad,\lambda}^{phénol-énol} * [phénol - énol]^*(t) + k_{rad,\lambda}^{phénol-kéto} * [phénol - kéto]^*(t)$$

Avec $k_{rad,\lambda} = k_{rad} * I(\lambda)$

$k_{rad} * I(\lambda)$	505 nm	525 nm	555 nm
Phénol-énolate	27	40	54
Phénol-kéto	110	106	86
Phénol-énol	18	8	3

Avec $I(\lambda)$, les intensité des courbes de fluorescence, multipliés par leur k_{rad} et leur temps de vie de fluorescence respectifs.

Au début de la procédure, les valeurs initiales pour k_2 et k_3 sont 0 ns⁻¹. Nous n'observons que le déclin de la forme phénol-énol (courbe rouge sur la Figure 55a). L'algorithme de fit détermine ensuite les constantes k_2 et k_3 qui permettent de décrire au mieux le déclin de fluorescence expérimental. La constante k_2 est quasiment nulle, donc la conversion de la

forme énol vers la forme kéto est donc négligeable devant la conversion kéto → énol dont les valeurs sont rapportées dans le Tableau 4.

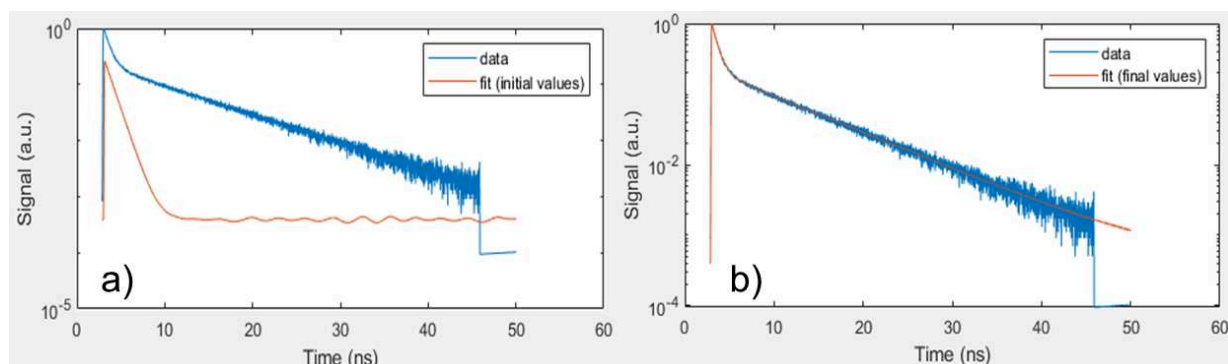


Figure 55 : a) la courbe bleue est le déclin de fluorescence du dérivé 6'-MeOxyLH à $\lambda_{ex} = 430$ nm et $\lambda_{em} = 525$ nm, la courbe rouge correspond aux données initiales de la procédure. b) représente le fit final lorsque la procédure est finie.

Tableau 4 : Constante de conversion kéto-énol en fonction des longueurs d'onde d'émission

	430 nm		
λ_{Em} (nm)	505	525	555
K3 (ns ⁻¹)	0,52	0,46	0,42

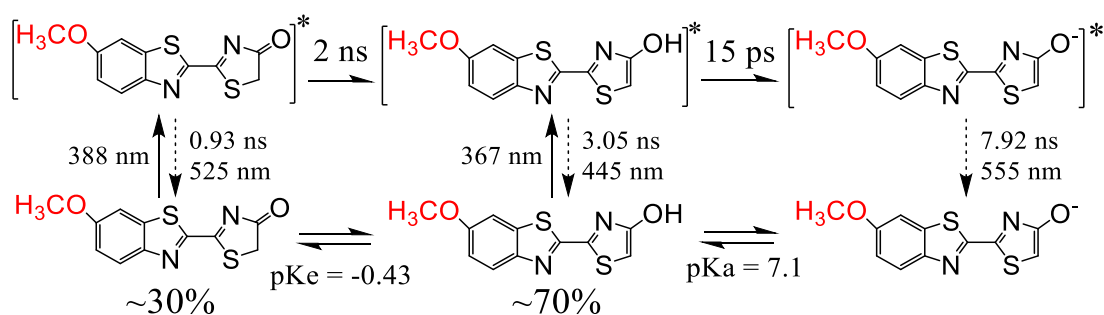


Schéma 12 : cycle de photoluminescence du dérivé 6'-MeOxyLH

Le Schéma 12 résume le chemin de photoluminescence du dérivé 6'-MeOxyLH avec les temps caractéristiques associés à la réaction de l'ESPT de la forme phénol-énol à la forme phénol-énolate déterminés par la spectroscopie pompe-sonde, ainsi que le taux d'interconversion calculé à l'état excité.

IV.5 Oxyluciférine

IV.5.1 Analyse à l'état stationnaire et résolue en temps

Après avoir étudié chaque phénomène un à un, en utilisant les différents dérivés pour ne sélectionner qu'une ou plusieurs formes possibles de l'OxyLH₂ et ainsi décomposer l'analyse de la molécule nous allons maintenant nous intéresser à cet émetteur naturel. A pH 5, l'absorption et l'émission de l'OxyLH₂ (Figure 56) correspond à celle du 6'-MeOxyLH, ce qui signifie qu'à l'état fondamental, les deux tautomères sont en équilibre avec la même proportion : 70% pour le phénol-kéto et 30% pour le phénol-énol et que l'émission à 555 nm correspond à celle du phénol-énolate. L'absorption à pH 11 est centrée à 425 nm et l'émission à 539 nm. Ces nouvelles propriétés n'ont pas été observées avec d'autres composés, nous les associons au di-anion phénolate-énolate (pKa=7,4 et 9,1).

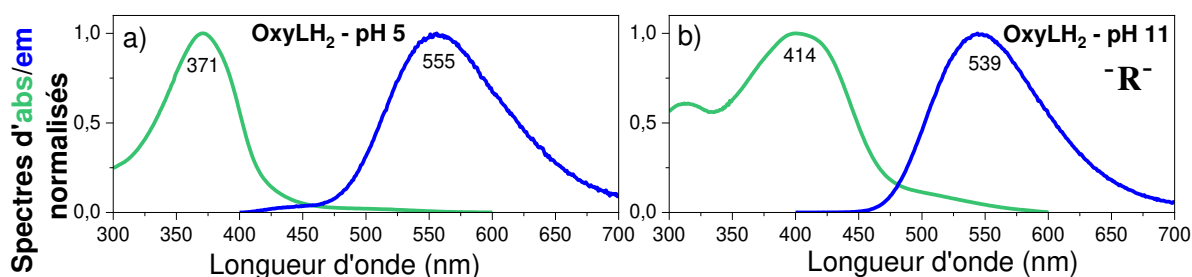


Figure 56 : Spectres d'absorption et d'émission normalisés de l'OxyLH₂ à pH 5 (a) et pH 11 (b)

Nous retrouvons une constante de 7,9 ns avec les mesures de fluorescence résolue en temps (Figure 57) à pH 5, observée avec le 6'-MeOxyLH, qui confirme l'émission de la forme phénol-énolate générée par la déprotonation de la forme phénol-énol. Une deuxième constante, cette fois-ci plus courte (590 ps) est, elle, associée à la durée de vie de la forme phénolate-kéto, observée avec le dérivé 5,5-Cpr-OxyLH, provenant de l'ESPT de la forme phénol-kéto. A pH 11, nous relevons une nouvelle constante de temps de 6,22 ns, temps de vie de la forme phénolate-énolate.

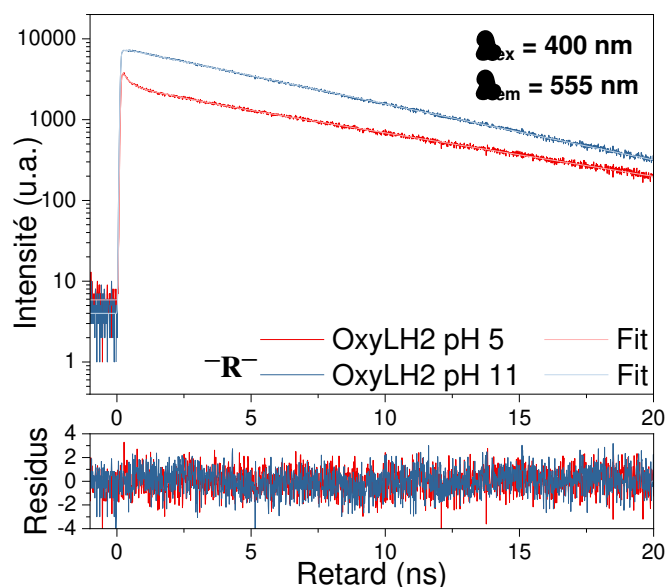


Figure 57 : Déclin de fluorescence de l'OxyLH₂ à pH 5 (courbe rouge) et pH 11 (courbe bleue) avec leur fit, et les résidus

La constante de temps de 590 ps de l'OxyLH₂ est légèrement éloignée de 630 ps, déclin de la forme phénolate-kéto mesuré avec le dérivé 5,5-Cpr-OxyLH à pH 11. Afin de nous assurer que ces deux valeurs correspondent bien au déclin de la même espèce, nous faisons un fit global sur le déclin de fluorescence de l'OxyLH₂ et du dérivée 5,5-Cpr-OxyLH à pH 11 (Figure 58). Le fit global révèle une constante de 0,6 ns avec un χ^2 de 1,15. L'erreur relative étant proche de 1, nous pouvons conclure que les deux déclins peuvent être ajustés avec la même constante de temps, caractéristique de la forme phénolate-kéto.

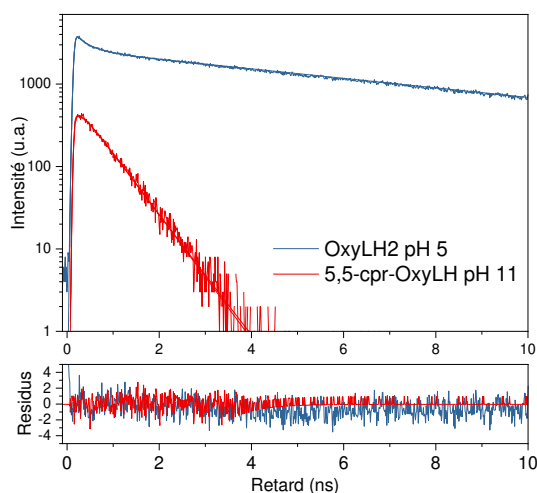


Figure 58 : fit global réalisé sur les mesures de TCSPC de l'OxyLH₂ et du 5,5-Cr-OxyLH à pH 11

IV.5.2 Analyse à l'état excité – spectroscopie pompe-sonde

Nous procédons maintenant à l'analyse par la spectroscopie pompe-sonde, les résultats sont représentés sur la Figure 59. Comme pour les précédents composés, nous identifions une ESA qui croît en quelques centaines de femtoseconde à 475 nm à pH 5. En revanche, une deuxième ESA apparaît autour de 700 nm, qui n'avait été observée que pour le 4,6'-DMeOxyl, le 6'-MeOxylH à pH 5 et le 4-MeOxylH à pH 5, c'est une signature de la forme phénol-énol. Sur une échelle de temps d'une dizaine de picoseconde, nous observons une décroissance de l'ESA de la forme phénol-énol et une croissance d'une troisième ESA autour de 525 nm ainsi qu'une très légère SE à 650 nm. La troisième ESA, qui est interprétée comme provenant de la forme phénolate-kéto, est créée avec l'ESPT de la forme phénol-kéto. Cette hypothèse explique aussi la croissance de la SE de l'espèce déprotonée. Le déclin de l'ESA à 700 nm correspond à l'ESPT de la forme phénol-énol vers la forme phénol-énolate comme observé avec le composé 6'-MeOxylH. De plus, nous remarquons sur la Figure 59c, une extension de la SE jusqu'à 600 nm. En effet, l'émission de la forme phénol-énolate à 555 nm, a une durée de vie plus longue que la forme phénol-kéto. Ainsi, lorsque l'ESA à 525 nm décroît, elle laisse apparaître cette SE.

A pH 11, l'OxylH₂ est totalement déprotonée à l'état fondamental nous pouvons alors déterminer les signatures de la forme phénolate-énolate avec l'expérience pompe-sonde. Trois contributions croissent avec une même échelle de temps, une SE autour de 575 nm et deux ESA, à 375 nm et vers 700 nm. Ces trois contributions déclinent en même temps car aucune réaction ne se produit à l'état excité.

Afin d'extraire les différentes constantes de temps des données pompe-sonde à pH 5 et pH 11, nous procédons à une analyse globale, voir la Figure 60. A pH 5, nous utilisons les quatre premiers vecteurs singuliers pour déterminer précisément les constantes de temps. Le cinquième vecteur singulier se situe dans le même ordre de grandeur que les résidus des fits des quatre premiers, il n'apporte donc pas d'informations supplémentaires. A pH 11 nous n'utilisons que les deux premiers vecteurs singuliers pour les mêmes raisons.

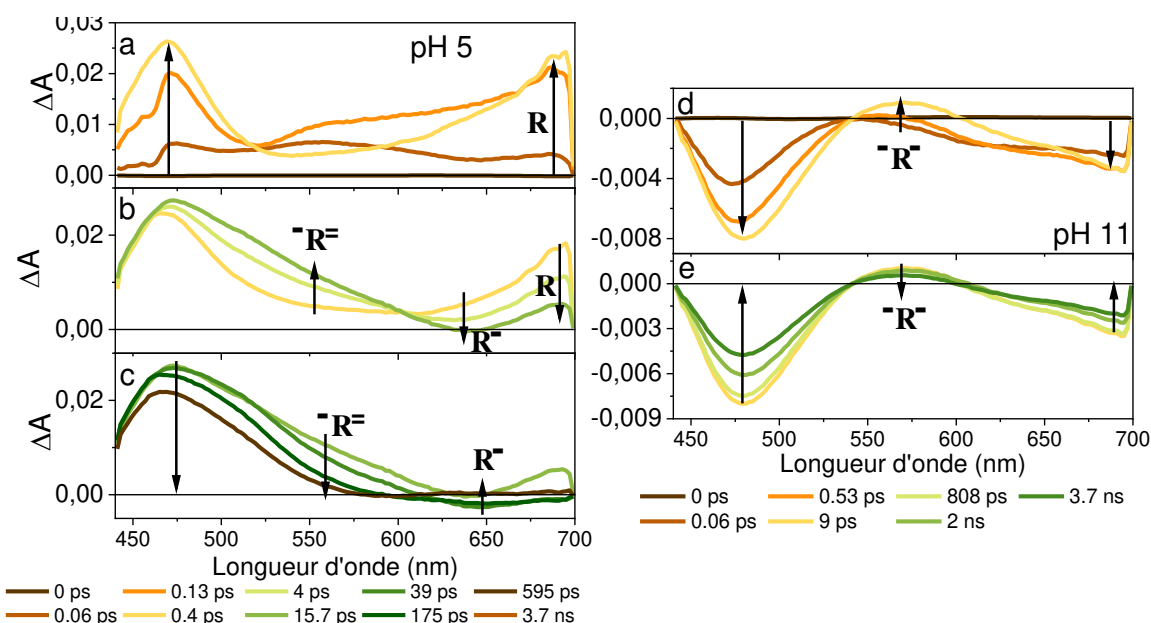


Figure 59 : Signal ΔA de l'OxyLH₂ en fonction des longueurs d'onde, mesuré à plusieurs retards à pH 5 (gauche) et pH 11 (droite)

Les différentes constantes de temps sont répertoriées dans le Tableau 5. Les constantes en rouge correspondent à la durée de vie de la forme phénolate-kéto, et celles en bleues sont la durée de vie de la forme phénol-énolate. Une seule constante de temps associée au transfert de proton, en vert, est observée pour l'OxyLH₂, elle correspond à une moyenne pondérée des deux transferts de proton observés pour le 6'-MeOxyLH et le 5,5-Cpr-OxyLH.

Tableau 5 : Temps caractéristiques des dérivés 6'-MeOxyLH, et 5,5-Cpr-OxyLH à pH 5 ainsi que de l'OxyLH₂ à pH 5 et pH 11

Dérivés	Relaxation vibrationnelle	ESPT	Temps de vie
6'-MeOxyLH à pH 5	$0,30 \pm 0,07$ ps	$15,3 \pm 0,8$ ps	$0,63 \pm 0,01$ ns $7,9 \pm 0,01$ ns
5,5-Cpr-OxyLH à pH 5	$0,43 \pm 0,01$ ps	$3,0 \pm 0,1$ ps $22 \pm 0,7$ ps	620 ± 10 ps
OxyLH ₂ à pH 5	$0,20 \pm 0,02$ ps	21 ± 1 ps	590 ± 10 ps $7,9 \pm 0,01$ ns
OxyLH ₂ à pH 11	$1 \pm 0,1$ ps $3,5 \pm 1,9$ ps		$6,2 \pm 0,01$ ns

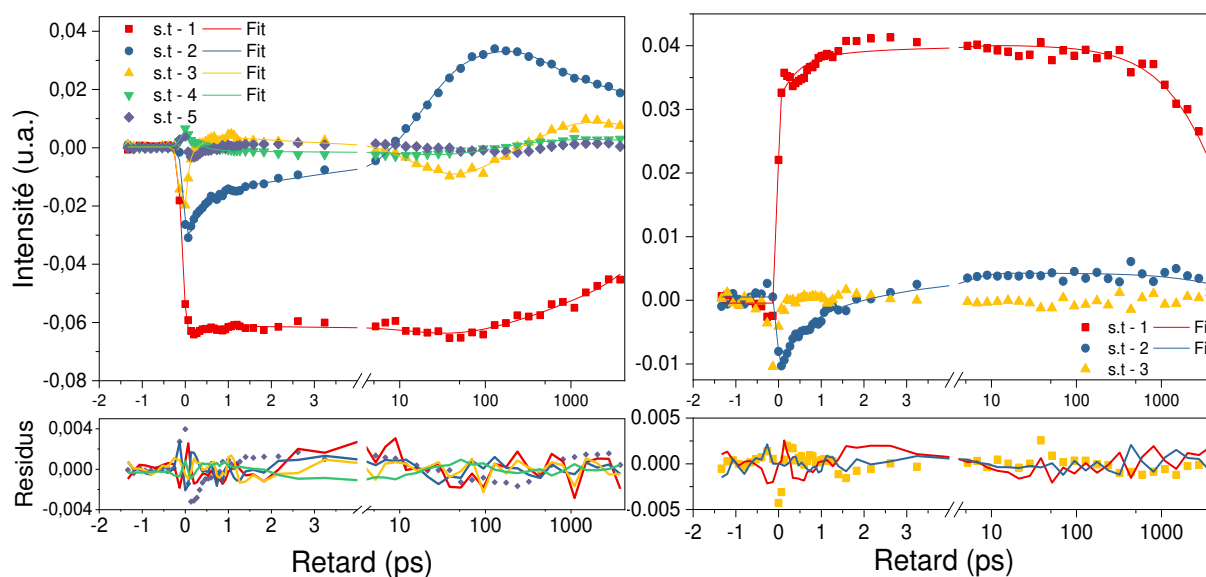


Figure 60 : courbes avec symboles - vecteurs singuliers (S.T) de l'OxyLH₂ à pH 5 à gauche et à pH 11 à droite. La courbe pleine correspond au fits des S.T et leurs résidus sont tracés en dessous de chaque graphes des S.T

Avec les amplitudes des différentes constantes de temps relevées, nous pouvons extraire les DAS, représentés sur la Figure 61. Les plus courtes, 0,2 ps à pH 5 et 1 ps e 3,5 ps à pH 11 sont associées à la relaxation vibrationnelle de la molécule et/ou à la solvation. Les courbes jaunes représentent les déclin de fluorescence, leurs valeurs associées ont été mesurées par la manipulation TCSPC. A pH 5, la constante du déclin de fluorescence 7,9 ns est la durée de vie de l'espèce phénol-énolate. Le DAS associé à cette constante décrit un déclin de l'ESA à 475 nm et de la légère SE autour de 600 nm, ces deux contributions sont des signatures de la forme phénol-énolate d'après les résultats obtenus pour le composé 6'-MeOxyLH. A pH 11, l'OxyLH₂ se présente sous sa forme déprotonée, phénolate-énolate et a une durée de vie de 6,2 ns. Le DAS associé à cette constante décrit donc le déclin des trois contributions présentes : des deux ESA à 475 nm et 700 nm, ainsi que de la SE à 560 nm. Deux nouvelles constantes apparaissent à pH 5, 21 ps et 590 ps. Nous pouvons facilement associer 21 ps aux deux transferts de proton, phénol → phénolate et émol → émolate dont les constantes valent respectivement 22 ps et 15 ps pour le 5,5-Cpr-OxyLH et le 6'-MeOxyLH. La différence entre ces deux valeurs n'est pas suffisante pour être discriminée dans nos mesures. La forme phénolate-kéto est observée avec une durée de vie de 590 ps avec les données de TCSPC. Cette constante est alors fixées dans les données pompe-sonde et correspond à la courbe DAS grise, sa forme spectrale est très proche de celle du DAS à 630 ps pour le dérivé 5,5-Cpr-OxyLH ce qui confirme l'association de cette constante à la durée de vie de la forme phénolate-kéto.

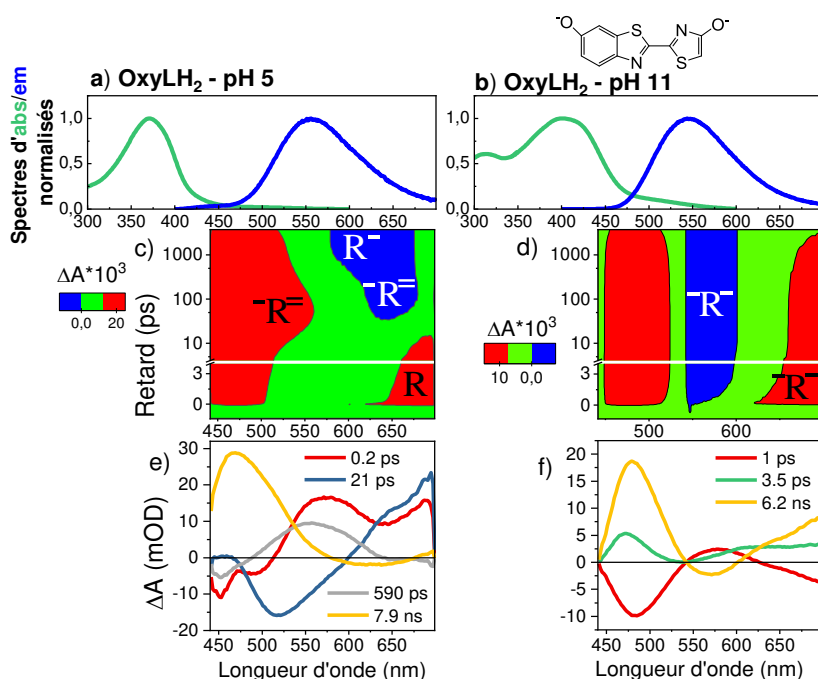


Figure 61 : a) et b) sont les spectres d'absorption et d'émission de l'OxyLH₂ à pH 5 à pH 11 respectivement, d) et e) représente les résultats 2D de la manipulation pompe sonde, reconstruits avec l'analyse globale, g) et h) sont les DAS des dérivés.

IV.5.3 Tautomérisation

Tout comme le composé 6-MeOxyLH, nous nous intéressons maintenant à une possible tautomérisation à l'état excité. A l'état fondamental, le pK_e entre la forme énol et la forme kéto vaut -0.4, et les proportions relatives des espèces sont de 30% pour la forme phénol-kéto et 70% pour la forme phénol-énol⁶⁶.

De même que précédemment, nous excitons spécifiquement la forme phénol-kéto avec une excitation à 430 nm. Juste après excitation, donc avant toutes réactions à l'état excité, nous considérons une population N de l'espèce phénol-kéto*. Celle-ci peut se déprotoner pour créer la forme phénolate-kéto ou subir une conversion pour faire apparaître la forme phénol-énol qui elle-même se convertira en phénol-énolate après une déprotonation. Avant de calculer le taux de conversion à l'état excité, nous allons tout d'abord chercher à connaître les concentrations relatives des formes phénolate-kéto et phénol-énolate avec la méthode de TCSPC ainsi qu'à partir des spectres d'émission mesurés à l'état stationnaire. En utilisant ces résultats, nous pourrons calculer le taux de conversion en résolvant le système d'équations différentielles couplées. Et enfin, pour confirmer nos résultats, nous réutiliserons la dernière

méthode qui consiste à ajuster une courbe de déclin de fluorescence avec la résolution du système d'équations différentielles définis.

IV.5.3.1 Détermination des concentrations relatives de la formes phénolate-kéto et phénol-énolate

IV.5.3.1.1.D'après les déclins de fluorescence

Dans une première série d'expériences, nous avons mesuré les déclins de fluorescence après excitation à 430 nm, aux longueurs d'onde d'émission suivantes : 610 nm, 640 nm et 670 nm. L'analyse des déclins de fluorescence a révélé la présence des deux formes déprotonées : 0,63 ns pour le phénolate-kéto et 7,9 ns pour le phénol-énolate. Le fit permet également de déterminer les amplitudes associées à ces deux contributions :

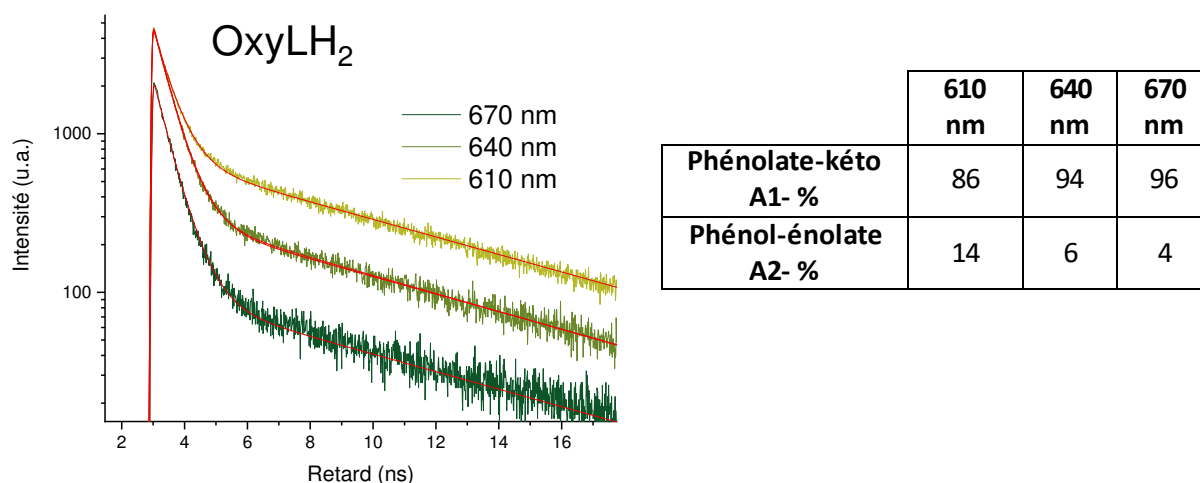


Figure 62 : Déclins de l'OxyLH₂ à $\lambda_{ex} = 430$ nm et $\lambda_{em} = 610, 640$ et 670 nm, les courbes correspondent à un fit bi-exponentiel avec $\tau_1 = 0.63$ ns et $\tau_2 = 7.92$ ns, les amplitudes associées aux constantes de temps sont répertoriées dans le tableau

Le signal de fluorescence $S(\nu, t)$ s'écrivant de la même façon que pour le 6'MeOxyLH eq (1), il est possible d'en déduire les concentrations relatives des espèces phénolate-kéto et phénol-énolate à partir des amplitudes des fits :

$$N_i(0) = \frac{A_i(\nu)}{F_i(\nu)} = \frac{A_i(\nu)}{k_{rad} \cdot I_i(\nu)}$$

Avec k_{rad} pour l'espèce phénolate-kéto : $k_{rad} = 11e7 \text{ s}^{-1}$ et pour l'espèce phénol-énolate : $k_{rad} = 9,9e7 \text{ s}^{-1}$

$I(\nu)$ est le spectre d'émission normalisé : $\int I(\nu) d\nu = 1$.

Finalement, pour l'oxyluciférine, en solution aqueuse à pH 5, l'état excité est composé de 22% de phénol-énolate et 78% de phénolate-kéto après les réactions de déprotonation ou d'interconversion d'après le tableau suivant.

	610 nm	640 nm	670 nm
Phénolate-kéto N1- %	77	77	80
Phénol-énolate N2- %	23	23	20

IV.5.3.1.2.D'après les spectres d'émission à l'état stationnaire

Afin de confirmer ces premiers résultats, nous répétons la procédure qui permet d'analyser les résultats obtenus à l'état stationnaire. Le spectre de l'OxyLH₂ peut être reconstruit avec une combinaison linéaire du spectre de la forme phénol-énolate et phénolate-kéto (Figure 63). Chacun d'eux ont été au préalable, normalisés par leur constante radiative et leur durée de vie, comme décrit précédemment.

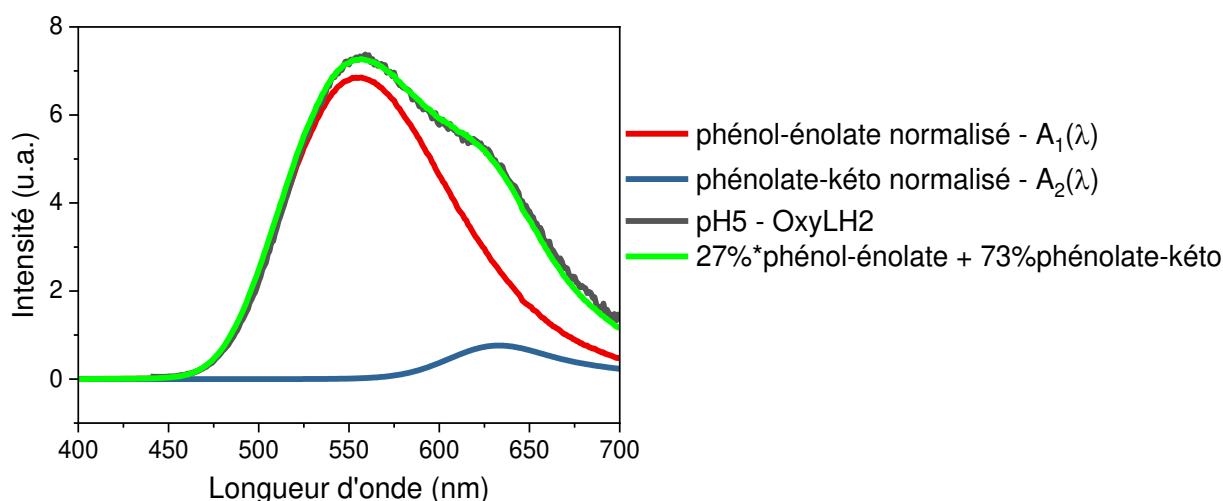
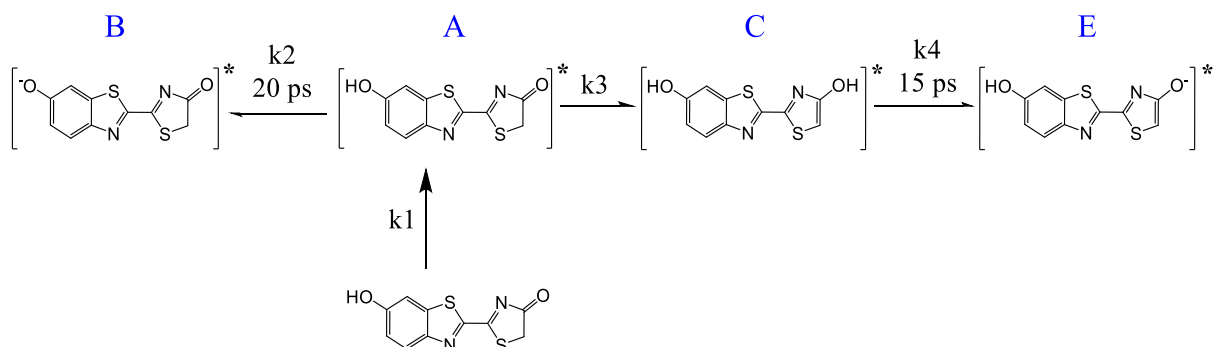


Figure 63 : Spectres d'émission normalisés de l'OxyLH₂ (noir), phénolate-kéto (bleu), phénol-énolate (rouge). Le spectre d'émission calculé (vert) est obtenu avec une combinaison linéaire des deux spectres phénolate-kéto et phénol-énolate

Les résultats obtenus démontrent qu'à l'état excité et après excitation spécifique de la forme phénol-kéto de l'OxyLH₂, les propriétés d'émission découlent d'un mélange pour lequel il y a 27% de phénol-énolate et 73 % de phénolate-kéto. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec l'analyse résolue en temps et valide le rapport des concentrations 25/75 (phénol-énolate/phénolate-kéto) à l'état excité, après les réactions de conversion ou de déprotonation contre un rapport 70/30 (phénol-énol/phénol-kéto) à l'état fondamental. Ce changement de rapport démontre l'existence de la conversion kéto → émol.

IV.1.1.1 Détermination du taux de conversion kéto-énol – méthode n°1

Afin de caractériser la dynamique de cette conversion, nous définissons un modèle numérique où nous supposons, comme dans le cas du composé 6'-MeOxylH, que la conversion éno1→kéto est très lente devant la conversion kéto→éno1 :



En résolvant analytiquement à l'aide du logiciel *Maple* le système d'équations différentielles couplées, nous obtenons les équations suivantes qui permettent de déterminer les fractions relatives (à N) des formes phénolate-kéto et phénol-énolate :

$$B = f_{phenolate-keto} = \frac{N * k2(1 - e^{-(k3+k2)t})}{k2 + k3}$$

$$E = f_{phenol-enolate} = \frac{N * k3.((k3 + k2).(1 - e^{-k4.t}) - k4.(1 - e^{-(k3+k2)t}))}{(k3 + k2).(k3 + k2 - k4)}$$

Quand $(k3 + k2)t \gg 1$ et $k4t, (k3 + k2)t \gg 1$, nous pouvons définir les concentrations relatives des deux formes émettrices en fonction des constantes de vitesse :

$$B = \frac{N * k2}{k2 + k3} ; E = \frac{N * k3}{k2 + k3}$$

En reprenant les concentration $N_1(0)$ et $N_2(0)$, correspondant aux nombres de molécules phénolate-kéto et phénol-énolate immédiatement après l'interconversion kéto→éno1, définie avec les mesures statiques et résolue en temps décrites ci-dessus, et en les associant avec les équations E et B, il est possible des calculer k3 :

$$\frac{N_1(0)}{N_2(0)} = \frac{A_1(v) k_{rad2} \cdot I_2(v)}{A_2(v) k_{rad1} \cdot I_1(v)} = \frac{B}{E}$$

$$k3 = k2 * \frac{A_2(v) k_{rad1} \cdot I_1(v)}{A_1(v) k_{rad2} \cdot I_2(v)}$$

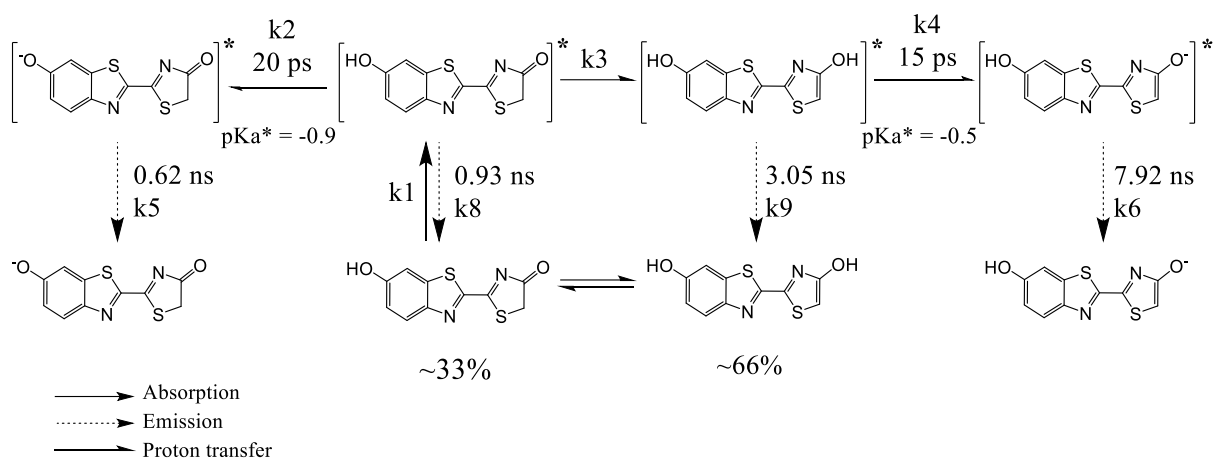
λ	610 nm	640 nm	670 nm
k3 (ns⁻¹)	19,6	19,1	16,5

Ainsi, nous obtenons une constante de conversion de la forme kéto vers la forme énole de ~ 55 ps ($k3_{moy} = 18,4 \text{ ns}^{-1}$) à pH 5 en solution aqueuse d'après le tableau ci-dessus.

IV.1.1.2 Détermination du taux de conversion kéto-énole – méthode n°2

Une nouvelle étude est réalisée pour confirmer ces premiers résultats. Le but de celle-ci est d'utiliser un fit sur les données de TCSPC avec la résolution des équations différentielles couplées. Afin de déterminer la valeur de k3 qui décrit au mieux la dynamique d'émission, nous utilisons plusieurs longueurs d'onde d'émission 610, 640 et 670 nm.

Nous définissons les conditions initiales :



$$\left\{ \begin{array}{l}
 \frac{d[\text{phénol} - \text{kéto}]}{dt} = -k_{1c} e^{-\left(\frac{t-t_0}{\tau_0}\right)^2} [\text{phénol} - \text{kéto}] + \frac{[\text{phénol} - \text{kéto}^*]}{0.93} \\
 \frac{d[\text{phénol} - \text{kéto}^*]}{dt} = k_{1c} e^{-\left(\frac{t-t_0}{\tau_0}\right)^2} [\text{phénol} - \text{kéto}] - \frac{[\text{phénol} - \text{kéto}^*]}{0.93} - k_3 [\text{phénol} - \text{kéto}^*] + k_4 [\text{phénol} - \text{éno}^*] - \frac{[\text{phénol} - \text{kéto}^*]}{0.02} \\
 \frac{d[\text{phénol} - \text{éno}]}{dt} = \frac{[\text{phénol} - \text{éno}^*]}{3.05} \\
 \frac{d[\text{phénol} - \text{éno}^*]}{dt} = k_3 [\text{phénol} - \text{kéto}^*] - \frac{[\text{phénol} - \text{éno}^*]}{0.015} - \frac{[\text{phénol} - \text{éno}^*]}{3.05} \\
 \frac{d[\text{phénol} - \text{énolate}^*]}{dt} = \frac{[\text{phénol} - \text{éno}^*]}{0.015} - \frac{[\text{phénol} - \text{énolate}^*]}{7.92} \\
 \frac{d[\text{phénolate} - \text{kéto}^*]}{dt} = \frac{[\text{phénol} - \text{kéto}^*]}{0.02} - \frac{[\text{phénolate} - \text{kéto}^*]}{0.62}
 \end{array} \right.$$

Comme le composé étudié dans la partie précédente, à l'état fondamental, la forme phénol éniol est présente à 30% et la forme phénol kéto à 70% mais à 430 nm seulement la forme phénol-kéto est excitée. Toutes les constantes cinétiques sont fixées et déterminées par les mesures de déclin de fluorescence ou par la spectroscopie pompe-sonde, mis à part k_3 qui correspond à la constante de la conversion kéto→éniol, nous rappelons que le retour éniol→kéto est supposé être très lent.

Le déclin de fluorescence de l'OxyLH₂ est composé du déclin de la forme phénol-kéto, phénolate-kéto et phénol-éniolate :

$$F(t) = k_{rad,\lambda}^{phenolate-keto} \times [phenolate - keto]^*(t) + k_{rad,\lambda}^{phenol-enolate} \times [phenol - enolate]^*(t) + k_{rad,\lambda}^{phenol-keto} \times [phenol - keto]^*(t)$$

Avec $k(rad, \lambda) = k_{rad} * I(\lambda)$

$k(rad, \lambda)$	670 nm	640 nm	610 nm
Phénol-kéto	7,8	20	22,8
Phénol-éniolate	12,5	14,8	28,2
Phénolate-kéto	83,6	80,2	60,4

Les intensités utilisées sont celles des courbes de fluorescence des différentes formes .

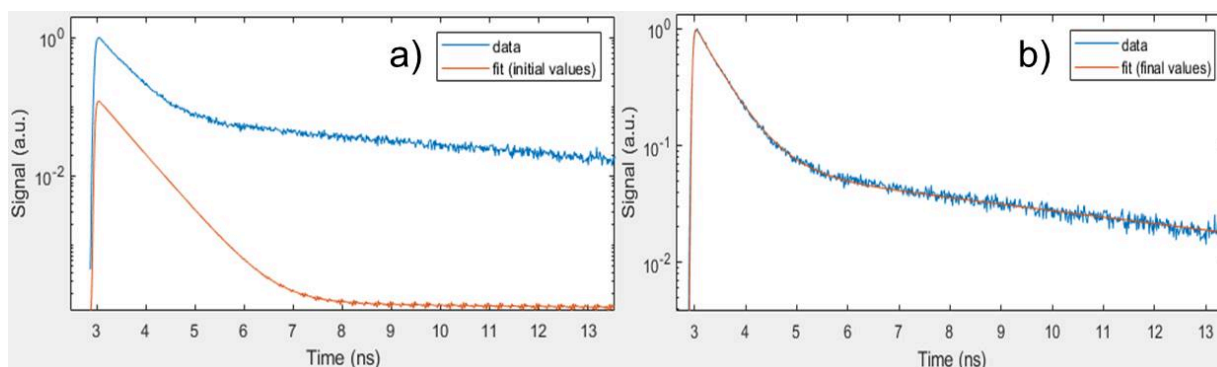


Figure 64 : a) la courbe bleue est le déclin de fluorescence de l'OxyLH₂ à $\lambda_{ex} = 430$ nm et $\lambda_{em} = 640$ nm, la courbe rouge correspond aux données initiales de la procédure. b) représente le fit final lorsque la procédure est finie.

Le fit initial à une constante k_3 égale à zéro, on observe alors un temps de montée due à la formation de la forme phénolate puis une seule constante de désexcitation de cette même forme phénolate-kéto (0,63 ns, Figure 64a). Après avoir convergé, l'algorithme permet de décrire parfaitement les résultats expérimentaux (Figure 64b). La valeur finale pour la constante k_3 est environ 17 ns^{-1} , cette valeur est en accord avec l'analyse précédente et

confirme une conversion de la forme cétone à la forme énole avec une constante de temps de 60 ps.

OxyLH2	430 nm		
Em	610	640	670
k3 (ns ⁻¹)	17,86	17,52	15,64

IV.2 Conclusion

Dans cette partie, nous avons utilisé la spectroscopie pompe-sonde afin de caractériser la dynamique à l'état excité de l'OxyLH₂ et de ces analogues en fonction du pH. L'utilisation du dérivé 5,5-Cpr-OxyLH a permis de déterminer pour la première fois, en solution aqueuse, le temps caractéristique l'ESPT associé à la conversion de la forme phénol-kéto vers la forme phénolate-kéto. Cette constante est de l'ordre de 20 ps, pour le dérivé 4-MeOxyLH, l'ESPT de la forme phénol-énol à phénolate-énol présente quant à lui un temps caractéristique d'environ 200 ps. Le composé suivant, 6'-MeOxyLH, a été utilisé pour suivre l'ESPT de la forme phénol-énol vers la forme phénol-énolate, et déterminer sa constante de temps qui est de l'ordre de 15 ps. De plus, nous avons aussi démontré une interconversion à l'état excité de la forme kéto vers la forme énol. Tous ces résultats ont permis d'interpréter la dynamique de l'émetteur naturel, l'OxyLH₂ et de compléter le cycle de photoluminescence avec les différentes cinétiques à l'état excité (Schéma 13).

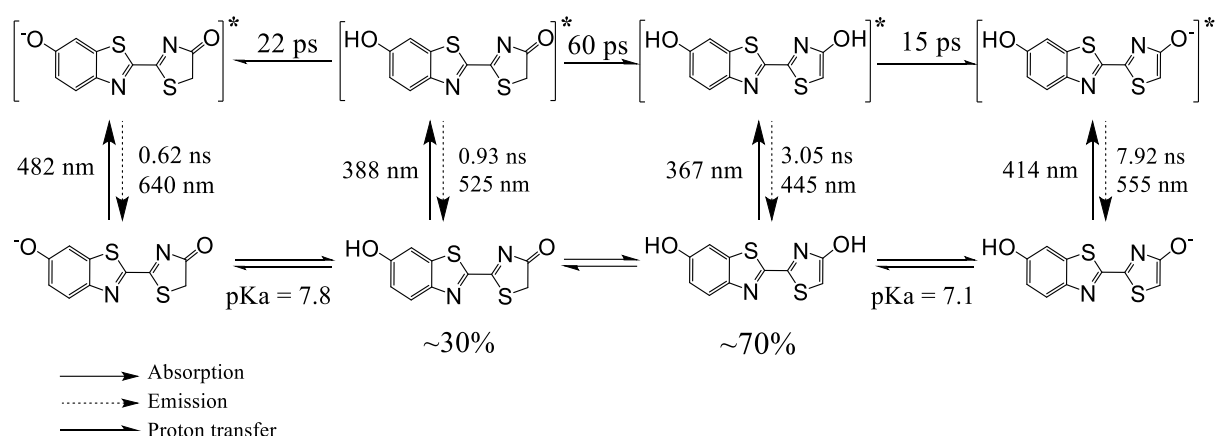


Schéma 13 : cycle de photoluminescence de l'oxyluciférine

Article I

Excited-State Proton Transfer in Oxyluciferin and Its Analogues

Excited-State Proton Transfer in Oxyluciferin and Its Analogues

Pauline Gosset, Grégory Taupier, Olivier Crégut, Johanna Brazard, Yves Mély, Kokou-Dodzi Dorkenoo, Jérémie Léonard,* and Pascal Didier*



Cite This: *J. Phys. Chem. Lett.* 2020, 11, 3653–3659



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

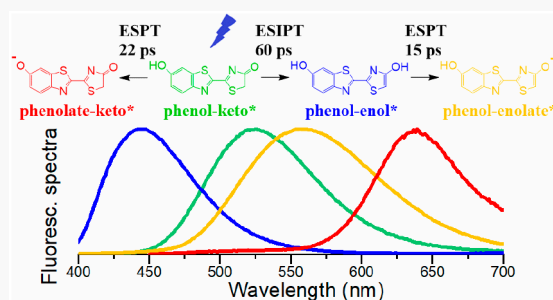


Article Recommendations



Supporting Information

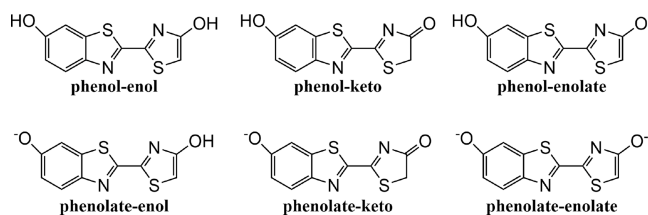
ABSTRACT: One of the most characterized bioluminescent reactions involves the firefly luciferase that catalyzes the oxidation of the luciferin producing oxyluciferin in its first excited state. While relaxing to the ground state, oxyluciferin emits visible light with an emission maximum that can vary from green to red. Oxyluciferin exists under six different chemical forms resulting from a keto/enol tautomerization and the deprotonation of the phenol or enol moieties. The optical properties of each chemical form have been recently characterized by the investigations of a variety of oxyluciferin derivatives, indicating unresolved excited-state proton transfer (ESPT) reactions. In this work, femtosecond pump–probe spectroscopy and time-resolved fluorescence spectroscopy are used to investigate the picosecond kinetics of the ESPT reactions and demonstrate the excited state keto to enol conversion of oxyluciferin and its derivatives in aqueous buffer as a function of pH. A comprehensive photophysical scheme is provided describing the complex luminescence pathways of oxyluciferin in protic solution.



Bioluminescence refers to the fascinating phenomenon of natural conversion of chemical energy into light¹ by living organisms. It is observed in the deep sea from sharks,² dinoflagellates,^{3,4} and jellyfishes³ or on earth from bacteria^{3,5} or worms.⁶ To date, firefly is the most studied bioluminescent organism due to the high efficiency of its light-emissive enzymatic reaction.⁷ The light is emitted through the luciferase-catalyzed oxidation of D-luciferin resulting in the formation of oxyluciferin (OxyLH₂) in its first singlet excited state (S₁), which then decays radiatively to the ground state.^{8–11} Due to its high quantum yield and the absence of autofluorescence (no photoexcitation) that enable a high signal-to-noise ratio, the luciferin/luciferase complex is very popular and widely used as a luminescent probe^{11,12} for bioassays^{13–15} and for in vivo and in vitro bioimaging.^{16–20}

Natural bioluminescence wavelengths are observed to vary from green to red.^{1,21} Due to its increasing number of applications, it is essential to understand the origin of the color modulation which depends on several factors such as temperature, pH, or nature of the luciferase enzyme.^{1,22–24} Oxyluciferin can exist under six different chemical forms resulting from keto/enol tautomerization (see Scheme 1) and the deprotonation of the phenol and enol moieties.^{25,26} The main obstacle to the understanding of the OxyLH₂ fluorescence emission is the high complexity of its environment-sensitive photochemistry, which implies several ground-state equilibria and excited-state interconversions between various protonated/deprotonated and keto/enol forms. In addition, a major limiting experimental factor has long been related to the chemical synthesis of OxyLH₂, its lability being

Scheme 1. Possible Ground-State Chemical Forms of Oxyluciferin in Solution

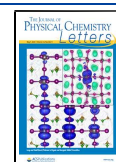


due to the presence of both keto and enol forms in protic solution that permits a Mannich-type dimerization.²⁷ For these reasons, most spectroscopic investigations were performed on luciferin in solution in the absence of the enzyme^{28–32} or only recently on OxyLH₂ and model compounds where excited state proton transfer (ESPT) or keto–enol tautomerization are blocked. The steady-state optical properties of these derivatives have been extensively investigated both theoretically^{26,33–41} and experimentally^{31,42,43} allowing for instance determination of the relative concentrations of each chemical form as a function of pH.^{31,42} We recently characterized the pH dependence of oxyluciferin photophysics by using the 5,5-

Received: March 16, 2020

Accepted: April 20, 2020

Published: April 20, 2020



Cpr-OxyLH (Cpr = (spiro) cyclopropyl) and the 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL to mimic the keto species and 4-MeOxyLH, 6'-MeOxyLH, or 4,6'-DMeOxyL as enol analogues.³¹ These experiments allowed us to propose a complete model to account for the photoluminescence cycle of OxyLH₂ in aqueous solution. However, the limited temporal resolution of these experiments prevented the characterization of the sub-50 ps dynamics associated with excited state reactions (ESPT and tautomerization). The majority of the ultrafast spectroscopy investigations to characterize the ESPT of D-luciferin, and more recently of OxyLH₂ in solution were performed by the group of D. Huppert^{44–47} by time-resolved fluorescence up-conversion or photon counting techniques. Presiado et al. worked with D-luciferin to mimic the keto form and dehydroluciferin to model the enol form,⁴⁴ and other groups used the 5,5-dimethyloxyluciferin to inhibit the keto–enol tautomerization.^{6,11} Erez et al. used fluorescence up-conversion to determine ESPT rate constant in water ($3.0 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$). They were however not able to disentangle the contributions of the various forms of OxyLH₂ which were since then shown to coexist in their experimental conditions (pH = 6).³¹ The only transient absorption experiment we are aware of was carried out on luciferin, with ps time resolution.⁴⁸

The ESPT reaction is also predicted by theoretical calculations performed to model the proton transfer for OxyLH₂ and its analogues.^{49–52} Another key feature of the OxyLH₂ photophysics relies on the keto–enol tautomerization. Indeed, according to the well-established enzymatic reaction model, the bioluminescence emitter is produced in its keto form which can, during its excited state lifetime, undergo partial enolization and deprotonation. Experiments performed by Naumov et al. using oxyluciferin analogues evidenced that in a nonpolar and basic environment the keto form in the excited state can tautomerize into the enol form, which subsequently undergoes excited state proton transfer to produce the enolate ion.^{26,32} These authors were however unable to determine the time scale of the keto–enol conversion.

To decipher the ps kinetics associated with the conversion between the OxyLH₂ species, we report here on femtosecond transient absorption (TA) and nanosecond fluorescence decay measurements (see experimental details in the [Supporting Information](#) (SI)) performed on OxyLH₂ and its analogues ([Scheme 2](#)) in acidic (pH = 5) and basic (pH = 11) aqueous buffer solutions for which it is possible to avoid a mixture between protonated and deprotonated forms in the ground state. Still, the ground state keto–enol tautomerism results in

the coexistence of both phenol–keto ([Scheme 2a](#)) and phenol–enol ([Scheme 2b](#)) tautomers for the OxyLH₂ at pH = 5 as previously reported.³¹

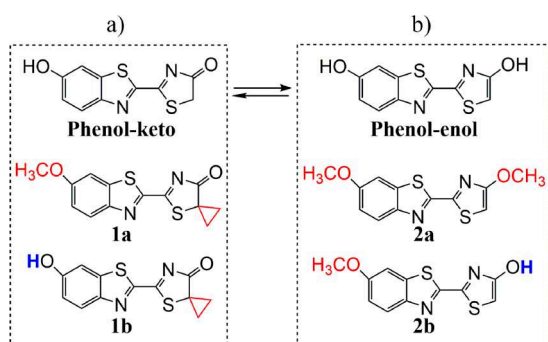
Hence, we first studied compounds **1a** and **1b** which mimic the keto species, since the Cpr cycle prevents the conversion to the enol form (see [Scheme 1](#)). In **1a**, the phenol form is “locked” since the hydroxyl group is replaced by a methoxy substituent (red) that precludes deprotonation in S₀ and in S₁ (ESPT is no longer possible). Conversely, **1b** is used to investigate the phenol–phenolate conversion of the keto form, in both S₀ and S₁. [Figure 1](#) displays the TA data obtained for these compounds as a function of pH.

The absorption and emission maxima wavelengths of **1a** are 388 and 525 nm respectively, independent of the pH value ([Figure 1a](#)). At pH = 5, **1b** is protonated and its absorption spectrum is the same as that of **1a**, characterizing the phenol–keto form. At pH = 11, **1b** is deprotonated (i.e., phenolate–keto) and its absorption maximum is shifted to 482 nm. For both pH values, the emission spectrum of **1b** is the same, centered at 640 nm, indicating that the same emissive state is observed.

For **1a**, two contributions are clearly apparent in the TA data ([Figure 1d](#)), a positive signal (in red) at 460 nm associated with an Excited-State Absorption (ESA) and a negative signal (in blue) at 525 nm corresponding to the Stimulated Emission (SE) band matching the steady-state emission spectrum of the phenol–keto form later denoted **R⁼** hereafter. For **1b** at pH = 5, the early ESA and SE bands at 470 and 525 nm respectively, are associated with the same S₁ signature of the phenol–keto form (**R⁼**). After a few picoseconds, these bands undergo a red shift to 550 and 640 nm respectively, which correspond to the S₁ signatures of the phenolate–keto form (**R⁼**) as evidenced by the TA data obtained at pH = 11 in [Figure 1f](#). We conclude that the TA data for **1b** at pH = 5 reveal the deprotonation of the phenol–keto form in S₁, namely an ESPT reaction. At long time delays at pH = 5 ([Figure 1e](#)), a positive signal at 480 nm remains up to 4 ns (and beyond), after the decay of the two **R⁼** S₁ signatures. This long-lived signal corresponds to the absorption band of the deprotonated, ground-state phenolate–keto form.

The results of the global analysis of the TA data (see methods in [Table S1](#)) are reported [Figure 1g,h,i](#). The long time constants (yellow) were obtained from fluorescence decay measurements (see [Table S2](#)) and fixed for the TA analysis. The short time constants of 0.6 and 2.2 ps for **1a**, 0.43 ps for **1b** at pH = 5, and 0.5 and 4.25 ps for **1b** at pH = 11 characterize spectral relaxations likely due to vibrational and solvent relaxation. The 3 ps time constant for **1b** at pH = 5 is a time scale on which we may expect further vibrational and solvent relaxation in line with the 2.2 ps DAS obtained for **1a**, but on this time scale, the rise of the 640 nm SE band of the deprotonated form (**R⁼**) is clearly observed. On the 22 ps time constant, we observe the complete decay of the initial ESA band at 470 nm, as well as the decay of the initial SE and rise of the subsequent ESA both around 540–570 nm. Hence, both the 3 and 22 ps time constants are associated with the ESPT reaction kinetics. The DAS associated with the infinite time constant is similar to the steady-state absorption spectrum measured at pH = 11, confirming its assignment to the deprotonated ground state. Therefore, reprotonation of the ground state is significantly slower than 4 ns, which is the maximum accessible time delay in our TA experiment.

Scheme 2. Model Compounds Used To Mimic Various Forms of OxyLH₂



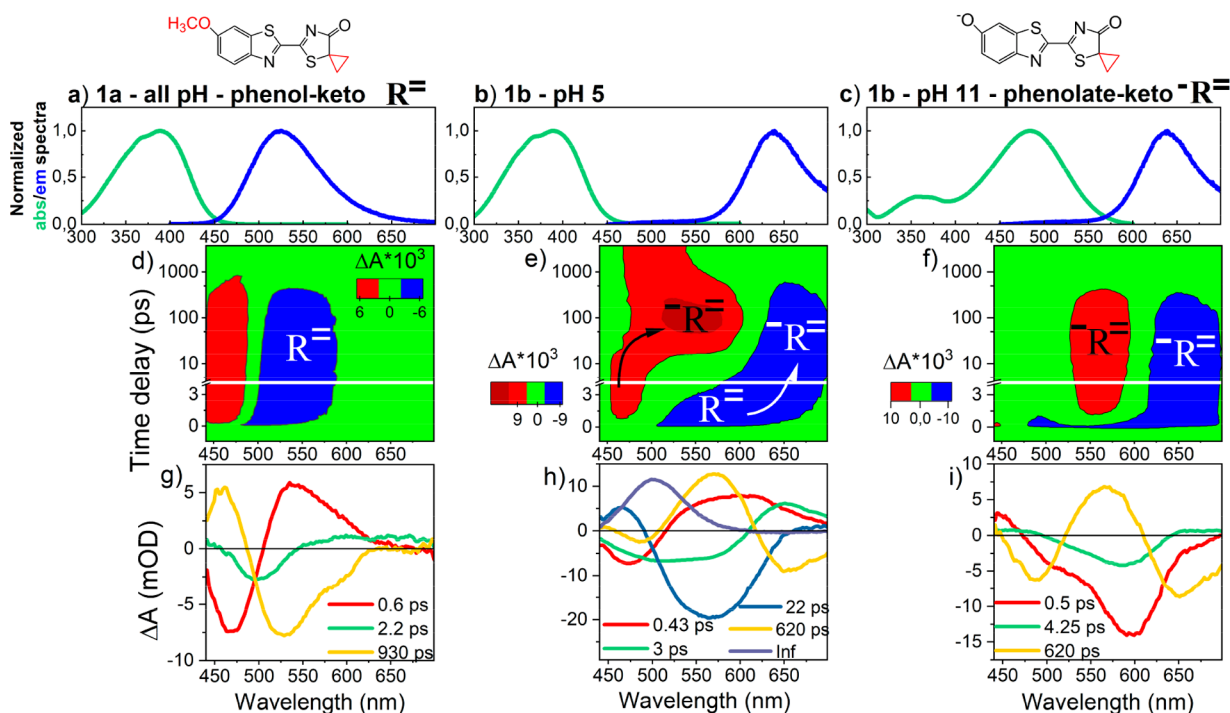
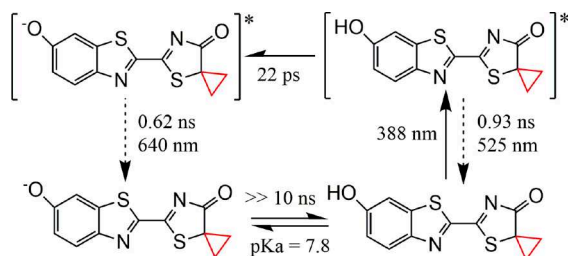


Figure 1. Excited-state signatures of the phenol-keto analogues. TA spectroscopy of **1a** for all pH values (right) and **1b** at pH = 5 (middle) and pH = 11 (left). (a, b, and c) Steady-state absorption (green) and emission (blue) spectra. (d, e, and f) 2D, false-color representations of the differential transient absorption (ΔA) signal as a function of probe wavelength and pump–probe delay. Positive (red) and negative (blue) contributions are Excited State Absorptions (ESA) and Stimulated emissions (SE), respectively. (g, h, and i) Decay Associated Spectra (DAS) obtained from global analysis (see methods in SI).

Scheme 3 summarizes the photoluminescence pathway of the phenol-keto form and the characteristic time associated

Scheme 3. Photoluminescence Pathway of the Phenol-Keto Species



with the ESPT reaction from the phenol-keto to phenolate-keto form, as determined here by TA spectroscopy.

We next report on the excited-state dynamics of **2a** and **2b** (Scheme 2b). For **2a**, where two methoxy groups prevent deprotonation in S_0 or S_1 , the absorption and emission maxima are at 367 and 445 nm, respectively (Figure 2a). For **2b**, only one methoxy group is present to lock the “phenol” moiety, i.e. methoxyphenyl, such that the enol–keto conversion may occur. At pH = 5, the absorption spectrum is maximum at 367 nm and corresponds to a mixture of both tautomers which indeed coexist at equilibrium in the ground state. Upon excitation at 400 nm, the fraction of light absorbed by the enol and keto forms are 66% and 34%, respectively.⁴² Only the enol moiety can undergo an ESPT. At pH = 11 instead, the enolate form is pure in the ground state with an absorption band (415 nm) characterizing the phenol-enolate form. The **2b** emission maximum is 555 nm for both pH values.

The TA spectra for **2a** are characterized by two ESA bands centered at 475 and 675 nm (Figure 2d), the former one overcoming—and therefore masking—the SE signal expected in the same spectral range. The 675 nm ESA will next be used as a specific S_1 signature of the phenol-enol form denoted **R** hereafter. For **2b** at pH = 5, the same two ESA bands as in **2a** (**R** signature) are observed at early times and are replaced after several tens of ps by the S_1 signatures of the phenol-enolate form (**R**[−]), revealed at pH = 11 (Figure 2f). We note here, already, that since both tautomers are present in the ground state, we should also expect to observe in the **2b** TA map the **R**[−] signature as illustrated in Figure 1d (remember that **2b** cannot deprotonate on the phenol moiety, like **1a**). While the **R**[−] signature is however not easily identified by visual inspection of Figure 2e, it will clearly arise from its quantitative analysis and corresponding DAS as discussed below.

The DAS resulting from global analysis (see Table S1) are displayed in Figure 2g, h, and i. Here again, the shortest time constants of 1.6 ps for **2a** and 0.3 ps for **2b** at pH = 5 and 0.2 and 2.1 ps for **2b** at pH = 11 are attributed to intramolecular and solvent relaxations, and the longest time constants (yellow) are those obtained from fluorescence decay measurements (Table S2). The remaining 15 and 630 ps components for **2b** at pH = 5 are not present at pH = 11. The 15 ps DAS is clearly associated with the phenol-enol to phenol-enolate ESPT, because its spectral shape reveals the decay of the 675 nm ESA band characterizing **R**, and the rise of the **R**[−] SE band around 580 nm. Finally, the 630 ps DAS (Figure 2h, gray curve) displays, below 600 nm, a spectral shape similar to that of the 930 ps DAS characterizing the decay of the phenol-keto (**R**[−]) signature as identified with **1a** (Figure 1g), in full line

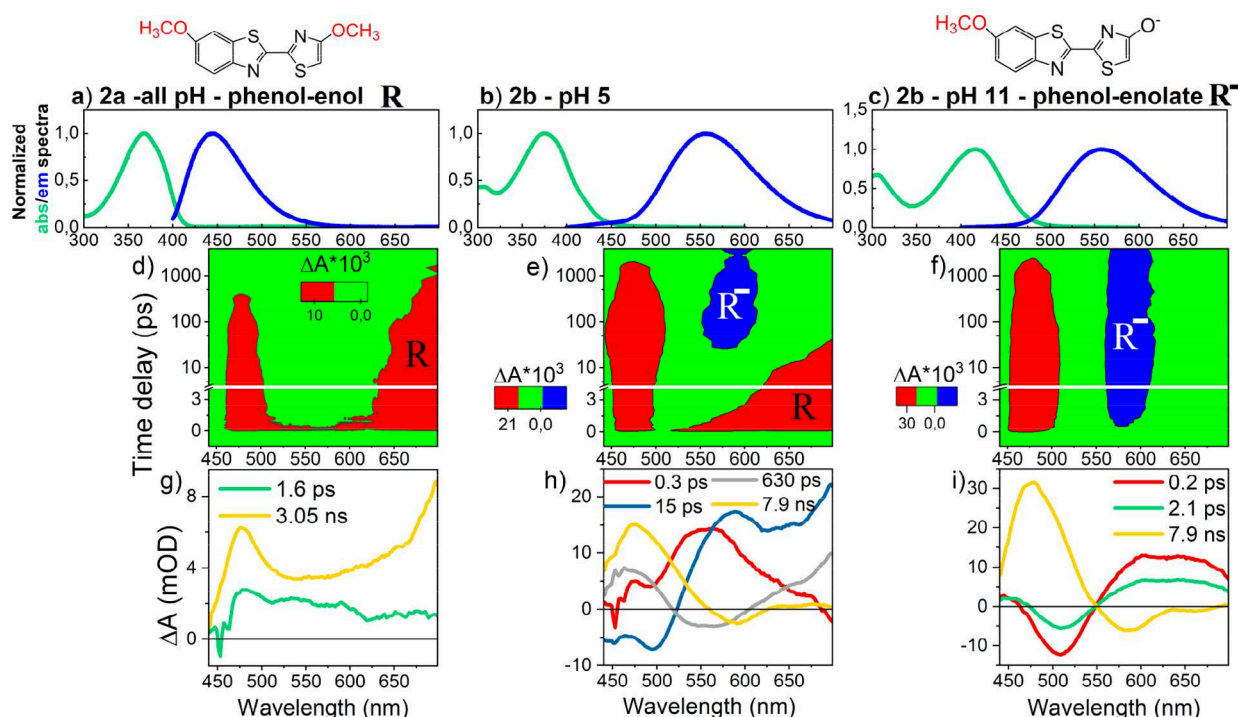
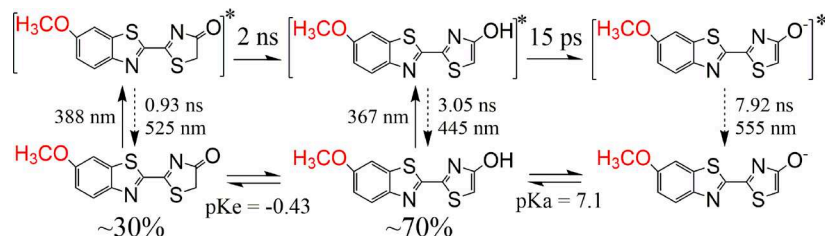


Figure 2. Excited-state signatures of the phenol–enol analogues. TA spectroscopy of **2a** for all pH values (right) and **2b** at pH = 5 (middle) and pH = 11 (left). Panels (a) to (i): same as in [Figure 1](#).

Scheme 4. Photoluminescence Pathway of the Phenol–Enol Species



with our expectations above since both tautomers are excited at 400 nm.

This analysis is confirmed by time-resolved fluorescence spectroscopy of **2b** at pH = 5, which also reveals a 630 ps lifetime—significantly different from the 930 ps one measured for **1a**—together with a 7.9 ns time constant associated with the decay of the phenol-enolate form (see Table S2). As we will further argue below for the case of OxyLH₂, we propose here that the decrease in the lifetime of the phenol-keto species in **2b** with respect to **1a** is due to the keto to enol conversion, which is an additional decay channel for **2b**, as compared to **1a** where the cyclopropyl group prevents it. We thus infer the rate constant of the S₁ keto to enol conversion of **2b** as being (2 ns)⁻¹ = (630 ps)⁻¹ - (930 ps)⁻¹. Accordingly, Scheme 4 summarizes the photoluminescence pathway accounting for the ESPT leading to the formation of the phenol-enolate form as well as the excited-state keto-enol conversion.

After identifying the spectral signatures and kinetics of **1a** and **2b**, we conclude this work by discussing the photoluminescence pathway of OxyLH₂ at pH = 5. TA spectroscopy data are displayed in Figure 3. At pH = 5, OxyLH₂ is a 30%/70% keto/enol mixture, characterized by an absorption maximum at 371 nm, and a dual emission spectrum with a dominating band centered at 555 nm and a much weaker one

at 450 nm (Figure 3a). Upon 400 nm excitation of both tautomers, the TA data (Figure 3b) reveal the 675 nm ESA band characterizing the S_1 signature of the phenol-enol form (**R**) at early time delays. On the few-10 ps time scale, this signature disappears to give rise to a red (640 nm) SE while the high energy ESA red shifts from 475 nm to $\sim$ 520 nm. This indicates the formation of phenolate-keto (R^-) form, as observed in Figure 1e, produced upon direct excitation of the phenol-keto form already present in S_0 . Finally, the SE band broadens down to below 600 nm on the few-100 ps time scale and remains long-lived, which is the signature identified for the phenol-enolate form (R^- , Figure 2e) formed via ESPT upon direct excitation of the phenol-enol form.

The quantitative analysis of the TA data (see [Table S1](#)) is reported in [Figure 3c](#). The longest lifetime of 7.9 ns was determined by TCSPC fluorescence spectroscopy (see [Table S2](#)). The spectral shape of the 7.9 ns DAS is thought to correspond to the sum of the phenol-enolate ESA (7.9 ns DAS in [Figure 2i](#)) and the phenolate-keto ground state absorption observed for **1b** ("inf" DAS in [Figure 2h](#)). The 590 ps DAS has a spectral shape recalling the 630 ps DAS observed in [Figure 1h](#) and is thus assigned to the phenolate-keto ($^-\text{R}^=$) decay. The 21 ps DAS component ([Figure 3c](#)) likely accounts for both ESPT reactions occurring on similar time scales. The shortest

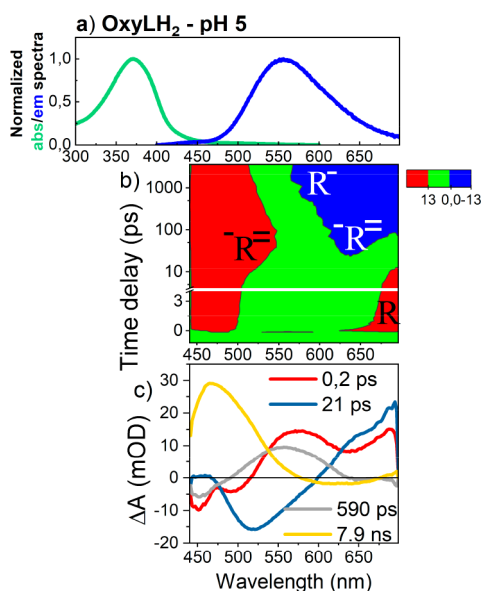


Figure 3. Excited-state signatures of OxyLH₂ measured at pH = 5. (a) Steady-state absorption (green) and emission (blue) spectra. (b) 2D map of the differential transient absorption (ΔA) signal as a function of probe wavelength and pump–probe delay. Positive (red) and negative (blue) contributions correspond to ESA and SE, respectively. (c) DAS obtained after global analysis.

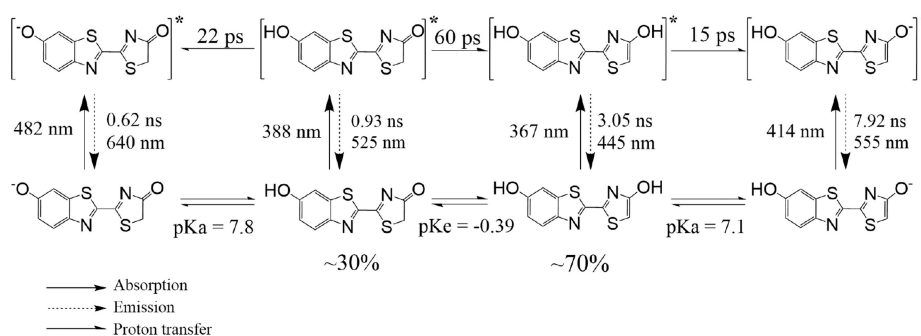
time constant (0.2 ps) and corresponding DAS are assigned to spectral relaxations due to intramolecular and/or solvent relaxations. Similarly to the experiments performed on compounds **1b** and **2b** in basic conditions, the excited state dynamics of oxyluciferin at pH = 11 (Figure S2) is described by a single species displaying a fluorescence lifetime of 6.2 ns significantly different from the phenol-enolate lifetime (7.9 ns). This contribution is associated with the dianion OxyL^{2−} (i.e., phenolate-enolate) which was shown to be the only ground state species in basic conditions,³¹ and does not contribute to the photoluminescence pathway in acidic conditions.

We next wonder if the S₁ keto to enol conversion observed with **2b** may also occur for OxyLH₂ at pH 5. We were best able to address this question based on fluorescence spectroscopy after shifting the excitation wavelength to 430 nm, where only the phenol-keto form absorbs in the initial tautomer mixture (Figure S3). The measured fluorescence decays and emission spectrum clearly evidence the contribution of both phenolate-keto and phenol-enolate forms (Figure S5), demonstrating the excited state phenol-keto to phenol-enol conversion. Both forms are also rapidly converted, through an ESPT reaction,

into the phenolate-keto and phenol-enolate anions, respectively. More precisely, the relative amplitudes associated with the decay components of the phenolate-keto (0.62 ns) and of the phenol-enolate (7.9 ns) (see Figure S5a) allow us to infer the phenol-keto to phenol-enol conversion rate k_1 , on the basis of the global photoluminescence (Scheme 5) and corresponding rate equations solved numerically (see SI). Independently, the relative weight of both anion emission spectra in the OxyLH₂ steady-state fluorescence (Figure S5b) can be analyzed (see SI) to infer k_1 as well. Both the analyses of time-resolved and steady-state emission data reveal the same value of $k_1 = (60 \text{ ps})^{-1}$. All time constants associated with the kinetics of the complex photoluminescence pathway of OxyLH₂ determined in this work are summarized in Scheme 5.

In conclusion, spectrally resolved femtosecond transient absorption experiments and TCSPC fluorescence decay measurements were used to characterize the excited-state dynamics of oxyluciferin and its analogues as a function of the pH in water solution. With the help of derivatives where deprotonations or keto–enol tautomerization are blocked, it was possible to determine for the first time the characteristic time constants associated with the excited-state reactions. For the phenol-keto and phenol-enol model compounds, the measured ESPT time scales are on the order of 15–20 ps. Moreover, the DAS analysis performed on the model compounds allowed us to identify their specific S₁ spectral signatures. The results obtained with these compounds were used to interpret the dynamics observed on the natural emitter: OxyLH₂. In particular, the characteristic spectral signatures of the model compounds were used to disentangle the contributions from the phenol-enol and phenol-keto forms in the complex photophysics of OxyLH₂, including site-specific ESPT reactions and their kinetics. In addition, experiments with red-shifted excitation were performed to characterize the excited-state conversion of OxyLH₂ from the phenol-keto to phenol-enol forms. All these results were used to fully unravel the complex photoluminescence pathways of OxyLH₂ at pH = 5 by providing the excited-state reaction time scales (Scheme 5). Though these results do not directly apply to the photoreactivity within the luciferase active pocket, they demonstrate the role played by the pH on the excited-state photophysics, and the key role of specific hydrogen bonds between the chromophore and the protein binding pocket for controlling the bioluminescence spectrum via the tuning of excited-state proton transfer or tautomerism reaction kinetics. They also suggest that the same strategy could be used by incorporating these synthetic compounds in the natural binding pocket of Luciferase in order to unravel the

Scheme 5. Photoluminescence Pathways of Oxyluciferin in Aqueous Solution at pH 5



photoluminescence mechanism of the oxyluciferin–luciferase complex. This work is in progress in our laboratories.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcllett.0c00839>.

Experimental details; fluorescence decays and singular transients measured at pH = 5 and pH = 11; tables containing all the measured lifetimes; description of the model used to determine the keto to enol excited state conversion rate (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Jérémie Léonard – Institut de Physique et de Chimie des Matériaux de Strasbourg, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7504 Strasbourg, France; Email: jeremie.leonard@ipcms.unistra.fr

Pascal Didier – Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France; orcid.org/0000-0003-2850-9186; Email: pascal.didier@unistra.fr

Authors

Pauline Gosset – Institut de Physique et de Chimie des Matériaux de Strasbourg, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7504 Strasbourg, France; Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

Grégory Taupier – Institut de Physique et de Chimie des Matériaux de Strasbourg, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7504 Strasbourg, France

Olivier Crégut – Institut de Physique et de Chimie des Matériaux de Strasbourg, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7504 Strasbourg, France

Johanna Brazard – Institut de Physique et de Chimie des Matériaux de Strasbourg, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7504 Strasbourg, France

Yves Mély – Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France; orcid.org/0000-0001-7328-8269

Kokou-Dodzi Dorkenoo – Institut de Physique et de Chimie des Matériaux de Strasbourg, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7504 Strasbourg, France

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcllett.0c00839>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (BIOLUM ANR-16-CE29-0013).

■ REFERENCES

- (1) Seliger, H. H.; McElroy, W. D. The Colors Of Firefly Bioluminescence: Enzyme Configuration And Species Specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1964**, *52* (1), 75–81.
- (2) Duchatelet, L.; Claes, J. M.; Mallefet, J. Embryonic Expression of Encephalopsin Supports Bioluminescence Perception in Lanternshark Photophores. *Mar. Biol.* **2019**, *166* (21). DOI: [10.1007/s00227-019-3473-9](https://doi.org/10.1007/s00227-019-3473-9).

- (3) Woodland, J.; Gibson, H. Intermediates in the Bioluminescent Oxidation of Reduced Flavin Mononucleotide. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238* (7), 2537–2554.

- (4) Lindström, J.; Grebner, W.; Rigby, K.; Selander, E. Effects of Predator Lipids on Dinoflagellate Defence Mechanisms - Increased Bioluminescence Capacity. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (13104). DOI: [10.1038/s41598-017-13293-4](https://doi.org/10.1038/s41598-017-13293-4).

- (5) Lee, J. Perspectives on Bioluminescence Mechanisms. *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93* (2), 389–404.

- (6) Branchini, B. R.; Southworth, T. L.; Murtiashaw, M. H.; Magyar, R. A.; Gonzalez, S. A.; Ruggiero, M. C.; Stroh, J. G. An Alternative Mechanism of Bioluminescence Color Determination in Firefly Luciferase. *Biochemistry* **2004**, *43* (23), 7255–7262.

- (7) Ando, Y.; Niwa, K.; Yamada, N.; Enomoto, T.; Irie, T.; Kubota, H.; Ohmiya, Y.; Akiyama, H. Firefly Bioluminescence Quantum Yield and Colour Change by PH-Sensitive Green Emission. *Nat. Photonics* **2008**, *2* (1), 44–47.

- (8) White, E. H. The Chemi and Bioluminescence of Firefly Luciferin : An Efficient Chemical Production of Electronically Excited States. *Bioorg. Chem.* **1971**, *1* (1–2), 92–122.

- (9) McCapra, F. Chemical Mechanisms in Bioluminescence. *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9* (6), 201–208.

- (10) Mccapra, F. The Chemistry of Bioluminescence. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1982**, *215*, 247–272.

- (11) Branchini, B. R.; Murtiashaw, M. H.; Magyar, R. A.; Portier, N. C.; Ruggiero, M. C.; Stroh, J. G. Yellow-Green and Red Firefly Bioluminescence from 5,5-Dimethyloxyluciferin. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (10), 2112–2113.

- (12) Branchini, B. R.; Southworth, T. L.; Fontaine, D. M.; Kohrt, D.; Welcome, F. S.; Florentine, C. M.; Henricks, E. R.; DeBartolo, D. B.; Michelini, E.; Cevenini, L.; Roda, A.; Grossel, M. J. Red-Emitting Chimeric Firefly Luciferase for in Vivo Imaging in Low ATP Cellular Environments. *Anal. Biochem.* **2017**, *534*, 36–39.

- (13) Roura, S.; Gálvez-Montón, C.; Bayes-Genis, A. Bioluminescence Imaging: A Shining Future for Cardiac Regeneration. *J. Cell. Mol. Med.* **2013**, *17* (6), 693–703.

- (14) Minekawa, T.; Ohkuma, H.; Abe, K.; Maekawa, H.; Arakawa, H. Practical Application of Bioluminescence Enzyme Immunoassay Using Enhancer for Firefly Luciferin-Luciferase Bioluminescence. *Luminescence* **2011**, *26* (3), 167–171.

- (15) Takakura, H.; Kojima, R.; Urano, Y.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T. Aminoluciferins as Functional Bioluminescent Substrates of Firefly Luciferase. *Chem. - Asian J.* **2011**, *6* (7), 1800–1810.

- (16) Sun, Y.-Q.; Liu, J.; Wang, P.; Zhang, J.; Guo, W. D-Luciferin Analogues: A Multicolor Toolbox for Bioluminescence Imaging. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51* (34), 8428–8430.

- (17) Greer, L. F.; Szalay, A. A. Imaging of Light Emission from the Expression of Luciferases in Living Cells and Organisms: A Review. *Luminescence* **2002**, *17* (1), 43–74.

- (18) Shinde, R.; Perkins, J.; Contag, C. H. Luciferin Derivatives for Enhanced in Vitro and in Vivo Bioluminescence Assays. *Biochemistry* **2006**, *45* (37), 11103–11112.

- (19) Tian, X.; Li, Z.; Lau, C.; Lu, J. Visualization of in Vivo Hydrogen Sulfide Production by a Bioluminescence Probe in Cancer Cells and Nude Mice. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (22), 11325–11331.

- (20) Buckley, S. M. K.; Delhove, J. M. K. M.; Perocheau, D. P.; Karda, R.; Rahim, A. A.; Howe, S. J.; Ward, N. J.; Birrell, M. A.; Belvisi, M. G.; Arbuthnot, P.; Johnson, M. R.; Waddington, S. N.; McKay, T. R. In Vivo Bioimaging with Tissue-Specific Transcription Factor Activated Luciferase Reporters. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (11842). DOI: [10.1038/srep11842](https://doi.org/10.1038/srep11842).

- (21) Cheng, Y.-Y.; Liu, Y.-J. Theoretical Development of Near-Infrared Bioluminescent Systems. *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24* (37), 9340–9352.

- (22) Hiyama, M.; Akiyama, H.; Koga, N. Theoretical Insights into the Effect of PH Values on Oxidation Processes in the Emission of Firefly Luciferin in Aqueous Solution. *Luminescence* **2017**, *32* (6), 1100–1108.

- (23) Orlova, G.; Goddard, J. D.; Brovko, L. Yu. Theoretical Study of the Amazing Firefly Bioluminescence: The Formation and Structures of the Light Emitters. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (23), 6962–6971.
- (24) Hosseinkhani, S. Molecular Enigma of Multicolor Bioluminescence of Firefly Luciferase. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68* (7), 1167–1182.
- (25) Snellenburg, J. J.; Laptinok, S. P.; DeSa, R. J.; Naumov, P.; Solntsev, K. M. Excited-State Dynamics of Oxyluciferin in Firefly Luciferase. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (50), 16252–16258.
- (26) Ran, X. Q.; Zhou, X.; Goddard, J. D. The Spectral-Structural Relationship of a Series of Oxyluciferin Derivatives. *ChemPhysChem* **2015**, *16* (2), 396–402.
- (27) Maltsev, O. V.; Nath, N. K.; Naumov, P.; Hintermann, L. Why Is Firefly Oxyluciferin a Notoriously Labile Substance? *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53* (3), 847–850.
- (28) Cheng, Y.-Y.; Liu, Y.-J. What Exactly Is the Light Emitter of a Firefly? *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11* (11), 5360–5370.
- (29) White, E. H.; Wörther, H.; Field, G. F.; McElroy, W. D. Analogs of Firefly Luciferin. *J. Org. Chem.* **1965**, *30* (7), 2344–2348.
- (30) Kakiuchi, M.; Ito, S.; Yamaji, M.; Viviani, V. R.; Maki, S.; Hirano, T. Spectroscopic Properties of Amine-Substituted Analogues of Firefly Luciferin and Oxyluciferin. *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93* (2), 486–494.
- (31) Ghose, A.; Rebarz, M.; Maltsev, O. V.; Hintermann, L.; Ruckebusch, C.; Fron, E.; Hofkens, J.; Mély, Y.; Naumov, P.; Sliwa, M.; Didier, P. Emission Properties of Oxyluciferin and Its Derivatives in Water: Revealing the Nature of the Emissive Species in Firefly Bioluminescence. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (6), 2638–2649.
- (32) Solntsev, K. M.; Laptinok, S. P.; Naumov, P. Photoinduced Dynamics of Oxyluciferin Analogues: Unusual Enol “Super”Photoacidity and Evidence for Keto–Enol Isomerization. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (40), 16452–16455.
- (33) García-Iriepa, C.; Gosset, P.; Berraud-Pache, R.; Zemmouche, M.; Taupier, G.; Dorkenoo, K. D.; Didier, P.; Léonard, J.; Ferré, N.; Navizet, I. Simulation and Analysis of the Spectroscopic Properties of Oxyluciferin and Its Analogues in Water. *J. Chem. Theory Comput.* **2018**, *14* (4), 2117–2126.
- (34) Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G. Theoretical Study of the Nontraditional Enol-Based Photoacidity of Firefly Oxyluciferin. *ChemPhysChem* **2015**, *16* (2), 455–464.
- (35) Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G. Quantum/Molecular Mechanics Study of Firefly Bioluminescence on Luciferase Oxidative Conformation. *Chem. Phys. Lett.* **2014**, *608*, 45–49.
- (36) Pinto da Silva, L.; Simkovitch, R.; Huppert, D.; Esteves da Silva, J. C. G. Theoretical Study of the Efficient Fluorescence Quenching Process of the Firefly Luciferin. *J. Photochem. Photobiol., A* **2013**, *266*, 47–54.
- (37) Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G. Theoretical Analysis of the Color Tuning Mechanism of Oxyluciferin and 5-Hydroxyoxyluciferin. *Comput. Theor. Chem.* **2012**, *988*, 56–62.
- (38) da Silva, L. P.; da Silva, J. C. G. E. Computational Investigation of the Effect of PH on the Color of Firefly Bioluminescence by DFT. *ChemPhysChem* **2011**, *12* (5), 951–960.
- (39) Chen, S.-F.; Liu, Y.-J.; Navizet, I.; Ferré, N.; Fang, W.-H.; Lindh, R. Systematic Theoretical Investigation on the Light Emitter of Firefly. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7* (3), 798–803.
- (40) Navizet, I.; Roca-Sanjuán, D.; Yue, L.; Liu, Y.-J.; Ferré, N.; Lindh, R. Are the Bio- and Chemiluminescence States of the Firefly Oxyluciferin the Same as the Fluorescence State? *Photochem. Photobiol.* **2013**, *89* (2), 319–325.
- (41) Falklöf, O.; Durbeek, B. Distinguishing between Keto-Enol and Acid-Base Forms of Firefly Oxyluciferin through Calculation of Excited-State Equilibrium Constants. *J. Comput. Chem.* **2014**, *35* (30), 2184–2194.
- (42) Rebarz, M.; Kukovec, B.-M.; Maltsev, O. V.; Ruckebusch, C.; Hintermann, L.; Naumov, P.; Sliwa, M. Deciphering the Protonation and Tautomeric Equilibria of Firefly Oxyluciferin by Molecular Engineering and Multivariate Curve Resolution. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (10), 3803–3809.
- (43) Hirano, T.; Hasumi, Y.; Ohtsuka, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Yamaji, M.; Hashizume, D. Spectroscopic Studies of the Light-Color Modulation Mechanism of Firefly (Beetle) Bioluminescence. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (6), 2385–2396.
- (44) Presiado, I.; Erez, Y.; Simkovitch, R.; Shomer, S.; Gepshtein, R.; Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G.; Huppert, D. Excited-State Proton Transfer of Firefly Dehydroxyluciferin. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116* (44), 10770–10779.
- (45) Erez, Y.; Presiado, I.; Gepshtein, R.; Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G.; Huppert, D. Comparative Study of the Photoprotolytic Reactions of D-Luciferin and Oxyluciferin. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116* (28), 7452–7461.
- (46) Presiado, I.; Erez, Y.; Huppert, D. Excited-State Intermolecular Proton Transfer of Firefly Luciferin III. Proton Transfer to a Mild Base. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114* (51), 13337–13346.
- (47) Erez, Y.; Presiado, I.; Gepshtein, R.; Huppert, D. Excited-State Intermolecular Proton Transfer of Firefly Luciferin IV. Temperature and PH Dependence. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115* (9), 1617–1626.
- (48) Cherednikova, E. Y.; Chikishev, A. Y.; Kosobokova, O. V.; Mizuno, M.; Sakai, M.; Takahashi, H. Picosecond Time-Resolved Absorption Spectroscopy of Luciferin. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *308* (5–6), 369–372.
- (49) Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G. Chemiexcitation Induced Proton Transfer: Enolate Oxyluciferin as the Firefly Bioluminophore. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (6), 2140–2148.
- (50) Pinto da Silva, L.; Simkovitch, R.; Huppert, D.; Esteves da Silva, J. C. G. Oxyluciferin Photoacidity: The Missing Element for Solving the Keto-Enol Mystery? *ChemPhysChem* **2013**, *14* (15), 3441–3446.
- (51) Pinto da Silva, L.; Santos, A. J. M.; Esteves da Silva, J. C. G. Efficient Firefly Chemi/Bioluminescence: Evidence for Chemiexcitation Resulting from the Decomposition of a Neutral Firefly Dioxetanone Molecule. *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117* (1), 94–100.
- (52) da Silva, L. P.; da Silva, J. C. G. E. Firefly Chemiluminescence and Bioluminescence: Efficient Generation of Excited States. *ChemPhysChem* **2012**, *13* (9), 2257–2262.

Supporting information

Excited-State Proton Transfer in Oxyluciferin and Its Analogues

Pauline Gosset, Grégory Taupier, Olivier Crégut, Johanna Brazard, Yves Mély,

Kokou-Dodzi Dorkenoo, Jérémie Léonard^{*}, Pascal Didier^{*}

**corresponding authors: jeremie.leonard@ipcms.unistra.fr and pascal.didier@unistra.fr*

Contents:

Materials and Methods

Figure S1: Fluorescence decay and singular transients obtained for OxyLH₂ in aqueous solution (pH=5)

Figure S2: Fluorescence decay and singular transients obtained for OxyLH₂ in aqueous solution (pH=11)

Figure S3: Fraction of absorbed light at pH=5

Figure S4: Fit of fluorescence decay with numerical model

Figure S5: Excited state keto to enol conversion

Table S1: Time constants obtained by fitting the singular transients of the TA measurements of all compounds

Table S2: Time constants obtained by fitting the fluorescence decays of all compounds

Table S3: keto-enol conversion rate obtained from the analytical solution

Materials and Methods

1. **Sample preparation.** OxyLH₂ and its analogues have been synthesized following the procedure previously reported¹. Stock solutions of all compounds were prepared in spectroscopic grade DMSO (Sigma-Aldrich) and stored in several aliquots at 4°C. The buffers were prepared by diluting a 1 M stock solution in deionized, Millipore-purified water (18.2 MΩ). Buffered stock solutions were prepared as follows: 75 mM NaCl/20 mM KH₂PO₄/0.2 mM MgCl₂ for pH 5 and 75 mM NaCl/25 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS)/0.2 mM MgCl₂ for pH 11. The pH of the buffers was adjusted with 250 mM HCl or with 250 mM NaOH separately at 20 °C. The compounds stock solutions were further diluted in the prepared aqueous buffer of different pH to a final concentration of 1 μM (5% DMSO) for steady-state and fluorescence decay measurements and 20 μM (20% DMSO) for transient absorption spectroscopy. In the latter case, the DMSO percentage was increased to avoid aggregation. Absorption and emission spectroscopy were used to check that the measured optical properties were not modified upon increase of DMSO content.

2. **Steady-state spectroscopy.** Absorption spectra were recorded with a Cary-4000 spectrometer (Agilent Technologies). Steady-state fluorescence spectra were recorded with a Fluoromax 4 spectrofluorometer (Horiba Jobin Yvon) with 2 nm excitation/emission slit and corrected for the instrumental response characteristics.

3. **Time-correlated single-photon-counting (TCSPC) measurements.** The fluorescence decays of all compounds were measured by the time-correlated single photon counting (TCSPC) method at two excitation wavelengths (400 nm and 430 nm). Excitation pulses were generated by supercontinuum lasers (NKT Photonics SuperK Extreme) with 10 MHz repetition rate. The fluorescence decays were collected throughout the emission spectra, using a polarizer set at magic angle and a 16 mm band-pass monochromator (Jobin Yvon). The single-photon events were detected with a micro-channel plate photomultiplier R3809U Hamamatsu, coupled

to a pulse pre-amplifier HFAC (Becker-Hickl GmbH) and acquired on a time correlated single photon counting board SPC-630 (Becker-Hickl GmbH). The instrumental response function (IRF) was recorded with a polished aluminum reflector and fitted with a Gaussian function displaying a full-width at half-maximum of 40 ps. Time-resolved decays were then fitted with a bi-exponential function, convolved with a normalized Gaussian function (FWHM=40 ps) used to model the IRF. In the case where two species contribute to the measured fluorescence decay signal, the signal can be written as:

$$S(v, t) = N_1(0) \cdot k_{\text{rad}1} \cdot I_1(v) e^{-\frac{t}{\tau_1}} + N_2(0) \cdot k_{\text{rad}2} \cdot I_2(v) e^{-\frac{t}{\tau_2}} \quad \text{Equation (1)}$$

where $N_{1,2}(0)$ are the concentrations of the two fluorescence species, $k_{\text{rad}1,2}$ the radiative decay rates calculated with the Strickler & Berg's equation² and $I_{1,2}(v)$ the emission spectra of the emissive forms¹ that were normalized as follow: $\int I_{1,2}(v) dv = 1$.

4. Pump probe spectroscopy. Pulses are delivered by a Ti:sapphire laser (Tsunami, Spectra Physics) and are amplified with a regenerative amplifier (Spitfire) delivering 160 fs pulses at 800 nm with a repetition rate of 5 kHz. The amplified laser beam is split in two. A 400 nm pump pulse is produced by second harmonic generation from the first beam in a 2-mm thick BBO crystal. The second beam is focused inside a 2 mm thick sapphire crystal to generate a supercontinuum (from 420 nm to 700 nm) used as the probe pulse. The pump polarization is controlled with a half wave plate, to obtain the magic angle configuration. Pump and probe pulses are focused by the same off-axis parabolic mirror on a cell containing the samples in solution. The spinning cell is composed by two glass windows, separated by a 1 mm thick O-ring, the rotation rate (500 rpm) allows exciting a fresh volume of the sample with each pump pulse. The measured signal corresponds to the time-resolved differential transmission spectrum $\Delta T/T(\tau, \lambda)$ of the probe as a function of the pump-probe delay τ and the wavelength λ . All the data will be presented here in ΔA ($\Delta A = -\ln(10) \times \Delta T/T$). To optimize the signal-to-noise ratio,

we need an optical density of 0.1 per mm at 400 nm which corresponds to a concentration 20 μ M.

5. Global analysis. After each TA experiment, we record the solvent signal – sometimes referred to as coherent artifact. This signal is used to measure the wavelength dependence of time zero – resulting from the group velocity dispersion – referred to as chirp - of the probe beam³. We perform conventional TA data analysis, which consists in subtracting this solvent signal from the data recorded on the molecules in solution and post-processing the data to correct the chirp⁴. Then, the global analysis starts with Singular Value Decomposition (SVD) of the data in three matrices: singular values (SV), singular transients (ST) and singular spectra. A global fitting is realized on the two or three main ST. The number of STs considered for the fit is such that the neglected ST's should have an amplitude weaker than the residuals of the global fit. The fitting function is a sum of exponential functions convolved with a Gaussian function modeling the Instrument Response Function (IRF). Up to 5 time constants are needed to minimize the Chi square of the global fit. Finally, each time constant determined by the fit is associated with a Decay Associated Spectrum (DAS) defining the wavelength dependence of the corresponding preexponential factor and therefore the spectral evolution associated with each time constant.

6. Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS). FCS measurements were performed on a home-build two-photon system set-up based on an Olympus IX70 inverted microscope with an Olympus 60 $\times$ 1.2NA water immersion objective⁵. Two-photon excitation at 780 nm was provided by a mode-locked titanium-sapphire laser (Tsunami, Spectra Physics). The normalized autocorrelation function was calculated on-line with a hardware correlator (ALV5000, ALV GmbH, Germany). The experimental curves were fitted using a free-diffusion

model: $G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}}$ where N is the average number of fluorescent

molecules in the focal volume, τ the lag time, τ_D the average residence time in the focal volume, and S a structural parameter defined as the ratio between the axial and lateral radii of the beam waist. The size of the observation volume (V) was measured by performing a z-scan on a 20 nm fluorescent beads immobilized on a glass coverslip. The concentration was then calculated as follow: $C = \frac{N}{V\mathcal{N}_A}$ where $\mathcal{N}_A$ is the Avogadro constant.

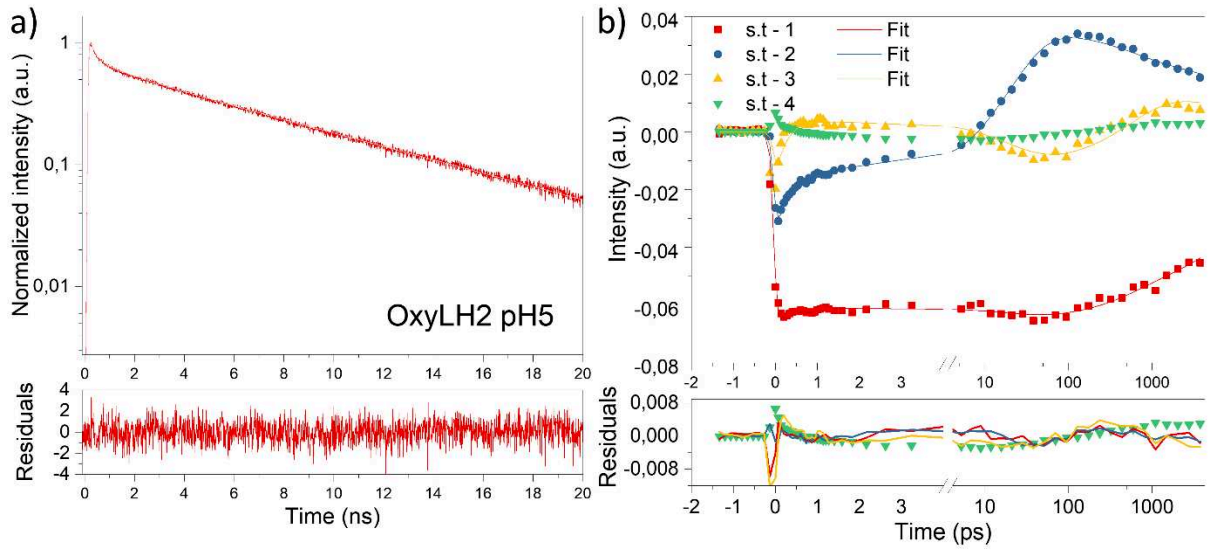


Figure S1: a) Fluorescence decay of OxyLH₂ measured in aqueous solution at pH 5, $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 555$ nm. The curve is fitted with a multiexponential function as described in the materials section and its weighted residuals are displayed below. The time constants are reported in Table S2. b) Four first singular transients obtained from the SVD analysis of OxyLH₂ at pH 5 (Figure 3 of the main text). The three first STs were fitted using a global approach, the obtained results are reported in Table S1.

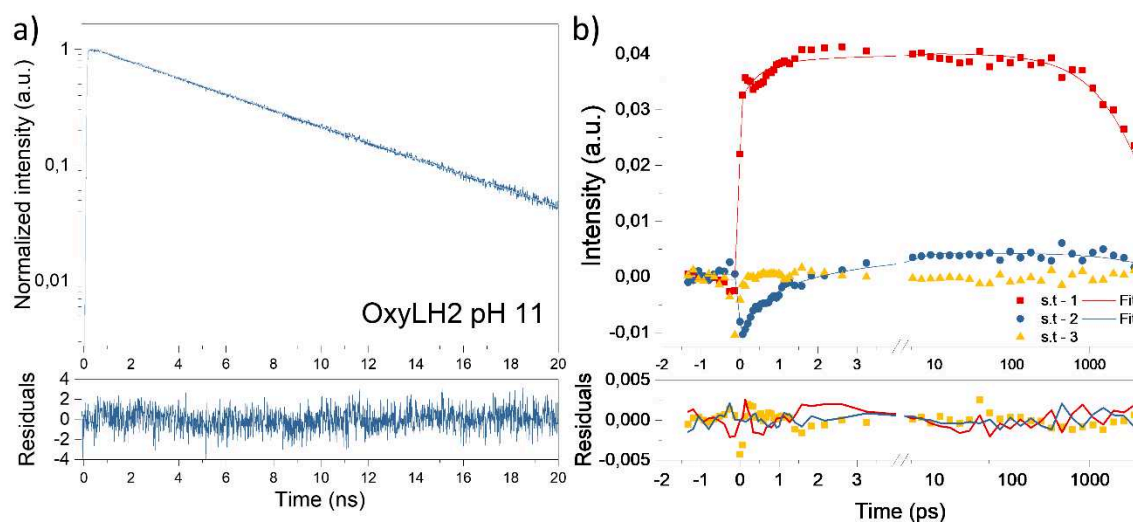


Figure S2: a) Fluorescence decay of OxyLH₂ measured in aqueous solution at pH=11, $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 539$ nm. The curve is fitted with a mono-exponential function as described in the materials section and its weighted residuals are displayed below. The time constants are reported in Table S2. b) Three first singular transients obtained from the SVD analysis of OxyLH₂ at pH=11. The two first STs were fitted using a global approach, the obtained results are reported in Table S1.

Table S1. Results of the global analysis of the TA data measured for OxyLH₂ and its derivatives. The STs were fitted using a global approach, τ_1 and τ_2 correspond to intramolecular and solvent relaxations, τ_3 is associated with the ESPT, τ_4 and τ_5 were fixed by the TCSPC results and correspond to the fluorescence lifetimes of the excited states (see Table S2).

Compound	pH	τ_1/ps	τ_2/ps	τ_3/ps	τ_4/ps	τ_5/ns	τ_6
2a	All		1.6 ± 0.4			3.05	
1a	All	0.60 ± 0.05	2.2 ± 0.4		930		
1b	5	0.43 ± 0.01	3.0 ± 0.1	22 ± 0.7	620		Inf
	11	0.5 ± 0.03	4.25 ± 0.90		620		
2b	5	0.30 ± 0.07		15.3 ± 0.8	630	7.92	
	11	0.20 ± 0.03	2.1 ± 0.3			7.92	
OxyLH₂	5	0.20 ± 0.02		21 ± 1	590 ± 44	7.93	
	11	1 ± 0.1	3.5 ± 1.9			6.22	

Table S2. Fluorescence decay time constants of OxyLH₂ and its derivatives, measured by TCSPC with their amplitudes (in parenthesis) at $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm.

Compound	pH	τ_1/ns (%)	τ_2/ns (%)	τ_3/ns (%)
2a $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm	All			3.05 ± 0.01 (100)
1a $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm	All		0.93 ± 0.01 (100)	
1b $\lambda_{\text{em}} = 640$ nm	5	0.063 ± 0.01 (-33)	0.62 ± 0.01 (67)	
	11		0.62 ± 0.01 (100)	
2b $\lambda_{\text{em}} = 555$ nm	5		0.63 ± 0.01 (51)	7.92 ± 0.02 (49)
	11			7.92 ± 0.02 (100)
OxyLH₂ $\lambda_{\text{em}} = 555$ nm	5		0.59 ± 0.01 (26)	7.93 ± 0.02 (74)
	11			6.22 ± 0.02 (100)

Determination of the Excited-state phenol-keto to phenol-enol conversion rate

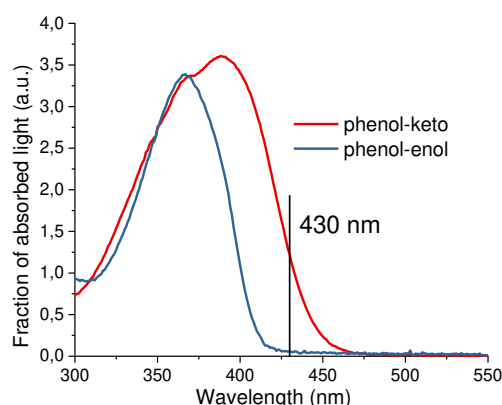
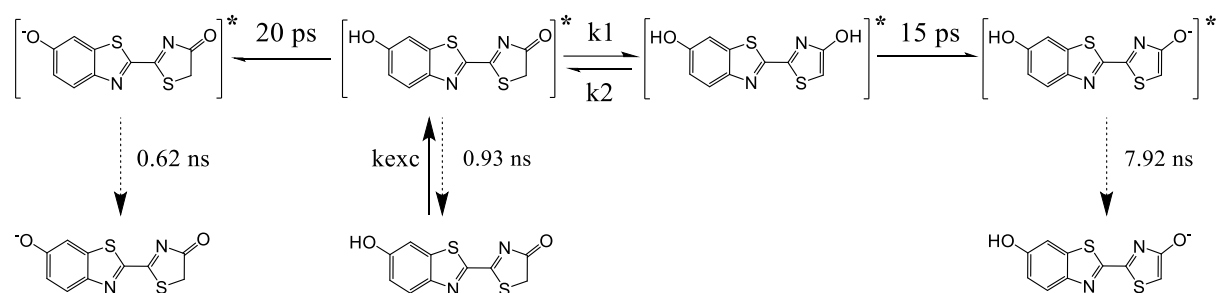


Figure S3: Fractions of absorbed light at pH=5 of phenol-keto (red) and phenol-enol (blue) forms. Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) was used to determine the absolute concentrations of compounds **1a** and **2a** in aqueous buffer (pH=5). The extinction coefficients of the two species were then deduced from absorbance measurements. The fraction of absorbed light was calculated from the pH-concentration profiles previously reported¹.

To determine the kinetics of this conversion, we defined the following model in which the phenol-keto form is selectively excited by a 30 ps light pulse at 430 nm:



The dynamics of the system is governed by the following set of coupled differential equations:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[\text{phenol} - \text{keto}]}{dt} = -k_{\text{exc}} e^{-\left(\frac{t-t_0}{\tau_0}\right)^2} [\text{phenol} - \text{keto}] + \frac{[\text{phenol} - \text{keto}^*]}{0.93} \\ \frac{d[\text{phenol} - \text{keto}^*]}{dt} = k_{\text{exc}} e^{-\left(\frac{t-t_0}{\tau_0}\right)^2} [\text{phenol} - \text{keto}] - \frac{[\text{phenol} - \text{keto}^*]}{0.93} - k_1 [\text{phenol} - \text{keto}^*] + k_2 [\text{phenol} - \text{enol}^*] - \frac{[\text{phenol} - \text{keto}^*]}{0.02} \\ \frac{d[\text{phenol} - \text{enol}]}{dt} = \frac{[\text{phenol} - \text{enol}^*]}{3.05} \\ \frac{d[\text{phenol} - \text{enol}^*]}{dt} = k_1 [\text{phenol} - \text{keto}^*] - k_2 [\text{phenol} - \text{enol}^*] - \frac{[\text{phenol} - \text{enol}^*]}{0.015} - \frac{[\text{phenol} - \text{enol}^*]}{3.05} \\ \frac{d[\text{phenol} - \text{enolate}^*]}{dt} = \frac{[\text{phenol} - \text{enol}^*]}{0.015} - \frac{[\text{phenol} - \text{enolate}^*]}{7.92} \\ \frac{d[\text{phenolate} - \text{keto}^*]}{dt} = \frac{[\text{phenol} - \text{keto}^*]}{0.02} - \frac{[\text{phenolate} - \text{keto}^*]}{0.53} \end{array} \right.$$

where k_1 and k_2 correspond to the rate associated with phenol-keto $\rightarrow$ phenol-enol and phenol-enol $\rightarrow$ phenol-keto excited state conversions, k_{exc} stands for the excitation rate. To validate

this model, the fluorescence decays (Figure S4) were fitted by numerically solving the set of coupled differential equations. In this model, the time dependent fluorescence decay at a specific wavelength is proportional to the excited-state populations. For instance, at 640 nm the fluorescence decay is given by:

$$F(t) = k_{r,640}^{phenolate-keto} \times [phenolate - keto]^*(t) + k_{r,640}^{phenol-enolate} \times [phenol - enolate]^*(t)$$

k_1 and k_2 were the only free parameters used to fit the oxyluciferin fluorescence decay curves. All the other parameters were obtained from TCSPC and TA measurements and were therefore fixed. The result of the fit of the TCSPC data recorded at 640 nm upon 430 nm excitation is reported in Figure S4. The retrieved rate constants for the phenol-keto to phenol-enol conversion are $k_1 = 17 \text{ ns}^{-1} = 1/58 \text{ ps}^{-1}$ and $k_2 \sim 0 \text{ ns}^{-1}$.

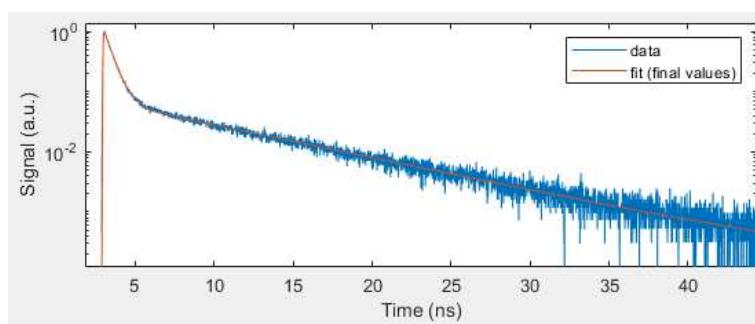


Figure S4: Fluorescence decay measured at $\lambda_{ex}=430 \text{ nm}$ and $\lambda_{em}=640 \text{ nm}$ (blue). The fit (red) was obtained by solving numerically the set of coupled differential equations.

We next determine the analytical solution of the set of coupled differential equations to retrieve the relative proportions of each form in the excited state, as a function of the rate constants, assuming $k_2=0 \text{ ns}^{-1}$. In this case, it is possible to express analytically the relative proportions of the emissive phenolate-keto ($f_{phenolate-keto}$) and phenol-enolate ($f_{phenol-enolate}$) forms produced by the fast excited state reactions. More precisely, neglecting all the fluorescence decay rates with

respect to the much faster excited state reaction rates, one can simplify the rate equation system and write:

$$f_{phenolate-keto} \approx \frac{k_3(1 - e^{-(k_3+k_2)t})}{k_3 + k_1} \xrightarrow{(k_3+k_2)t \gg 1} \frac{k_3}{k_1 + k_3}$$

$$f_{phenol-enolate} \approx \frac{k_1 \cdot ((k_1 + k_3) \cdot (1 - e^{-k_4 t}) - k_4 \cdot (1 - e^{-(k_1+k_3)t}))}{(k_1 + k_3) \cdot (k_1 + k_3 - k_4)} \xrightarrow{k_4 t, (k_1+k_3)t \gg 1} \frac{k_1}{k_1 + k_3}$$

k_1 is the phenol-keto to phenol-enol conversion rate.

$k_3 = 1/20 \text{ ps}^{-1}$ is the ESPT constant for the phenol to phenolate conversion.

$k_4 = 1/15 \text{ ps}^{-1}$ is the ESPT constant for the enol to enolate conversion.

From Equation 1, it is possible to express analytically $N_1(t_1)$ and $N_2(t_1)$ that correspond to the concentrations of the phenolate-keto and phenol-enolate species respectively at $t=t_1$, where $t_1 > \tau_{\text{ESPT},1}/k_1$ and $t_1 \ll 0.62 \text{ ns}, 7.92 \text{ ns}$. Note, that since the excited state reactions are not resolved in the TCSPC experiment, $t_1 \sim t_0$ within the time resolution (i.e. IRF temporal width). These relative proportions are experimentally obtained from the analysis of fluorescence decays (Figure S5a): 24% for phenol-enolate (7.92 ns) and 76% for phenolate-keto (0.62 ns) allowing us to calculate the phenol-keto to phenol-enol conversion rate k_1 . The values obtained for different emission wavelengths are reported in table S3 and are in good agreement with the ones obtained with the numerical model.

Table S3: keto-enol conversion rate obtained using the analytical model measured at different emission wavelengths.

	Excitation - 430 nm		
Emission - nm	610	640	670
$k_1(\text{keto} \rightarrow \text{enol}) - \text{ns}^{-1}$	19.6	19.1	16.5

Finally, integrating $S(\nu, t)$ (see Equation 1 above) over t yields the steady-state emission spectrum of OxyLH₂ that corresponds to a linear combination of phenolate-keto and phenol-enolate emission spectra (Figure S5b):

$$\int_0^{\infty} S(\nu, t) dt = N_1(t_1) \cdot k_{rad1} \cdot I_1(\nu) \cdot \tau_1 + N_2(t_1) \cdot k_{rad2} \cdot I_2(\nu) \cdot \tau_2$$

$$= N_1(t_1) \cdot A_1(\nu) + N_2(t_1) \cdot A_2(\nu)$$

The OxyLH₂ spectrum can thus be obtained with the spectra of phenol-enolate $A_1(\lambda)$ and phenolate-keto $A_2(\lambda)$. Here we found 73% of phenolate-keto and 27% of phenol-enolate. With the help of the analytical model, k_1 can be retrieved:

$$k_1 = k_3 * \frac{[phenol - enolate] \sim 0.27}{[phenolate - keto] \sim 0.73} = 18.5 \text{ ns}^{-1}$$

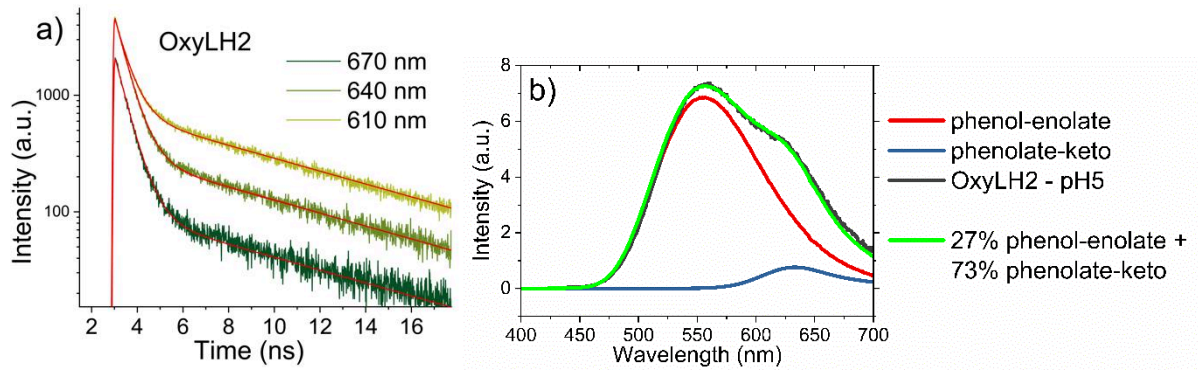


Figure S5: Excited-state keto-enol conversion a) Fluorescence decays measured for different emission wavelengths upon excitation at 430 nm (red curves correspond to the best fits obtained using the bi-exponential model: $\tau_1 = 0.62 \text{ ns}$ and $\tau_2 = 7.92 \text{ ns}$). b) Measured emission spectra of OxyLH₂ (black), of phenol-enolate (red) and phenolate-keto (blue). The two latter spectra were normalized as described above. The calculated steady-state emission spectrum (green curve) is obtained by using the relative concentrations of the phenol-enolate and phenolate-keto forms retrieved from the analytical model.

Bibliography

- (1) Ghose, A.; Rebarz, M.; Maltsev, O. V.; Hintermann, L.; Ruckebusch, C.; Fron, E.; Hofkens, J.; M.; Mentractions of the phenol-enolate and phenolate-keto forms retrieved from the analytical model. doi.org/10.1039/C5CP00000A Nature of the Emissive Species in Firefly Bioluminescence. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (6), 2638hem. Brz, M.; Maltsev, O. V.; Hintermann,
- (2) Strickler, S. J.; Berg, R. A. Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules. *The Journal of Chemical Physics* **1962**, *37* (4), 814al of Chemical PhysicsRelationship betwe
- (3) 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 AS. A.; Dobryakov, A. L.; Ruthmann, J.; Ernsting
- (4) Megerle, U.; Pugliesi, I.; Schrieffer, C.; Sailer, C. F.; Riedle, E. Sub-50 fs Broadband Absorption Spectroscopy with Tunable Excitation: Putting the Analysis of Ultrafast Molecular Dynamics on Solid Ground. *Appl. Phys. B* **2009**, *96* (29). Phys. B Pugliesi, I.; doi.org/10.1007/s00340-009-3610-0.
- (5) Bouchaala, R.; Richert, L.; Anton, N.; Vandamme, T. F.; Djabi, S.; M.; M50 fs Broadband Absorption Spectroscopy with Tunable Excitation: Putting the Analysis of Ultrafast Molecular *ACS Omega* **2018**, *3* (10), 14333R.; Rich<https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01488>.

Partie V

Etude des propriétés optiques de l'oxyluciférine en présence de la luciférase

Jusqu'à maintenant, la discussion portait sur le mécanisme d'émission de l'oxyluciférine en solution aqueuse. En étudiant les caractéristiques des différents analogues de l'oxyluciférine, nous avons pu caractériser leurs propriétés optiques afin d'identifier les formes chimiques qui participent au mécanisme d'émission. En plus des formes phénol-kéto et phénol-énol, qui sont déjà présentes à l'état fondamental, nous avons mis en évidence les contributions des formes phénolate-kéto et phénol-énolate à l'état excité pour des pH inférieurs à 8 et de la forme phénolate-énolate pour un pH supérieur 8. En variant le pH de la solution, nous avons suivi le transfert de proton associé à la conversion phénol-kéto/phénolate-kéto à l'aide de la spectroscopie pompe-sonde, ainsi que celui associé à la conversion phénol-énol/phénol-énolate. Pour finir, nous avons discuté de la tautomérisation kéto/enol grâce à des mesures réalisées en excitant spécifiquement la forme phénol-kéto. Finalement, nous avons déterminé le cycle de photoluminescence de l'oxyluciférine dans sa totalité.

Dans la nature, le photoproduit oxyluciférine, est formé dans la poche protéique de la luciférase, suite à une réaction enzymatique impliquant la formation d'un complexe luciférine/luciférase en présence d'ATP. Il est possible d'observer plusieurs couleurs de bioluminescence en fonction des insectes qui la produisent, bien que le substrat soit toujours le même. Ce changement d'émission provient, en général, de mutation d'acides aminés de la luciférase qui conduisent à un changement de polarité ou de pH au sein du site actif. En plus de modifier certaines caractéristiques d'émission - une diminution de polarité entraîne une diminution de la longueur d'onde d'émission - il est aussi possible que le microenvironnement modifie les équilibres entre les différentes formes chimiques de l'oxyluciférine. D'après un grand nombre de travaux théoriques, il existe deux conformations de luciférase. Une dite « ouverte » qui entraîne une émission rouge, et une autre dite « fermée » associée à une émission dans le vert. Des calculs ainsi que des expériences tendent à montrer que la forme phénolate-kéto est suffisante pour reproduire tout le spectre de bioluminescence observé chez ces êtres vivants, pour lesquels la longueur d'onde d'émission varie de 500 à 610 nm.

Cette dernière partie a pour but de participer au débat portant sur la nature chimique de l'émetteur associé à la bioluminescence de la luciole. Afin d'étudier la photophysique du processus de bioluminescence, nous utiliserons deux approches. Après avoir produit et purifié la luciférase *photinus pyralis*, en suivant le protocole décrit dans la partie II.4, la première méthode consistera à reproduire le phénomène de bioluminescence en utilisant la d-luciférine

et l'ATP tandis que pour la seconde méthode, le complexe luciférase/dérivé sera reformé en présence d'AMP.

Après avoir discuté sur la formation du complexe, ainsi que du positionnement des dérivés dans la protéine, nous pourrons comparer les résultats obtenus avec les deux systèmes. En effet, la formation du complexe avec les dérivés permettra de caractériser les nouvelles propriétés des dérivés, et donc des formes de l'oxyluciférine, à l'intérieur de la protéine. Ainsi, en comparant les résultats de l'OxyLH₂ créée à partir de la réaction de bioluminescence, nous aurons la possibilité d'identifier les espèces de l'oxyluciférine présentes dans la poche protéique, à l'état stationnaire comme à l'état excité, et ainsi émettre l'hypothèse quant à la nature chimique de l'émetteur responsable de la bioluminescence.

Ainsi, ce dernier chapitre comprend trois parties majeures. La première discute de la nature ainsi que de l'activité de la luciférine après sa purification afin de s'assurer qu'elle soit capable de produire la bioluminescence. Ensuite, nous nous interrogerons sur la liaison des analogues à la protéine. Pour se faire, des expériences d'anisotropie de fluorescence à l'état stationnaire et résolue en temps seront réalisées. Ces expériences seront aussi utiles pour démontrer l'importance de l'AMP qui favorise la liaison du dérivé à la luciférase. Nous discuterons finalement de la nature de l'émetteur responsable de la bioluminescence en comparant les complexes reformés avec l'AMP à celui créé par la bioluminescence.

V.1 La bioluminescence

Une fois purifiée, nous devons nous assurer que la protéine n'est pas dénaturée. Pour se faire, nous utilisons le dichroïsme circulaire. Comme nous l'avons vu dans le chapitre II.6, les hélices α , les feuillets β ou les structures aléatoires, présentent des caractéristiques de dichroïsme circulaire particulières. Le résultat obtenu est tracé sur la Figure 65. Deux pics sont identifiables, une bande négative à 209 nm, qui correspond à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ et une deuxième autour de 222 nm, qui correspond à une transition $n \rightarrow \pi^*$. Ces deux pics sont des signatures d'hélices α . Le résultat que nous obtenons avec la luciférase *Photinus Pyralis* est en accord avec des mesures publiées dans la littérature¹³⁹. Nous remarquons, de plus, que le signal en dessous de 202 nm devient positif, en effet, une troisième caractéristique des hélices α est une bande positive à 192 nm correspondant à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$. Celle-ci n'est pas

observée dans notre cas car à cette longueur d'onde s'ajoute le signal du solvant (PBS) qui absorbe en dessous de 200 nm et sature la mesure. La solution pour s'affranchir de cet effet, serait de réduire considérablement le chemin optique à l'intérieur de la cuve (quelques micromètres), tout en augmentant la concentration de protéine afin de garder un bon signal de dichroïsme circulaire tout en diminuant la contribution du solvant.

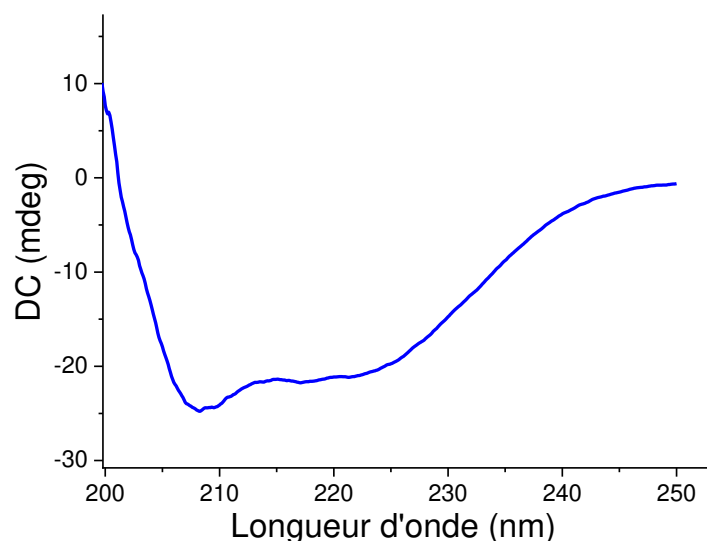


Figure 65 : dichroïsme circulaire de la luciférase *photinus pyralis* mesuré en mdeg

Un test d'activité enzymatique de la luciférase est ensuite réalisé : TriStar² de Berthold technologies. Il consiste à ajouter un réactif (ATP + d-luciférine) à la luciférase et à mesurer la luminescence émise. La variation linéaire du signal de luminescence en fonction de la concentration de la luciférase prouve que la protéine est bien active (Figure 66). Ce test est effectué à chaque nouvelle production et purification pour s'assurer que la protéine ne soit pas dénaturée.

Afin de connaître sa concentration, la valeur d'absorption est relevée à 280 nm (tryptophane). La loi de Beer-Lambert $A = \epsilon cl$ permet de calculer la concentration en fonction de coefficient d'extinction molaire ϵ en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$. Les différentes concentrations obtenues après les purifications sont de l'ordre de 110 μM . Afin de caractériser la bioluminescence de la luciole dans son environnement naturel, nous reproduisons la réaction avec la d-luciférine, la luciférase purifiée et l'ATP à pH neutre. L'ATP provient de Sigma Aldrich (Référence : FL-AA) tandis que la d-luciférine provient de GoldBio. La réaction de bioluminescence est reproduite en ajoutant la luciférase à la d-luciférine avec une concentration dix fois plus élevée, pour que

toute la luciférine soit consommée, dans une solution tampon à pH 8 contenant des ions magnésium. Lorsque l'ATP est ajoutée en excès, l'échantillon est placé dans le spectrofluorimètre (Fluorolog – Jobin Yvon). Le faisceau d'excitation est bloqué manuellement, pour ne mesurer que le signal de bioluminescence. L'émission est collectée toutes les 5 minutes et est tracée sur la Figure 67.

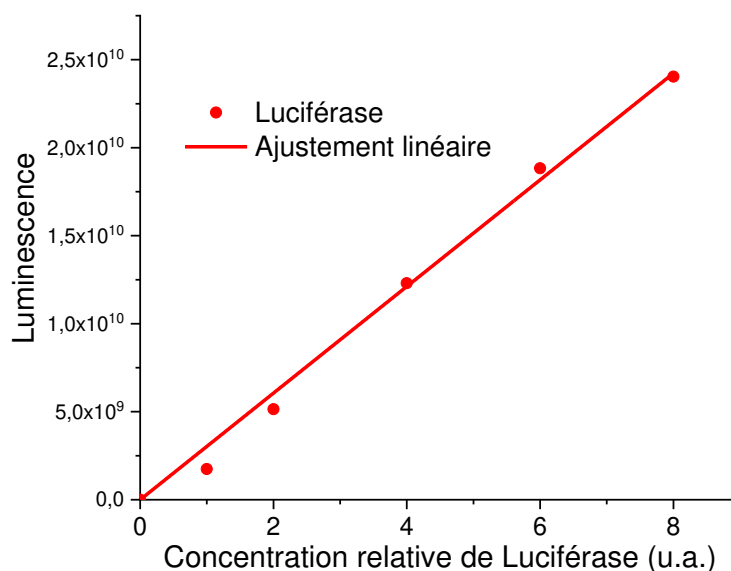


Figure 66 : test d'activité de la luciférase, mesure de la luminescence en fonction de la concentration de la protéine

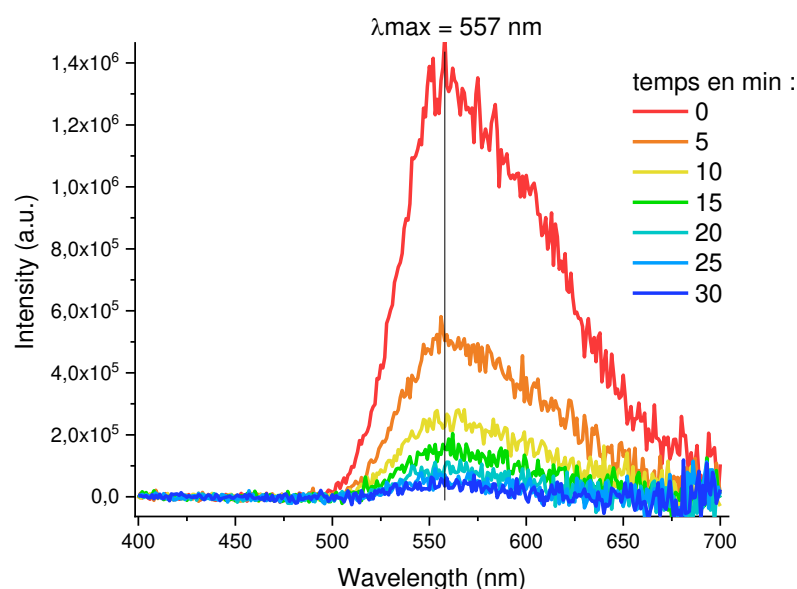


Figure 67 : Spectres de bioluminescence de l'oxyluciférine produite dans la poche protéique

Le signal présente un maximum à 557 nm qui s'atténue avec le temps jusqu'à devenir nul lorsque toute la luciférine est consommée.

V.2 Formation du complexe enzymatique

V.2.1 Nécessité de l'AMP

L'expérience d'anisotropie de fluorescence a pour but de vérifier la liaison des dérivés à la luciférase. Elle consiste à mesurer la dépolarisation de l'émission d'un fluorophore lorsque ce dernier est excité par une onde lumineuse polarisée verticalement. Cette dépolarisation dépend du mouvement de rotation de la molécule et donc plus particulièrement de sa masse, comme le décrit l'équation de Perrin (chapitre II.5.1). Grâce à cette expérience, il est possible de suivre l'évolution de la formation du complexe entre un analogue et la protéine.

Dans la nature, c'est avec de l'ATP que la luciférine forme un complexe avec la luciférase. L'ATP se transforme en AMP et après la réaction d'oxydation, le photoproduit, oxyluciférine est créé. Ainsi, dans les conditions naturelles, l'oxyluciférine forme un complexe avec la luciférase et l'AMP. Dans la suite de nos expériences, nous allons étudier ces complexes, analogues/luciférase. Comme ils ne seront pas créés à partir de la réaction de bioluminescence mais en remplaçant directement la molécule analogue dans la protéine, cette manipulation nous amène à nous demander si l'AMP est nécessaire à la formation du complexe. Pour répondre à cette question, nous comparerons deux expériences pour chaque analogue. La première mesure se fait avec un dérivé en solution aqueuse. De par sa masse faible ~ 250 g/mol, l'anisotropie de fluorescence mesurée sera quasiment nulle. Puis, la luciférase est ajoutée à l'échantillon. Lorsque le dérivé se lie à la protéine pour former un complexe, il voit sa masse augmentée considérablement (environ 330 fois plus grande), ce qui ralentit le mouvement de rotation de la molécule et conduit à l'augmentation de l'anisotropie de fluorescence. Nous considérons que toutes les molécules présentes dans l'échantillon sont liées à une protéine, lorsque la valeur de l'anisotropie de fluorescence n'augmente plus avec l'ajout de luciférase. Ainsi, le signal provenant de la proportion de molécules libres restantes en solution sera négligeable devant celui provenant du complexe. La deuxième mesure est identique à la première, mais cette fois-ci l'AMP est ajoutée en excès (cent fois plus concentrée que l'analogue) à l'échantillon.

Cette expérience nous permettra à la fois, de déterminer l'importance de l'AMP, mais aussi de déterminer la concentration de protéine nécessaire pour considérer que la majorité des analogues soient liés à la luciférase. Ainsi, le signal provenant de la proportion de molécules libres restantes en solution sera négligeable devant celui provenant du complexe.

Les résultats de l'anisotropie de fluorescence en régime stationnaire sont représentés sur la Figure 68. Nous pouvons classer les dérivés en trois groupes distincts. Le premier comprend le 4,6'DMeOxyl et le 4-MeOxylH car leurs deux courbes d'anisotropie de fluorescence (échantillon sans AMP en noire, échantillon avec AMP en rouge) sont similaires. Un plateau est observé pour des concentrations de luciférase dix fois supérieures à celles des dérivés. Cela nous indique qu'un rapport de concentration de dix doit être utilisé pour étudier les caractéristiques des complexes 4,6'DMeOxyl/luciférase et 4-MeOxylH/luciférase. De plus, pour ces deux composés, l'AMP ne semble pas affecter la formation du complexe.

Le deuxième groupe contient les dérivés 6'-Me-5,5-CprOxyl et 5,5-CprOxylH. Pour ces deux composés, aucun plateau d'anisotropie de fluorescence est observé. En effet, même avec une concentration en luciférase trente fois supérieure à celle des dérivés, la valeur de l'anisotropie ne cesse d'augmenter. Ce résultat est d'autant plus remarquable pour le dérivé 6'-Me-5,5-CprOxyl. Malgré tout, l'AMP semble quand même faciliter la formation du complexe, mais son effet n'est pas suffisant pour que la proportion de molécule libre puisse être négligée. Cette observation peut s'expliquer par la présence du cycle spiro-cyclopropyle qui rend plus difficile l'accès au site actif.

Enfin, le dernier groupe comprend le dérivé 6'-MeOxylH et l'OxylH₂. Comme pour le deuxième groupe, l'AMP semble être importante pour lier le composé à la protéine car pour une même concentration de luciférase, la valeur de l'anisotropie de fluorescence est plus élevée avec AMP que sans. Cela signifie que l'AMP contribue à la formation du complexe et est donc indispensable à nos expériences. En revanche, en présence d'AMP, un plateau est clairement identifiable lorsque la concentration de la protéine est seulement deux fois plus élevée que celle de l'analogue. Ainsi, pour ces deux dérivés nous utiliserons un rapport de concentrations dérivé/protéine de trois afin de considérer que tous les analogues soient bien liés à la protéine.

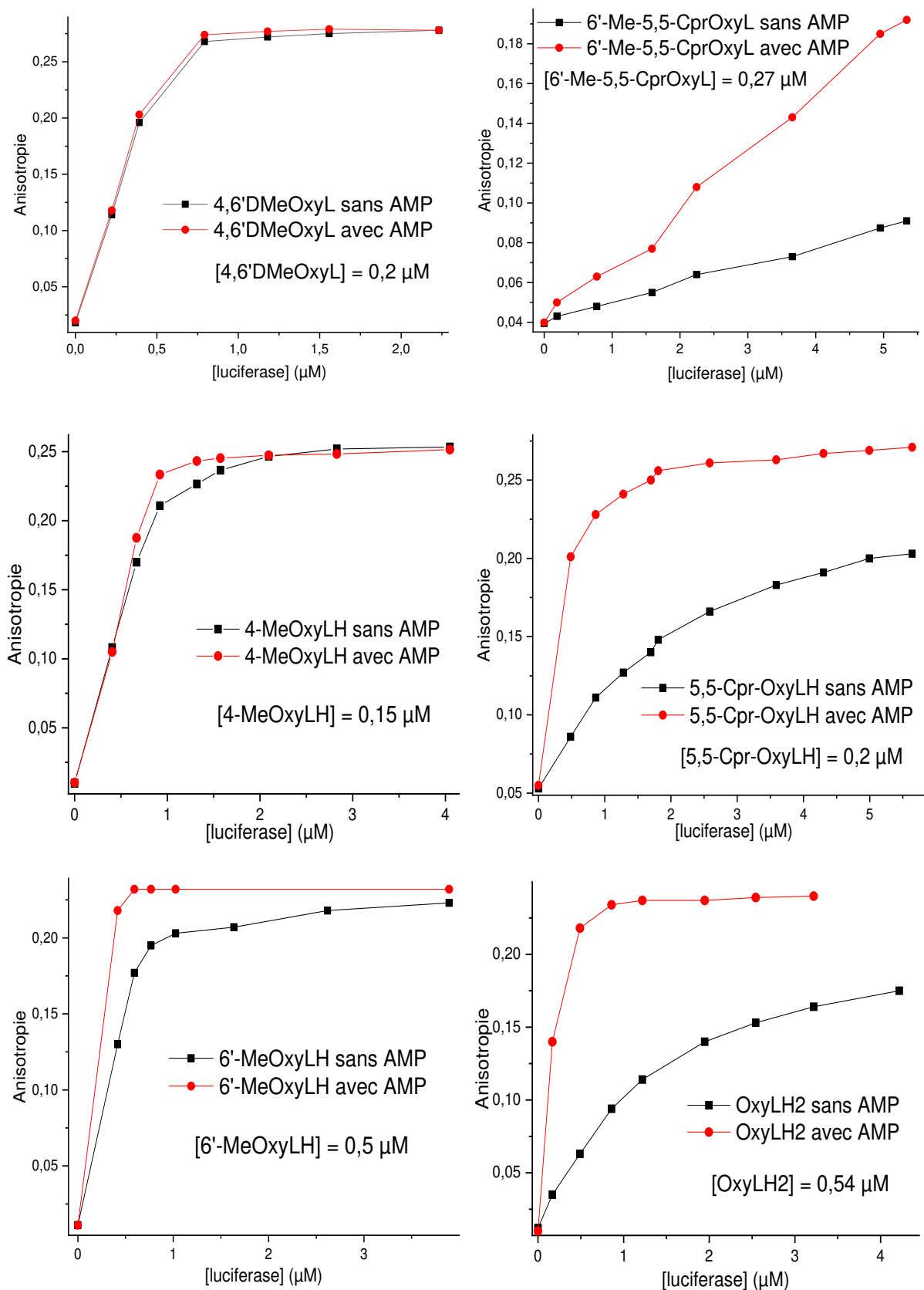


Figure 68 : mesures d'anisotropie de fluorescence tracées en fonction de la concentration de la protéine, pour les six dérivés. Les courbes rouges sont des mesures réalisées en présence d'AMP et les courbes noires sont obtenues en absence d'AMP.

V.2.2 Mutations de la luciférase

Les expériences d'anisotropie de fluorescence nous assurent que les dérivés utilisés se lient à la luciférase (à l'exception du 6'-Me-5,5-CprOxyL et du 5,5-CprOxyLH) en présence d'AMP mais ne donnent pas d'informations sur le site de liaison. Il est donc important de vérifier que les analogues se trouvent bien au sein de la cage protéique. Il est indéniable que lorsque la réaction de bioluminescence a lieu, l'oxyluciférine est créée dans le site actif de la luciférase. Mais lorsque le complexe est recréé *in vitro*, la situation peut être différente. La méthode de référence consisterait à obtenir des cristaux de complexes afin de les étudier par cristallographie aux rayons X. Malheureusement, nous n'avons pas eu l'opportunité de réaliser ce type d'expériences. Nous avons donc entrepris de produire deux mutants ponctuels de la luciférase dans le but de bloquer l'entrée dans le site actif. Pour le premier, l'acide aminé Gly315 est remplacé par un tryptophane (G315W), dans le second la Ser347 est remplacée par un acide glutamique (S347E, Figure 69).

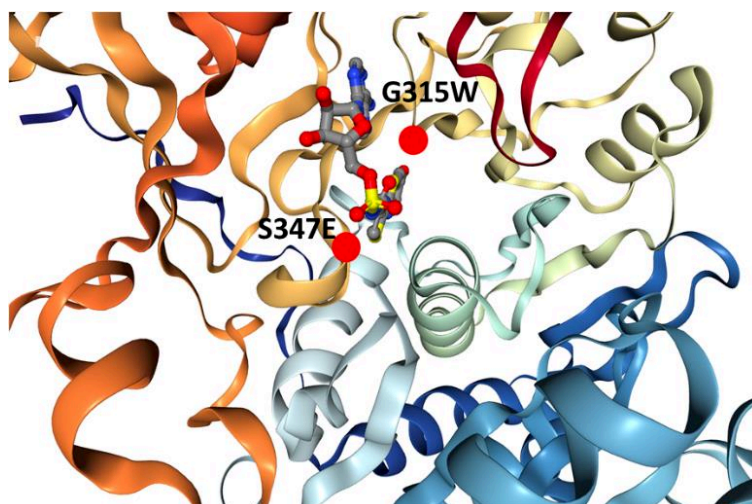


Figure 69 : schéma représentant l'oxyluciférine à l'intérieur du site actif de la luciférase. Les points rouges représentent les deux mutations ponctuelles introduites pour créer le mutant G315W et le mutant S347E

Après avoir produit et purifié ces deux mutants, nous procédons aux mêmes tests que pour la luciférase sauvage, décrits dans le paragraphe V.1, à savoir un test d'activité ainsi qu'une mesure par dichroïsme circulaire.

Le test d'activité révèle que la luciférase sauvage émet une luminescence une à deux millions de fois plus intense que les mutants (Figure 70). Cela pourrait signifier que la luciférine n'aurait

plus la possibilité de s'introduire dans le site actif pour créer l'oxyluciférine. Ainsi le test d'activité soutient l'hypothèse que les mutations agissent sur l'accessibilité du site actif.

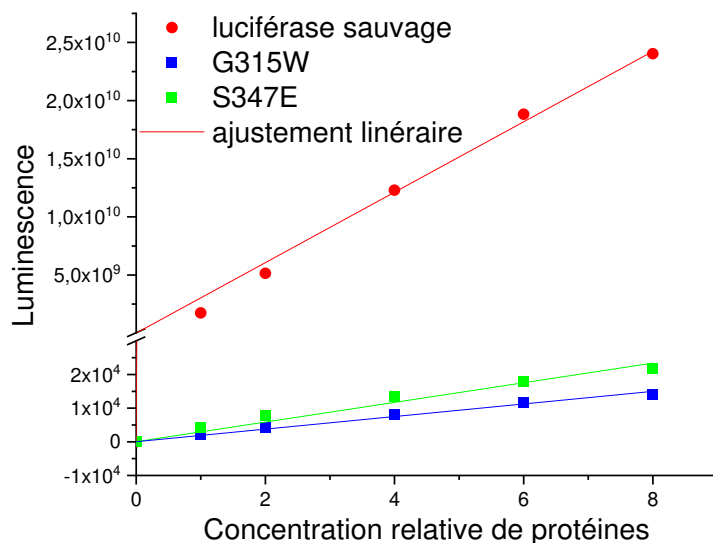


Figure 70 : test d'activité de la luciférase et des deux mutants

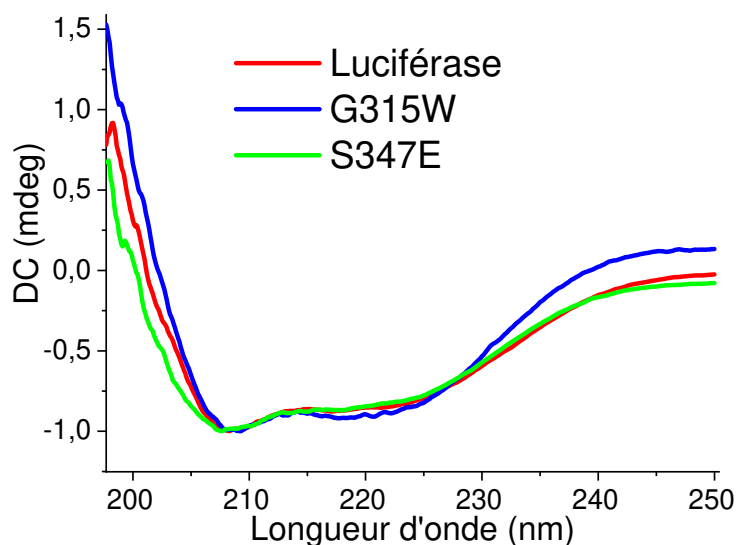


Figure 71 : résultats de la mesure de dichroïsme circulaire de la luciférase on mutée (courbe bleue) et des mutants S347E (courbe rouge) et G315W (courbe noire)

Afin de vérifier si ces mutations n'ont pas dégradé la structure de la luciférase, nous utilisons le dichroïsme circulaire. Les résultats sont représentés sur la Figure 71. Les courbes de dichroïsme circulaire des mutants présentent une grande similarité avec celle de la luciférase sauvage. Ces résultats confirment que les mutants produits ne sont pas dénaturés, et comme la luciférase sauvage ils sont principalement formés d'hélice α comme l'indique les bandes positives à 209 nm et 222 nm.

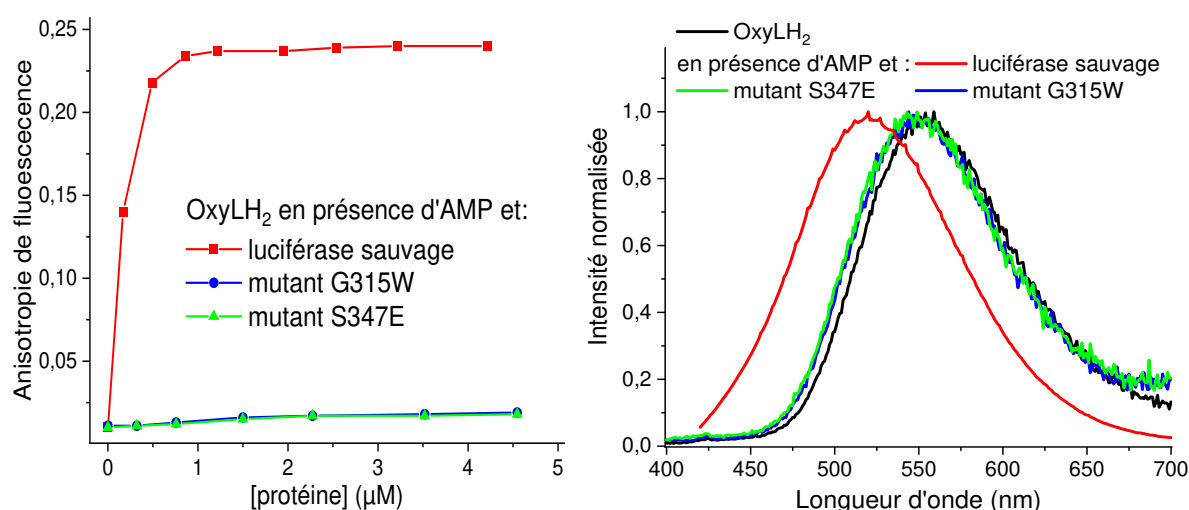


Figure 72 : a) mesures d'anisotropie de fluorescence de l'oxyluciférine en augmentant la concentration de luciférase sauvage (points rouge), ou de ces deux mutants G315W (points verts) et S347E (points bleus). b) spectres d'émission de l'oxyluciférine en solution aqueuse (courbe noire) et en présence de la luciférase sauvage (courbe rouge) ou de ces deux mutants G315W (courbe bleue) et S347E (courbe verte).

Bien que la bioluminescence n'ait plus lieu, une vérification de la liaison des dérivés aux luciférase mutées est tout de même nécessaire. Pour ce faire, des mesures d'anisotropie de fluorescence et de spectres d'émission sont réalisées avec l'oxyLH₂ (Figure 72). Nous avons vu précédemment, que lorsque l'oxyLH₂ forme un complexe avec la luciférase en présence d'AMP, les valeurs de l'anisotropie augmentent avec la concentration en luciférase, jusqu'à atteindre un plateau qui indique l'absence de molécules libres. De plus, un décalage spectral vers les faibles longueurs d'onde est observé, à cause de l'environnement apolaire à l'intérieur de la protéine et des interactions électrostatiques avec l'AMP. Lorsque ces mesures sont répétées avec les deux mutations de la luciférase G315W et S347E, les résultats ne semblent pas évoluer de la même façon que pour ceux obtenus avec la luciférase sauvage et sont similaires de ceux obtenus en solution aqueuse. En effet, la Figure 72a ne montre aucune augmentation des valeurs d'anisotropie de fluorescence lorsque la concentration des protéines mutées augmente. Cette mesure indique qu'aucune liaison ne se fait entre l'oxyLH₂ et les mutants, ni dans le site actif ni avec des acides aminés situés à la surface des luciférases mutées. Les spectres d'émission (Figure 72b) confirment cette conclusion. En effet, aucun décalage spectral n'est observé et les spectres de l'oxyLH₂ avec les mutants correspondent à ceux obtenus avec l'oxyLH₂ en solution aqueuse. Ces deux expériences montrent que lorsque le site actif n'est pas accessible, les molécules analogues ne se lient plus à la protéine. Nous

considérons donc, pour la suite de la discussion, que nos dérivés se situent bien à l'intérieur de la poche protéique de luciférase sauvage. En revanche, pour confirmer de manière certaine cette hypothèse, des mesures de cristallographie seraient nécessaires.

V.2.3 Spectres d'émission

Cette partie a pour but de comparer les propriétés d'émission des analogues formant un complexe avec la protéine en absence et présence d'AMP. Tout d'abord, quand le dérivé se place dans la poche protéique, il passe d'un solvant polaire (l'eau) à une cage hydrophobe de polarité plus faible. Ce changement de polarité doit entraîner des changements des propriétés spectrales. En effet, le maximum d'émission se décale vers le rouge à cause de la stabilisation à l'état excité par les molécules du solvant qui diminue l'énergie entre l'état excité S1 et l'état fondamental. Le fluorophore étant lui-même polaire, aura une grande sensibilité à la polarité du solvant et après son excitation dans l'état S1, les dipôles se réorientent de façon à minimiser l'énergie d'interaction. A l'inverse, dans la protéine, la différence d'énergie entre les deux états (fondamental et excité) augmente, donc la longueur d'onde d'émission diminue, quand la polarité diminue. Le principe est illustré Figure 73 . En prenant en compte cette propriété du solvant, nous pouvons prédire que l'entrée du dérivé dans le site actif de la luciférase se traduit par un décalage spectral de son maximum d'émission, vers des longueurs d'onde plus faibles¹²⁹. Le fluorophore étant lui-même polaire, aura une grande sensibilité à la polarité du solvant et après son excitation dans l'état S1, les dipôles se réorientent de façon à minimiser l'énergie d'interaction. A l'inverse, dans la protéine, la différence d'énergie entre les deux états (fondamental et excité) augmente, donc la longueur d'onde d'émission diminue, quand la polarité diminue. Le principe est illustré sur la Figure 73 . En prenant en compte cette propriété du solvant, nous pouvons prédire que l'entrée du dérivé dans le site actif de la luciférase se traduit par un décalage spectral de son maximum d'émission, vers des longueurs d'onde plus faibles.

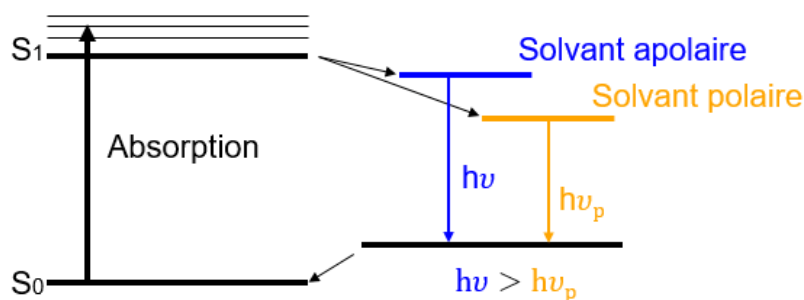


Figure 73 : illustration du principe d'émission d'un fluorophore. L'émission dans un solvant polaire correspond à des longueurs d'onde plus grandes que l'émission dans un solvant apolaire

Dans la partie introduction, nous avons vu que l'AMP pouvait aussi contribuer au décalage spectral de l'émission. En effet, Nakatani *et al.* ont relevé une contribution électrostatique entre l'AMP et l'oxyLH₂ qui conduit à un décalage spectral vers les longueurs d'onde bleues⁹⁶. Pinto Da Silva *et al.* expliquent que lorsque les interactions intermoléculaires entre la forme phénolate-kéto et l'AMP diminuent, un décalage spectral vers le rouge peut être observé¹¹⁴. Et enfin, Garcia-Iriepa *et al.* affirment que l'émission varie en fonction de l'état de protonation de l'AMP¹⁰¹. L'AMP²⁻ conduit à un décalage spectral vers le bleu, plus important que celui produit par l'AMP⁻. Ainsi, l'AMP peut à son tour, affecter les propriétés spectrales des analogues.

Pour chaque dérivé, nous avons mesuré son spectre d'émission en solution aqueuse (courbes noires sur la Figure 74), puis en présence de la luciférase lorsque sa concentration est dix fois supérieure à celle du dérivé sans AMP (courbes vertes sur la Figure 74), et en présence de la luciférase avec de l'AMP ajoutée en excès à une concentration cent fois supérieure à celle de la luciférase (courbes bleues en pointillées sur la Figure 74).

Les résultats, décrits sur la Figure 74, peuvent aussi être décomposés en trois groupes. Tout d'abord, nous pouvons isoler le cas du dérivé 4,6'-DMeOxyL. Son maximum d'émission lorsqu'il se situe dans la protéine, est décalé de 9 nm par rapport à son maximum d'émission en solution aqueuse (voir Tableau 6). En revanche, comme pour les résultats d'anisotropie de fluorescence, le résultat en présence d'AMP ne diffère pas de celui sans AMP. Nous pouvons alors conclure que ce décalage provient simplement du changement de polarité.

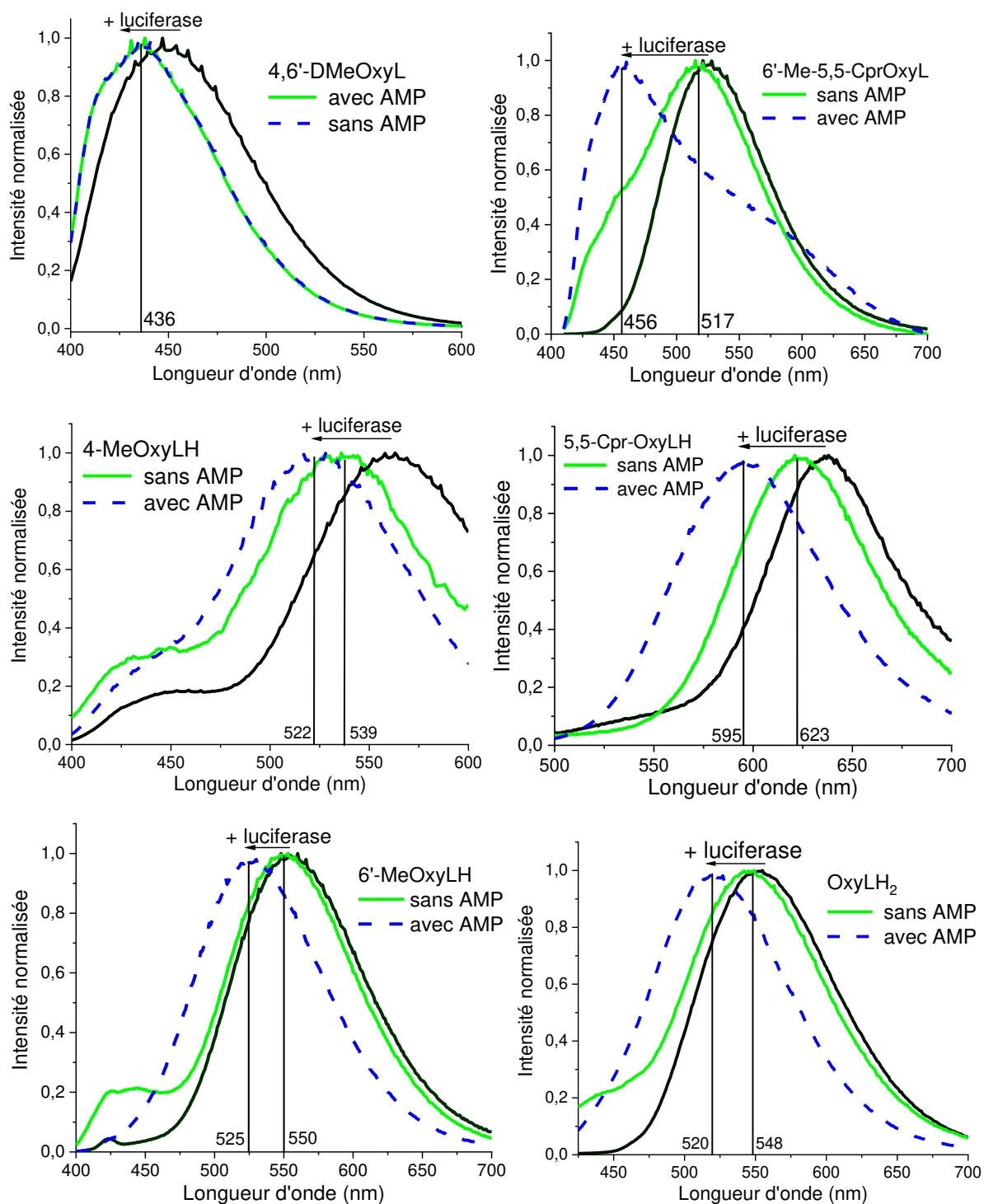


Figure 74 : Spectre d'émission des six dérivés, en solution aqueuse (courbe noire), en présence de luciférase et sans AMP (courbe verte), en présence de luciférase avec AMP (courbe bleue en pointillés)

Ensuite, pour les trois dérivés 4-MeOxyLH, 6'-Me-5,5-CprOxyL et 5,5-CprOxyLH, un décalage spectral est observé pour chaque nouvelle condition (avec l'ajout de luciférase et l'ajout d'AMP). En effet, l'émission du dérivé 4-MeOxyLH en solution aqueuse présente un maximum centré à 560 nm, tandis que celui mesuré en présence de protéine se décale vers les longueurs d'onde bleues, de 21 nm et de 38 nm lorsque l'AMP est ajoutée à la solution. Ici, en plus d'un décalage spectral dû au changement de polarité de l'environnement du dérivé, un effet de l'AMP sur le spectre d'émission est visible. Cet effet peut s'expliquer par la théorie de Nakatani *et al.* qui expliquent que l'AMP peut moduler les propriétés électrostatiques de l'environnement à l'intérieur de la luciférase et conduire à un décalage spectral vers le bleu. Pour les deux autres dérivés, 6'-Me-5,5-CprOxyL et 5,5-CprOxyLH, les données sont plus difficiles à interpréter car les résultats de la partie précédente (V.2.1 - Figure 68) montrent qu'avec une proportion de luciférase 10 fois supérieure à celle du dérivé, l'anisotropie de fluorescence n'a toujours pas atteint de plateau. C'est-à-dire que la proportion de dérivés non liés dans la solution n'est pas négligeable par rapport à celle en complexe et donc que les résultats des spectres d'émission sont une combinaison linéaire de l'émission provenant de l'analogue seul et de l'analogue en complexe avec la protéine. En revanche, tout comme les résultats de l'anisotropie de fluorescence nous pouvons observer un impact fort de l'AMP, qui produit un décalage spectral plus important (voir Tableau 6). Cette variation du maximum d'émission peut s'expliquer de la même façon que pour le composé 4-MeOxyLH.

Enfin, les deux derniers dérivés sont le 6'-MeOxyLH et OxyLH₂. Leurs résultats diffèrent des autres analogues car en présence de luciférase, la position du maximum d'émission ne varie que très peu (quelques nanomètres). Cela peut s'expliquer par l'absence de liaison à l'enzyme. Comme l'anisotropie de fluorescence ne présente pas de plateau pour la concentration de luciférase utilisée, toutes les molécules analogues ne peuvent pas être considérées comme étant en complexe avec la protéine. Les spectres d'émission avec la luciférase seront donc proches des spectres en solutions aqueuse. En revanche, lorsque l'AMP est ajoutée à la solution, l'anisotropie de fluorescence (Figure 67) présente un plateau qui assure que la contribution associée aux analogues libres est réduite à son minimum. Le décalage spectral devient alors significatif, et est de 30 nm pour les deux dérivés, par rapport à l'émission en solution aqueuse (voir Tableau 6).

Tableau 6 : différence de longueur d'onde du maximum d'émission de chaque dérivé en présence de luciférase avec et sans AMP par rapport au maximum d'émission en absence de luciférase

	4,6'-DMeOxyL	6'-Me-5,5-Cpr-OxyL	4-MeOxyLH	5,5-Cpr-OxyLH	6'-MeOxyLH	OxyLH ₂
Sans AMP	9 nm	8 nm	21 nm	14 nm	5 nm	2 nm
Avec AMP	9 nm	69 nm	38 nm	42 nm	30 nm	30 nm

Tableau 7 : Maximum d'émission relevé pour chaque dérivé dans trois conditions : en solution aqueuse, en présence de protéine sans AMP et en présence de protéine avec AMP

		4,6'-DMeOxyL	6'-Me-5,5-Cpr-OxyL	4-MeOxyLH	5,5-Cpr-OxyLH	6'-MeOxyLH	OxyLH ₂
Sans luciférase		445 nm	525 nm	560 nm	640 nm	555 nm	550 nm
Avec luciférase	Sans AMP	436 nm	517 nm	539 nm	623 nm	550 nm	548 nm
	Avec AMP	436 nm	477 nm	517 nm	596 nm	523 nm	523 nm

V.2.4 Constante de dissociation – anisotropie de fluorescence résolue en temps

Nous avons vu dans la partie V.2.1 l'importance du rôle joué par l'AMP dans la formation du complexe. Dans le cas où l'anisotropie de fluorescence n'atteint pas un plateau, les résultats des mesures de spectroscopie proviennent alors d'un mélange des formes libres et liés. Ces résultats sont alors plus difficiles à interpréter et il devient primordial de connaître le pourcentage des deux formes. Nous nous sommes déjà intéressés à cette question en mesurant l'anisotropie de fluorescence à l'état stationnaire dans la partie V.2.1. Le problème de ces mesures, est que l'interprétation peut être faussée si le rendement du chromophore varie lorsqu'il se trouve lié à la protéine. En effet, il est possible d'observer une augmentation de l'intensité d'émission avec la liaison à l'enzyme ; le microenvironnement du dérivé peut réduire la contribution des voies de relaxation non-radiatives et ainsi augmenter sa durée de vie de fluorescence et son rendement quantique. Afin de contourner ce problème, nous mesurons l'anisotropie de fluorescence résolue en temps.

Comme pour l'étude à l'état stationnaire, nous mesurons l'intensité de fluorescence avec une polarisation parallèle puis perpendiculaire par rapport à la polarisation du faisceau

d'excitation. L'anisotropie de fluorescence résolue en temps se définit par l'équation suivante :

$$r(t) = \frac{I_{//}(t) - G \cdot I_{\perp}(t)}{I_{//}(t) + 2 \cdot G \cdot I_{\perp}(t)} = r_0 \sum_i a_i e^{-\frac{t}{\theta_i}}$$

Où $I_{// \text{ ou } \perp}(t)$ correspond au signal d'émission avec une polarisation parallèle (ou perpendiculaire) au faisceau d'excitation, r_0 correspond à l'anisotropie mesurée à l'état stationnaire lorsque toutes les molécules sont liées et θ est le temps de corrélation de rotation.

Dans notre cas, nous distinguons une population composée des dérivés libres en solution et une autre composée des dérivés liés à la protéine. Le signal est donc composé de deux termes ($i=2$). Nous pouvons calculer θ_2 associé à la taille de la luciférase de 60 kDa, comme un temps de corrélation rotationnel d'1 ns correspond à 2 400 Da, on en déduit que $\theta_2 = 25 \text{ ns}$. Ce temps de vie ne pouvant pas être mesuré précisément avec la méthode de comptage de photon TCSPC, il sera fixé dans l'analyse de nos données.

Les deux mesures de déclin de fluorescence sont alors ajustées avec les équations suivantes :

$$I_{//}(t) = I_{magic}(t) \cdot (1 + 2 \cdot r_0 \cdot ((1 - a)e^{-\frac{x-t_0}{\theta_1}} + a e^{-\frac{x-t_0}{\theta_2}}))$$

$$I_{\perp}(t) = I_{magic}(t) \cdot (1 - r_0 \cdot ((1 - a)e^{-\frac{x-t_0}{\theta_1}} + a e^{-\frac{x-t_0}{\theta_2}}))$$

Avec a , la concentration relative de dérivé en complexe protéique.

Les résultats sont représentés sur la Figure 75 pour les dérivés 5,5-Cpr-OxyLH, 6'-MeOxyLH et OxyLH₂ lorsque la concentration de luciférase est nulle et lorsqu'elle est dix fois supérieure à celle du dérivé. Dans un premier temps, nous pouvons constater pour chaque dérivé que le temps de vie de fluorescence augmente avec l'ajout de luciférase. Pour le 6'-MeOxyLH et l'OxyLH₂, le temps de vie de 7,9 ns en solution aqueuse augmente à 11,7 ns pour le 6'-MeOxyLH et 10,6 ns pour l'OxyLH₂. En revanche, pour le dérivé 5,5-Cpr-OxyLH, son déclin de fluorescence mesuré à 0,62 ns en solution aqueuse est retrouvé en présence de la luciférase avec en plus, une deuxième constante de temps de 5,4 ns. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle ce composé ne se lie pas totalement à la protéine et qu'il reste des molécules libres dans la solution.

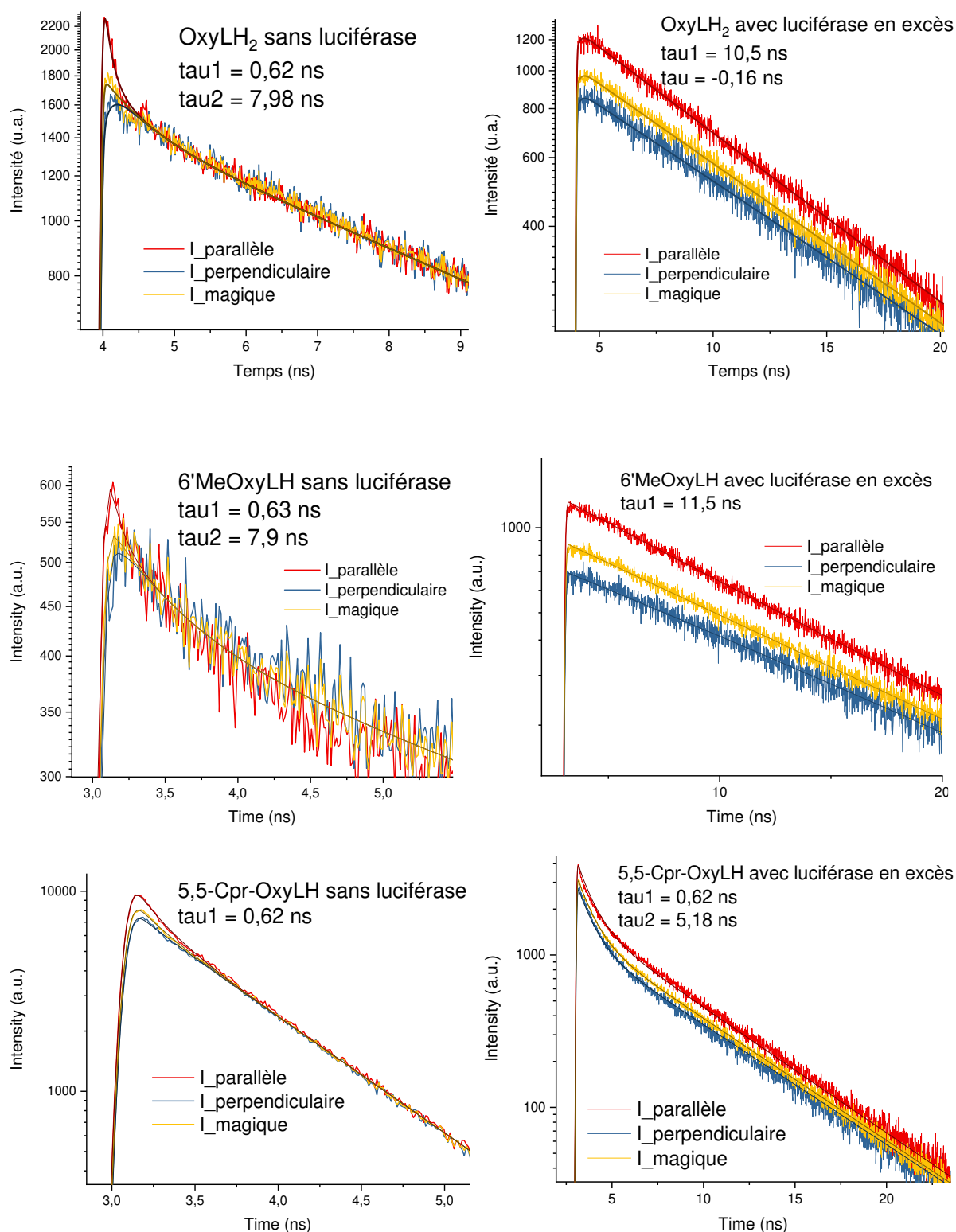


Figure 75 : Déclins de fluorescence mesurés avec une polarisation parallèle (courbes rouges), perpendiculaire (courbes bleues) et à angle magique (courbes jaunes) par rapport à la polarisation du faisceau incident pour les composés OxyLH₂, 6'-MeOxyLH et 5,5-Cpr-OxyLH en solution aqueuse et en présence de luciférase et d'AMP en excès

En répétant ces mesures avec des concentrations croissantes de protéine, nous pouvons reconstruire une courbe représentant la fraction de molécules liée (a) en fonction de la concentration de la luciférase, Figure 76.

Nous cherchons maintenant à calculer la constante de dissociation (K_D) de la réaction enzymatique définie de la façon suivante :

$$E + S \rightleftharpoons ES$$

$$K_D = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[a - y]x}{y} \Leftrightarrow y = \frac{ax}{K_D + x}$$

Avec $[E]$ la concentration de la protéine qui correspond à l'axe des abscisses Figure 76, $[S]$ la concentration du dérivé et $[ES]$ la concentration du dérivé qui est lié avec la protéine et qui correspond à l'axe des ordonnées sur la Figure 76. Ainsi, en ajustant la courbe obtenue avec l'anisotropie de fluorescence résolue en temps, avec l'équation écrite ci-dessus, il est possible de retrouver K_D .

Pour le dérivé 6'-MeOxyLH la constante de dissociation définie par l'anisotropie de fluorescence résolue en temps est de 0.1 μ M quand à celle de l'OxyLH₂ elle vaut 0.8 μ M. Pour le dérivé 5,5-Cpr-OxyLH, la constante de dissociation ne pourra pas être mesurée par l'anisotropie de fluorescence résolue en temps car même avec une concentration de luciférase dix fois supérieure à celle du dérivé (lorsque l'anisotropie de fluorescence mesurée à l'état stationnaire semble atteindre un plateau, $r = 0.25$), celui-ci contient encore une proportion non négligeable de molécules libres. Les deux dérivés 5,5-Cpr-OxyLH et 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL sont composés d'un cycle spiro-cyclopropyle qui rend plus difficile l'accès au site actif de la luciférase. Cela explique pourquoi, pour les mêmes proportions de luciférase et de molécules analogues qu'avec les autres dérivés, nous ne pouvons pas déterminer la constante de dissociation.

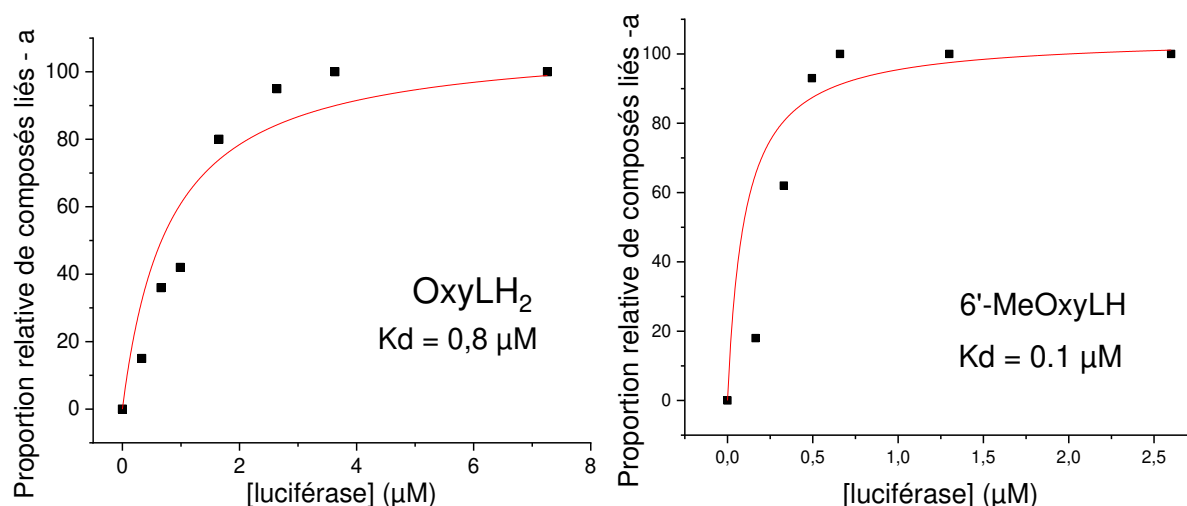


Figure 76 : Concentration relative (a) de l'OxyLH₂ et du dérivé 6'-MeOxyLH en complexe avec la luciférase en fonction de la concentration en luciférase. Les courbes rouges correspondent à un ajustement réalisé avec l'équation $y = ax/(K_D + x)$ et permettent de retrouver les constantes de dissociations des deux molécules

Tableau 8 : Constantes de dissociation mesurées pour chacun des dérivés

	4,6'-DMeOxyL	6'-Me-5,5-Cpr-OxyL	4-MeOxyLH	5,5-Cpr-OxyLH	6'-MeOxyLH	OxyLH ₂
K_D (μM)	0,24	/	0,24	/	0,1	0,8

Afin d'étudier les dérivés en complexe avec la luciférase, nous avons choisi d'utiliser un rapport de concentration de dix, c'est-à-dire que la concentration de luciférase utilisée doit être dix fois supérieure à celle du dérivé pour considérer que tous les analogues soient liés à la protéine.

V.3 Discussion – quelle est la nature de l'émetteur ?

En solution aqueuse, nous savons désormais que ce sont les formes phénol-énolate et phénolate-kéto qui contribue à l'émission de l'oxyluciférine pour des pH inférieurs à 7 alors que seule la forme phénolate-énolate contribue à des pH supérieurs à 7. Mais lorsque l'oxyluciférine est recrée à partir de la réaction de bioluminescence, c'est-à-dire lorsqu'elle se trouve dans la poche protéique de la luciférase, son émission peut potentiellement impliquer d'autres formes. Jusqu'à présent, les principales études portant sur l'émetteur de la bioluminescence sont théoriques et elles arrivent à la même conclusion : l'espèce phénolate-kéto est l'espèce la plus stable dans le processus de bioluminescence. De plus, les

variations des longueurs d'onde d'émission peuvent s'expliquer par la sensibilité à la température et au pH de la forme phénolate-kéto. Elle permet donc à elle seule d'expliquer la modulation de la longueur d'onde associée à la bioluminescence. Viviani *et al.* expliquent qu'à pH 6 les longueurs d'onde élevées (612 nm) peuvent être obtenues ^{83,93} à partir de la forme par phénolate-kéto lorsque la protéine est dans sa conformation ouverte, tandis que les longueurs d'onde de bioluminescence plus faible (557 nm), obtenus à pH basique (> 9), proviennent d'une émission de la forme phénolate-kéto dans la protéine ayant une conformation fermée. Bien que cette espèce soit la plus favorable d'un point de vue théorique, la tautomérisation permettant d'obtenir la forme énoïl n'est pas totalement exclue.

Dans cette dernière partie, nous participerons au débat concernant l'espèce émettrice de l'oxyluciférine lorsqu'elle se trouve en complexe avec la protéine. Pour se faire, nous comparerons les résultats à l'état stationnaire ainsi qu'à l'état excité, de l'oxyluciférine recréée à partir de la d-luciférine avec ceux obtenus en remplaçant les différents dérivés dans la poche protéique de la luciférase *Photinus pyralis*. Pour la suite de ce chapitre, nous ne tiendrons pas compte des résultats obtenus pour les dérivés 6'-Me-5,5-CprOxyL et 5,5-CprOxyLH puisque les expériences réalisées en présence de protéine ne nous ont pas permis de conclure quant à la formation du complexe.

V.3.1 Résultats à l'état stationnaire

Pour commencer, nous cherchons à déterminer les espèces de l'oxyLH₂ présentes à l'état fondamental dans la poche protéique. Les spectres d'absorption des dérivés sont tracés sur la Figure 77. L'oxyLH₂ reproduite à partir de la réaction de bioluminescence, que nous appellerons photoproduit, est comparée avec les 4 analogues, dont l'oxyLH₂ synthétisée, appelée analogue.

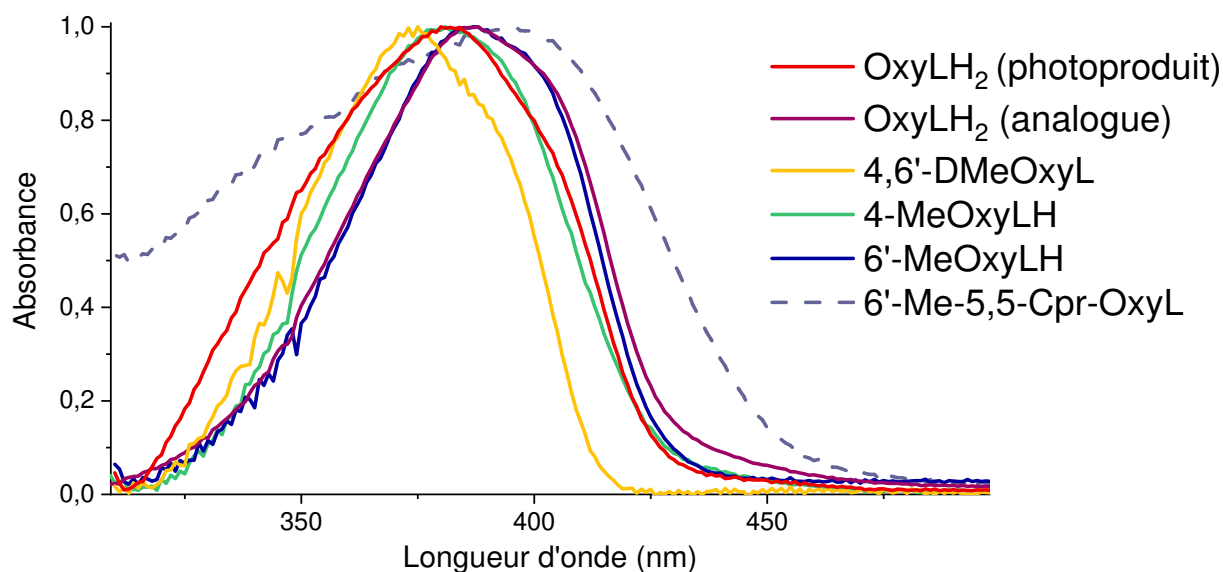


Figure 77 : Spectres d'absorption de l'oxyLH₂, photoproduit de la réaction (courbe rouge) et d'autre dérivés en complexe avec la protéine, à pH 7.4

Nous pouvons distinguer trois longueurs d'onde d'absorption, 374 nm pour le dérivé 4,6'-DMeOxyL, 381 nm pour le 4-MeOxyLH et l'oxyLH₂ (photoproduit) puis 387 nm pour le 6'-MeOxyLH et l'oxyLH₂ (analogue). Bien que le 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL ne se complexe pas totalement avec la protéine, son spectre d'absorption semble tout de même s'élargir en présence de la protéine. Le dérivé 4,6'-DMeOxyL, qui mime la forme phénol-énol, présente un maximum d'absorption décalé vers les faibles longueurs d'onde par rapport aux autres dérivés. Ce décalage pourrait s'expliquer par la présence des groupements méthoxyles. Pour vérifier cette hypothèse, les spectres d'absorption du 4-MeOxyLH, du 6'-MeOxyLH et de l'oxyLH₂ (analogue) sont reproduit dans le DMSO (Figure 78). En effet, le DMSO a déjà été utilisé pour mimer l'environnement protéique^{140,141}. C'est un solvant polaire, aprotique avec une constante diélectrique $\epsilon = 46.8 \text{ F.m}^{-1}$. Bien que sa permittivité soit plus élevée que celle de la protéine (inférieure à 20 F.m^{-1}), ce solvant sera utile pour appréhender les changements que pourrait entraîner la protéine sur les spectres d'absorption. Néanmoins, le solvant ne peut pas mimer les interactions électrostatiques existantes avec les résidus du site actif qui peuvent influencer ses propriétés optiques. Nous remarquons un décalage spectral par rapport à l'absorption en solution aqueuse de quelques nanomètres. Les trois spectres des dérivés coïncident avec le spectre d'absorption du 4,6'-DMeOxyL en présence de la protéine. Néanmoins, aucun décalage spectral est observé entre le 4,6'-DMeOxyL et le 4-MeOxyLH ou 6'-MeOxyLH dans le DMSO comme c'est le cas dans la protéine. Nous pouvons alors faire l'hypothèse que les formes protonées et déprotonées sont en équilibre à l'intérieur du site

actif de la protéine (phénol-énol et phénolate-énolate pour le 4-MeOxyLH et phénol-énol et phénol-énolate pour le 6'-MeOxyLH et l'oxyLH₂). En solution aqueuse nous avons pu caractériser les propriétés des espèces déprotonées en faisant varier le pH de la solution. Le pKa des différents analogues se situe autour de 7, donc à pH 11 tous les dérivés se trouvent sous leur forme déprotonées. Or, en présence de la luciférase, l'émission et l'absorption des dérivés ne varient plus en fonction du pH (Figure 79), ce qui rend impossible la photo-sélection des espèces déprotonées et leur caractérisation à l'intérieur de la poche protéique.

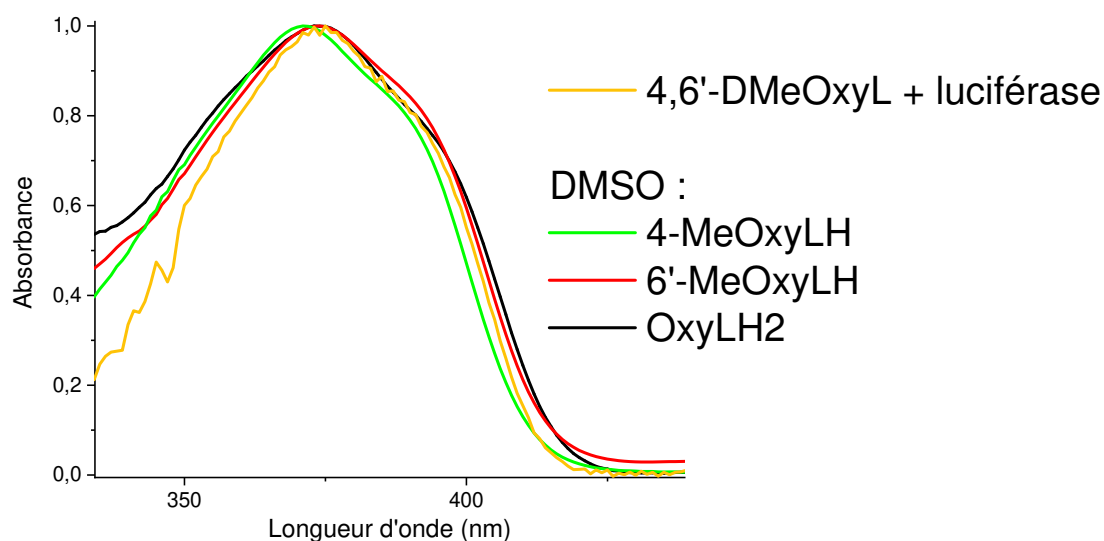


Figure 78 : Spectres d'absorption des dérivés dans le DMSO

Quant à l'oxyLH₂ (photoproduit), son spectre s'élargit autour de 350 nm. Nous proposons les trois hypothèses suivantes pour expliquer cet élargissement : la première est liée à la présence de la forme phénol-kéto à l'état fondamental, la deuxième à la présence de la d-luciférine encore présente en solution aqueuse (qui ne serait pas totalement consommée par la réaction enzymatique), et enfin, cet épaulement pourrait aussi provenir d'une mauvaise correction du signal de diffusion.

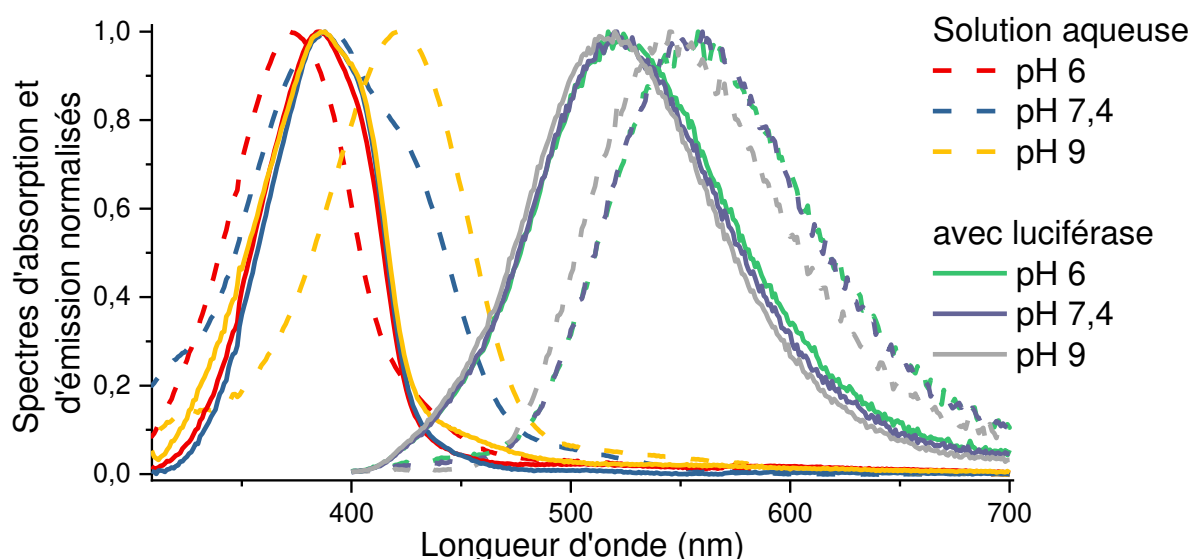


Figure 79 : Spectres d'absorption (courbes rouges, bleues, et jaunes) et spectres d'émission (courbes vertes, violettes et grises) du dérivé oxyLH₂ en solution aqueuse (pointillé) et en présence de la luciférase (trait plein). Les spectres en présence de la protéine ne dépendent plus du pH.

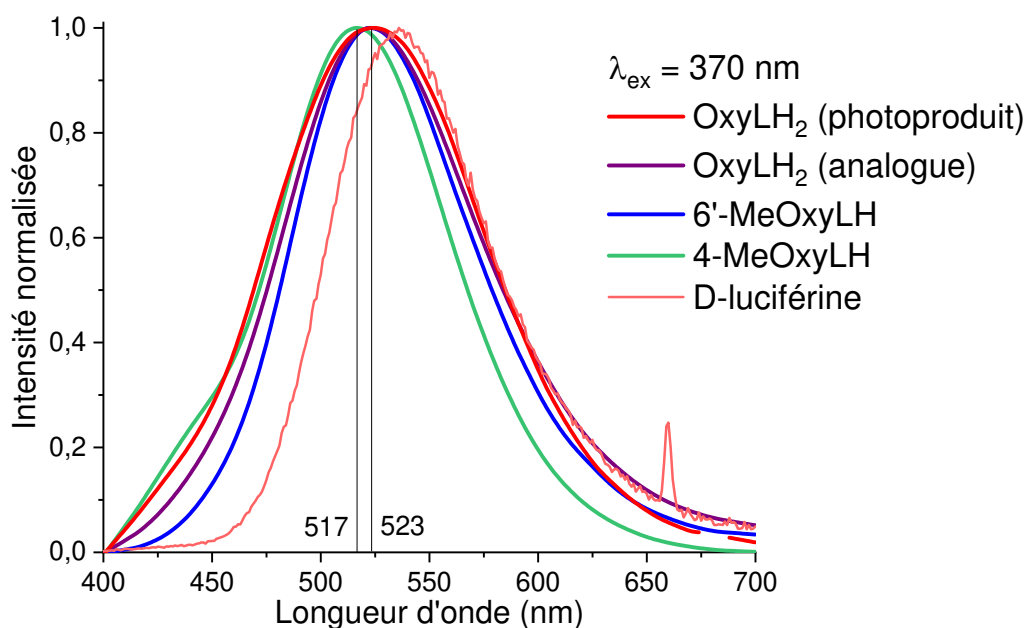


Figure 80 : Spectres d'émission de l'oxyLH₂, photoproduit de la réaction (courbe rouge) et d'autre dérivés en complexe avec la protéine, ainsi que la d-luciférine (courbe rose) à pH 7,4 et à $\lambda_{ex} = 370$ nm

Les spectres d'émission sont tracés sur la Figure 80, à la longueur d'onde d'excitation 370 nm. Le maximum d'émission du dérivé 4-MeOxyLH est 517 nm, et correspond à l'émission de la

forme phénolate-énol dans la protéine. De plus, un épaulement est observé autour de 440 nm, correspondant à la forme phénol-énol. L'émission du dérivé 6'-MeOxyLH est, quant à elle, centrée autour de 523 nm et correspond à l'émission de la forme phénol-énolate. Ce maximum d'émission est aussi retrouvé pour le dérivé l'oxyLH₂ synthétisé ainsi que l'oxyLH₂ formée à partir de la réaction de bioluminescence. En revanche, l'émission du photoproduit semble aussi contenir toutes les espèces observées avec les différents analogues. Il contient l'épaulement autour de 440 nm (phénol-énol), et recouvre les deux maximums d'émission à 517 nm (phénolate-énol) et à 523 nm (espèce phénol-énolate). Le spectre semble aussi s'élargir pour les longueurs d'onde supérieures à 523 nm, cela pourrait s'expliquer par la présence de la d-luciférine non-consommée et encore présente en solution aqueuse. En effet, la molécule a une absorbance positive à 370 nm et son émission se situe à 530 nm. De plus, lorsque la longueur d'onde d'excitation est décalée à 430 nm en dehors des bandes d'absorption de la d-luciférine, cet élargissement n'est plus présent (Figure 81), et cette fois-ci les courbes d'émission des deux oxyLH₂ s'ajustent à celle du dérivé 6'-MeOxyLH et certifient la présence de la forme phénol-énolate. La présence de la d-luciférine observée avec les spectres d'émission consolide l'hypothèse faite sur les spectres d'absorption de l'oxyLH₂ (photoproduit) pour expliquer l'épaulement retrouvé autour de 350 nm. Ce dernier est donc probablement dû à la présence de la d-luciférine non-consommée au cours de la réaction enzymatique.

L'utilisation de la longueur d'onde d'excitation à 510 nm permet d'exciter spécifiquement la forme phénolate-kéto. A cette longueur d'onde d'excitation, un signal est observé seulement pour l'oxyLH₂ formée à partir de la réaction de bioluminescence. Cette émission qui est associée à la forme phénolate-kéto présente un maximum d'émission centré à 568 nm en bon accord avec les calculs théoriques réalisés par nos partenaires (565 nm, résultats non-publiés).

Le spectre de bioluminescence, centré à 558 nm, n'est obtenu à partir d'aucun spectre d'émission d'analogues, ni avec l'oxyLH₂ formée à partir de la réaction de bioluminescence. Bien qu'il soit très proche du signal associé à la forme phénolate-kéto, nous ne pouvons pas affirmer avec certitude que la bioluminescence est produite par cette espèce. Si nous considérons qu'une autre espèce participe au mécanisme de bioluminescence, celle-ci se convertit certainement en une autre espèce à l'état fondamental. En revanche, si la bioluminescence provient bien de la forme phénolate-kéto, comme le prédisent la plupart des

études théoriques, une tautomérisation a lieu à l'état fondamental car la forme phénolate-kéto est largement minoritaire par rapport à la forme phénol-énolate.

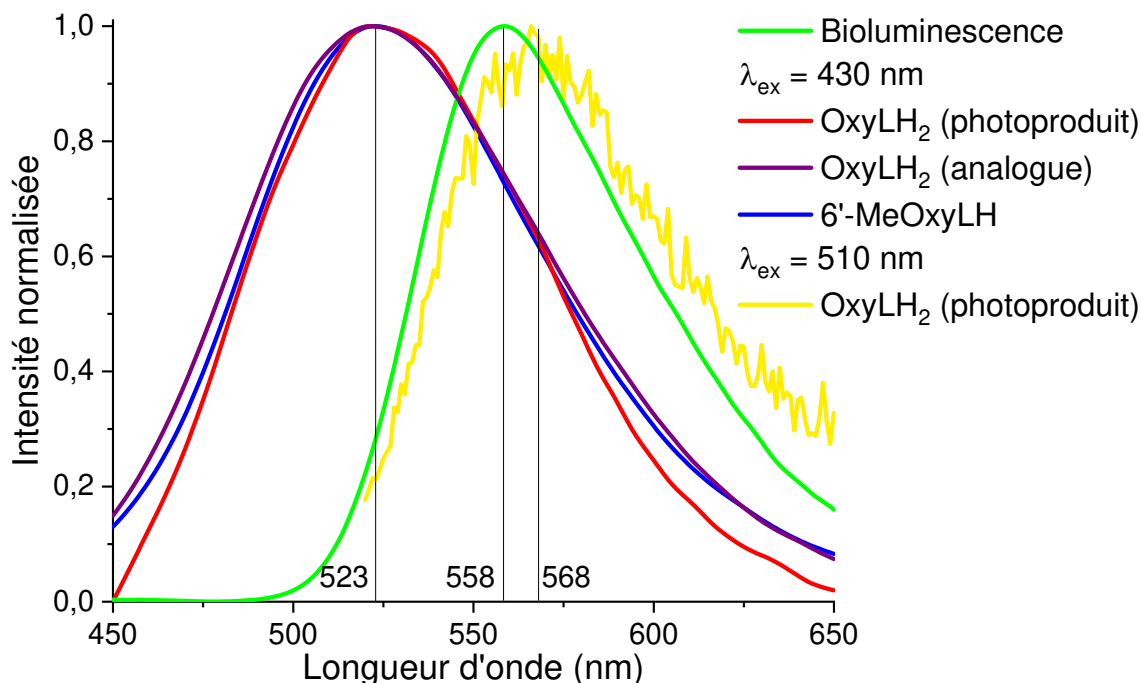


Figure 81 : Spectres d'émission de la bioluminescence (courbe verte) ainsi que de l'oxyLH₂, photoproduit de la réaction à $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$ (courbe rouge) et à $\lambda_{ex} = 510 \text{ nm}$ (courbe jaune) et d'autre dérivés en complexe avec la protéine, à pH 7,4 et à $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$.

Les différents maximums d'absorption et d'émission des dérivés et de l'oxyLH₂ créée à l'intérieur de la poche protéique sont répertoriés dans le Tableau 9. Nous remarquons une différence entre les spectres obtenus pour le photoproduit et le dérivé synthétique. En effet, bien que ce soit la même molécule, en plus d'observer un décalage spectral de l'absorption, la forme phénolate-kéto retrouvée dans le photoproduit n'existe pas pour le dérivé synthétique. Une hypothèse pour expliquer cette différence serait liée à l'orientation adoptée par l'oxyLH₂ dans la cage protéique. En effet, comme l'ont montré certains travaux théoriques (en cours de rédaction), lorsque l'analogue adopte une certaine orientation dans la cage protéique, l'encombrement stérique ne lui permet pas de changer d'orientation. Il serait alors possible que dans un sens, la conversion émol-kéto soit inhibée par les résidus du site actif ce qui pourrait expliquer l'absence de la forme phénolate-kéto pour la molécule synthétisée.

Tableau 9 : Maximums d'absorption et d'émission pour l'oxyLH₂ et ses dérivés en solution aqueuse et en complexe avec la luciférase à pH 7,4.

pH 7,4	Absorption (nm)		Emission (nm) ($\lambda_{ex} = 370$ nm)	
	aqueuse	luciférase	aqueuse	luciférase
4,6'-DMeOxyL	367	374	445	436
6'-Me-5,5-Cpr-OxyL ^a	388	396	525	477
5,5-Cpr-OxyLH ^a	388	405	637	596
4-MeOxyLH	367	381	560 450	517
6'-MeOxyLH	394	387	555	523
OxyLH ₂ analogue	394	387	555	523
OxyLH ₂ photoproduit	/	381	/	517+523 ($\lambda_{ex} = 370$ nm) 568 ($\lambda_{ex} = 510$ nm)

^a dérivés pour lesquels les valeurs avec la luciférase ne sont pas relevées avec certitude.

V.3.2 Mesures de temps de vie

Afin d'identifier les espèces de l'oxyLH₂ présentes dans le cas des complexes synthétiques, des mesures de temps de vie de fluorescence avec les différents analogues sont réalisées. Par rapport aux déclinés mesurés en solution aqueuse, lorsque les composés forment un complexe avec la luciférase nous observons une augmentation des durées de vie de fluorescence qui s'explique par une diminution des contributions non-radiatives. Cette augmentation est également observée lorsque les analogues sont mis en solution dans du DMSO. Bien que le solvant soit aprotique, il est possible d'observer les formes déprotonées des dérivés dans le DMSO, comme le montre la Figure 82.

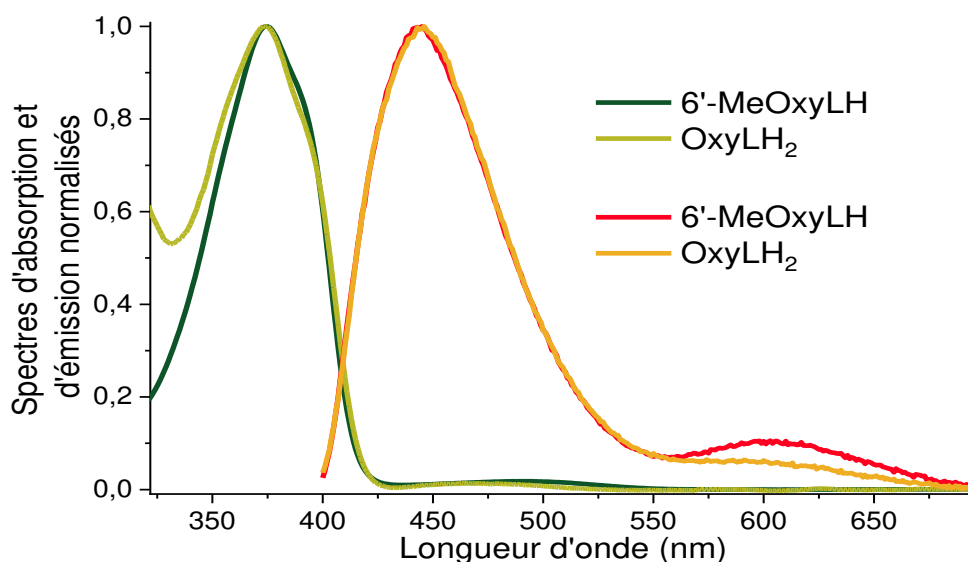


Figure 82 : Spectres d'absorption et d'émission du dérivé 6'-MeOxyLH et OxyLH₂ dans le DMSO

Bien que le solvant ne puisse pas mimer les interactions électrostatiques avec les résidus du site actif de la protéine, nous observons la même tendance (Figure 83). Dans le DMSO, les déclin sont ajustés par un modèle à deux composantes : 3 ns et 10,5 ns. La composante longue est aussi observée dans le déclin de l'oxyLH₂ du 6'-MeOxyLH en présence de protéine et est donc associée à la forme phénol-énolate. La seconde, plus courte est associée à la forme phénolate-kéto, comme en solution aqueuse. Mais celle-ci n'est pas observable en présence de luciférase. Ainsi, lorsque l'oxyLH₂ est remplacée dans la poche protéique avec l'AMP, la conversion de la forme énol à la forme kéto ne semble plus possible.

Nous avons vu, par les mesures de fluorescence, que l'oxyLH₂ pouvait se trouver sous sa forme phénolate-énol et phénol-énolate. Pour vérifier ces hypothèses, le déclin de fluorescence du dérivé 4-MeOxyLH est mesuré afin d'obtenir le temps de vie de la forme phénolate-énol, ainsi que celui de 6'-MeOxyLH pour obtenir celui la forme phénol-énolate. Les résultats sont représentés sur la Figure 84.

Le temps de vie du dérivé 4-MeOxyLH est de 6 ns avec un ESPT ayant lieu sur un temps caractéristique de 430 ps quant à celui du 6'-MeOxyLH il est de 11,7 ns (Tableau 10). Le déclin de fluorescence de l'oxyLH₂ (analogue ou photoproduit) est mesuré avec une constante de temps de 10,6 ns, pour les mêmes longueurs d'onde d'émission et d'excitation que le 6'-MeOxyLH et le 4-MeOxyLH. Cet écart d'environ 1 ns pourrait être lié à la présence des

groupements méthoxy sur la partie benzothiazole du dérivé 6'-MeOxyLH, qui modifieraient les interactions électrostatiques et stériques au sein du site actif.

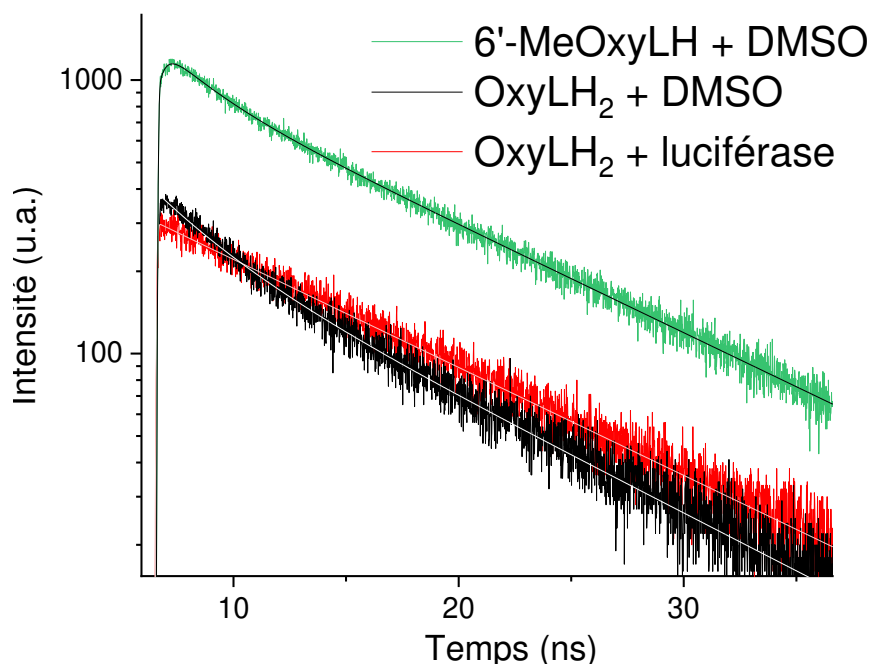


Figure 83 : Déclin de fluorescence à $\lambda_{ex} = 370 \text{ nm}$ de l'oxyLH₂ (analogue) à $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$ dans la protéine et dans le DMSO à $\lambda_{em} = 600 \text{ nm}$

Une différence supplémentaire entre le photoproduit et l'analogue (oxyLH₂) apparaît dans les déclins de fluorescence. En effet, dans le cas du photoproduit nous détectons une composante plus courte de 6 ns pour l'oxyLH₂. Nous avons dans un premier temps attribué cette constante à l'espèce phénolate-énol. En effet, pour la longueur d'onde d'excitation de 370 nm, les spectres d'émission des oxyLH₂ se superposent avec celui du 4-MeOxyLH (forme phénolate-énol) qui présente une durée de vie de 6 ns (Figure 84). En revanche, cette constante de temps n'est pas retrouvée pour l'oxyLH₂ (analogue) qui présente un déclin purement mono-exponentiel et ce quelle que soit la longueur d'onde d'excitation ou d'émission. De plus, la cinétique de l'ESPT mesurée avec le dérivé 4-MeOxyLH (430 ps) n'est pas observée pour l'oxyLH₂ (photoproduit) et pourrait donc être inférieure à 50 ps, limite de résolution de l'expérience de TCSPC. Ces deux différences nous amènent à formuler une autre hypothèse quant à l'origine de cette constante de temps. Les déclins de fluorescence mesurés pour la d-luciférine en solution aqueuse ont un caractère mono-exponentiel avec une durée de vie de 5 ns. Il est parfaitement possible d'ajuster le déclin de fluorescence du photoproduit avec la constante de temps de 6 ns (pour la forme phénolate-énol) ou de 5 ns (pour la d-luciférine), on obtient alors un χ^2 de l'ordre de 1 qui ne permet pas de conclure. Ainsi, la constante de

temps courte observée pour le photoproduit est soit associée à la forme phénolate-énol, soit à la d-luciférine non-consommée par la réaction enzymatique.

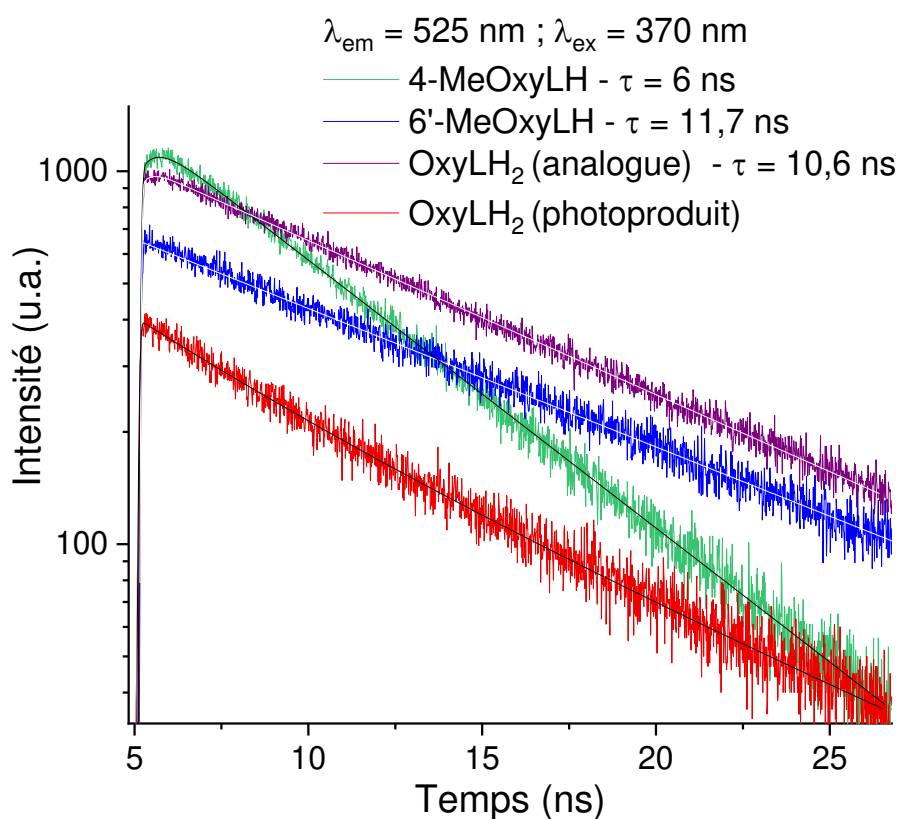


Figure 84 : Déclins de fluorescence de l'oxyLH₂, photoproduit de la réaction (courbe rouge) et d'autres dérivés en complexe avec la protéine, à pH 7,4 et à $\lambda_{ex} = 370 \text{ nm}$

Nous avons également observé une émission centrée autour de 568 nm lorsque la longueur d'onde d'excitation est de 510 nm, une mesure de TCSPC est réalisée dans ces conditions (Figure 85). L'ajustement des données par une fonction multi-exponentielle fait ressortir deux constantes de temps : 0,37 ns et 7 ns. Etant donné que les dérivés mimant les formes phénol-kéto et phénolate-kéto ne peuvent pas être utilisés pour caractériser leurs propriétés en présence de protéine, nous n'avons pas de données à comparer pour interpréter ces constantes de temps. Les seules conclusions sont que ces constantes ne proviennent pas des formes énols (protonées ou non) car nous n'avons pas observé ces constantes de temps avec les quatre autres dérivés.

Les différents déclins de fluorescence des dérivés et de l'oxyLH₂ (photoproduit) sont répertoriés dans le Tableau 10 et le Tableau 11, respectivement. A l'issue de cette analyse, des incertitudes subsistent encore sur les formes de l'oxyLH₂ présentes à l'intérieur du

complexe lorsque celui est formé par la réaction de bioluminescence. Néanmoins un résultat ressort de cette analyse : la forme phénolate-kéto n'est probablement pas la seule à contribuer à l'émission du complexe bioluminescent.

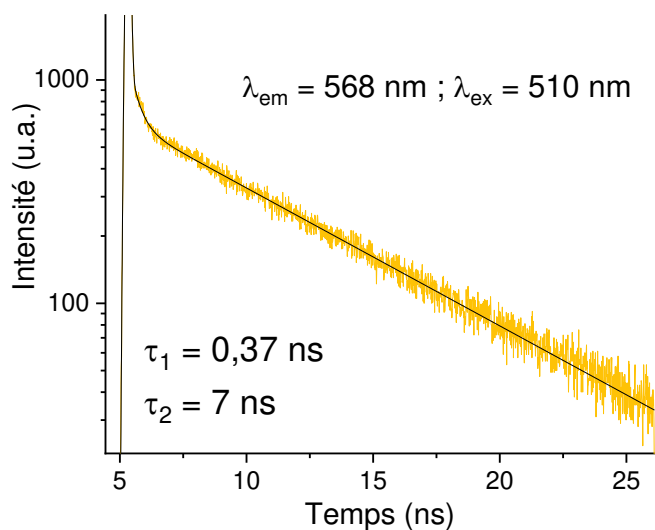


Figure 85 : déclin de fluorescence de l'oxyLH₂ (photoproduit) à $\lambda_{ex} = 510 \text{ nm}$ et à $\lambda_{em} = 568 \text{ nm}$

Tableau 10 : temps de vie des dérivés en solution aqueuse puis en présence de la luciférase à pH 7,4

pH 7,4	Temps de vie (ns)	
	aqueuse	luciférase
4,6'-DMeOxyL	3,05	3,6
6'-Me-5,5-Cpr-OxyL ^a	0,930	0,930 4,08
5,5-Cpr-OxyLH ^a	0,62	0.62 5.1
4-MeOxyLH	0.21 4.88	0,43 (-17) 6 (83)
6'-MeOxyLH	0,68 7,9	11,7
OxyLH ₂	0,62 7,9	0,1 (10) 10,6 (90)
D-luciférine	5	/

Tableau 11 : temps de vie de l'OxyLH₂ (photoproduit) à l'intérieur de la poche protéique

OxyLH ₂ (photoproduit)	Tau (ns)
$\lambda_{ex} = 370 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$	5 (42) 10,7 (58)
$\lambda_{ex} = 510 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 568 \text{ nm}$	0,37 (50) 7 (50)

V.3.3 Spectroscopie pompe-sonde

Des mesures de spectroscopie pompe sonde ont été réalisées avec l'oxyLH₂ remplacée dans la luciférase en présence d'AMP et l'oxyLH₂ créée à partir de la bioluminescence. Malheureusement, l'échantillon contenant le photoproduit a agrégé au cours de l'acquisition et les résultats obtenus ne sont pas interprétables. Quant aux résultats obtenus avec l'oxyLH₂ (analogue) ils sont représentés sur la Figure 86.

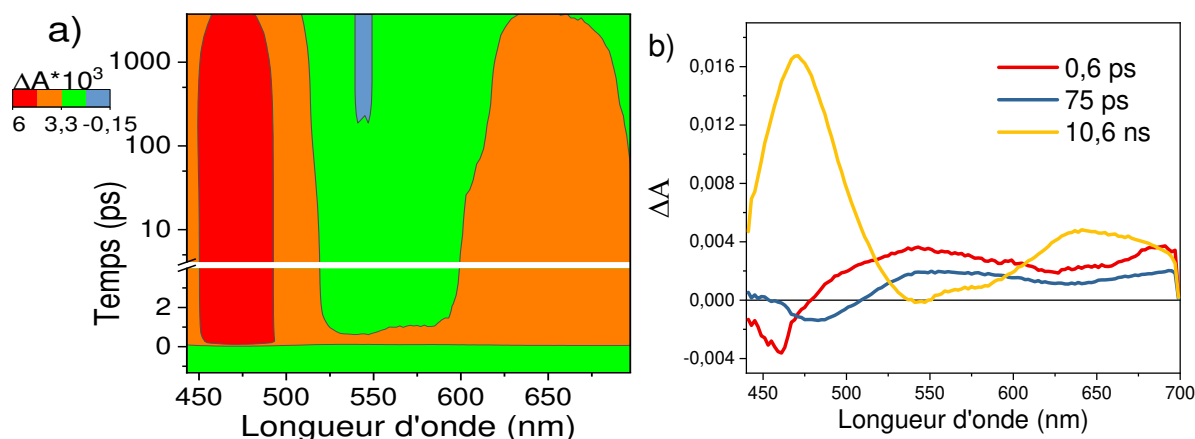


Figure 86 : résultats de la spectroscopie pompe-sonde de l'oxyLH₂ remplacée dans son microenvironnement au sein de la luciférase

Le signal ΔA présente une première ESA à 475 nm qui apparaissait pour quasiment toutes les espèces en solution aqueuse, excepté la forme phénolate-kéto. Une deuxième ESA apparaît à 650 nm. En solution aqueuse, cette ESA était centrée autour de 700 nm et était associée à la forme phénol-énol ou phénolate-énolate. Enfin, une faible SE se distingue autour de 540 nm. Les DAS associés à cette mesure sont représentés sur la Figure 86b). La courbe jaune décrit les déclin des trois contributions (l'ESA à 475 nm, la SE à 540 nm et l'ESA à 650 nm) qui ont lieu sur une échelle de temps de 10.6 ns. Cette constante a été mesurée par TCSPC et a été bloquée pour l'analyse globale des résultats pompe-sonde. La constante de temps courte, 0.6 ps correspond à la relaxation vibrationnelle de la molécule et/ou à la solvation. Le DAS associé à la constante de temps de 75 ps correspond à une croissance de la SE à 540 nm ainsi qu'à un déclin d'une ESA centrée autour de 700 nm. En effet, à cette longueur d'onde nous pouvons distinguer la superposition de deux ESA (Figure 86a), une première qui débute à 600 nm et qui s'étend au-delà de 700 nm. Cette dernière est retrouvée en solution aqueuse avec le dérivé 4,6'-DMeOxyl et est associée à la forme phénol-énol et semble décliner rapidement, et une seconde moins large, entre 625 nm et 675 nm qui persiste jusqu'à la fin de l'acquisition. On

peut donc associer cette constante de temps (75 ps) à l'apparition de la forme phénol-énolate (SE) ainsi qu'à la disparition de la forme phénol-énol (ESA), elle caractérise donc la cinétique de l'ESPT. Cette dernière est également observée dans les expériences TCSPC mais la résolution temporelle de notre expérience ne nous a pas permis de la mesurer précisément (temps de montée d'environ 100 ps).

V.4 Conclusion

Ce chapitre nous aura permis d'appréhender un peu mieux le mécanisme de bioluminescence de la luciole.

Après avoir produit et purifiée la luciférase, nous avons pu reproduire la réaction de bioluminescence avec la d-luciférine et l'ATP. L'oxyLH₂ étant alors créée dans le site actif de la luciférase, nous avons pu en étudier toutes ses propriétés par des mesures à l'état stationnaire mais également résolues en temps. Ensuite, nous avons reformé les complexes entre la luciférase et nos dérivés en présence d'AMP. Nous avons dans un premier temps démontré l'importance du rôle joué par l'AMP qui favorise la liaison du dérivé à la luciférase. Les expériences réalisées avec les mutants ponctuels pour lesquels l'entrée dans le site actif est bloquée ont conforté l'hypothèse selon laquelle les dérivées se lient bien au sein de la poche protéique.

Nous avons alors pu comparer les propriétés des complexes reformés avec l'AMP et celles du photoproduit généré par la réaction de bioluminescence. Dans un premier temps nous avons pu constater que la longueur d'onde où se situe le maximum d'intensité de la bioluminescence, bien qu'il soit proche de l'émission de la forme phénolate-kéto, n'est plus observé lorsque nous excitons le photoproduit. Cela peut s'expliquer par le fait que des réactions ont lieu à l'état fondamental (conversions intra ou intermoléculaires). Dans ces conditions, le photoproduit serait présent principalement sous sa forme phénol-énol à l'état fondamental et l'émission de fluorescence proviendrait de la forme phénol-énolate.

Finalement, nous avons constaté que l'oxyLH₂ (photoproduit) et l'oxyLH₂ (analogue) ne possédaient pas les mêmes propriétés. En effet, les spectres d'émission pouvaient se différencier par un épaulement autour de 530 nm pour le photoproduit, ainsi qu'une constante de 5 ns dans les déclins de fluorescence. Nous avons attribué ces différences aux

contributions de la d-luciférine qui ne serait pas consommée et donc encore présente en solution en fin de réaction enzymatique. En revanche, un changement de la longueur d'onde maximale d'absorption ne peut pas s'expliquer par la présence de la d-luciférine. Une hypothèse permettant d'expliquer ce décalage serait liée à l'orientation de l'analogue au sein du site actif qui favoriserait la déprotonation sur la partie énol plutôt que sur la partie phénol. Cette hypothèse est confortée par les mesures d'absorbance pour lesquelles nous observons un maximum d'absorption de l'oxyLH₂ (analogue) identique à celui du dérivé 6'-MeOxyLH, contrairement à l'oxyLH₂ (photoproduit) qui présente un maximum similaire à celui du dérivé 4-MeOxyLH.

Partie VI

Conclusions et Perspectives

VI.1 Conclusion générale

Depuis plusieurs années le mécanisme associé à la bioluminescence de la luciole est au cœur d'un vaste débat. L'oxyluciférine, photoproduit de la réaction qui peut exister sous six formes différentes, a fait naître une interrogation sur la nature de l'espèce produisant la bioluminescence. Pour contribuer à ce débat, nous avons tout d'abord commencé par étudier l'oxyluciférine en solution aqueuse. En utilisant des dérivés synthétiques, qui imitent chacun une forme spécifique de l'oxyluciférine, ainsi que des mesures de spectroscopie résolue en temps nous avons pu suivre la dynamique des transferts de proton à l'état excité et reconstruire entièrement le cycle de photoluminescence de l'oxyluciférine en solution aqueuse (Schéma 14). Nous avons démontré l'existence d'une conversion de la forme phénol-kéto vers la forme phénolate-kéto sur une échelle de temps de l'ordre de 20 ps, un ESPT de la forme phénol-énol vers la phénol-énolate (15 ps), ainsi qu'une conversion kéto → énol à l'état excité sur une échelle de temps de 60 ps.

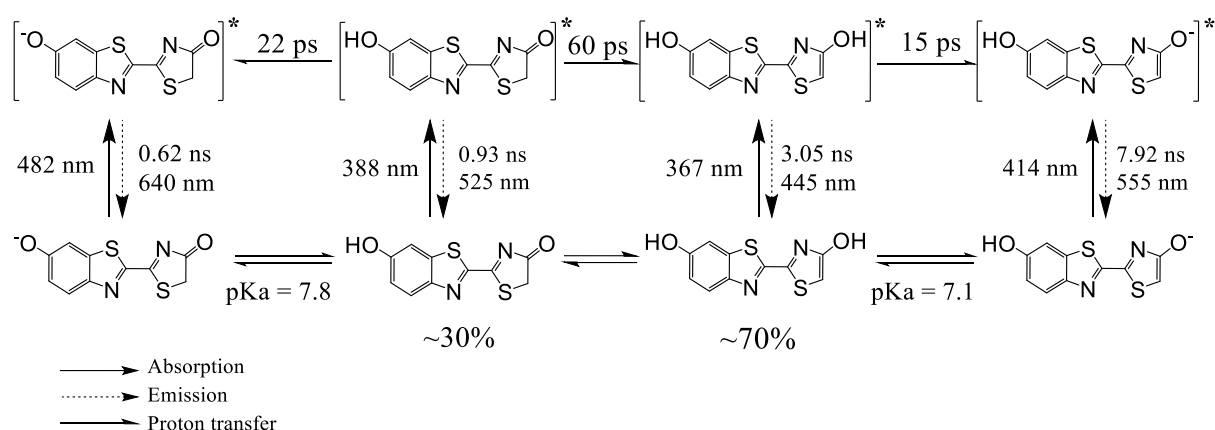


Schéma 14 : cycle de photoluminescence de l'oxyLH₂ en solution aqueuse

L'étude de l'oxyluciférine en solution aqueuse a été utile pour mieux nous familiariser avec le système bioluminescent mais dans la nature, le photoproduit est créé et émet à l'intérieur de la luciférase en présence d'AMP, qui assure la liaison entre la molécule et la protéine. Afin d'analyser la bioluminescence, nous avons remplacé l'oxyluciférine dans son environnement naturel. Nous avons alors entrepris deux types d'expériences : reproduire la bioluminescence à partir de la d-luciférine ou remplacer l'analogue oxyLH₂ à l'intérieur de la luciférase en présence d'AMP. Dans le premier cas, nous avons pu observer les caractéristiques du photoproduit et nous avons constaté que le spectre de bioluminescence ne pouvait plus être reproduit en excitant le photoproduit revenu à l'état fondamental. Cela peut être expliqué par

des conversions chimiques à l'état fondamental, comme des conversions intra ou intermoléculaires qui transforment l'espèce qui émet la bioluminescence en une autre espèce chimique.

Pour la seconde approche, qui consiste à recréer un complexe synthétique, il est nécessaire de s'assurer de la bonne formation de ce dernier. L'anisotropie de fluorescence à l'état stationnaire ou résolue en temps nous a permis de constater que nos dérivés se lient à la protéine en présence d'AMP et de connaître la quantité de luciférase à utiliser pour s'assurer que les contributions provenant de la proportion non liée soient négligeables (excepté le 6'-Me-5,5-Cpr-OxyL ou 5,5-Cpr-OxyLH). De plus, nous avons produit deux mutants de la luciférase pour lesquels l'entrée du site actif est bloqué. Les résultats de l'anisotropie de fluorescence n'ont montré aucune liaison, ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle les analogues se lieraient bien à la protéine au sein du site actif. Nous avons observé deux différences fondamentales par rapport aux résultats en solution aqueuse. Premièrement, un léger décalage vers les longueurs d'onde plus élevées dans les spectres d'absorption, ainsi qu'un décalage important de l'émission vers les longueurs d'onde bleues qui provient de la polarité du microenvironnement et des interactions électrostatiques entre le dérivé et les résidus ou l'AMP qui l'entourent. Enfin une augmentation du temps de vie de fluorescence a été observée et peut être expliquée par la rigidité de l'environnement qui limite la désexcitation par voie non radiative. L'utilisation de nos dérivés a également permis de montrer que le photoproduit oxyLH₂ serait présent principalement sous sa forme phénol-énol à l'état fondamental, la fluorescence proviendrait alors de la forme phénol-énolate (Figure 87).

Enfin, nos expériences ont montré une limite quant à l'utilisation des analogues pour mimer les formes naturelles de l'oxyluciférine. En effet, les résultats obtenus pour le complexe reformé avec l'analogue et le photoproduit présentent quelques différences comme l'ont montré les spectres d'absorption. Nous avons alors émis l'hypothèse que les analogues pouvaient s'introduire dans le mauvais sens à l'intérieur du site actif et ainsi favoriser une déprotonation sur une partie de la molécule plutôt que sur l'autre.

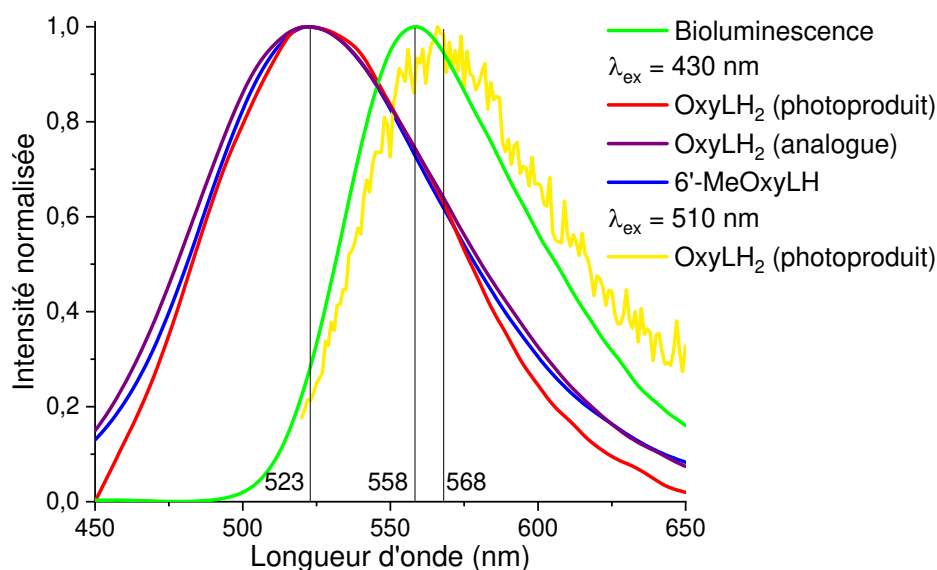


Figure 87 : Spectres d'émission de la bioluminescence (courbe verte) ainsi que de l'oxyLH₂, photoproduit de la réaction à $\lambda_{ex} = 340$ nm (courbe rouge) et à $\lambda_{ex} = 510$ nm (courbe jaune) et d'autre dérivés en complexe avec la protéine, à pH 7,4 et à $\lambda_{ex} = 340$ nm

VI.2 Perspectives

Afin d'obtenir des informations sur l'orientation prise par l'analogue dans la cavité, il faudrait étudier par cristallographie aux rayons X, les cristaux des complexes reformés avec la luciférase, les dérivés et l'AMP. Cette méthode nous informerait sur la position de l'oxyLH₂ ou du dérivé dans la luciférase et pourrait, de plus, répondre à une deuxième interrogation qui porte sur la nature des espèces de l'oxyluciférine présentes dans la poche protéique.

Une autre possibilité serait d'utiliser de l'ATP ou de la d-luciférine photoactivable. En effet, en utilisant une longueur d'onde d'excitation qui active la molécule, il serait possible de synchroniser la réaction de bioluminescence et d'utiliser les mesures résolues en temps pour identifier les espèces participant au mécanisme d'émission. A la suite de cette expérience, plusieurs constantes de temps peuvent ressortir, celles associées aux espèces de l'oxyluciférine créées à la suite de la réaction chimique. Néanmoins, nous détecterions également la contribution de la d-luciférine. En effet, la longueur d'onde permettant la photoactivation (ATP et d-luciférine, 360 nm) coïncide avec la bande d'absorption de la d-luciférine. Après avoir identifié cette composante, il sera alors possible d'identifier les contributions des espèces de l'oxyluciférine participant au mécanisme de bioluminescence, avec les autres constantes de temps observées.

Une troisième expérience utilisant la microfluidique pourrait aussi présenter un intérêt pour déterminer la nature des espèces de l'oxyluciférine présentes dans la poche protéique. Cette expérience consisterait à générer des gouttelettes contenant la d-luciférine photoactivable, la luciférase, l'ATP et les ions magnésium. Après la formation de la gouttelette, la bioluminescence est déclenchée par une impulsion photoactivant la d-luciférine, les déclin de fluorescence seront collectés alors au cours de la propagation des gouttes afin de suivre et d'identifier les espèces créées au cours de la réaction.

Ces trois expériences pourraient ainsi permettre de clore le débat concernant la nature de l'émetteur de la bioluminescence chez *photinus pyralis*.

Le dernier chapitre de la thèse décrit les résultats obtenus principalement à pH neutre (7.4) or, le spectre de bioluminescence varie en fonction du pH (Figure 88). Comme nous ne pouvons pas reproduire cette dépendance au pH en remplaçant les dérivés dans la protéine, comme le prouve la Figure 79 dans le chapitre V.3.1, il serait intéressant de reproduire la bioluminescence en utilisant une gamme de pH variant de 5 à 11 pour reproduire les expériences réalisées dans le chapitre V. il s'agirait alors de mesurer les spectres d'absorption et d'émission du complexe formé ainsi que les déclin de fluorescence. Des études théoriques démontrent que la luciférase se trouve dans une conformation ouverte à pH acide. Son site actif deviendrait alors plus polaire avec l'entrée de molécules d'eau. Si tel est le cas, les mesures de déclin de la bioluminescence par TCSPC devraient correspondre aux déclin mesurés en solution aqueuse et seraient donc plus faciles à interpréter pour identifier l'espèce émettrice.

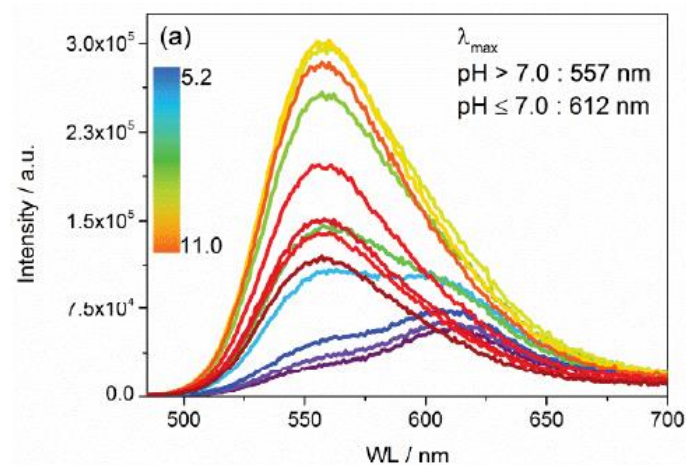


Figure 88 : Spectres de bioluminescence réalisés avec la d-luciférine, la luciférase et l'ATP pour un pH allant de 5.2 à 11

La bioluminescence offre de nombreuses applications. Elle est, par exemple, de plus en plus utilisée dans des technologies biomédicales mais également pour de l'imagerie aussi bien in vitro que in vivo. Il reste aujourd'hui une application, qui bien que tout indiquée, ne propose pas encore de solution reposant sur la bioluminescence : l'éclairage. En effet, qu'il soit privé ou public l'éclairage est aujourd'hui très gourmand en énergie et dans une économie visant à contrôler sa dépendance énergétique, la bioluminescence semble être la candidate idéale pour l'élaboration d'une solution respectueuse de l'environnement. C'est d'ailleurs cette dernière qui est privilégiée par plusieurs start-ups et PME comme par exemple la start-up Strasbourgeoise Woodlight (<https://woodlight.fr/>), dont l'ambition est de produire des végétaux intégrant la réaction enzymatique retrouvée chez la luciole, leur permettant ainsi de produire de la lumière.

La bioluminescence est un phénomène fascinant que nous a offert la nature et la maîtrise et la compréhension que nous avons acquise au travers des recherches récentes, nous permettent d'envisager des exploitations à grande échelle. Ce qui, il y a encore quelques années était de la science-fiction, est aujourd'hui de la science et la porte ainsi ouverte laisse entrevoir de magnifiques opportunités.

Annexes

Article II

Simulation and Analysis of the
Spectroscopic Properties of Oxyluciferin
and Its Analogues in Water

Simulation and Analysis of the Spectroscopic Properties of Oxyluciferin and Its Analogues in Water

Cristina García-Iriepa,^{*,†,‡} Pauline Gosset,^{‡,§} Romain Berraud-Pache,^{†,‡} Madjid Zemmouche,[†] Grégory Taupier,[‡] Kokou Dodzi Dorkenoo,[‡] Pascal Didier,[§] Jérémie Léonard,[‡] Nicolas Ferré,^{||} and Isabelle Navizet^{*,†,‡}

[†]Université Paris-Est, Laboratoire Modélisation et Simulation Multi Échelle, MSME, UMR 8208 CNRS, UPEM, 5 bd Descartes, 77454 Marne-la-Vallée, France

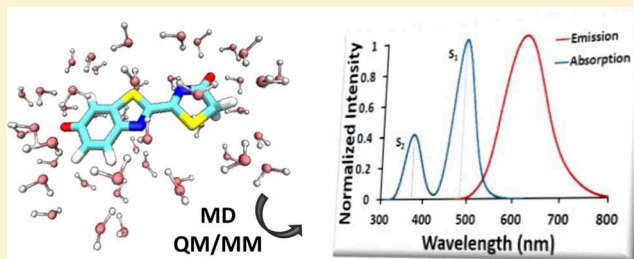
[‡]Université de Strasbourg, CNRS, Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg UMR 7504 and Labex NIE, 67034 Strasbourg, France

[§]Université de Strasbourg, CNRS, Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies UMR 7021, 67034 Strasbourg, France

^{||}Aix-Marseille Univ, CNRS, Institut de Chimie Radicale, 13013 Marseille, France

Supporting Information

ABSTRACT: Firefly bioluminescence is a quite efficient process largely used for numerous applications. However, some fundamental photochemical properties of the light emitter are still to be analyzed. Indeed, the light emitter, oxyluciferin, can be in six different forms due to interexchange reactions. In this work, we present the simulation of the absorption and emission spectra of the possible natural oxyluciferin forms in water and some of their analogues considering both the solvent/oxyluciferin interactions and the dynamical effects by using MD simulations and QM/MM methods. On the one hand, the absorption band shapes have been rationalized by analyzing the electronic nature of the transitions involved. On the other hand, the simulated and experimental emission spectra have been compared. In this case, an ultrafast excited state proton transfer (ESPT) occurs in oxyluciferin and its analogues, which impairs the detection of the emission from the protonated state by steady-state fluorescence spectroscopy. Transient absorption spectroscopy was used to evidence this ultrafast ESPT and rationalize the comparison between simulated and experimental steady-state emission spectra. Finally, this work shows the suitability of the studied oxyluciferin analogues to mimic the corresponding natural forms in water solution, as an elegant way to block the desired interexchange reactions allowing the study of each oxyluciferin form separately.



INTRODUCTION

Bioluminescence is the process responsible for flashes of bright light coming out from a wide variety of living organisms. It results from the conversion of chemical energy into visible light, catalyzed by a protein. This natural phenomenon is present in several organisms such as bacteria, beetles, squid, worms, fungi, algae, and jellyfish.^{1,2} In the last decades, the study of the bioluminescence mechanism as well as the spectroscopic properties of the emitter species have attracted considerable interest among scientists. In this regard, the bioluminescent processes of the jellyfish (aequorin/green fluorescent protein system)^{3–6} and the one of fireflies^{7,8} are the most studied up to now.

In particular, its large number of applications has motivated the extensive study of firefly bioluminescence. For instance, firefly bioluminescence has been used for rapid analysis of bacterial contamination,⁹ in vivo bioluminescence imaging,^{10,11} multiple gene expression and regulation,^{12,13} monitoring of cell dynamics,^{14,15} and drug screening¹⁶ among others. Nowadays, the general bioluminescent mechanism in fireflies is well

accepted and consists of an enzymatic multistep oxidation.^{17–19}

First, an enzyme called luciferase binds a substrate known as luciferin and catalyzes the formation of luciferyl adenosine monophosphate. Afterward, the emitter species, so-called oxyluciferin (OxyLH₂), is generated in the first singlet-excited state by decomposition of a cyclic peroxide and release of CO₂. Finally, oxyluciferin decays to the ground state by emitting light in the visible spectral window.

It is remarkable that for fireflies, the color emission can vary from yellow-green to red depending on diverse factors such as pH,²⁰ the presence of bivalent metal ions,²¹ temperature,²² luciferase mutations,²³ and luciferin structure modifications.^{24,25} However, despite the large number of studies focused on understanding the origin of the emission color modulation, this mechanism remains unsolved.^{26–28} Indeed, the fact that oxyluciferin can exist in six different chemical forms further complicates the rationalization of the emission color modulation.

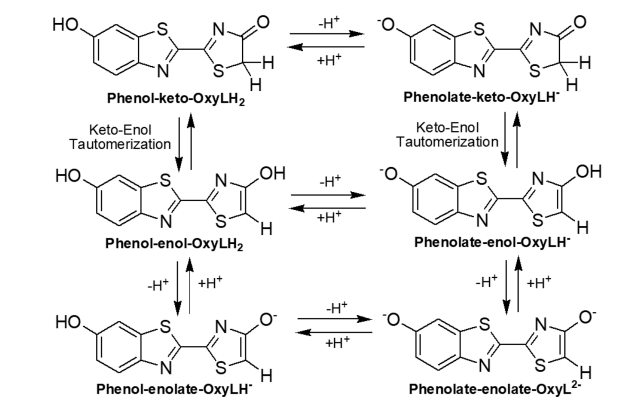
Received: December 12, 2017

Published: March 6, 2018



lation. These six different chemical forms of oxyluciferin rise from a triple equilibrium of phenol and/or enol deprotonation together with a keto/enol tautomerization (Chart 1), these equilibria being sensitive to the solvent, pH, or interactions with bases.^{29–31}

Chart 1. Chemical Equilibria Leading to the Six Possible Oxyluciferin Forms

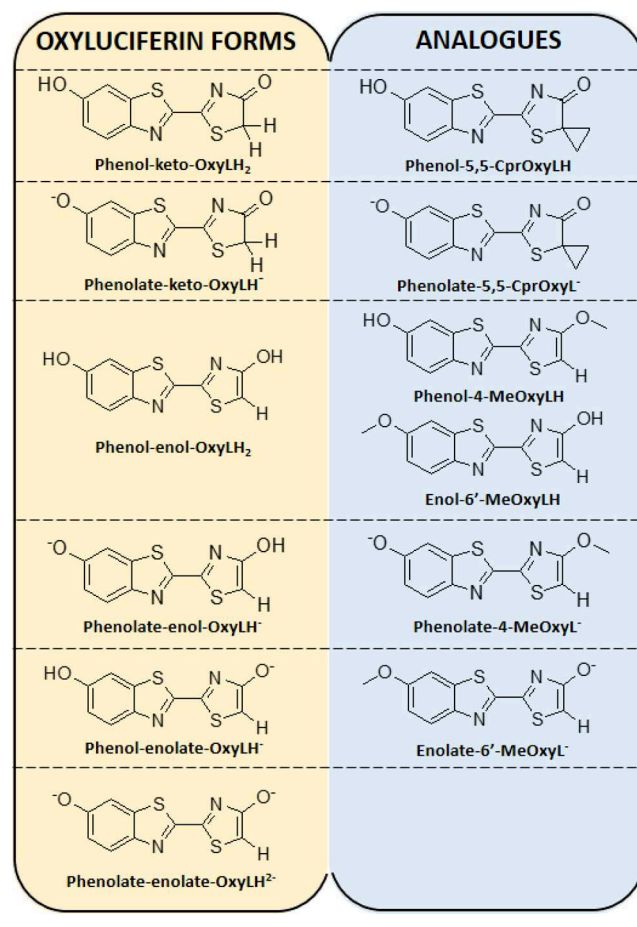


In order to simplify this scenario, some studies have proposed novel derivatives as an elegant way to block one or more of these chemical equilibria. For instance, the 5,5-dimethyloxyluciferin analogue has been used to block the keto/enol tautomerization,^{27,31–33} but it is unstable upon photo-excitation.³⁴ For this reason, the 5,5-spirocyclopropyloxyluciferin (5,5-CprOxyLH in Chart 2) analogue has emerged as a best candidate to mimic the keto form of oxyluciferin.^{34,35} Moreover, other oxyluciferin derivatives have been proposed in order to block the deprotonation/protonation equilibrium of the phenol and/or enol groups such as the 4-methoxyoxyluciferin (4-MeOxyLH in Chart 2) or 6'-methoxyoxyluciferin (6'-MeOxyLH in Chart 2).^{27,33–35} This strategy enables the experimental study of the individual chemical forms of oxyluciferin that can otherwise not be isolated.

A different approach that can be followed to investigate the photochemical properties of the less stable oxyluciferin forms is to perform computational studies. In the past, computational studies have provided essential information about the bioluminescence mechanism of fireflies,^{36–38} emission color modulation,^{28,39} and relative stability of the different oxyluciferin forms⁴⁰ as well as their pK_a values.^{41,42} This way, computational studies have become essential to learn more about this system.

Here, we propose a simple approach to simulate the absorption and emission spectra of all possible oxyluciferin forms and some analogues in explicit water solution. For this aim, molecular dynamics have been performed to consider the explicit water molecules, and QM/MM methods have been used to compute the excitation and emission energies. More precisely, this work presents three novelties compared to the computational studies reported up to now. First, the absorption and emission spectra have been simulated considering both the dynamical effect and the explicit interactions between the solvent and oxyluciferin by means of molecular dynamics. So far, the excitation and emission energies of some natural oxyluciferin forms have been computed in the gas phase,^{36,43} considering the solvent implicitly with the polarizable continuum model (PCM),^{44,45} by microsolvation including 11

Chart 2. Chemical Structures of the Six Possible Chemical Forms of Oxyluciferin and the Corresponding Analogues under Study



water molecules⁴⁶ or using a canonical ensemble of hydration structures obtained from first-principles molecular dynamics.⁴⁷

Second, this work presents for the first time a detailed analysis of the electronic nature of the vertical transitions not only to the first singlet-excited state but also to upper-lying excited states. This data is important to rationalize the shape of the absorption spectra, in some cases structured, and to reveal hidden transitions from an experimental point of view (e.g., embedded within a more intense and broad band). Third, a quite extensive study of the spectral properties of oxyluciferin and its analogues is reported as it covers a total of 12 derivatives: the six possible chemical forms of oxyluciferin and three analogues, considering the protonated and the deprotonated forms (Chart 2). Moreover, a comparative study of oxyluciferin and its analogues is presented to validate if they can be used to mimic natural oxyluciferin in water solution. It is remarkable that in all cases, a good agreement between the experimental and simulated spectra has been found using the strategy proposed in this study.

METHODS

Computational Methods. Classical dynamic simulations have been performed with Amber14⁴⁸ in order to obtain a statistical number of snapshots to perform Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) calculations to simulate the absorption (emission) spectra considering explicit water molecules. To this end, the structure of the compound

optimized in the ground (excited) state has been selected as the starting point for MD simulations. The bond distances, angles, dihedrals, and charges parameters for the oxyluciferin derivatives (geometry and charges of the minima in the ground and first excited states) have been derived from the QM calculations in gas phase and used as the starting point. The compound has been solvated with TIP3P water molecules⁴⁹ within an octahedral box, ensuring a solvent shell of at least 10 Å around the molecule, corresponding to around 900 water molecules. Then, the system has been minimized, followed by a heating step from 100 to 300 K in 20 ps. Afterward, a production run of 10 ns has been performed with a 2 fs time step, under NPT conditions (300 K and 1 atm) and using periodic boundary conditions. The pressure and temperature were assured by the Berendsen algorithm.⁵⁰

Then, 100 snapshots have been extracted, and the excitation (emission) energies were computed at the QM/MM level of theory. At least 7 electronic excited states have been considered for the excitation energy calculation to simulate the spectra up to 300 nm. In all cases, the absorption and emission spectra have been simulated as a convolution of the excitation and emission energies of 100 snapshots, using a full-width at half-maximum of 0.2 eV. 100 snapshots were enough to achieve the spectral shape convergence. Moreover, for oxyluciferin anions this convergence has been further checked by simulating the spectra considering 1000 snapshots (see Figure S2 and S7). The parameters have been updated as many times as needed by optimizing the system (derivative and explicit water molecules) at the QM/MM level to reach the spectral shape convergence of the simulated spectra. In particular, for each set of parameters, a corresponding 10 ns MD was performed, 100 snapshots were extracted, and the QM/MM absorption (emission) spectra were simulated. New parameters were adjusted from the QM/MM calculation, and the process was performed with the new set of parameters until reaching the spectral shape convergence between the previous and the next simulated spectra (Figure S1). In order to further check the suitability of the oxyluciferin parameters, we have compared the absorption and emission spectra simulated with and without optimizing oxyluciferin at the QM/MM level of theory. In all cases, similar spectra have been obtained (Figures S3 and S6).

For the QM/MM calculations, a nonpolarizable scheme has been used. In particular, the water molecules were treated at the MM level (not polarizable model), whereas the oxyluciferin derivative was included in the QM region and its excitation (emission) energy computed at the B3LYP^{51–53}/6-311G(2d,p) level of theory. This functional and basis set have been selected as they have been previously reported to be suitable for this chromophore.^{47,54–56} Calculations in gas phase have been performed using Gaussian09⁵⁷ and the same functional and basis set used for the QM/MM calculations. The QM/MM calculations have been carried out using a QM/MM coupling scheme⁵⁸ between Gaussian09⁵⁷ and Tinker.⁵⁹ In particular, the interaction between the QM charge density (electrons and nuclei) and the external electrostatic potential of the MM part was computed by the electrostatic potential fitted (ESPF) method.⁵⁸ The microiterations technique⁶⁰ was used to converge the MM subsystem geometry for every QM minimization step.

Experimental Methods. The model analogues 4-MeOxylH and 6'-MeOxylH were synthesized as previously reported.³³ The synthesis and characterization of the new spirocyclic analogues 5,5-CprOxylH will be reported else-

where. Stock solutions of all compounds were prepared in spectroscopic grade DMSO (Sigma-Aldrich) and stored in several aliquots at -20°C to minimize the freeze-thaw cycle. They were further diluted 1000-fold to a final concentration of about a few μM in aqueous buffer with different pH. The buffers were prepared by diluting a 1 M stock solution in deionized, Millipore-purified water (18.2 M Ω). Buffered stock solutions were prepared as follows: 75 mM NaCl/20 mM KH_2PO_4 /0.2 mM MgCl_2 for $\text{pH} \leq 7.0$ and 75 mM NaCl/25 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS)/0.2 mM MgCl_2 for $\text{pH} > 7.0$. The buffer was separated into several fractions, and their pHs were adjusted by 250 mM HCl or by 250 mM NaOH separately at 20°C . Separate buffers at different pHs were used in all spectral measurements.

Absorption spectra were recorded with a Cary-4000 spectrometer (Agilent Technologies). Steady-state fluorescence spectra were recorded with Fluoromax 4 spectrofluorometer (Horiba Jobin Yvon) with 2 nm excitation/emission slit and corrected for the instrumental response characteristics.

The femtosecond source is a regenerative amplifier that delivers 120 fs pulses at 800 nm with a repetition rate of 5 kHz ("Spitfire", Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA). We generated 400 nm, 150 fs pump pulse by second harmonic generation in a BBO crystal. We obtained supercontinuum probe pulse (430 to 700 nm) by self-phase modulation in a 2 mm thick sapphire crystal. Pump and probe beams were focused by the same 38.1 mm focal length off-axis parabolic mirror on a 1 mm thick quartz cuvette containing the sample. To excite a fresh volume of the sample for each pump pulse, the cuvette was moved continuously. Time and spectrally resolved differential transmission $\Delta T/T(\tau, \lambda)$ of the probe as a function of the pump-probe delay τ and the wavelength λ was measured in a standard pump-probe configuration. The spectra were obtained by dispersing the transmitted reference and probe beams in a spectrometer followed by a CCD detector (Roper, Trenton, NJ, USA). The analogues concentration was adjusted to obtain an optical density of 0.1 per mm at 400 nm ($\sim 50 \mu\text{M}$) to optimize the signal-to-noise ratio of the differential transmission of the probe.

■ RESULTS AND DISCUSSION

Here is presented a detailed analysis of the photochemical and photophysical properties of all the possible chemical forms of oxyluciferin and their analogues in explicit water (Chart 2). For this study we have selected the following oxyluciferin analogues: i) 5,5-CprOxylH which presents a cyclopropyl substituent in the thiazole ring to block the keto-enol tautomerization; ii) 4-MeOxylH which has a methoxy group in the enol moiety of the thiazole ring to block both the keto-enol tautomerization and enol deprotonation; and iii) 6'-MeOxylH that presents a methoxy group in the phenol moiety to block the phenol deprotonation. In particular, this section is divided into three parts: i) Analysis of the possible hydrogen bond interactions between each oxyluciferin derivative and the explicit water molecules by MD simulations; ii) Absorption spectrum simulation, comparison with the experimental data, and analysis of the involved electronic transitions; and iii) Simulation of the emission spectrum and comparison with the experimental steady-state and time-resolved data to get insight into the chemical nature of the emitter specie.

Water/Oxyluciferin Hydrogen Bond Interactions.

Before starting with the study of the photochemical properties of oxyluciferin and its analogues it is important to analyze the

hydrogen bond patterning between the water molecules and each solute due to its known influence on both the absorption and emission spectra.^{40,47,61}

Starting with the natural forms of oxyluciferin, we have calculated the average number of hydrogen bond interactions between the water molecules and the heteroatoms (O10, O11, N3, N3' in Figure 1) along the MD trajectory (Table S1). By

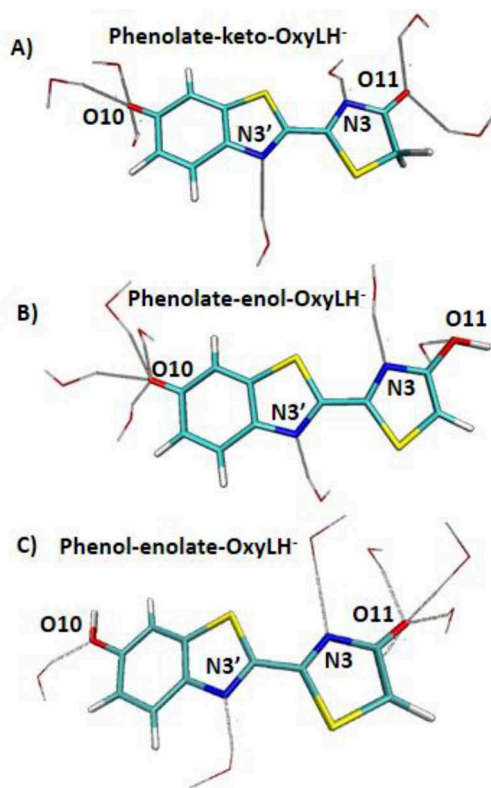


Figure 1. Graphical representation of the hydrogen bond pattern for selected MD snapshots of A) phenolate-keto-OxyLH⁻, B) phenolate-enol-OxyLH⁻, and C) phenol-enolate-OxyLH⁻. Atom labeling for oxyluciferin heteroatoms is depicted.

analyzing the data, general patterns can be set: *i*) for both the phenolate (Figure 1A and B) and enolate (Figure 1C) derivatives, the deprotonated oxygen leads three to four hydrogen bonds with three/four different water molecules, *ii*) regarding the keto group (Figure 1A), between one and two water molecules interact with the oxygen atom, both in the phenol and in the phenolate derivatives, whereas *iii*) the interaction of only one water molecule with the oxygen of the enol group (Figure 1B) or phenol group (Figure 1C) has been observed during half of the simulation time and *iv*) the two nitrogen atoms of the structure present in general one hydrogen bond interaction in less than half of the simulation time. Moreover, we have observed that during the simulation time there is a continuous interchange of the water molecules involved in the hydrogen bond interactions with the ones of the solvation sphere, as could be expected at room temperature.

Similar hydrogen bond patterns have been found for the oxyluciferin analogues (Table S1). That is, neither the methyl nor the cyclopropyl substituents have a great influence on the hydrogen bond interactions. Just a slight difference was observed for phenolate-4-MeOxyL⁻ and enolate-6'-MeOxyL⁻ compared to their respective natural forms phenolate-enol-

OxyLH⁻ and phenol-enolate-OxyLH⁻. In these cases, the average number of hydrogen bonds found for the oxygen of the methoxy group (≈ 1 for phenolate-4-MeOxyL⁻ and 1–2 for enolate-6'-MeOxyL⁻) is a bit larger than the one found for the corresponding natural forms (0–1 for phenolate-enol-OxyLH⁻ and phenol-enolate-OxyLH⁻), probably due to the inductive effect of the methyl group that increases the electronic charge of the oxygen atom.

Absorption Spectra Simulation. Before starting the analysis of the absorption spectra and the electronic nature of the optically bright electronic transitions, it is essential to validate the procedure used to simulate the absorption spectra (see the Methods section for details). To this end, a comparison between the simulated and the experimental absorption spectra of the oxyluciferin analogues has been performed. We selected oxyluciferin analogues instead of the natural forms for this purpose as it is impossible to record experimentally the absorption spectra of each natural form in water due to the low thermal stability of some of them and, certainly, a mixture of different forms in equilibrium (Chart 1).^{33,34} Hence, we simulated the absorption spectra for the protonated and deprotonated forms of 5,5-CprOxyLH, 4-MeOxyLH, and 6'-MeOxyLH. By analyzing Figure 2, we can conclude that a good overall agreement between the simulated and experimental spectra has been achieved in terms of both the shape and the maximum absorption wavelengths. This almost quantitative match found could be partially originated

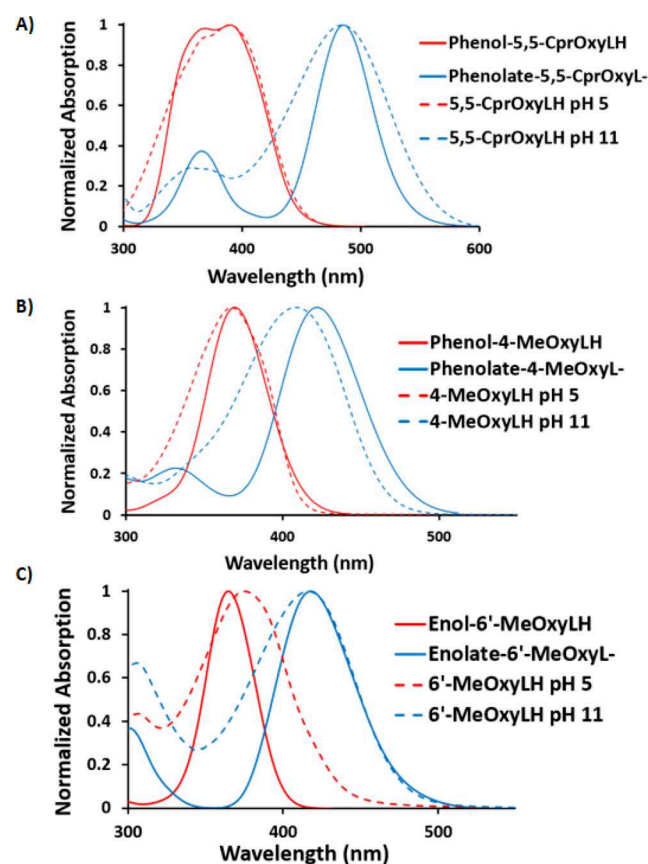


Figure 2. Normalized simulated absorption spectra (thick lines) of both the protonated (red lines) and deprotonated (blue lines) forms and the normalized experimental absorption spectra (dotted lines) recorded at pH 5 (red lines) and pH 11 (blue lines) for A) 5,5-CprOxyLH, B) 4-MeOxyLH, and C) 6'-MeOxyLH.

from an error compensation between the selected functional, B3LYP, and the fact that “vertical” TD-DFT values are used for comparison (i.e., not considering the vibronic coupling). The B3LYP functional usually underestimates the excitation energies of transitions with significant charge transfer (CT) character. However, this effect can be mitigated in our case due to the small size of the molecule and the not so large CT character of the transition. Moreover, a clear limitation of the presented procedure is that the vibronic coupling is not considered for the spectra simulation which in some cases has a significant effect,^{62,63} but the low-lying vibronic couplings are somehow considered by the MD simulations performed in this study.

After the validation procedure, we have performed a systematic comparison between the simulated absorption spectra of the oxyluciferin analogues and their corresponding natural forms to give insight into their suitability to mimic oxyluciferin in water. In general, almost overlapped absorption spectra have been obtained (Figure S4). Only for phenol-5,5-CprOxyLH, the structured shape of the dominating absorption band is slightly different from the one simulated for phenol-keto-OxyLH₂, but both share the same specificity compared to other chemical forms: absorption bands are significantly broader and more structured. Hence, we can conclude that the electronic structures and absorption spectra of the proposed oxyluciferin analogues resemble to a great extent the ones of the natural forms in water. Moreover, we show that the introduction of the methyl and cyclopropyl groups does not modify the shape nor the maximum absorption wavelength of the absorption spectra.

In addition to the overall spectral shapes, we may analyze the electronic nature of the corresponding optically bright transitions. Starting with the keto derivatives, both phenol-keto-OxyLH₂ and phenol-5,5-CprOxyLH present one of the broadest absorption bands (red line in Figure 2A). The computational data predict that the first three singlet excited states (S_1 , S_2 , and S_3) are optically bright and close in energy such that the dominating low-energy absorption band actually corresponds to three different electronic transitions, explaining the width and structured shape of both the experimental and simulated spectra (Figure 3A and Figure S4C). To analyze the electronic nature of these three transitions, we have investigated the molecular orbitals involved in each one. The electronic nature of the S_0 - S_1 transition corresponds to the previously reported transition responsible for oxyluciferin emission^{28,36,64,65} for which the electron density of the HOMO is mainly located on the benzothiazole moiety and the LUMO on the thiazolone part. The S_0 - S_2 transition is similar to the S_0 - S_1 transition, but part of the electron density of the bonding orbital (HOMO-1) is located on the sulfur atom of the benzothiazole moiety. Moreover, S_1 and S_2 are close in energy, and their electronic nature results in a mixture of HOMO to LUMO and HOMO-1 to LUMO monoexcitations. This fact can explain their similar absorption intensities. To get insight into this finding, the transition dipole moment strengths of the S_0 - S_1 and S_0 - S_2 transitions have been computed, finding values of ca. 5 and 3 au respectively. This result is in line with the similar intensities found for these transitions in the simulated and experimental spectra (see the Supporting Information and Figure S9). On the other hand, the S_0 - S_3 transition is the most different one as it involves a local rearrangement of the electron density on the thiazolone part (Figure 3A). A similar picture has been observed for phenol-keto-OxyLH₂ (Figure S5D).

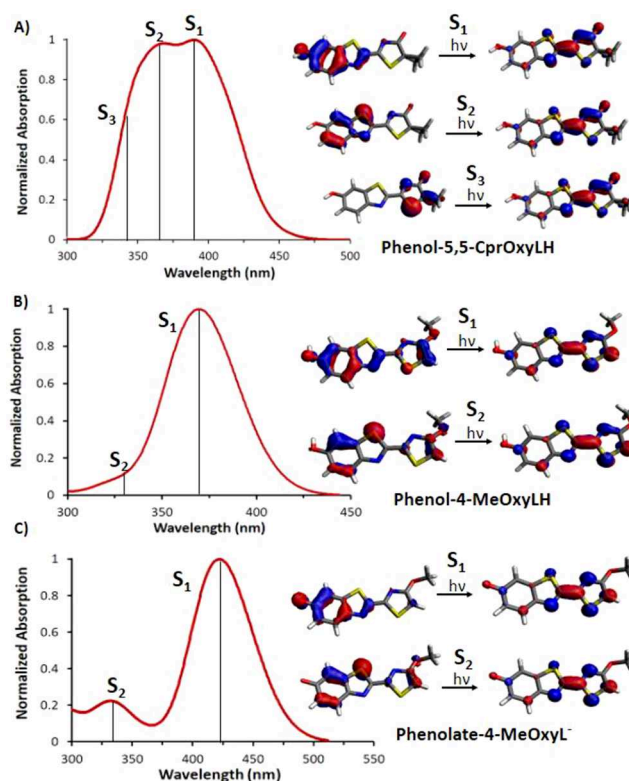


Figure 3. Simulated absorption spectra and molecular orbitals involved in each optically bright electronic transition of A) phenol-5,5-CprOxyLH, B) phenol-4-MeOxyLH, and C) phenolate-4-MeOxyL⁻.

In contrast, a simpler picture is observed for the corresponding deprotonated compounds phenolate-keto-OxyLH⁻ and phenolate-5,5-CprOxyL⁻: the S_0 - S_1 and S_0 - S_2 transitions lead to two well-separated absorption bands (Figures 2A, S4D, and S5A). Their electronic nature is similar to the ones found for the corresponding protonated derivatives.

A similar study has been done for phenol-enol-OxyLH₂ and its two corresponding analogues phenol-4-MeOxyLH and enol-6'-MeOxyLH. Experimentally, the low-energy absorption band is similarly broad (red lines in Figure 2B and 2C), but in this case no strong shoulders are observed like for the phenol-keto derivatives, although the band is slightly asymmetric. We predict that this band mostly corresponds to the S_0 - S_1 transition, while the less intense S_0 - S_2 transition is hidden in the tail (Figures 3B, S4A, S4E, and S5B). In this case, the transition dipole moment strength found for S_2 is 1 order of magnitude smaller than the one of S_1 (0.5 vs 6 au), in contrast to the similar values found for these two transitions for the phenol-keto derivatives, as both states are quite far in energy and their electronic nature is not mixed (Figure S9). Hence, we can state that the general picture found for the phenol-enol derivatives is simpler than the one of the phenol-keto ones, since the S_1 and S_2 states are energetically more distant and S_2 is not so intense. The electronic nature of S_0 - S_1 and S_0 - S_2 transitions is similar to the ones found for the phenol-keto derivatives.

Regarding the deprotonated forms, the picture of phenolate-enol-OxyLH⁻ and phenolate-4-MeOxyL⁻ is very similar to the one found for their protonated forms: a broad experimental band with the S_0 - S_2 transition hidden in the tail (Figures 2B, 3C, and S4B). For phenol-enolate-OxyLH⁻ and enolate-6'-MeOxyL⁻ the S_1 and S_2 states are even more distant in energy

yielding to two well-separated bands (Figures 2C, S4F, and S5C).

Hence, thanks to the computation of the vertical transitions we have been able to rationalize the different absorption band shapes found for oxyluciferin natural forms and its analogues and, what is more, reveal hidden transitions which were experimentally embedded in high intense bands. Moreover, we have shown that the studied oxyluciferin analogues present almost identical absorption spectra and electronic nature of the vertical transitions than the corresponding natural forms in water (Figure 4A and B). It should be recalled that for the

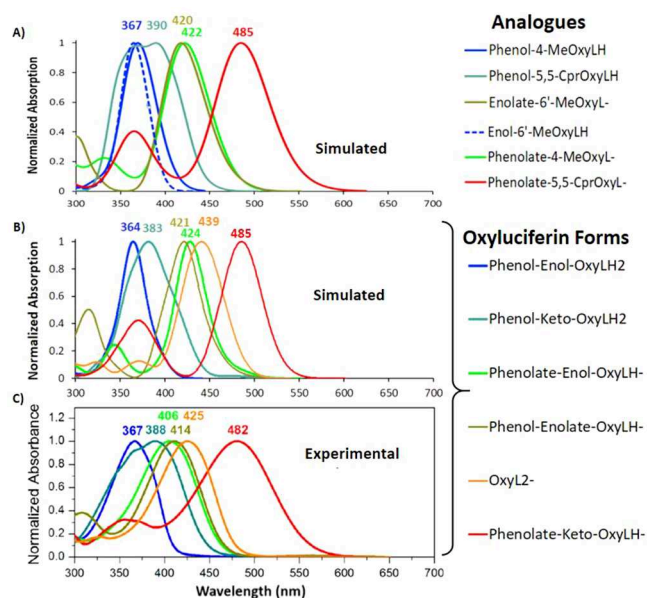


Figure 4. Summary graph of the simulated absorption spectra considering explicit water molecules of A) oxyluciferin analogues and B) natural oxyluciferin forms. C) Absorption spectra obtained by the MCR-ALS procedure³⁴ for the natural oxyluciferin forms (Reprinted from ref 34. Copyright 2017 American Chemical Society).

analogues under study, a quite good agreement between experimental and simulated absorption spectra has been achieved (Figure 2). In addition, the simulated absorption spectra of oxyluciferin natural forms in water are in line with the reported ones obtained by applying the multivariate curve resolution–alternating least-squares (MCR-ALS) procedure (Figure 4B and C).³⁴

Emission Spectra Simulation. In this section we analyzed and rationalized the shape of the emission spectra of the three selected oxyluciferin analogues and their corresponding natural forms (Chart 2) in both their protonated and deprotonated forms. With this aim, a combined experimental and computational study has been performed.

Starting with the experimental results, the steady-state emission spectra recorded at pH 5 and 11 are quite similar for all oxyluciferin analogues (dotted red and blue lines in Figure 5). In particular for 5,5-CprOxylH and 6'-MeOxylH the spectra at the two pH overlap, while for 4-MeOxylH only an additional weak, higher-energy band arises at pH 5 (Figure 5B). This is due to the fact that the protonated species are very short-lived in the excited state due to Excited State Proton Transfer (ESPT), and hence, essentially only the emission of the deprotonated forms is observed by steady-state fluorescence, even if the protonated form is excited. To evidence

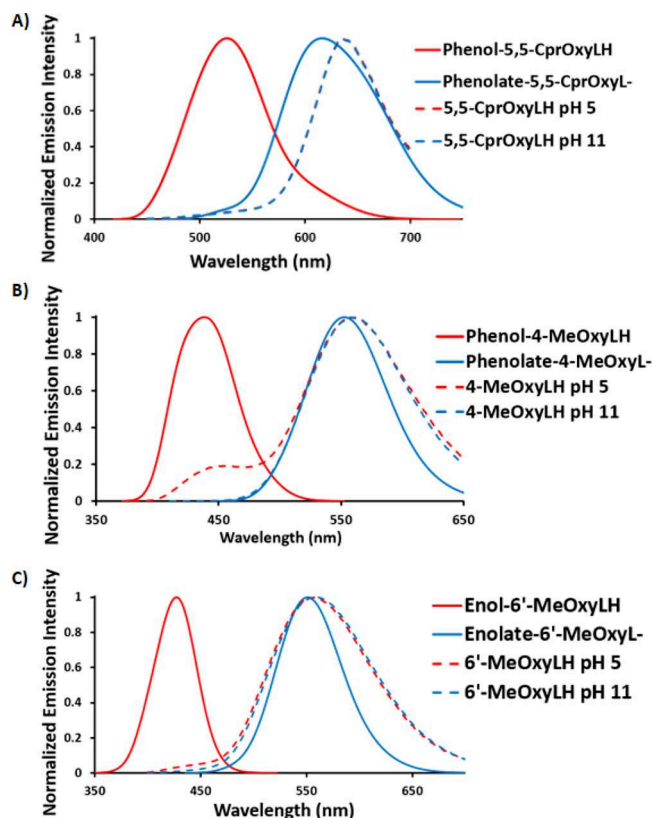


Figure 5. Normalized simulated emission spectra (thick lines) of both the protonated (red lines) and deprotonated (blue lines) forms and the normalized experimental emission spectra (dotted lines) recorded at pH 5 (red lines) and pH 11 (blue lines) of A) 5,5-CprOxylH, B) 4-MeOxylH, and C) 6'-MeOxylH.

the ultrafast ESPT, femtosecond pump–probe measurements were performed on 5,5-CprOxylH in two different pH conditions: the compound was dissolved in aqueous buffer at pH = 5, where it is protonated, and at pH = 11, where it is deprotonated ($pK_a \sim 7.8$).

To extract the characteristic time associated with the proton transfer we analyzed the positive contribution associated with the stimulated emission (SE) of the protonated and the deprotonated forms for both pH. At pH = 11, the compound is already deprotonated in the ground state. The positive band around 610 nm rapidly red shifts to 640 nm that is the fluorescence emission wavelength of the deprotonated compound (see Figure 6). Hence the 640 nm band is attributed to SE from the S_1 state, and its early red shift is attributed to the rapid Stokes shift due to vibrational and/or solvent relaxation (<1 ps), according to the fit of the 640 nm kinetic trace (Figure 6). After this initial rapid Stokes shift, the signal decays with a monoexponential behavior on the 700 ps time scale in excellent agreement with the measured fluorescence lifetime.³⁴ At pH = 5, the early band centered at 525 nm is interpreted as SE, in agreement with the known 525 nm emission of the protonated species.³⁴ This band rapidly decays, while the 640 nm band characterizing the emission of the deprotonated form rises. This spectral evolution is a clear signature of the ESPT. The rise and decay of the 640 and 525 nm bands, respectively, are displayed in Figure 6. Their global fit confirms that both kinetics evolve simultaneously and biexponentially with the same 1.5 and 16.5 ps time constants.

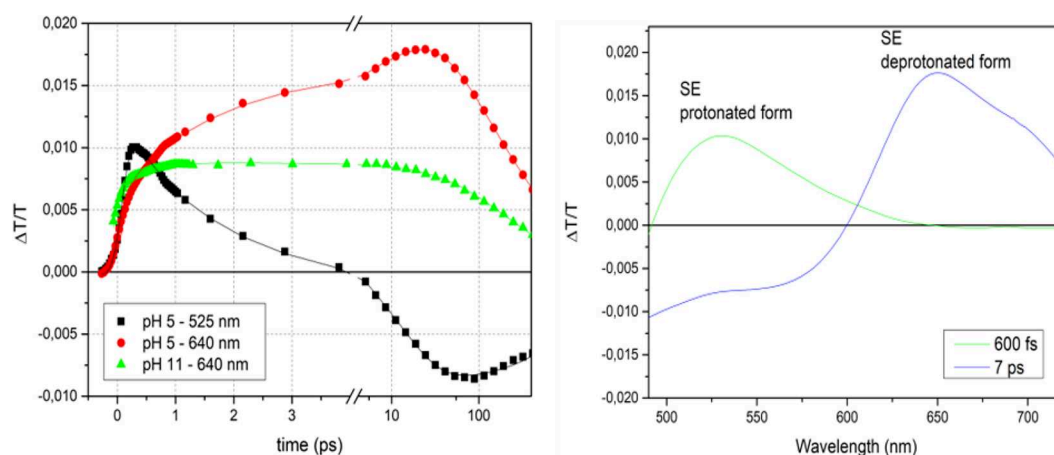


Figure 6. Left panel: Results of a pump–probe experiment performed on S,5-CprOxyLH in water at pH = 11 and pH = 5. Green symbols and line: kinetic trace of the SE at 640 nm for pH = 11 and its fit. Black symbols and line: pH = 5 kinetic traces at 525 nm attributed to the emission of protonated species and its fit. Red symbols and line: pH = 5 kinetic traces at 640 nm attributed to the emission of the deprotonated species and its fit. Right panel: Differential transmission spectra of the probe beam measured at pH 5 for two pump–probe delays.

Finally, after formation of the deprotonated form in the excited state, the latter decays on the same time scale as at pH = 11.

These preliminary results demonstrate that the excited state dynamics of the S,5-CprOxyLH is ruled by a very fast ESPT reaction. For this reason, the emission spectra recorded at pH 5 and 11 by steady-state fluorescence are identical.

Next, we compared the emission wavelengths maxima of the three analogues previously measured by steady-state spectroscopy with the simulated spectra.³⁴ For all the analogues, the simulated spectra of the deprotonated forms match the steady-state fluorescence spectra recorded at pH 11 (thick and dotted blue lines in Figure 5) with maxima (617, 554, and 551 nm for S,5-CprOxyLH, 4-MeOxyLH, and 6'-MeOxyLH, respectively) in good agreement with the values recorded by steady-state fluorescence (640, 560, and 550 nm for S,5-CprOxyLH, 4-MeOxyLH, and 6'-MeOxyLH, respectively).³⁴ Regarding the simulated emission spectra of the protonated forms (thick red lines in Figure 5), they cannot be directly compared, for all compounds, with the steady-state fluorescence spectra recorded at pH 5 due to efficient ESPT, as demonstrated for S,5-CprOxyLH by pump probe experiments. In the case of 4-MeOxyLH, time-correlated single photon counting measurements evidenced a slower ESPT dynamics (240 ps),³⁴ which is slow enough to enable monitoring the steady-state emission from the protonated form (Figure 5B, red dotted line band centered at 450 nm). Moreover, it was possible to experimentally determine the emission maxima of two analogues of the (protonated) phenol-enol and phenol-keto forms (6'-Me-5,5-CprOxyL and 4,6'-DMeOxyL, where no ESPT reaction can occur due to replacement of the labile H atom by a methyl group) at 525 and 445 nm, respectively.³⁴ The simulated emission maxima of S,5-CprOxyLH, 4-MeOxyLH, and 6'-MeOxyLH are obtained at 526, 439, and 430 nm, respectively thus fully in line with the experimental spectra.

Besides, we have also simulated the emission spectra of the six possible forms of oxyluciferin and compared with the ones simulated for the analogues (Figure S8). For both the phenolate-enol and phenolate-keto-OxyLH⁻, the emission spectra are slightly blue-shifted compared to the respective analogues, whereas for phenol-enol-OxyLH₂ it is slightly red-shifted. However, the energy difference between the emission

maxima of these natural forms and their analogues is within the method error (<0.1 eV). For the other derivatives, a quite good agreement has been found. Hence, we can state that all the analogues studied in this work are representative of oxyluciferin in water in terms of the emission wavelengths/energies.

Moreover, we have compared the simulated spectra with the experimental ones of the natural forms. A slight blue-shift was found for the phenolate-keto and phenolate-enol-OxyLH⁻ forms (Figure 7B) compared to the experimental ones reported (Figure 7C). However, the energy differences between the simulated and experimental emission maxima of the natural forms are in all cases less than 0.1 eV, within the method error.

So, thanks to this analysis we have been able to rationalize the emission spectra experimentally recorded for the three analogues at pH 5 and 11, demonstrating an efficient ESPT for

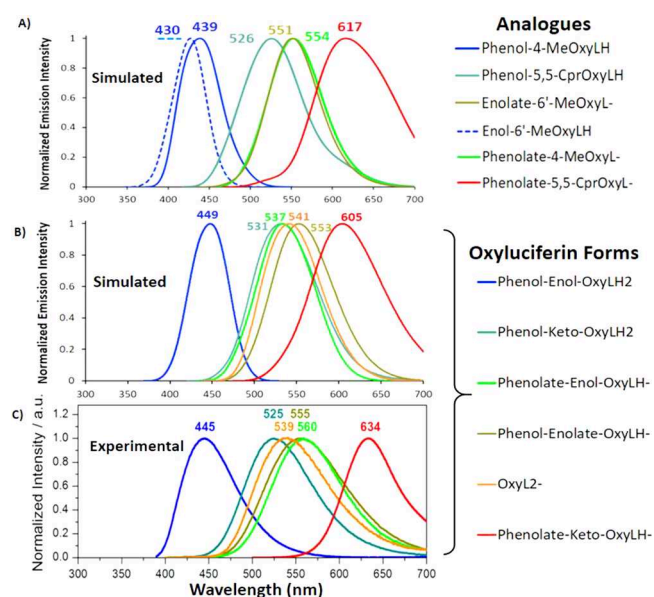


Figure 7. Summary graph of the simulated emission spectra considering explicit water molecules of A) oxyluciferin analogues and B) natural oxyluciferin forms. C) Emission spectra obtained by the MCR-ALS procedure³⁴ of natural oxyluciferin forms (Reprinted from ref 34. Copyright 2017 American Chemical Society).

their protonated forms. Moreover, we have provided by simulation the emission spectra of the protonated forms of 5,5-CprOxyLH and 6'-MeOxyLH, impossible to record by steady-state experiments. Finally, we have shown that the analogues under study are representative of oxyluciferin natural forms in water (Figure 7A and B).

CONCLUSIONS

In this study, we have presented a simple procedure to simulate the absorption and emission spectra of oxyluciferin and their analogues in water solution. It has to be noted that this procedure considers at the same time the interaction of the solute with explicit water molecules and dynamical effects, giving a more realistic picture of the system. In general, a quite good agreement between the simulated and experimental spectra has been obtained hence, independently confirming the MCR-ALS results for oxyluciferin in water.

By analyzing the electronic nature of the vertical transitions, we have found the main difference between phenol-enol and phenol-keto derivatives: the absorption band of the phenol-keto derivatives was found to be structured, since three optically bright excited states are close in energy; whereas for the phenol-enol derivatives an intense band corresponding to the S_0 - S_1 transition has been found with a high-energy tail corresponding to S_0 - S_2 . Moreover, it has been shown the key importance of including the dynamical effect for phenol-keto derivatives to reproduce the structured absorption spectra experimentally found.

Regarding the emission spectra, we have demonstrated an ultrafast ESPT for the neutral phenol-keto form, not time-resolved in our previous work.³⁴ In addition, we report the simulated emission spectra of the protonated forms, being impossible to record them by steady-state experiments.

Finally, thanks to the comparative study of the photochemical properties of the natural oxyluciferin forms and their corresponding analogues presented in this work, we have demonstrated that these analogues can be used to mimic natural oxyluciferin forms, at least in water solution. This will promote future studies focused on rationalizing the emission color modulation in fireflies, as the possible chemical equilibria can be smartly blocked by using these derivatives.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jctc.7b01240.

Computational details, absorption spectrum shape convergence, analysis of hydrogen bond interactions, simulated absorption spectra optimizing the chromophore, simulated absorption spectra of oxyluciferin forms and analogues, analysis of the absorption spectra of oxyluciferin analogues, simulated emission spectra optimizing the chromophore, emission spectrum shape convergence, simulated emission spectra of oxyluciferin forms and analogues, emission oscillator strength, relative absorption intensity for phenol-keto and phenol-enol derivatives (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: cristina.garciairiepa@u-pem.fr.

*E-mail: isabelle.navizet@u-pem.fr.

ORCID

Cristina García-Iriepe: 0000-0002-7577-8242

Romain Berraud-Pache: 0000-0002-3028-3481

Pascal Didier: 0000-0003-2850-9186

Nicolas Ferré: 0000-0002-5583-8834

Isabelle Navizet: 0000-0002-2158-6157

Funding

All authors are grateful to the French Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-BIOLUM ANR-16-CE29-0013). C.G.-I. acknowledges Fundación Ramón Areces for a postdoctoral fellowship.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

- (1) Shimomura, O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*; World Scientific: Singapore, 2012.
- (2) Herring, P. J. *Bioluminescence in Action*; Academic Press: London, New York, 1978.
- (3) Zimmer, M. Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 759–782.
- (4) Tsien, R. Y. The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544.
- (5) Remington, S. J. Green Fluorescent Protein: A Perspective. *Protein Sci.* **2011**, *20*, 1509–1519.
- (6) Baubet, V.; Le Mouellic, H.; Campbell, A. K.; Lucas-Meunier, E.; Fossier, P.; Brûlet, P. Chimeric Green Fluorescent Protein-Aequorin as Bioluminescent Ca²⁺ Reporters at the Single-Cell Level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 7260–7265.
- (7) Fraga, H.; Allue, I.; Bowers, K.; Cobbold, P.; Southworth, T. L.; Hall, M. S.; Pangburn, S. J.; Buck, L. M.; Leach, F. R. Firefly Luminescence: A Historical Perspective and Recent Developments. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 146.
- (8) Kaskova, Z. M.; Tsarkova, A. S.; Yampolsky, I. V. 1001 Lights: Luciferins, Luciferases, Their Mechanisms of Action and Applications in Chemical Analysis, Biology and Medicine. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 6048–6077.
- (9) Griffiths, M. The Role of ATP Bioluminescence in the Food Industry: New Light on Old Problems. *Food Technol.* **1996**, *50*, 62–73.
- (10) Shinde, R.; Perkins, J.; Contag, C. H. Luciferin Derivatives for Enhanced In Vitro and In Vivo Bioluminescence Assays. *Biochemistry* **2006**, *45*, 11103–11112.
- (11) Greer, L. F.; Szalay, A. A. Imaging of Light Emission from the Expression of Luciferases in Living Cells and Organisms: A Review. *Luminescence* **2002**, *17*, 43–74.
- (12) Kricka, L. J. Application of Bioluminescence and Chemiluminescence in Biomedical Sciences. *Methods Enzymol.* **2000**, *305*, 333–345.
- (13) Ohkuma, H.; Abe, K.; Kosaka, Y.; Maeda, M. Detection of Luciferase Having Two Kinds of Luminescent Colour Based on Optical Filter Procedure: Application to an Enzyme Immunoassay. *Luminescence* **2000**, *15*, 21–27.
- (14) Shao, Q.; Jiang, T.; Ren, G.; Cheng, Z.; Xing, B. Photoactivable Bioluminescent Probes for Imaging Luciferase Activity. *Chem. Commun.* **2009**, *27*, 4028.
- (15) Doyle, T. C.; Burns, S. M.; Contag, C. H. In Vivo Bioluminescence Imaging for Integrated Studies of Infection. *Cell. Microbiol.* **2004**, *6*, 303–317.
- (16) Fan, F.; Wood, K. V. Bioluminescent Assays for High-Throughput Screening. *Assay Drug Dev. Technol.* **2007**, *5*, 127–136.
- (17) White, E. H.; Rapaport, E.; Seliger, H. H.; Hopkins, T. A. The Chemi- and Bioluminescence of Firefly Luciferin: An Efficient Chemical Production of Electronically Excited States. *Bioorg. Chem.* **1971**, *1*, 92–122.
- (18) Deluca, M. Firefly Luciferase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **2006**, *44*, 37–68.

- (19) Navizet, I.; Liu, Y.-J.; Ferré, N.; Roca-Sanjuán, D.; Lindh, R. The Chemistry of Bioluminescence: An Analysis of Chemical Functionalities. *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 3064–3076.
- (20) Ando, Y.; Niwa, K.; Yamada, N.; Enomoto, T.; Irie, T.; Kubota, H.; Ohmiya, Y.; Akiyama, H. Firefly Bioluminescence Quantum Yield and Colour Change by pH-Sensitive Green Emission. *Nat. Nat. Photonics* **2008**, *2*, 44–47.
- (21) Wang, Y.; Kubota, H.; Yamada, N.; Irie, T.; Akiyama, H. Quantum Yields and Quantitative Spectra of Firefly Bioluminescence with Various Bivalent Metal Ions. *Photochem. Photobiol.* **2011**, *87*, 846–852.
- (22) Mochizuki, T.; Wang, Y.; Hiyama, M.; Akiyama, H. Robust Red-Emission Spectra and Yields in Firefly Bioluminescence against Temperature Changes. *Appl. Phys. Lett.* **2014**, *104*, 213704.
- (23) Wang, Y.; Akiyama, H.; Terakado, K.; Nakatsu, T. Impact of Site-Directed Mutant Luciferase on Quantitative Green and Orange/red Emission Intensities in Firefly Bioluminescence. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2490.
- (24) Mofford, D. M.; Reddy, G. R.; Miller, S. C. Aminoluciferins Extend Firefly Luciferase Bioluminescence into the Near-Infrared and Can Be Preferred Substrates over D-Luciferin. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 13277–13282.
- (25) Reddy, G. R.; Thompson, W. C.; Miller, S. C. Robust Light Emission from Cyclic Alkylaminoluciferin Substrates for Firefly Luciferase. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13586–13587.
- (26) Hosseinkhani, S. Molecular Enigma of Multicolor Bioluminescence of Firefly Luciferase. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 1167–1182.
- (27) Hirano, T.; Hasumi, Y.; Ohtsuka, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Yamaji, M.; Hashizume, D. Spectroscopic Studies of the Light-Color Modulation Mechanism of Firefly (Beetle) Bioluminescence. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2385–2396.
- (28) Navizet, I.; Liu, Y.-J.; Ferré, N.; Xiao, H.-Y.; Fang, W.-H.; Lindh, R. Color-Tuning Mechanism of Firefly Investigated by Multi-Configurational Perturbation Method. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 706–712.
- (29) Naumov, P.; Kochunnonny, M. Spectral–Structural Effects of the Keto–Enol–Enolate and Phenol–Phenolate Equilibria of Oxyluciferin. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11566–11579.
- (30) Maltsev, O. V.; Nath, N. K.; Naumov, P.; Hintermann, L. Why Is Firefly Oxyluciferin a Notoriously Labile Substance? *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 847–850.
- (31) Naumov, P.; Ozawa, Y.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S. Structure and Spectroscopy of Oxyluciferin, the Light Emitter of the Firefly Bioluminescence. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11590–11605.
- (32) Branchini, B. R.; Murtiashaw, M. H.; Magyar, R. A.; Portier, N. C.; Ruggiero, M. C.; Stroh, J. G. Yellow-Green and Red Firefly Bioluminescence from 5,5-Dimethyloxyluciferin. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2112–2113.
- (33) Rebarz, M.; Kukovec, B.-M.; Maltsev, O. V.; Ruckebusch, C.; Hintermann, L.; Naumov, P.; Sliwa, M. Deciphering the Protonation and Tautomeric Equilibria of Firefly Oxyluciferin by Molecular Engineering and Multivariate Curve Resolution. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3803–3809.
- (34) Ghose, A.; Rebarz, M.; Maltsev, O. V.; Hintermann, L.; Ruckebusch, C.; Fron, E.; Hofkens, J.; Mély, Y.; Naumov, P.; Sliwa, M.; Didier, P. Emission Properties of Oxyluciferin and Its Derivatives in Water: Revealing the Nature of the Emissive Species in Firefly Bioluminescence. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 2638–2649.
- (35) Ghose, A.; Maltsev, O. V.; Humbert, N.; Hintermann, L.; Arntz, Y.; Naumov, P.; Mély, Y.; Didier, P. Oxyluciferin Derivatives: A Toolbox of Environment-Sensitive Fluorescence Probes for Molecular and Cellular Applications. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 1566–1575.
- (36) Orlova, G.; Brovko, L. Y.; Goddard, J. D. Theoretical Study of the Amazing Firefly Bioluminescence: The Formation and Structures of the Light Emitters. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6962–6971.
- (37) Navizet, I.; Roca-Sanjuán, D.; Yue, L.; Liu, Y. J.; Ferré, N.; Lindh, R. Are the Bio- and Chemiluminescence States of the Firefly Oxyluciferin the Same as the Fluorescence State? *Photochem. Photobiol.* **2013**, *89*, 319–325.
- (38) Hiyama, M.; Akiyama, H.; Koga, N. Theoretical Insights into the Effect of pH Values on Oxidation Processes in the Emission of Firefly Luciferin in Aqueous Solution. *Luminescence* **2017**, *32*, 1100–1108.
- (39) Hiyama, M.; Akiyama, H.; Mochizuki, T.; Yamada, K.; Koga, N. Analysis of Photoexcitation Energy Dependence in the Photo-luminescence of Firefly Luciferin. *Photochem. Photobiol.* **2014**, *90*, 820–828.
- (40) Noguchi, Y.; Hiyama, M.; Shiga, M.; Sugino, O.; Akiyama, H. Reverse Stability of Oxyluciferin Isomers in Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 8776–8783.
- (41) Hiyama, M.; Akiyama, H.; Yamada, K.; Koga, N. Theoretical Study of Firefly Luciferin pKa Values-Relative Absorption Intensity in Aqueous Solutions. *Photochem. Photobiol.* **2013**, *89*, 571–578.
- (42) Hiyama, M.; Mochizuki, T.; Akiyama, H.; Koga, N. Analysis of Oxyluciferin Photoluminescence Pathways in Aqueous Solutions. *Photochem. Photobiol.* **2015**, *91*, 74–83.
- (43) Yang, T.; Goddard, J. D. Predictions of the Geometries and Fluorescence Emission Energies of Oxyluciferins. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 4489–4497.
- (44) Hiyama, M.; Noguchi, Y.; Akiyama, H.; Yamada, K.; Koga, N. Vibronic Structures in Absorption and Fluorescence Spectra of Firefly Oxyluciferin in Aqueous Solutions. *Photochem. Photobiol.* **2015**, *91*, 819–827.
- (45) Coccia, E.; Varsano, D.; Guidoni, L. Theoretical S1←S0 Absorption Energies of the Anionic Forms of Oxyluciferin by Variational Monte Carlo and Many-Body Green's Function Theory. *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13*, 4357–4367.
- (46) Falklöf, O.; Durbejj, B. Distinguishing between Keto-Enol and Acid-Base Forms of Firefly Oxyluciferin through Calculation of Excited-State Equilibrium Constants. *J. Comput. Chem.* **2014**, *35*, 2184–2194.
- (47) Hiyama, M.; Shiga, M.; Koga, N.; Sugino, O.; Akiyama, H.; Noguchi, Y. The Effect of Dynamical Fluctuations of Hydration Structures on the Absorption Spectra of Oxyluciferin Anions in an Aqueous Solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 10028–10035.
- (48) Case, D. A.; Babin, V.; Berryman, J. T.; Betz, R. M.; Cai, Q.; Cerutti, D. S.; Cheatham, T. E., III; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Gusarov, S.; Homeyer, N.; Janowski, P.; Kaus, J.; Kolossváry, I.; Kovalenko, A.; Lee, T. S.; LeGrand, S.; Luchko, T.; Luo, R.; Madej, B.; Merz, K. M.; Paesani, F.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Sagui, C.; Salomon-Ferrer, R.; Seabra, G.; Simmerling, C. L.; Smith, R. C.; Swails, J.; Walker, W.; Wang, J.; Wolf, R. M.; Kollman, P. A. *Amber14*; 2014.
- (49) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935.
- (50) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684.
- (51) Becke, A. Becke's Three Parameter Hybrid Method Using the LYP Correlation Functional. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, S648–S652.
- (52) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623–11627.
- (53) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1988**, *37*, 785–789.
- (54) Berraud-Pache, R.; Navizet, I. QM/MM Calculations on a Newly Synthesised Oxyluciferin Substrate: New Insights into the Conformational Effect. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 27460–27467.
- (55) Min, C.-G.; Ren, A.-M.; Guo, J.-F.; Li, Z.-W.; Zou, L.-Y.; Goddard, J. D.; Feng, J.-K. A Time-Dependent Density Functional Theory Investigation on the Origin of Red Chemiluminescence. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 251–259.

(56) Min, C.-G.; Leng, Y.; Zhu, Y.-Q.; Yang, X.-K.; Huang, S.-J.; Ren, A.-M. Modification of Firefly Cyclic Amino Oxyluciferin Analogues Emitting Multicolor Light for OLED and near-Infrared Biological Window Light for Bioluminescence Imaging: A Theoretical Study. *J. Photochem. Photobiol., A* **2017**, *336*, 115–122.

(57) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.

(58) Ferré, N.; Ángyán, J. G. Approximate Electrostatic Interaction Operator for QM/MM Calculations. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *356*, 331–339.

(59) Ponder, J. W. *TINKER, Software Tools for Molecular Design*, Version 6.3; Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Washington University School of Medicine: St. Louis, MO, 2004.

(60) Melaccio, F.; Olivucci, M.; Lindh, R.; Ferré, N. Unique QM/MM Potential Energy Surface Exploration Using Microiterations. *Int. J. Quantum Chem.* **2011**, *111*, 3339–3346.

(61) Ren, A.-M.; Goddard, J. D. Predictions of the Electronic Absorption and Emission Spectra of Luciferin and Oxyluciferins Including Solvation Effects. *J. Photochem. Photobiol., B* **2005**, *81*, 163–170.

(62) Charaf-Eddin, A.; Cauchy, T.; Felpin, F.-X.; Jacquemin, D. Vibronic Spectra of Organic Electronic Chromophores. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 55466–55472.

(63) Jacquemin, D.; Brémond, E.; Ciofini, I.; Adamo, C. Impact of Vibronic Couplings on Perceived Colors: Two Anthraquinones as a Working Example. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 468–471.

(64) Nakatani, N.; Hasegawa, J.; Nakatsuji, H. Red Light in Chemiluminescence and Yellow-Green Light in Bioluminescence: Color-Tuning Mechanism of Firefly, *Photinus Pyralis*, Studied by the Symmetry-Adapted Cluster–Configuration Interaction Method. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8756–8765.

(65) Milne, B. F. Red-Shifting the Optical Response of Firefly Oxyluciferin with Group 15/16 Substitutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 24971–24977.

Article III

pH-dependent absorption spectrum of
oxyluciferin analogues in the presence of
adenosine monophosphate

CHEMISTRY OF LIGHT INTERACTION

CHEMPHOTOCHEM

ACROSS THE WHOLE SPECTRUM

Accepted Article

Title: pH-dependent absorption spectrum of oxyluciferin analogues in the presence of adenosine monophosphate

Authors: Nuno Manuel de Almeida Barbosa, Madjid Zemmouche, Pauline Gosset, Cristina Garcia-Iriepe, Vincent Ledentu, Isabelle Navizet, Pascal Didier, and Nicolas Ferré

This manuscript has been accepted after peer review and appears as an Accepted Article online prior to editing, proofing, and formal publication of the final Version of Record (VoR). This work is currently citable by using the Digital Object Identifier (DOI) given below. The VoR will be published online in Early View as soon as possible and may be different to this Accepted Article as a result of editing. Readers should obtain the VoR from the journal website shown below when it is published to ensure accuracy of information. The authors are responsible for the content of this Accepted Article.

To be cited as: *ChemPhotoChem* 10.1002/cptc.201900150

Link to VoR: <http://dx.doi.org/10.1002/cptc.201900150>

WILEY-VCH

www.chemphotochem.org

A Journal of



pH-dependent absorption spectrum of oxyluciferin analogues in the presence of adenosine monophosphate

Dr. Nuno Manuel de Almeida Barbosa^{*†} Madjid Zemmouche[‡]

Pauline Gosset[§] Dr. Cristina García-Iriepa^{‡¶}

Dr. Vincent Ledentu[†] Prof. Isabelle Navizet[‡]

Prof. Pascal Didier[§] Prof. Nicolas Ferré^{*†}

Abstract

The photophysical properties of oxyluciferin, the light emitter responsible for firefly bioluminescence, are pH-dependent. One of the potential proton acceptor/donor is adenosine monophosphate (AMP). We have studied three oxyluciferin synthetic analogues with or without AMP, in water, in the pH=5 to 11 range, using both experimental steady-state absorption spectroscopy or the recently developed computational protocol that uses constant pH molecular dynamics and then hybrid QM/MM calculations (CpHMD-then-QM/MM). The latter features a systematic investigation of all the protonation microstates using molecular dynamics simulations coupled to thousands hybrid QM/MM vertical excitation energies. Our results demonstrate that AMP does not significantly modify the visible light absorption of the analogues, whatever the pH value. We also show that CpHMD-then-QM/MM is capable to qualitatively reproduce the pH-dependent absorption spectrum of the analogues, despite the employed low QM level of theory.

^{*}corresponding author

[†]Aix-Marseille Univ, CNRS, ICR, Marseille, France

[‡]Université Paris-Est, Laboratoire Modélisation et Simulation Multi Échelle, MSME UMR 8208 CNRS, UPEM, 5 bd Descartes, 77454 Marne-la-Vallée, France

[§]Université de Strasbourg, CNRS, Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies UMR 7021, 67034 Strasbourg, France

[¶]Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química, Universidad de Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km 33,600, 28871 Alcalá de Henares, Spain

1 Introduction

The molecular origin of the firefly bioluminescence lies in subtle microscopic interactions between the light emitter, called oxyluciferin, and its biological host, the luciferase enzyme catalyzing the oxyluciferin formation reaction (Figure 1)[1, 2]. When completed, this multi-step chemical reaction leads to oxyluciferin in an electronic excited state, which eventually releases energy by emitting visible light.

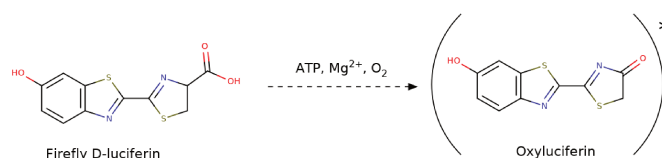


Figure 1: Bioluminescence reaction leading to the formation of the oxyluciferin light emitter in the excited state.

Excited oxyluciferin can exist in various forms whose relative contributions in the light-emission process have been debated over the years [3–6]. Most of these oxyluciferin forms can be interconverted by acid-base reactions or keto-enol tautomerization (Figure 2, left). Accordingly, oxyluciferin photochemical properties have been found to be pH-dependent [7]. Also, pH can modify the oxyluciferin environment, e.g. the protonation state of its luciferase host.

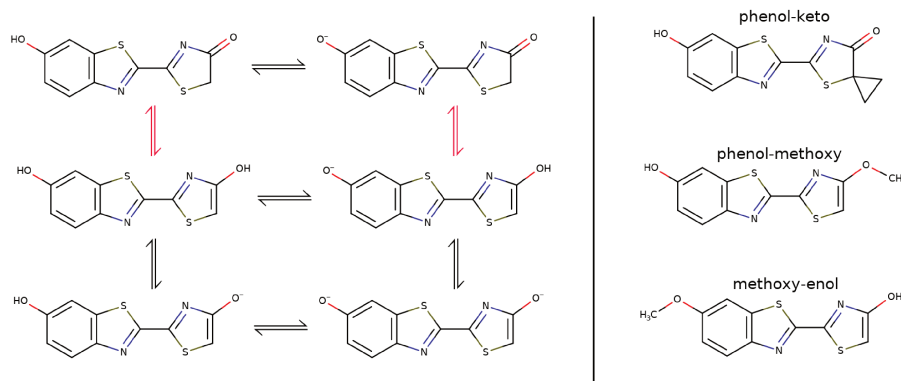


Figure 2: Natural (left) and synthetic (right) oxyluciferin structures. The natural ones are related by either keto-enol tautomerization (red arrows) or acid-base (black arrows) reactions. The synthetic analogues can only undergo acid-base reactions.

In luciferase, the time course of bioluminescence is found to be pH-dependent and explained by the same pH tendency as the rate of adenosine triphosphate

binding at the protein active site [8]. According to fragment molecular orbital calculations, the pH-induced adenosine monophosphate (AMP) change of protonation state is responsible for the polarization of a single oxyluciferin form (the deprotonated phenolate-keto one) in luciferase [9]. Other calculations have proposed a reactive route involving a proton transfer between the excited oxyluciferin and AMP[10]. The presence of specific interactions between the oxyluciferin anion (as well as a doubly-methylated analogue) and a water molecule is also known to tune the absorption spectrum by 50 nm [11]. This effect has also been found in computational studies by Kim and Rhee [12]. Very recently, the pH-sensitivity of luciferase photo-properties has been also explained by the presence of metal ions, weakening specific electrostatic interactions between oxyluciferin and titrating amino acid residues [13]. Finally, some of us have very recently studied the interplay between the protonation states of oxyluciferin+AMP complex and the size of its cavity in luciferase [14].

The extraction of the contribution due to each oxyluciferin form to the absorption or emission spectra is often tedious[15, 16]. For that reason, oxyluciferin analogues have been proposed and synthesized for inhibiting certain forms [6, 17–19]. In this work, we are interested in a particular set of analogues (Figure 2, right), studied both experimentally and theoretically [20–22]. In a nutshell, such analogues are meant to avoid any keto-enol tautomerization. Each analogue can be deprotonated at a single position. As a matter of fact, a good candidate for accepting or donating protons is AMP (chemical formula: $C_{10}H_{14}N_5O_7P$) which is present in the luciferase pocket. AMP first pKa being 3.8, it is assumed that it is deprotonated at pH values between 5 and 11. However, its second pKa value (6.2) is close from the oxyluciferin ones (7.1 and 9.0) as well as the analogue ones (phenol-keto: 7.8, phenol-methoxy: 8.7, methoxy-enol: 7.3). Accordingly, in the molecular complex formed between AMP and the oxyluciferin analogue, monodeprotonated and doubly-deprotonated AMP (hereafter denoted AMP for simplicity) could coexist with the neutral analogue and its deprotonated form. The existence of all these different possible protonation microstates is probably responsible for the pH-dependent properties of oxyluciferin and its analogues. The most basic demonstration is found in the variation of the absorption spectra of the bare analogues in water with the pH [20]. In the current work, AMP is introduced in the molecular models and its importance is evaluated using both experimental and theoretical absorption spectra of the analogues. Because of the absence of luciferase in the molecular model, the present work does not deal with the possible bioluminescence of the oxyluciferin analogues.

In the crudest approach, the simulation of an absorption spectrum is based on the vertical excitation energy computed at the chromophore ground state geometry. Among the numerous accurate methods rooted in quantum mechanics (QM), we may cite the three most popular ones: the Time-Dependent Kohn-Sham Density Functional Theory (hereafter simply denoted TDDFT [22, 23]), the second-order Perturbation Theory applied to a reference wavefunction commonly obtained from a multiconfigurational wavefunction [24] and the Equation-Of-Motion approach applied to a Coupled-Cluster wavefunction [25]. The latter two methods are usually restricted to small-to-medium size molecules because

of their high computational costs. Because of its favorable scaling, TDDFT can be applied to larger chromophores and/or take into account vibronic couplings [26], sometimes responsible of large maximum absorption wavelength (λ_{max}) shifts (with respect to the vertical transition) and the homogeneous broadening of the absorption peaks. On the other hand, when the chromophore is embedded in a complex environment (solvent, macromolecule, ...), the influence of its surroundings is responsible for the inhomogeneous broadening of the absorption bands. The latter effect is usually taken into account by considering a statistically meaningful distribution of the system configurations by means of molecular dynamics simulations (MD). Hundreds or thousands snapshots being extracted from the MD trajectory, their vertical excitation energies are calculated with TDDFT or a more qualitative QM level of theory, and then averaged [27]. In the case of pH-dependent absorption spectra, some of the authors have very recently proposed a new protocol, combining Constant-pH MD simulations and hybrid quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) vertical energy calculations (CpHMD-then-QM/MM) in which the chromophore interacts with its environment through empirical atomistic potentials, i.e. molecular mechanics (MM) [28, 29].

In summary, we report in this article both experimental and computed absorption spectra of three oxyluciferin analogues in interaction with AMP and water at different pH values. Besides rationalizing their microscopic origin, we evaluate the effect of AMP on the oxyluciferin analogue spectroscopic signatures and validate the selected modeling protocol. We emphasize that the present work introduces the possibility to evaluate and analyze the pH-dependent absorption spectrum of a titrating chromophore in a titrating environment.

2 Results and Discussion

As mentioned above, two main effects can contribute to the computed absorption spectrum λ_{max} and its lineshape: (i) the homogeneous broadening which will be evaluated thanks to vibrationally-resolved TDDFT calculations using a single structure for each electronic state; (ii) the inhomogeneous broadening that will be obtained using the CpHMD-then-QM/MM protocol, using a semi-empirical QM level of theory.

2.1 Oxyluciferin analogues in water

In this section, we compare the experimental and computed spectra obtained for each analogue in water, at pH values between 5 and 11. These spectra are reported in Figures 3, 4 and 5. Because these experimental spectra are completely equivalent to the ones already available in the literature [20, 22], we will just briefly comment them and focus on the computed ones.

Between 300 nm and 600 nm, the phenol-keto experimental spectra (Figure 3A) present a single large but structured absorption band at acidic pH with $\lambda_{max} = 389$ nm. At neutral and basic pH, two bands appear: an intense one

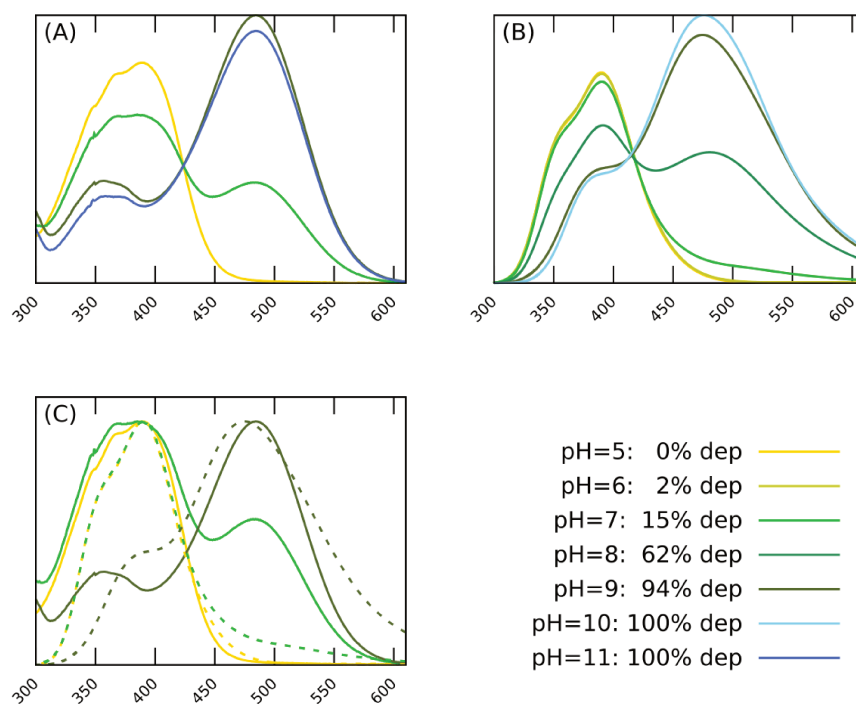


Figure 3: Absorption spectra of phenol-keto analogue ($pK_a=7.8$) between pH=5 and pH=11. (A) Experimental unnormalized spectra. (B) Computed unnormalized spectra. (C) Normalized experimental (plain lines) and computed (dashed lines) spectra. Wavelengths are given in nm, intensities are given in arbitrary units. The deprotonated phenol-keto populations are calculated out of the CpHMD trajectories and are indicated as "% dep".

at $\lambda_{max} = 480$ nm and a second one, weaker, around $\lambda_{max} = 360$ nm. These features are correctly reproduced with the computational protocol (Figure 3B). An isobestic point is found at about 420 nm. After normalization of the two sets of spectra, their comparison in Figure 3C shows a large difference at pH=7: the absorption band corresponding to the deprotonated form is present in the experimental spectrum, while it barely appears in the computed one. Two possible explanations can be given: (i) the oscillator strengths using the semi-empirical (PM7) QM level of theory are underestimated in the case of the deprotonated form or (ii) the computed deprotonated population (15%) does not compare with the experimental one. Indeed the refined measurement of the solution pH is 7.4, explaining why the experimental spectrum is intermediate between the computed pH=7 and pH=8 ones. The experimental protonated-deprotonated phenol-keto energy gap (90 nm) is correctly reproduced using the CphMD-then-

QM/MM protocol (85 nm).

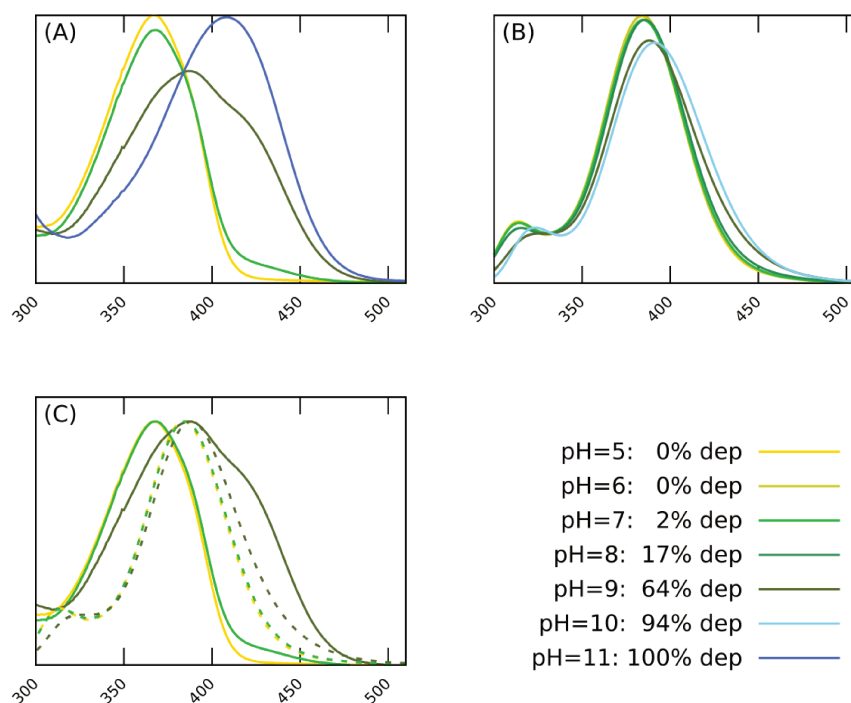


Figure 4: Absorption spectra of phenol-methoxy analogue ($pK_a=8.7$) between pH=5 and pH=11. (A) Experimental unnormalized spectra. (B) Computed unnormalized spectra. (C) Normalized experimental (plain lines) and computed (dashed lines) spectra. Wavelengths are given in nm, intensities are given in arbitrary units. The deprotonated phenol-methoxy populations are calculated out of the CpHMD trajectories and are indicated as "% dep".

Regarding the phenol-methoxy analogue (Figure 4), the experimental spectra can be analyzed as the superposition of two bands, one for the protonated form ($\lambda_{max} = 367$ nm) and one for the deprotonated form ($\lambda_{max} = 407$ nm). Owing to this analogue large pK_a value (8.7), the spectrum at pH=9 contains an almost equal contribution of both forms, resulting in a broad band between 320 and 500 nm. With respect to these experimental spectra, the computed protonated form λ_{max} is red-shifted by 17 nm, whereas the deprotonated form λ_{max} is blue-shifted by 16 nm. Consequently, the protonated–deprotonated phenol-methoxy energy gap is largely underestimated (7 nm instead of 40 nm) using the CpHMD-then-QM/MM approach. The most probable explanation is rooted in the QM semi-empirical level of theory which may be not accurate enough (see the discussion below).

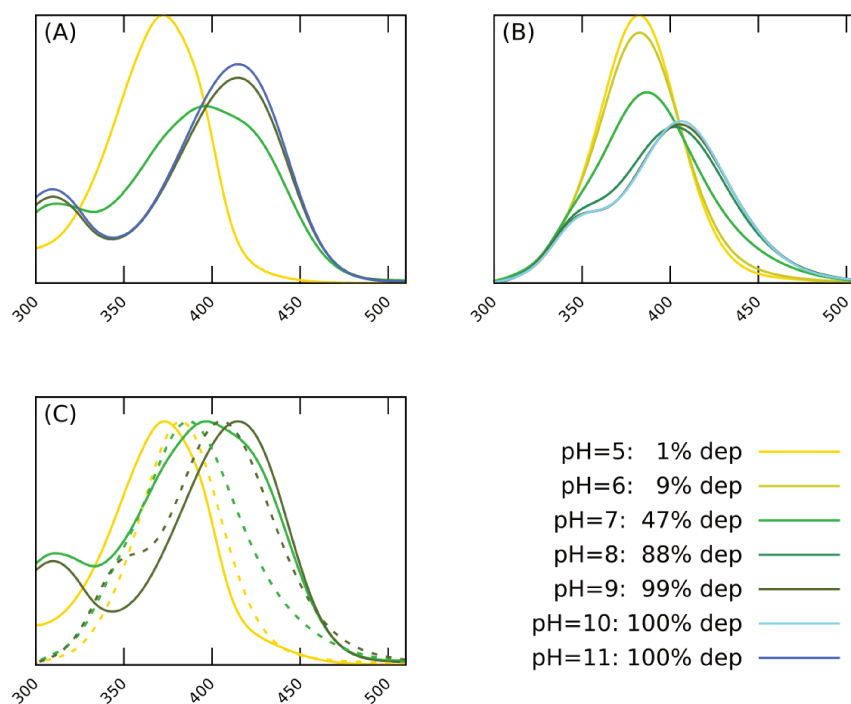


Figure 5: Absorption spectra of methoxy-enol analogue ($pK_a=7.3$) between $pH=5$ and $pH=11$. (A) Experimental unnormalized spectra. (B) Computed unnormalized spectra. (C) Normalized experimental (plain lines) and computed (dashed lines) spectra. Wavelengths are given in nm, intensities are given in arbitrary units. The deprotonated methoxy-enol populations are calculated out of the CpHMD trajectories and are indicated as "% dep".

In the case of the methoxy-enol analogue (Figure 5), the protonated form can be identified at $pH=5$ with an experimental $\lambda_{max} = 371$ nm while the deprotonated form spectroscopic signature is found at $\lambda_{max} = 414$ nm. The computed spectra show similar features: 382 nm for the deprotonated form (11 nm red-shifted with respect to experiment) and 406 nm for the deprotonated form (8 nm blue-shifted with respect to experiment). Accordingly the computed protonated-deprotonated energy gap (24 nm) is only half the experimental one (43 nm), hence showing the same trend already found with the phenol-methoxy analogue. Noticeably, in Figure 5C, the computed spectra at $pH=9$ and $pH=10$ feature a shoulder around 340 nm, whereas a more intense band starts in the corresponding experimental spectra.

The PM7 semi-empirical level of theory is well adapted to the calculation of tens of thousands of vertical excitation energies. It has already been vali-

dated on a different chromophore, the retinal in a rhodopsin protein[29]. Owing to the experimental-computational spectrum differences highlighted above, we have investigated the possibility to run time-dependent density-functional theory (TDDFT) calculations on a reduced set (1000 instead of 10000) of snapshots for each oxyluciferin analogue, at three pH values: acidic (5), close to the analogue pKa (7 or 8), and basic (10). Because of the TDDFT computational cost, the small 6-31G(d) basis set (together with the B3LYP exchange-correlation functional) has been selected. Aware of the possible charge transfer character of some excited states, we also evaluated a range-separated functional (Supplementary Information). However, its unbalanced treatment of protonated and deprotonated species leads us to prefer the B3LYP one. The 3 sets of spectra are compared in Figure 6. The resulting spectra are less smooth than the PM7 ones,

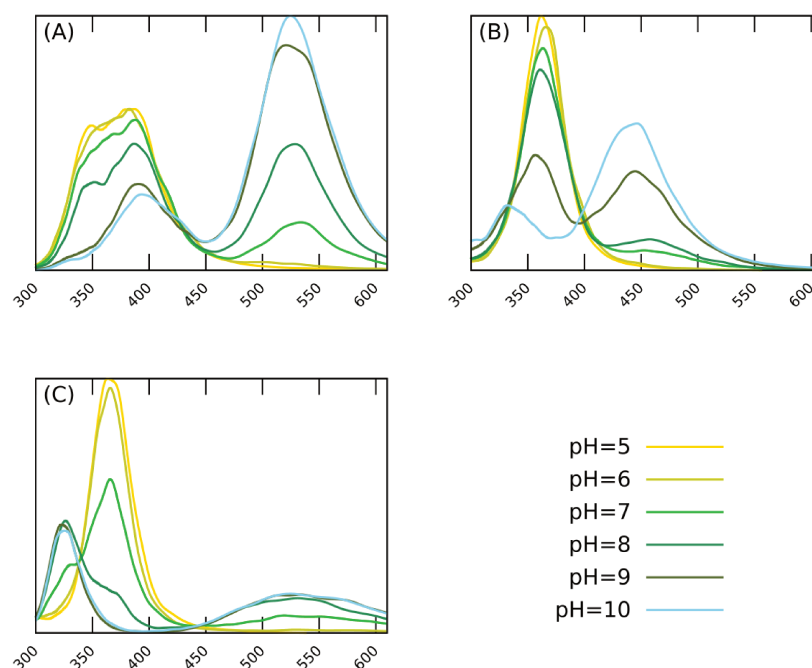


Figure 6: TDDFT absorption spectra of the three analogues (A: phenol-keto, B: phenol-methoxy, C: methoxy-enol). Wavelengths are given in nm, intensities are given in arbitrary units.

because of the limited sampling. The TDDFT spectrum of the phenol-keto analogue shows a too large energy gap between the protonated and deprotonated forms, due to the red-shift of the band that appears now around 550 nm. Nevertheless, it confirms that the large band between 300 and 450 nm is due to the protonated $S_0 \rightarrow S_1$ and the deprotonated $S_0 \rightarrow S_2$ transitions, depending

on the pH value [22]. At variance with the PM7 spectra, the phenol-methoxy TDDFT spectra show a significant 100 nm gap, however too large with respect to the experimental one. Similar to the phenol-keto spectrum, the deprotonated contribution shows a second excitation energy close to the protonated first excitation [22]. In the case of the methoxy-enol, the TDDFT spectra are clearly not accurate for the deprotonated form. Indeed, the first transition appears as a very large band between 450 and 700 nm while the corresponding experimental band can be found between 350 and 500 nm.

Despite these TDDFT inaccuracies, we have also investigated the effect of possible couplings between the analogue molecular vibrations and their excitation energies using TDDFT with a larger basis set. Ideally, we would need to apply a vibronic+ensemble approach as the one proposed recently by Zuehlsdorff and Isborn [30]. However, its computational cost would be prohibitive when multiple protonation states have to be considered. Instead we have used the crude approximation that intramolecular vibronic effects could be evaluated from a single gas phase calculation. Because the selected vibronic model [31] is based on the extraction of both the electronic ground state and excited state normal modes, this approach has been applied using a single geometry for each protonation state of each analogue, except for the protonated phenol-keto analogue for which the Franck-Condon approximation cannot be applied (the excited state geometry is too much distorted with respect to the ground state one, see Figure 7).

For all analogues, the maximum of the vibrationally-resolved spectra can be associated with the corresponding 0-0' excitation energy. Interestingly, the absorption of the deprotonated form of the methoxy-enol analogue is strongly red-shifted with respect to the other analogues (Table 1). Accordingly, the deprotonation of the methoxy-enol analogue is reflected in a 270 nm red-shift, much larger than the one in water, either experimentally observed or calculated. This shift is reduced to 135 nm in the case of the phenol-methoxy analogue, still much larger than the one in water. Assuming that the (protonated to deprotonated)

analogue	protonation	vertical	0-0' (max)
phenol-keto	prot	375	
	deprot	494	541 (539)
phenol-methoxy	prot	364	400 (398)
	deprot	497	535 (535)
methoxy-enol	prot	371	406 (405)
	deprot	606	674 (674)

Table 1: Vertical excitation energy, 0-0' excitation energy and maximum absorption energy (in nm) for each oxyLuciferin analogue.

nated) differential effect of the vibronic coupling in vacuum can be transferred (added) to the CpHMD-then-QM/MM spectra (Figures 4 and 5), the total protonated to deprotonated shift of calculated λ_{max} increases to 9 nm (instead of 7 nm, phenol-methoxy) and 57 nm (instead of 24 nm, methoxy-enol). The latter

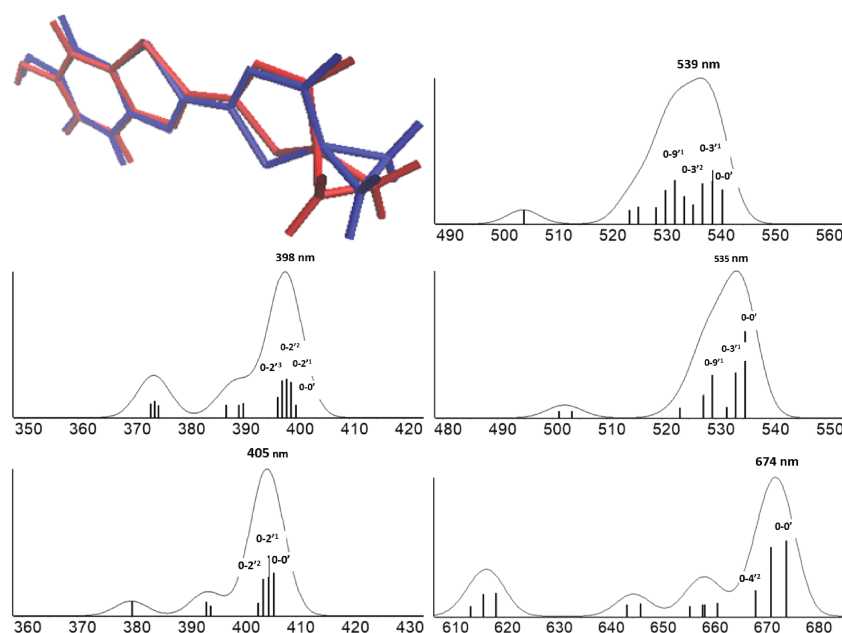


Figure 7: Vibrationally resolved TDDFT normalized absorption spectra of the three analogues (top: phenol-keto, middle: phenol-methoxy, bottom: methoxy-enol; left: protonated, right: deprotonated) in vacuum. Wavelengths are given in nm. The vibronic transitions are depicted with sticks. In the case of the protonated phenol-keto analogue, the superimposition of the electronic ground and first excited states minimum energy structures is provided and explains why the spectrum cannot be calculated.

value is in better agreement with the experimental 43 nm reported above. Qualitatively speaking, these results suggest that both pH and vibronic effects would deserve attention in some particular situations, like the methoxy-enol analogue. The evaluation of the vibronic contribution in water would require much more involved models, able to evaluate the intramolecular and intermolecular vibronic couplings in each and every populated protonation microstate.

Because of the sampling limitation and of the need to use a small-yet-computationally inexpensive basis set (at variance with the one recommended by some of us [22]), we keep PM7 as the QM level in the following, unless explicitly mentioned.

Among all the possible structural factors that could be connected to the analogue absorption spectrum pH-dependency, we have considered an intramolecular one (the torsion angle around the S-C-C-S central bond) and an intermolecular one (the radial distribution function (RDF) of the analogue alcohol oxygen-water oxygen distance). Even a slight rotation, e.g. due to the local solvent inhomogeneity, around the S-C-C-S bond would dramatically modify

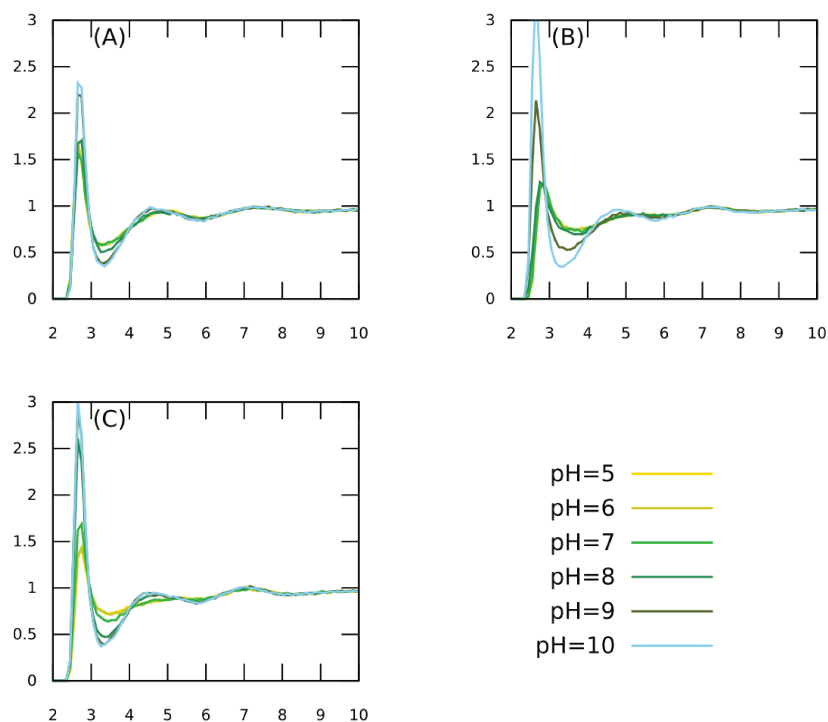


Figure 8: Normalized water oxygen – analogue alcohol oxygen RDF for the analogues phenol-keto (A), phenol-methoxy (B) and methoxy-enol (C). Distances are given in Å.

λ_{max} because of the conjugation between the two oxyluciferin analogue moieties. However, it turns out that the pH does not modify this parameter whose values ($180 \pm 10^\circ$) indicate a planar geometry (data not shown) whatever the analog. However, there is indication that the pH can influence the distribution of the water molecules around the analogue titrating site (Figure 8). All the three analogues exhibit similar pH-dependent solvent organizations, with the same first solvation sphere at about 2.5Å from the titrating oxygen atom. While the phenol-keto analogue can accommodate between 1.5 water molecules at pH=5 and 2.3 water molecules at pH=10, the two other analogues can accept up to 3 water molecules at pH=10. Not only the role of the water molecules hydrogen-bonded to the analogue phenol/phenolate or enol/enolate moieties changes from mixed acceptor/donor at acidic pH to only donor at basic pH, but the presence of the large negative electric charge of the deprotonated forms is most probably attracting more water molecules. Such a complex solvent effect involves specific solvent–solute interactions which can't be accounted for in isotropic solvent models like the one we have used for computing vibrationally-resolved spectra.

2.2 Oxyluciferin analogue-AMP complexes in water

The presence of AMP is supposed to influence the oxyluciferin analogue absorption spectra, at least because of the presence of a -1 or -2 electric charge in the considered pH range (5 to 11). Note that AMP absorbs UV light below 300 nm (as we verified by computing its vibrationally-resolved spectra at the TDDFT level of theory, see Supplementary Information), significantly different from the analogue absorption. Nevertheless, we have considered two different computational cases: (i) the analogue and AMP in the QM subsystem; (ii) the analogue in the QM subsystem and AMP in the MM one (together with the water molecules).

Before to present the pH-dependent analogue-AMP complex spectra, we first analyze the CpHMD trajectories, in terms of deprotonation fractions for each of the 4 possible microstates (2 protonation states for AMP times 2 for the analogue). Using the fitting procedure developed by some of us (see the Experimental Section), we were able to derive the pKa values of each analogue, together with the AMP one (Table 2). CpHMD populations and the fitted curves are reported in Supplementary Information. Compared to the AMP pKa

	phenol-keto	phenol-methoxy	methoxy-enol
AMP	6.7	7.7	6.7
analogue	7.2	8.7	7.3

Table 2: Microscopic pKa values for AMP and each analogue in their complexes solvated in water.

(6.2, corresponding to its second deprotonation), the presence of the analogue results in a larger pKa, meaning that AMP becomes a weaker proton donor. On the other hand, the analogue pKa values are barely affected by the presence of AMP, the largest deviation concerning the phenol-keto analogue (-0.6 pKa unit). From the titration point of view, the phenol-keto and the methoxy-enol analogues behave similarly when they interact with AMP.

The experimental and CpHMD-then-QMMM computed absorption spectra of the phenol-keto analogue in presence of AMP, at different pH values, are reported in Figure 9. Comparing Figures 3A and 9A, the experimental spectra do not significantly change with the complexation of the analogue with AMP. The differences introduced by AMP in the computed spectra remain small. First, a limited 8 nm blue-shift of the peak corresponding to the analogue deprotonated form can be noticed. Then, the protonated form band structure is lost when AMP is included into the QM subsystem. The QM/MM isobestic point is slightly blue-shifted with respect to the experimental one. The agreement between the experimental and computed pH=7 spectra has improved: both definitively show contributions from the protonated and deprotonated forms of the analogue, with relative intensities in good agreement.

In the case of the phenol-methoxy analogue (Figure 10), the influence of AMP is also negligible, as evidenced in the experimental spectra at all pH values. The computed spectra show a limited effect of AMP, through a 15 nm blue-

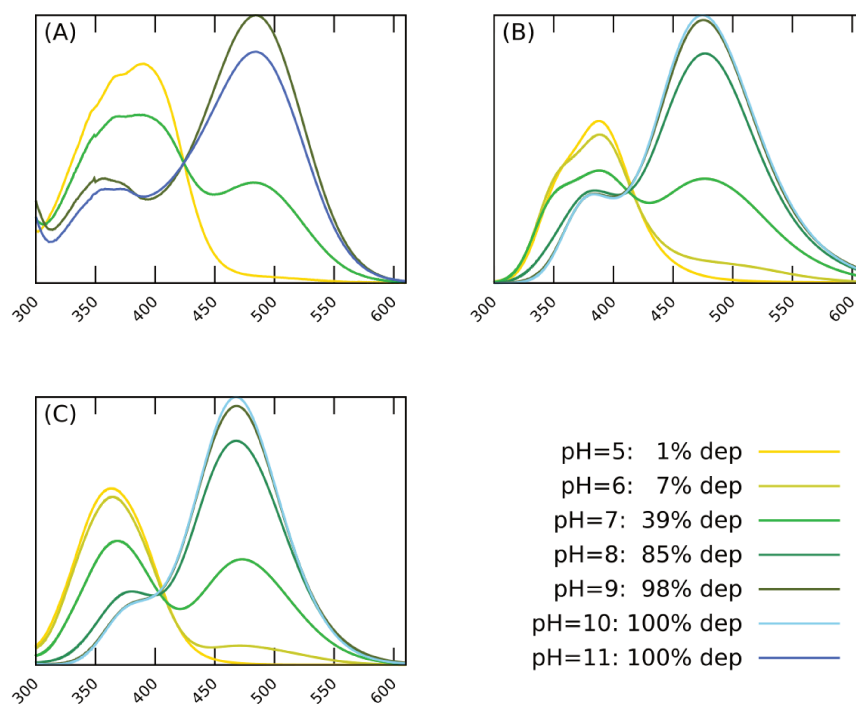


Figure 9: Absorption spectra of AMP + phenol-keto complex between pH=5 and pH=11. (A) Experimental unnormalized spectra. (B) Computed unnormalized spectra, AMP is part of the MM subsystem. (C) Computed unnormalized spectra, AMP is part of the QM subsystem. Wavelengths are given in nm. The deprotonated phenol-keto populations are calculated out of the CpHMD trajectories and are indicated as "% dep".

shift. Again, a 40 nm protonated to deprotonated analogue shift is measured, however the corresponding computed value is underestimated to less than 10 nm, whatever the chosen description (QM or MM) for AMP.

Even if the presence of AMP induces a slight shift of the methoxy-enol deprotonation (Figure 11) towards higher pH, the general features of its experimental absorption spectrum does not depend on AMP. The computed spectra are also independent of AMP. Only the level of theory for AMP induces a modification of the deprotonated second absorption ($\lambda_{max} = 340\text{nm}$) band shape, which appears as a shoulder when AMP is QM whereas it is a distinct peak when AMP belongs to the MM subsystem.

While AMP is always charged negatively (-1 or -2) in the 5 to 11 pH range, the analogues can be either neutral or negatively charged. Accordingly, it is expected that the distance between the two molecules increases with the pH.

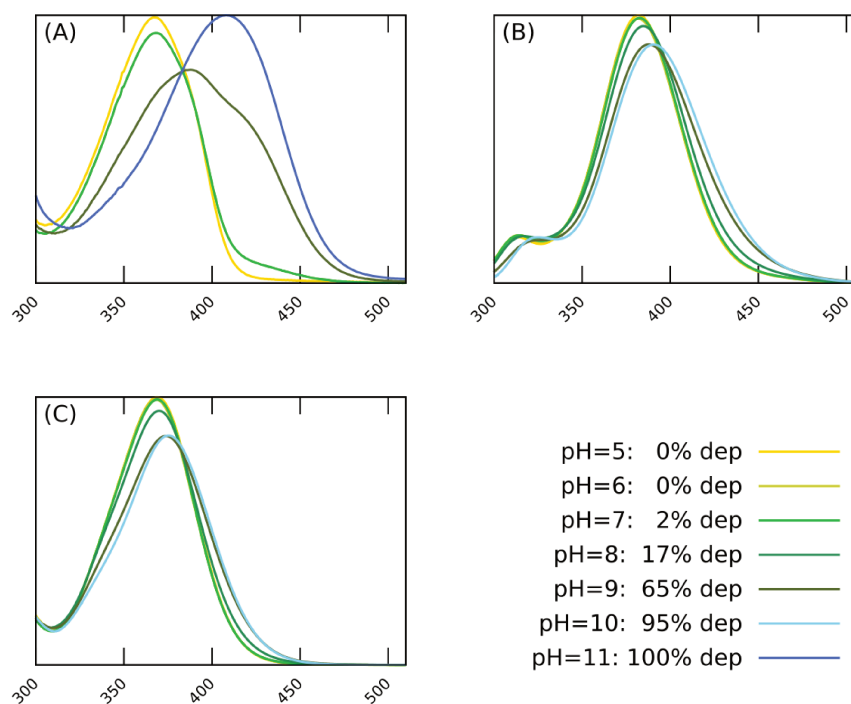


Figure 10: Absorption spectra of AMP + phenol-methoxy complex between pH=5 and pH=11. (A) Experimental unnormalized spectra. (B) Computed unnormalized spectra, AMP is part of the MM subsystem. (C) Computed unnormalized spectra, AMP is part of the QM subsystem. Wavelengths are given in nm. The deprotonated phenol-methoxy populations are calculated out of the CpHMD trajectories and are indicated as "% dep".

Having plotted the distance between their respective centers of mass (Figures S6-S8), the distributions of distances can be summarized as unimodal or bimodal distributions centered around 5 Å and/or around 30 Å (in a region comprised between 25 to 40 Å). No distinct trend can be discerned, whatever the pH or analogue. In other words, the two solutes can be either interacting or separated enough for their interaction to be completely screened by the solvent.

3 Conclusions

In this article, we have presented experimental and computational investigations of the pH-dependent absorption spectra for three aqueous oxyluciferin analogues in the presence of AMP. It has been shown that AMP does not mod-

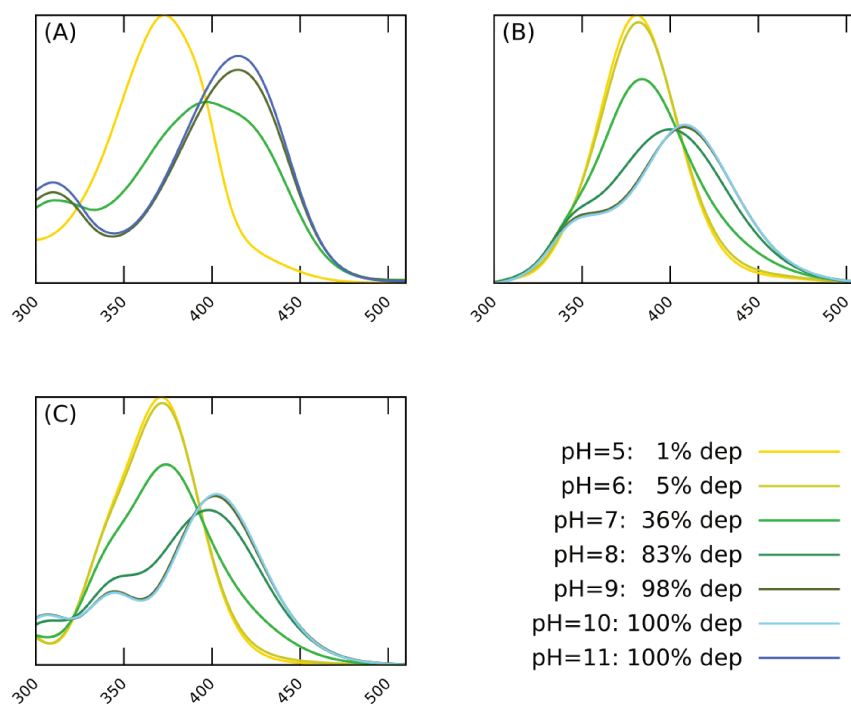


Figure 11: Absorption spectra of AMP + methoxy-enol complex between pH=5 and pH=11. (A) Experimental unnormalized spectra. (B) Computed unnormalized spectra, AMP is part of the QM subsystem. (C) Computed unnormalized spectra, AMP is part of the MM subsystem. Wavelengths are given in nm. The deprotonated methoxy-enol populations are calculated out of the CpHMD trajectories and are indicated as "% dep".

ify significantly the analogue light absorption, at all the considered pH values between 5 and 11. Despite its computational cost, the CpHMD-then-QM/MM approach is a particularly effective approach, able to capture the contributions of the different protonation microstates of the chromophore, interacting with another titratable molecule. Most notably, it allows to calculate the pH-dependent absorption spectrum as a weighted sum of contributions from individual protonation microstates. This converged statistical approach is utterly important for a correct evaluation of the pH effects. This last result calls for a generalization of such a pH-dependent approach for studying pH effects in a more complex environment like the oxyluciferin host, the luciferase protein, opening the way to the investigation of how pH can affect the firefly bioluminescence.

4 Experimental Section

Experimentally recorded absorption spectra Stock solutions of all compounds were prepared in spectroscopic grade DMSO (Sigma-Aldrich) and stored in several aliquots at 20°C to minimize the freezethaw cycle. They were further diluted 1000-fold to a final concentration of about a few μM in aqueous buffer with different pH. The buffers were prepared by diluting a 1 M stock solution in deionized, Millipore-purified water (18.2 M Ω). Buffered stock solutions were prepared as follows: 75 mM NaCl/20 mM KH₂PO₄/0.2 mM MgCl₂ for pH $\leq$ 7.0 and 75 mM NaCl/25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (TRIS)/0.2 mM MgCl₂ for pH > 7.0. The buffer was separated into several fractions, and their pH (error ± 0.02) was adjusted by 250 mM HCl or by 250 mM NaOH separately at 20°C (ΔpH 0.25). Final pH values are 5.0, 7.4, 9.1 and 11.1. Separate buffers at different pH were used for all spectral measurements. Absorption spectra were recorded with a Cary-4000 spectrometer (Agilent Technologies).

Determination of microscopic pKa values. When several titrating sites are interacting, the macroscopic parameter pKa becomes pH-dependent and can be replaced with the so-called pK_{1/2} parameter which is formally equal to the pH value at which the protonated and deprotonated populations of a particular titrating site become equal, whatever the other populations. In the case of the analogue-AMP complex (2 titrating sites), using a 3-parameter fitting procedure of the 4 microstate population curves, it is possible to determine the two individual pK_{1/2} values, that we simply call pKa for the sake of simplicity (see the Supplementary Information).

CpHMD and molecular parameters. We have used the standard CpHMD method implemented in the Amber18 software[32]. During the simulation, solvent molecules are considered explicitly in each sampled protonation microstate. However, any protonation/deprotonation event, i.e. a change of protonation microstate, is performed in implicit solvent. Accordingly, the implicit water solvent model must be seen as an infinite reservoir of protons that translates statistically to a semi-grand canonical ensemble in which the hydronium chemical potential is constant. When a given residue undergoes a protonation state change, its atomic charges are modified in order to represent the new state. Titratable hydrogen atoms have zero charge in the deprotonated form. Since this change of net charge occurs in implicit solvent, all the charge-dependent finite size effects that would occur in explicit solvent are prevented: each MD partial trajectory is performed using a constant total charge (if not 0, the usual correction term is applied to the particle-mesh Ewald sums). Optimized structures of oxyluciferin analogues as well as AMP at the B3LYP /6-311G(2d,p) level of theory were obtained from a previous study [22]. In order to describe non-standard residues in CpHMD, partial atomic charges of all the structures were derived following the restrained electrostatic potential (RESP) approach. Reference energies were calculated using the finddref tool implemented in the AMBER18

package[32]. The electrostatic contribution of the transition free energy for the deprotonation is calculated by taking into account the difference between the potential calculated with the charges for the proposed state and the potential calculated with the charges for the current protonation state, assuming that the nonelectrostatic transition free energy interactions are constant independently of the environment [33].

Oxyluciferin analogs and AMP parameters for each protonation state are reported as Supplementary Information.

The starting structures, analogues and complexes, were then solvated with TIP3P water molecules, extending for at least 20 Å from the structures to the box sides. All molecular dynamics simulations (MD) were performed using the AMBER18[32] software package. For each system, we followed the same 3 steps towards the equilibrium of the structures: i) an energy minimization of the whole system ii) a MD simulation gradually raising up the temperature of the system from 10 to 300 K iii) a 4 ns equilibration of the systems using a NPT ensemble. After the equilibration of the models, we applied the CpHMD method in explicit solvent using the discrete protonation state model. This method involves a MD simulation in explicit solvent followed by a Metropolis Monte Carlo-based evaluation of the Boltzmann distribution of protonated states for each residue in a random order. Willing to improve the sampling capabilities of this method, we used the replica exchange technique (pH-REMD)[34]. We took into account six 10 ns long pH-replicas between pH=5 and pH=10. Deprotonation fractions were checked to be converged much before reaching the 10 ns simulation length. All simulations were performed enforcing periodic boundary conditions.

QM/MM method. 10000 equally distributed snapshots were extracted from each trajectory and assigned to the corresponding protonation microstates. Three different QM/MM partitions were considered. In the absence of AMP, only the analogue belongs to the QM subsystem while the water molecules are always MM. When AMP is complexed with the analogues, we placed it either in the QM subsystem or in the MM subsystem. The electrostatic interaction between the QM and MM subsystems is taken into account by plugin the MM electrostatic potential into the QM one-electron hamiltonian. Two different QM hamiltonians have been used: the semi-empirical PM7 implemented in the MOPAC 2016 program [35] in which the MM potential enters in the diagonal Fock operator elements, or the DFT Khon-Sham one thanks to the ESPF method[36], implemented in a local version of Gaussian16 [37].

10000 vertical excitation energies and oscillator strengths have been computed using the MECI/PM7 approach in MOPAC [35]. The same properties have been determined at the TDDFT/TDA B3LYP/6-31G(d) level of theory using a restricted set of 1000 structures. The absorption spectra were generated from the first five excited states with a normalized Gaussian function using Newton-X [38].

Computed vibrationally-resolved absorption spectra. Vibrationally resolved absorption spectra have been computed on the basis of the TD-DFT vibrational signatures by using the Franck-Condon-Herzberg-Teller (FCHT) approximation and the Adiabatic Hessian method as implemented in Gaussian 16[37]. A comparison of the Franck-Condon (FC) and FCHT vibrationally resolved absorption and emission spectra of oxyluciferin has been already discussed in a previous study[39], showing that the FCHT spectra resemble the FC ones. For this reason, only the FCHT spectra are simulated in this study. The band broadening was simulated by Gaussian functions with half-widths at half-maximum (HWHM) of 135 cm^{-1} . The vibrationally-resolved absorption spectra have been simulated in vacuum. All the structures have been optimized in the ground and excited state at the DFT and TD-DFT levels of theory respectively, using the B3LYP functional and the 6-31+G(d,p) basis set.

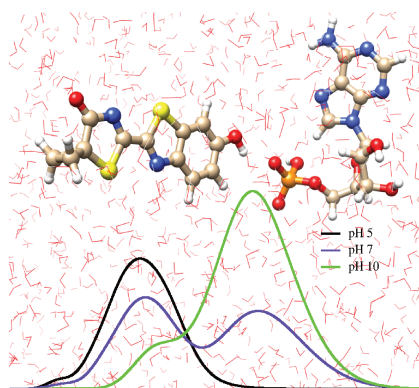
5 Acknowledgment

Agence Nationale de la Recherche is acknowledged for grant ANR-16-CE29-0013-01. Cristina Garcia-Iriepa acknowledges Fundación Ramón Areces for a postdoctoral fellowship. This work was granted access to the HPC resources of Aix-Marseille Université financed by the project Equip@Meso (ANR-10-EQPX-29-01) of the program "Investissements d'Avenir" supervised by the Agence Nationale de la Recherche.

6 Keywords

Oxyluciferin analogue, absorption spectrum, multiscale simulations, pH

7 TOC



Experimental (steady-state absorption spectroscopy) and computational (constant-pH molecular dynamics and QM/MM) insights on the pH-dependent absorption spectra of aqueous oxyluciferin analogues in presence of adenosine monophosphate (AMP) are reported. Most notably, the results demonstrate the adequacy of the computational approach to reproduce pH-dependent absorption spectrum as well as the negligible effect of AMP in the absorption spectra of the oxyluciferin analogues.

References

- [1] B. Branchini, S. Daunert, L. Blum, L. J. Kricka, G. Zomer, J. W. Hastings, F. Berthold, A. Lundin, A. M. G. Campana, R. Niessner, T. K. Christopolous, C. Lowik, *Chemiluminescence and Bioluminescence*, (Ed.: A. Roda), The Royal Society of Chemistry, **2011**, P001–590.
- [2] M. Vacher, I. F. Galván, B.-W. Ding, S. Schramm, R. Berraud-Pache, P. Naumov, N. Ferré, Y.-J. Liu, I. Navizet, D. Roca-Sanjuán, W. J. Baader, R. Lindh, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 6927–6974.
- [3] G. Orlova, J. D. Goddard, L. Y. Brovko, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6962–6971.
- [4] S.-F. Chen, Y.-J. Liu, I. Navizet, N. Ferré, W.-H. Fang, R. Lindh, *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 798–803.
- [5] L. P. da Silva, J. C. E. da Silva, *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 809–817.
- [6] Y.-Y. Cheng, Y.-J. Liu, *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 5360–5370.
- [7] Y. Ando, K. Niwa, N. Yamada, T. Enomoto, T. Irie, H. Kubota, Y. Ohmiya, H. Akiyama, *Nat. Photonics* **2007**, *2*, 44–47.
- [8] Y. Yanagisawa, T. Kageyama, N. Wada, M. Tanaka, S.-y. Ohno, *Photochem Photobiol* **2013**, *89*, 1490–1496.
- [9] B. F. Milne, M. A. L. Marques, F. Nogueira, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 14285.
- [10] L. P. da Silva, J. C. G. E. da Silva, *The Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119*, 2140–2148.
- [11] K. Støchkel, C. N. Hansen, J. Houmøller, L. M. Nielsen, K. Anggara, M. Linares, P. Norman, F. Nogueira, O. V. Maltsev, L. Hintermann, S. B. Nielsen, P. Naumov, B. F. Milne, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6485–6493.
- [12] H. W. Kim, Y. M. Rhee, *The Journal of Physical Chemistry B* **2013**, *117*, 7260–7269.
- [13] V. R. Viviani, G. V. M. Gabriel, V. R. Bevilacqua, A. F. Simões, T. Hirano, P. S. Lopes-de-Oliveira, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, DOI 10.1038/s41598-018-33252-x.

- [14] C. Garcia-Iriepe, I. Navizet, *Molecules* **2019**, *24*, 1565.
- [15] M. Rebarz, B.-M. Kukovec, O. V. Maltsev, C. Ruckebusch, L. Hintermann, P. Naumov, M. Sliwa, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3803–3809.
- [16] J. J. Snellenburg, S. P. Laptanok, R. J. DeSa, P. Naumov, K. M. Solntsev, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 16252–16258.
- [17] L. P. da Silva, A. J. M. Santos, J. C. G. E. da Silva, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 94–100.
- [18] M. Kakiuchi, S. Ito, M. Yamaji, V. R. Viviani, S. Maki, T. Hirano, *Photochem. Photobiol.* **2016**, *93*, 486–494.
- [19] C.-G. Min, Q.-B. Liu, Y. Leng, S.-J. Huang, C.-X. Liu, X.-K. Yang, A.-M. Ren, L. P. da Silva, *Comput. Theor. Chem.* **2018**, *1133*, 18–24.
- [20] A. Ghose, M. Rebarz, O. V. Maltsev, L. Hintermann, C. Ruckebusch, E. Fron, J. Hofkens, Y. Mély, P. Naumov, M. Sliwa, P. Didier, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 2638–2649.
- [21] A. Ghose, O. V. Maltsev, N. Humbert, L. Hintermann, Y. Arntz, P. Naumov, Y. Mély, P. Didier, *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 1566–1575.
- [22] C. García-Iriepe, P. Gosset, R. Berraud-Pache, M. Zemmouche, G. Taupier, K. D. Dorkenoo, P. Didier, J. Léonard, N. Ferré, I. Navizet, *J. Chem. Theory Comput.* **2018**, *14*, 2117–2126.
- [23] M. E. Casida, M. Huix-Rotllant in *Annual review of physical chemistry*, vol 63, (Eds.: M. A. Johnson, T. J. Martinez), Annual Review of Physical Chemistry BAI05, Annual Reviews, **2012**, pp. 287–323.
- [24] S. Gozem, F. Melaccio, R. Lindh, A. I. Krylov, A. A. Granovsky, C. Angeli, M. Olivucci, *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 4495–4506.
- [25] M. Caricato, B. Mennucci, G. Scalmani, G. W. Trucks, M. J. Frisch, *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 084102.
- [26] F. Santoro, D. Jacquemin, *WIREs Comput Mol Sci* **2016**, *6*, 460–486.
- [27] U. N. Morzan, D. J. A. de Armiño, N. O. Foglia, F. Ramírez, M. C. G. Lebrero, D. A. Scherlis, D. A. Estrin, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 4071–4113.
- [28] E. Pieri, V. Ledentu, M. Huix-Rotllant, N. Ferré, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 23252–23261.
- [29] E. Pieri, V. Ledentu, M. Sahlin, F. Dehez, M. Olivucci, N. Ferré, *J. Chem. Theory Comput.* **2019**, *15*, 4535–4546.
- [30] T. J. Zuehlsdorff, C. M. Isborn, *J. Chem. Phys.* **2018**, *148*, 024110.
- [31] F. Santoro, A. Lami, R. Improta, J. Bloino, V. Barone, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 224311.

- [32] D. Case, I. Ben-Shalom, S. Brozell, D. Cerutti, I. T.E. Cheatham, V. Cruzeiro, T. Darden, R. Duke, D. Ghoreishi, M. Gilson, H. Gohlke, A. Goetz, D. Greene, R. Harris, N. Homeyer, Y. Huang, S. Izadi, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, D. Mermelstein, K. Merz, Y. Miao, G. Monard, C. Nguyen, H. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, F. Pan, R. Qi, D. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C. Simmerling, J. Smith, R. Salomon-Ferrer, J. Swails, R. Walker, J. Wang, H. Wei, R. Wolf, X. Wu, L. Xiao, D. York, P. Kollman.
- [33] J. Mongan, D. A. Case, J. A. McCammon, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 2038–2048.
- [34] D. M. Y. Jason M. Swails, A. E. Roitberg, *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10*, 1341–1352.
- [35] J. J. P. Stewart, MOPAC 2016, <http://openmopac.net/>, **2016**.
- [36] N. Ferré, J. G.Ángyán, *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *356*, 331–339.
- [37] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, D. J. Fox, Gaussian 16 Revision B.01, Gaussian Inc. Wallingford CT, **2016**.
- [38] M. Barbatti, M. Ruckebauer, F. Plasser, J. Pittner, G. Granucci, M. Persico, H. Lischka, *Rev.: Comput Mol Sci.* **2014**, *4*, 26–33.
- [39] C. García-Iriepa, M. Zemmouche, M. Ponce-Vargas, I. Navizet, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 4613–4623.

Article IV

pH-dependent absorption spectrum of
oxyluciferin analogues in the active site of
firefly luciferase

PCCP

Physical Chemistry Chemical Physics

Accepted Manuscript

This article can be cited before page numbers have been issued, to do this please use: N. M. De Almeida Barbosa, P. Gosset, E. Real, V. Ledentu, P. Didier and N. Ferré, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2020, DOI: 10.1039/D0CP02514C.



This is an Accepted Manuscript, which has been through the Royal Society of Chemistry peer review process and has been accepted for publication.

Accepted Manuscripts are published online shortly after acceptance, before technical editing, formatting and proof reading. Using this free service, authors can make their results available to the community, in citable form, before we publish the edited article. We will replace this Accepted Manuscript with the edited and formatted Advance Article as soon as it is available.

You can find more information about Accepted Manuscripts in the [Information for Authors](#).

Please note that technical editing may introduce minor changes to the text and/or graphics, which may alter content. The journal's standard [Terms & Conditions](#) and the [Ethical guidelines](#) still apply. In no event shall the Royal Society of Chemistry be held responsible for any errors or omissions in this Accepted Manuscript or any consequences arising from the use of any information it contains.

Cite this: DOI: 00.0000/xxxxxxxxxx

pH-dependent absorption spectrum of oxyluciferin analogues in the active site of firefly luciferase[†]Nuno Manuel de Almeida Barbosa,^a Pauline Gosset,^b Eléonore Réal,^b Vincent Ledentu,^a Pascal Didier^b and Nicolas Ferré^{*a}

Received Date

Accepted Date

DOI: 00.0000/xxxxxxxxxx

In the quest for the identification of the light emitter(s) responsible for the firefly bioluminescence, the study of oxyluciferin analogues with controlled chemical and electronic structures is of particular importance. In this article, we report the results of our experimental and computational investigation of the pH-dependent absorption spectra characterizing three analogues bound into the luciferase cavity, together with adenosine-monophosphate (AMP). While the analogue microscopic pK_a values don't differ much from their reference values, it turns out that AMP protonation state is analogue-dependent and never doubly-deprotonated. Careful analysis of the interactions evidences the main role of E344 glutamic acid, as well as the flexibility of the cavity which can accommodate any oxyluciferin analogue. The consideration of the absorption spectra suggests that the oxyluciferin enolate form has to be excluded from the list of the bioluminescence reaction products.

1 Introduction

Bioluminescence, ie the ability of various living species to emit light, is characterized at the molecular scale by a complex biochemical reaction catalyzed by an enzyme called luciferase which eventually produces a light emitter called oxyluciferin^{1–4}. In the case of firefly and some other beetles, the oxyluciferin molecule, 2-(6'-hydroxybenzothiazol-2-yl)-4-hydroxythiazole, shows a chemical structure featuring two deprotonation sites and one tautomerization site⁵. Depending on the pH^{6,7} and on the electrostatic interactions with its surroundings^{8,9}, for instance with adenosine-monophosphate (AMP, Figure 1A) which is also produced during the bioluminescence reaction, oxyluciferin can formally exist in 6 different forms (Figure 1B), all being possibly involved into the light emission process¹⁰.

Accordingly, the elucidation of the oxyluciferin light-emitting form(s) has been, and still is, a long-lasting debate which fostered numerous experimental and theoretical investigations^{11–13}. While the phenolate-keto form is the most likely emitter up-to-date, the phenolate-enol and phenolate-enolate forms still remain potential candidates¹⁴. In order to disentangle the deprotonation

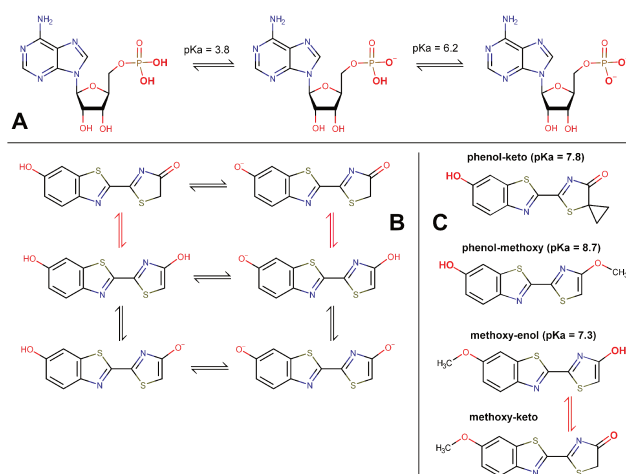


Fig. 1 A: adenosine monophosphate neutral, singly deprotonated and doubly protonated forms with titratable sites in bold. B: 6 possible forms of oxyluciferin (black double arrows indicate acid-base equilibrium, red ones indicate tautomerization). C: structures of the 3 considered titrating analogues together with the keto tautomer of the last analogue.

and tautomerization chemical reactions that are controlling the relative populations of the 6 oxyluciferin forms, several chemical analogues have been proposed, synthesized and studied spectroscopically and computationally^{15–22}. In the present work, we focus on 3 analogues (Figure 1C) which have been characterized experimentally¹⁷. At variance with two of them (phenol-keto, phenol-methoxy), the third one (methoxy-enol) can un-

^a Aix-Marseille Univ, CNRS, ICR, Marseille, France. Tel: +33 413945889; E-mail: nicolas.ferre@univ-amu.fr

^b Université de Strasbourg, UMR 7021 CNRS, Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, Strasbourg, France.

[†] Electronic Supplementary Information (ESI) available: CpHMD parameters, details of the titrating residue selection, titration curves, trajectory analysis, analysis of the interactions. See DOI: 10.1039/cXCP00000x/

dergo tautomerization and co-exist with a fourth form (methoxy-keto) which does not titrate. Overall, these analogues are particularly suited to the investigation of pH effects.

The most important spectroscopic features of these analogues in water have already been determined by means of steady-state UV-visible absorption and emission spectroscopies^{15,17}, time-resolved spectroscopies²³, as well as using computational approaches, mainly rooted in the time-dependent density functional theory^{22,24}. Changing the pH has a clear impact on the analogue absorption spectra. When protonated, all analogues absorb in the 300–450 nm range with λ_{max} being about 380 nm. At pH values larger than 8, the phenol-keto form is fully deprotonated and exhibit a first absorption band with λ_{max} being 480 nm, ie 100 nm red-shifted with respect to the protonated form. Regarding the phenol-methoxy and the methoxy-enol analogues, their protonated and deprotonated corresponding spectra only differ by 50 nm. Considering the possible interaction between the analogues and AMP (still in water), it has been shown that AMP does not modify significantly the absorption spectra, at all pH values between 5 and 11, even when a bounded complex is formed between AMP and the analogue²².

Since the analogue photophysical properties are dependent on their environment, the next step consists in studying them when inserted into their natural host: the luciferase protein. In the present article, we report the results of our investigation of pH effects on the absorption spectrum of the 3 oxyluciferin analogues in the *Photinus pyralis* firefly luciferase, in the presence of AMP. To this end, we used steady-state absorption spectroscopy and the recently-reported CpHMD-then-QM/MM modeling protocol^{25,26} which enables to sample both the conformational and the protonation state spaces (Constant-pH Molecular Dynamics, CpHMD)^{27,28} before running thousands of hybrid Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) calculations²⁹.

2 Experimental Section

2.1 Preparation of oxyluciferin analogues in luciferase, experimental absorption spectra

Oxyluciferin analogues have been synthesized following the procedure previously reported¹⁷. Stock solutions of all compounds were prepared in spectroscopic grade DMSO (Sigma-Aldrich) and stored in several aliquots at 4°C. The buffers were prepared by diluting a 1M stock solution in deionized, Millipore-purified water (18.2M Ω). Buffered stock solutions were prepared as follows: 75mM NaCl/20mM KH₂PO₄/0.2mM MgCl₂ for pH=6 and 75mM NaCl/25mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS)/0.2mM MgCl₂ for pH=9, and PBS for pH=7.5. The pH of the buffers was adjusted with 250mM HCl or with 250mM NaOH separately at 20°C. Luciferase was expressed in BL-21 (DE3*) E. coli bacteria cells using *Photinus Pyralis* plasmid and purified according to a previously published protocol³⁰. After purification, final solution was mixed with 10% of glycerol and aliquots were frozen with liquid nitrogen and stored at –80°C. The compounds stock solutions were finally diluted in the prepared aqueous buffer of different pH to a final concentration of 1 μ M (5% DMSO) with 10 μ M of luciferase and 3mM of AMP. A analogue/luciferase ratio

of 1/10 was used to avoid the contribution of unbound analogues. Absorption spectra were recorded with a Cary-4000 spectrometer (Agilent Technologies). The abrupt change in absorbance signal around 350 nm is an experimental artefact associated to the switch between the UV and visible lamps used in the spectrophotometer. The effect is more pronounced for diluted samples.

2.2 CpHMD and molecular parameters

In this work, 8 different systems were modeled considering the 3 different synthetic oxyluciferin analogues with one of them featuring two different tautomers, AMP in two possible acid-base equilibrium (neutral/singly deprotonated or singly deprotonated/fully deprotonated, respectively denoted AMP1 or AMP2 in the following) and the crystallographic protein structure of firefly luciferase in its second catalytic conformation (PDB 4G37)³¹. Similar setup was used in a previous study³². Aiming to parametrize non-standard residues as titratable ones in Amber18³³, partial atomic charges and reference energies were derived using the restrained electrostatic potential (RESP) method and the `finddgreff` tool respectively. Parametrization has been performed using molecular structures optimized at the B3LYP/6-311G(2d,p) level of theory when not available in previous studies^{21,22}. Parameters are reported in ESI first section†.

These systems were solvated in a cubic water box ensuring a distance of 20 Å between the protein and the box side, using the TIP3P water model. Each system was then equilibrated in the following way: (i) 20000-step energy minimized with restraints on the protein backbone atoms (5 kcal/mol/Å²), (ii) slowly heated up to 300 K and (iii) equilibrated for 5 ns without any restraints. In order to calculate the microscopic pK_a values of selected residues (including the analogue and AMP) along the pH interval of interest, we performed 6 CpHMD production runs of 60 ns for pH values between 6.5 and 9.0. Because of some convergence problems, the Replica Exchange protocol was used in the case of the phenol-keto/AMP1 system in order to improve the sampling of both the conformational and the protonation state spaces. All MD simulations were performed with Amber³³ software, using the ff14SB³⁴ force field parameters.

2.3 Iterative selection of the titrating residues

The very large number (157) of titratable residues in luciferase (Figure 2) does not allow a complete titration of the protein due to the computational cost of such calculation (the total number of protonation microstates is larger than 10⁴⁷). Furthermore, in the pH window we are interested in, some residues will remain either deprotonated or protonated. Thus, the careful selection of the most relevant residues to titrate is essential. Owing to our previous experience with Anabaena Sensory Rhodopsin, the application of our minimal electrostatic model³⁵ has shown that titratable residues located very far from the chromophore or at the border with the protein surroundings does not contribute much to the absorption spectrum. In the case of luciferase, such a tiny effect is fully screened by the one due to the titratable residues closer to the oxyluciferin analogue. Consequently, the selection process excludes titratable residues not close enough to the chro-

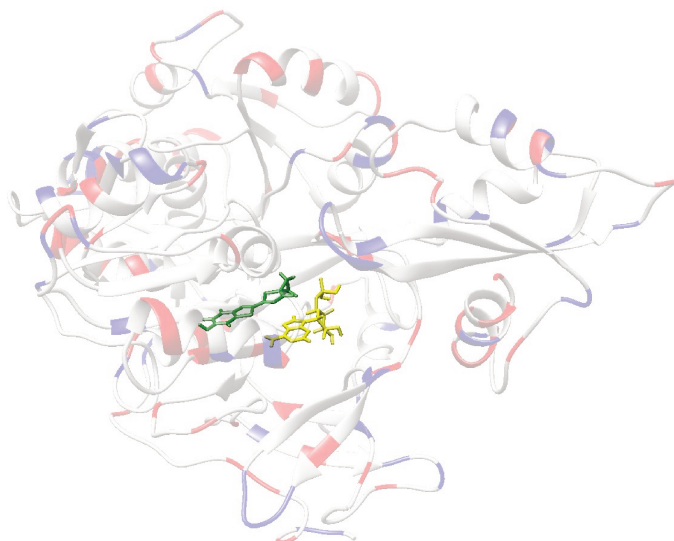


Fig. 2 Graphical representation of the luciferase protein, including all titratable residues in blue (positively charged) and red (negatively charged). AMP is colored in yellow and the oxyluciferin analogue is colored in green.

mophore and, for keeping the computational cost affordable, at most 20 residues have to be selected.

Besides the previous electrostatic point of view, the pK_a of the relevant residues should be such that they titrate in the 6.5 to 9.0 pH range we are interested in. Considering the pH-dependent deprotonated fraction x_i of the residue i ³⁶:

$$x_i(\text{pH}) = \frac{1}{1 + 10^{n_i(\text{p}K_a^i - \text{pH})}} \quad (1)$$

we assume that the residue i co-exists in both the protonated and deprotonated forms (ie it titrates) if its x_i ranges from 0.1 to 0.9. According to Equation (1), this condition translates to $\text{p}K_a^i - 1/n_i \leq \text{pH} \leq \text{p}K_a^i + 1/n_i$.

Since the Hill factor n_i reflects the possible interactions of i with other titrating residues, as well as structural fluctuations of its surroundings, we have first estimated n_i using several representative geometries. Clustering of MD trajectory snapshots (using heavy-atom root mean square deviation lower than 1.8 Å as a selection threshold) has been performed in order to extract N (typically 10 to 20) clusters. An average deprotonated fraction is then calculated according to:

$$\langle x_i(\text{pH}) \rangle = \sum_{k=1}^N w_k x_{i,k}(\text{pH}) \quad (2)$$

where w_k is the statistical weight of the cluster k and $x_{i,k}(\text{pH})$ is the deprotonated fraction of the residue i in the fixed environment of the cluster k :

$$x_{i,k}(\text{pH}) = \frac{1}{1 + 10^{(pK_{a,i,k}^i - \text{pH})}} \quad (3)$$

Finally, for each titrating residue a Hill factor n_i is determined by fitting this mean deprotonated fraction with the Hill equation already discussed (Equation 1). All $\text{p}K_a^{i,k}$ value are obtained using the PROPKA3.1 software.³⁷

Using this set of n_i Hill factors, the workflow of the titrating residue selection goes as follows. First, we carry out a $\text{p}K_a$ calculation on the most representative clusters extracted from a standard (fixed microstate) equilibrated MD trajectory. Second, a preliminary CpHMD run is performed considering a reduced set of 5 titrating residues. Afterwards, a new clustering is performed using the CpHMD trajectories before to calculate new $\text{p}K_a$ values of all titratable residues. After examination of these $\text{p}K_a$ values, the final set of titrating residues is selected (14 to 16 residues, depending on the considered system, the list is given in ESI Section 2†). Eventually a final CpHMD computation is performed.

2.4 QM/MM computations

Considering 30000 equally spaced snapshots extracted from the CpHMD trajectories, we calculated their QM/MM transition energies. The QM/MM partitioning defined the analogue and AMP as part of the quantum mechanics (QM) subsystem and the protein and solvent as part of the molecular mechanics (MM) subsystem. In order to describe the electrostatic interaction between QM/MM subsystems, we have included the MM external potential as extra diagonal elements in the semi-empirical PM7 Fock operator. Vertical excitation energies and transition oscillator strengths have been obtained using the Multi-Electron Configuration Interaction (MECI)³⁸ implemented in MOPAC 2016 program³⁹. The absorption spectra have been generated using the Newton-X 2.0 package⁴⁰.

3 Results and Discussion

3.1 CpHMD titration analysis

The $\text{p}K_a$ values of the titrating sites (selected amino-acids, oxyluciferin analogue, AMP) can be obtained from CpHMD calculations by fitting individual microstate population curves using a generalized Henderson-Hasselbach equation in which collective effects are modeled thanks to the Hill factor (see ESI Section 3†). In order to understand the environmental effect on the $\text{p}K_a$ values of oxyluciferin analogues and AMP, we have considered two different references: the free molecules in water and the analogue-AMP complexes in water. According to our previous study²², aqueous AMP only exists in deprotonated forms in the pH range we are interested in. In other words, only the second deprotonation equilibrium AMP2 is relevant in water (in the 6 to 9 pH range). According to Table 1, it turns out that the analogue $\text{p}K_a$ values do not change much when they are interacting with AMP. Conversely, AMP $\text{p}K_a$ always increases when it is associated with one analogue. Nevertheless, all analogues and AMP are titrating in the 6.5 to 9.0 pH window.

However, when AMP and one analogue are inserted into the luciferase cavity, their $\text{p}K_a$ values change dramatically.

- *AMP + phenol-keto*. This analogue is characterized by a $\text{p}K_a$ value which is almost independent on its environment. Being 7.8 in water, it shifts down to 7.2 when complexed with AMP (AMP2 model), still in water. Then, when it interacts with both AMP and luciferase, its $\text{p}K_a$ value increases a bit, reaching 7.5 or 7.6, depending on the AMP model. On the other hand, AMP is characterized by two $\text{p}K_a$ values

Table 1 Calculated oxyluciferin analogues and AMP pK_a values (AMP1 - first deprotonation and AMP2 - second deprotonation) using CpHMD calculations ("free" column: pK_a values of each free molecule in water; "complex": pK_a values of analogue-AMP complexes in water; "protein": pK_a values of analogue and AMP inside the luciferase cavity). Experimental pK_a values are 3.8/6.2, 7.8, 8.7, 7.3 for AMP, phenol-keto, phenol-methoxy, methoxy-enol, respectively.

	free	complex	protein
phenol-keto / AMP1	7.8 / 3.8	7.8 / < 5.0	7.5 / 6.8
phenol-keto / AMP2	7.8 / 6.2	7.2 / 6.7	7.6 / > 9.0
phenol-methoxy / AMP1	8.7 / 3.8	8.7 / 5.0	> 9.0 / > 9.0
phenol-methoxy / AMP2	8.7 / 6.2	8.7 / 7.7	> 9.0 / > 9.0
methoxy-enol / AMP1	7.3 / 3.8	7.7 / < 5.0	> 9.0 / < 6.0
methoxy-enol / AMP2	7.3 / 6.2	7.3 / 6.7	> 9.0 / > 9.0
methoxy-keto / AMP1	- / 3.8	- / < 5.0	- / 6.2
methoxy-keto / AMP2	- / 6.2	- / 6.7	- / > 9.0

which are far from the ones obtained previously in water: 6.8 (AMP1) and > 9.0 (AMP2). In the 6.5–9.0 pH range: (i) the doubly-deprotonated form of AMP does not exit, (ii) both phenol-keto and AMP are titrating, both molecules being either electrically neutral or negatively charged (-1).

- *AMP + phenol-methoxy.* The pK_a values of the analogue and AMP (whatever the model, AMP1 or AMP2) are calculated to be larger than 9.0. Accordingly, the two molecules do not titrate and are always fully protonated (electrically neutral) in the considered pH range.
- *AMP + methoxy-enol.* Similar to the phenol-methoxy analogue, the methoxy-enol one features a pK_a value larger than 9.0. Conversely, AMP pK_a depends on the model: smaller than 6.0 in the case of AMP1, larger than 9.0 in the case of AMP2. Hence, methoxy-enol is always protonated while AMP remains singly deprotonated between pH=6.5 and pH=9.0.
- *AMP + methoxy-keto.* Of course, this analogue does not titrate. However AMP first deprotonation occurs at much higher pH with respect to its reference pK_a while AMP second deprotonation (that we did not consider in CpHMD) should not occur in the considered pH range, given the results obtained for the other analogues.

In summary, only phenol-keto is titrating with a pK_a equal to 7.8 while the other two analogues do not titrate in the pH range considered for this study. These results highlight not only the importance of which oxyluciferin analogue is present inside of the luciferase active site, but also that thorough consideration of AMP protonation state is required, its pK_a value being analogue-dependent. Of course, these differences demonstrate the sensitivity of the pK_a value to the fine details of the interactions between the analogue and its surroundings: AMP, close titrating or non-titrating residues, luciferase conformations, ... as demonstrated in the following.

3.2 Analysis of the interactions in the active site

We hereafter present the most important interactions that can be attributed to the presence of the oxyluciferin analogue within the luciferase active site. We have selected some important residues using the criteria that their distances from the analogue and AMP titratable groups must be less than 16 Å (further titratable residues would always contribute negligibly to the pH-dependent absorption spectrum), as represented in Figure 3. As a first note,

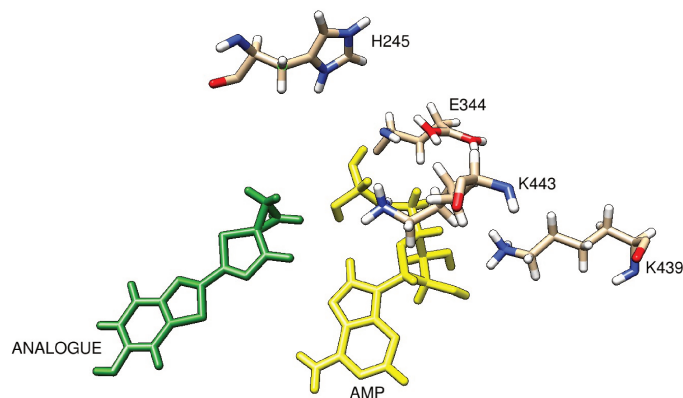


Fig. 3 Graphical representation of the 4 most important titrating residues around the oxyluciferin analogues (herein, the phenol-keto one) and AMP.

it should be mentioned that most of the selected titrating residues are closer to AMP than to the analogue. In the framework of the minimal electrostatic interaction model³⁵, this explains why AMP pK_a is much more pH-dependent than the analogue one (Table 1).

Small distances between AMP and titrating residues call for the consideration of possible proton exchange between titrating sites. Plotting protonation state populations along each CpHMD trajectory does not evidence any prevalence of such a mechanism (see ESI section 4†). The distance-based analysis is represented graphically in Figure 4. A thorough description of the analogue or AMP atoms participating to these interactions is included in ESI section 5†.

Starting with the phenol-keto analogue (Figure 4) top-left panel), the principal interactions are found along a rather long pathway, E311–R337–analogue–K443–AMP–E344, with an average inter-residue distance of 5 Å. On average, the analogue is slightly more often deprotonated than protonated, its negative charge being stabilized by R337 positive charge which, in turn, interacts with deprotonated E311. The analogue keto side also stays close to H245, K443 and AMP, highlighting the steric hindrance due to the cyclopropyl moiety (Figure 1C). AMP mainly carries a negative charge which is stabilized by its interaction with lysine K443 and to a lesser extent, K439. Interestingly, a close contact is evidenced between AMP and E344, both being mainly deprotonated, hence negatively charged.

In the case of phenol-methoxy analogue (Figure 4 top-right panel), several sets of close interactions ranging from 4 to 7 Å are found. The first one, very stable in the considered pH range, involves H245, the analogue and AMP, all of them being electrically neutral. The negative charge carried by E344 is mainly counterbalanced by K439 positive one. A third contact is found

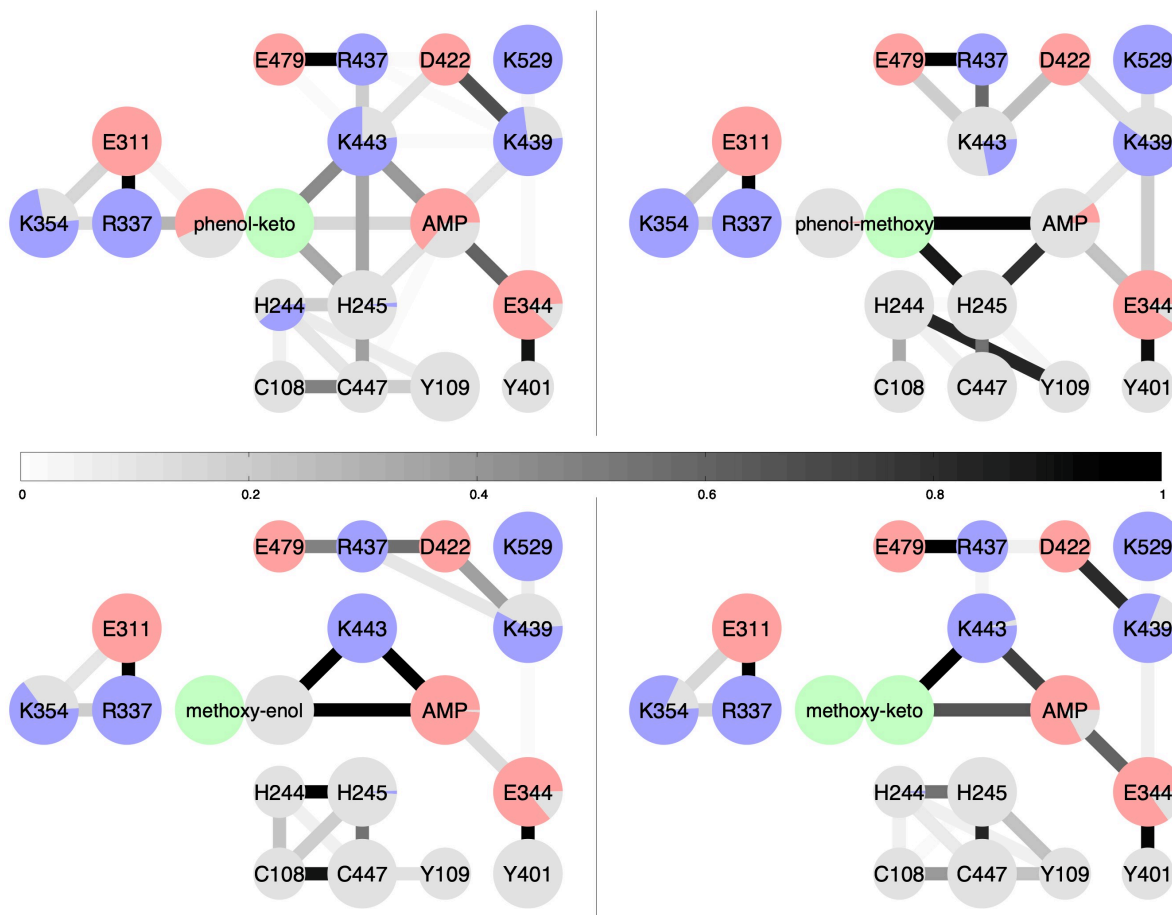


Fig. 4 Distance-based interaction analysis between analogues, AMP and relevant titratable residues. Blue, grey and red colors indicate positive, neutral and negative charged residues. Circle sub-surfaces are proportional to the average (de)protonated fraction. Analogue non-titratable moieties are represented in green. Inter-residue interactions are represented by segments whose color (from light gray to black) is proportional (central bar) to the fraction of close contacts (< 5 Å). Residues with titratable neighbors not reported on this diagram are represented by a reduced size circle, eg E479, D422, ...

between the electrically neutral H244 and Y109. K443 being 80% neutral, it remains close to the R437/E479 ion pair.

The methoxy-enol analogue and its tautomer form, methoxy-keto, share a common strong contact between the analogue, K443 and almost always deprotonated AMP. As a matter of fact, whatever its form, the analogue remains electrically neutral. AMP is more strongly interacting with E344 in the methoxy-keto case. Other electrically neutral groups can be found: E311–R337, R437–E479, D422–K439.

The general picture that can be drawn from this analysis involves local charge compensations, achieving local electroneutrality. For instance, when the analogue is partially negatively charged (phenol-keto), it interacts with R337. If not, the analogue is found closer to AMP (phenol-methoxy, methoxy-enol, methoxy-keto). Actually, the AMP case is more complex: depending on the analogue, it changes from neutral (phenol-methoxy) to partially negatively charged (phenol-keto and methoxy-keto) to fully deprotonated (methoxy-enol). If its charge neutralization is mainly due to K443, AMP is also interacting quite strongly with negatively charged E344, preventing local electroneutralization to occur. It turns out that steric hindrance explains this

behavior. The atomic density around E344 (Figure 5) is much higher than the one calculated for the other residues shown in Figure 3. This constrained environment induces concerted motions of the E344+AMP+Y401 cluster, the latter residue being hydrogen-bonded with E344 (Figure 6). Based on this analysis, we emphasize that the proximity of E344 negative charge with AMP explains why AMP second deprotonation does not occur in luciferase, at variance with what is found in water²².

Having considered the principal structural features within the full pH window, we now turn to a more detailed analysis of the pH effect on the analogue and AMP environment. Knowing the role that solvent has on protein structural stability and function, it is expected that pH can influence the water local concentration inside the active site of luciferase. Such property is monitored by means of radial distribution function (RDF) analysis between the oxygen atom of the analogue titratable group and the oxygen atom of water molecules (Figure 7). Given their identical titratable moieties, phenol-keto and phenol-methoxy analogues exhibit a first solvation shell with a maximum at the same distance of about 2.7 Å. However, while the number of water molecules is pH-independent in the latter analogue (slightly larger than 1), this

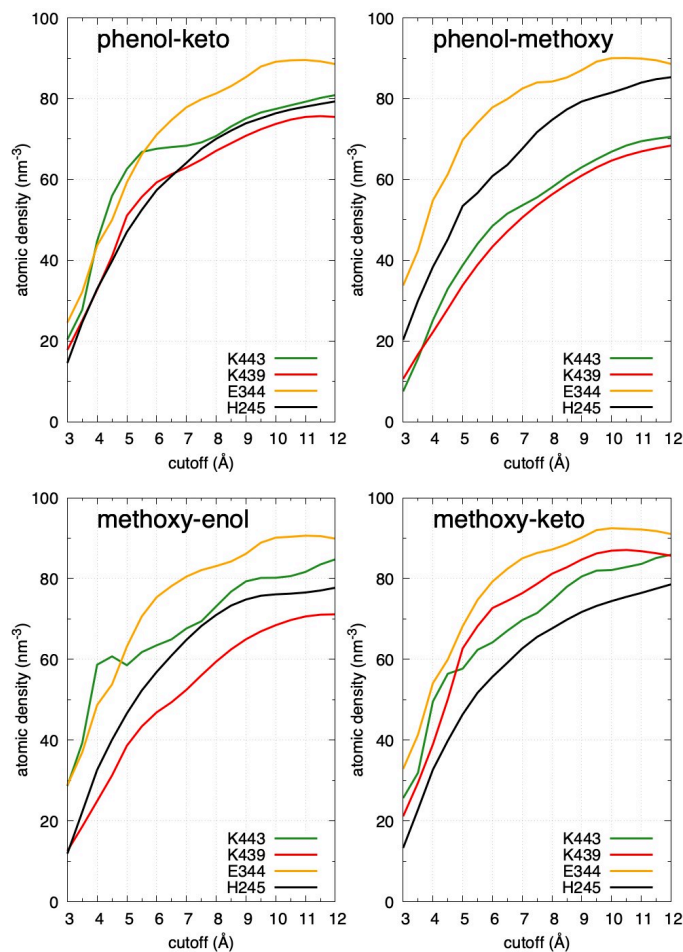


Fig. 5 Atomic density analysis for each analogue.

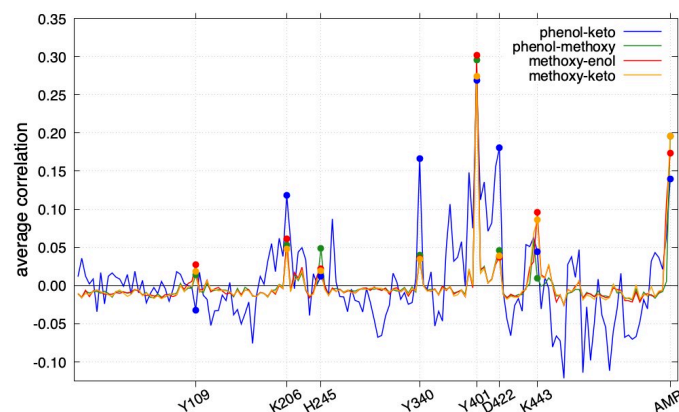


Fig. 6 E344 motion correlated with other residues in luciferase. In the case of phenol-keto, the replica-exchange technique used in the CpHMD calculation resulted in a larger sampling of the conformational space, explaining the observed larger motion correlations. In all, the main correlations are the same for all analogues and involve the residues explicitly mentioned below the x-axis.

value is much more changing in the former one: from less than 1 to more than 2 with increasing pH. This different behavior reflects the phenol deprotonation process in phenol-keto while phenol-methoxy remains neutral in the pH window. The methoxy-enol

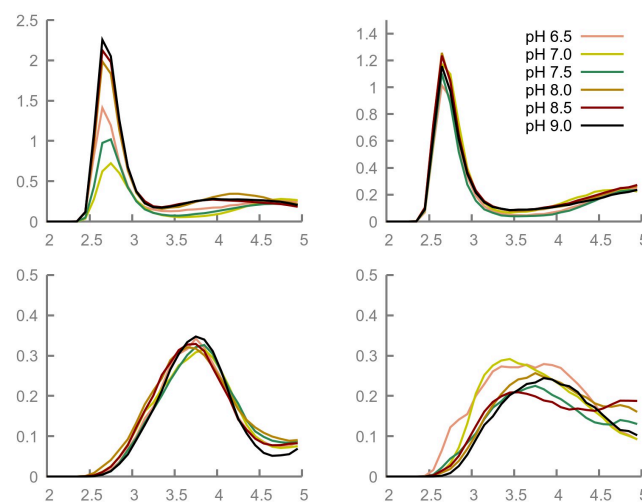


Fig. 7 Normalized radial distribution function of the analogue titrating O10/O11 – water O interatomic distance (in Å): phenol-keto (top left), phenol-methoxy (top right), methoxy-enol (bottom left), methoxy-keto (bottom right). Analogue atom numbering available in ESI†

analogue shows a different solvent organization when compared with the other two analogues: its first solvation shell is located at around 3.8 Å from its titrating enol group and hosts less than 0.4 water molecules. Such a difference can be attributed to the analogue orientation in the luciferase cavity, its enol group facing the AMP deprotonated phosphate moiety. Similarly to methoxy-enol, methoxy-keto does not interact with much water molecules. Moreover, these interactions are weaker, resulting in a less structured solvent organization.

To complement the previous analysis, we have calculated the distribution of distances between the analogue (still using the oxygen atom carrying the labile proton) and AMP phosphate P atom (Figure 8), to better understand the possible motion that each analogue can experience, as a function of pH. Regarding the

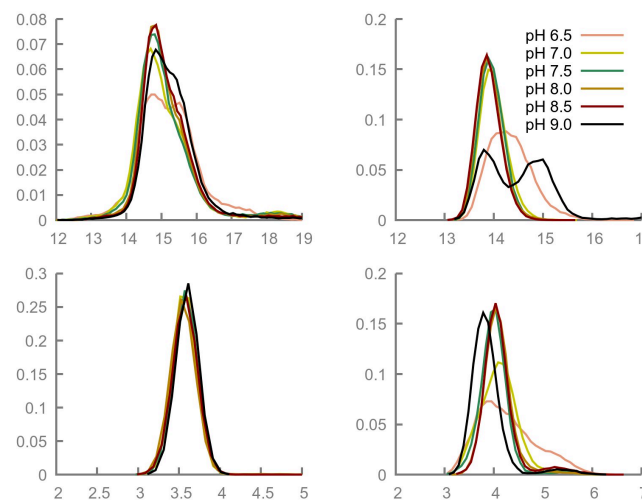


Fig. 8 Normalized radial distribution function of the analogue O10/O11 – AMP PA interatomic distances (in Å): phenol-keto (top left), phenol-methoxy (top right), methoxy-enol (bottom left) and methoxy-keto (bottom right). Analogue atom numbering are available in ESI†

phenol-keto analogue, two contributions are found: the largest one is centered at around 14.8 Å, while the second one, only appears at 15.7 Å as a small shoulder for pH values 6.5 and 9. Phenol-methoxy-AMP presents 2 distinct populations at pH 9 (13.8 and 15 Å), whereas for the remaining of the considered pH range, only single distributions are observed at approximately 13.9 and 14.3 Å. Such a behavior is difficult to explain: both the analogue and AMP do not titrate. However, we can notice large variations of two lysine protonation state populations, K439 and K443 which, in turn, may induce some local structural modifications responsible for these modified phenol-methoxy-AMP interactions. The methoxy-enol shows virtually no pH-induced variation of its distance with AMP, its position is particularly stable inside of the cavity due the strong interactions with AMP and K443 (Figure 4). Methoxy-keto demonstrates almost no variations of its distance with AMP, whatever the pH value. The broader distribution found at pH=6.5 can be attributed to AMP titration, its pK_a being 6.2 (Table 1). Such analogue- and pH-dependent behaviors can be rationalized using even finer details in the interactions between the analogue, AMP and their surroundings. The first one involves the translation and rotation of the phosphate group in AMP (ESI section 5†). Actually, it turns out that AMP can exist in two different principal conformations, folded and extended as represented in ESI section 5†. The equilibrium between these two structures is particularly apparent in phenol-keto, in which the cyclopropyl moiety is preventing the analogue to interact with AMP. Also apparent in the analysis of the atomic density around the analogue (Figure 9) in which the AMP contribution is much lower for the phenol-keto analogue, it calls for a closer look to the cavity in which the analogue lies. Selecting the residues which are (i) the closest to AMP and the analogue, hence defining the cavity, and (ii) whose side-chains are clearly mobile (the contact analysis reported in ESI section 5† shows that the backbone atoms belonging to the cavity are rather fixed while the side-chain ones are not), the analysis of their motions demonstrates that the cavity is flexible enough to adapt its shape to the presence of any of the analogues.

3.3 Experimental and computational absorption spectra

In this section, we compare the experimental and theoretical absorption spectra of the analogues and AMP1 within the active site of the enzyme luciferase, at pH values ranging from 6.5 to 9.0. These spectra are reported in Figures 10, 11 and 12. Corresponding maximum absorption wavelengths are summarized in Table 2.

Remembering that phenol-keto is the only analogue titrating in the considered pH window, we expect its absorption spectrum to change dramatically with the pH. This is indeed the case, either looking at the experimental spectrum or at the calculated one (Figure 10). At acidic pH, two intense experimental bands appear with maximum wavelengths at 400 nm and 355 nm (Table 2), that could either correspond to the two first allowed electronic transitions, quite energetically close, or to some vibronic progression in the first allowed transition. In the same 300 to 450 nm window, the computed spectrum only shows one band

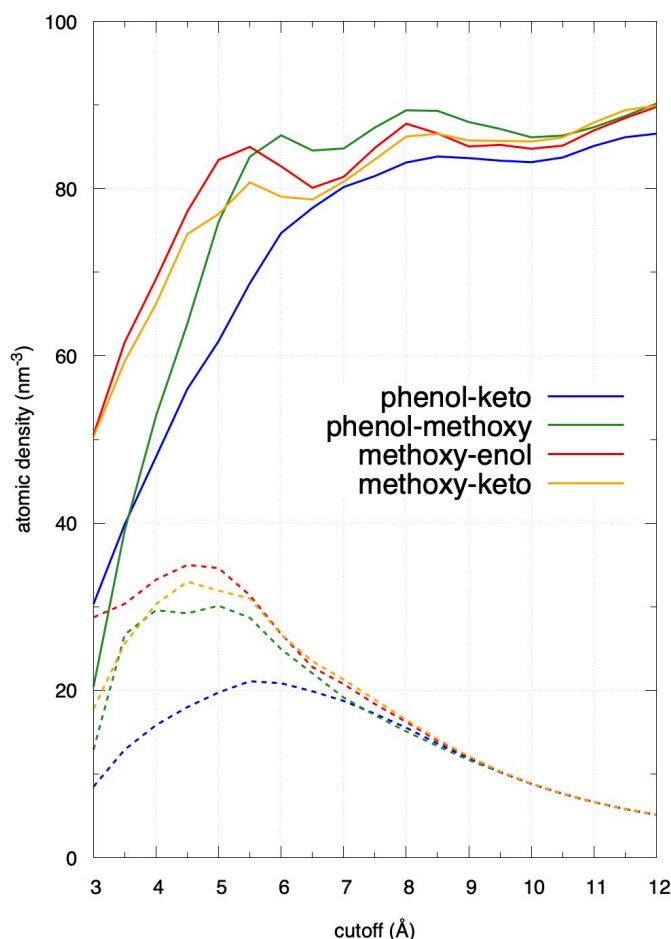


Fig. 9 Atomic density around the each analogue (using the oxygen atom closest to AMP as the reference). Plain lines: full densities; dashed lines: AMP contributions.

Table 2 Experimental and computed maximum absorption wavelengths in nm. In the case of the methoxy-enol analogue, the experimental spectrum includes the contribution from its tautomer, methoxy-keto, while both contributions are computed separately.

Analogue	Acidic pH		Neutral pH		Basic pH	
	Exp	Comp	Exp	Comp	Exp	Comp
phenol-keto	355	351	352	365	350	384
	400	562	399	505	483	481
phenol-methoxy	381	368	381	366	396	367
methoxy-enol	386	373	387	372	386	372
methoxy-keto		344		349		347

with maximum wavelength at 351 nm. Using the semi-empirical PM7 Hamiltonian does not allow to calculate possible vibronic couplings. Nevertheless, some of the vertical excitation calculations have been repeated using Time-Dependent Density Functional Theory B3LYP/6-311G(2d,p) on a restricted set of 1000 structures. Indeed, the corresponding spectrum shows two transitions with maxima at 371 and 400 nm (see ESI section 6†), in agreement with the experimental spectrum. We shall also notice

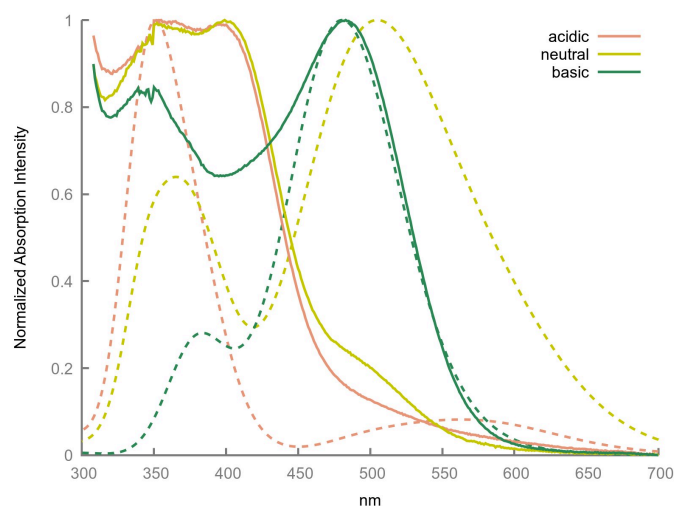


Fig. 10 Normalized experimental (full lines) and calculated (dash lines) absorption spectra of phenol-keto analogue. Experimental pH values: 6.0, 7.4 and 9.0; theoretical pH values: 6.5, 7.5 and 9.0.

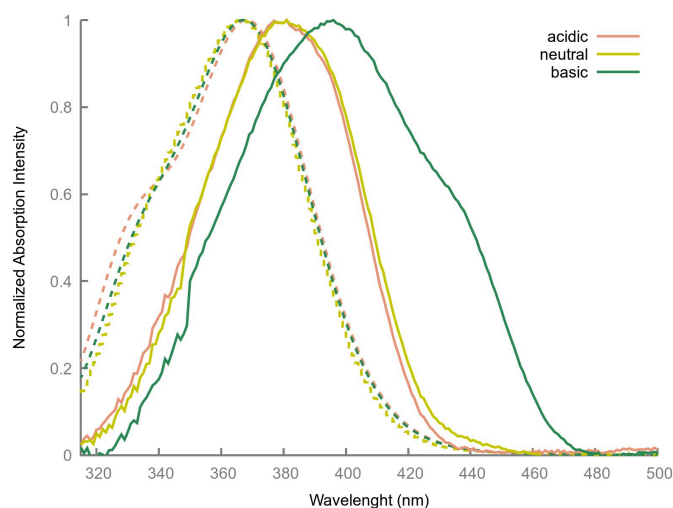


Fig. 11 Normalized experimental (full lines) and calculated (dash lines) absorption spectra of phenol-methoxy analogue. Experimental pH values: 6.0, 7.4 and 9.0; theoretical pH values: 6.5, 7.5 and 9.0.

the broad (450 to 700 nm) but not intense computed band. Analyzing the protonation microstate populations coming out of the corresponding CpHMD trajectory, it turns out that the very modest phenolate-keto population in acidic conditions is responsible for this band. At pH=9.0, the experimental spectrum presents a band with a maximum at 483 nm. This band is accurately reproduced theoretically. The CpHMD-then-QMMM approach only overestimates by 2 nm the energy gap between the phenol-keto protonated and deprotonated absorption maxima. On the other hand, the computed spectrum features a much less intense band with maximum at 384 nm. This latter band also exists in the experimental spectrum at a much higher intensity and a maximum at about 350 nm. The pH=7.5 value is very close from the phenol-keto pK_a (Table 1). Accordingly, the corresponding absorption spectrum should appear as a combination of the acidic and basic ones. The experimental spectrum remains close to the acidic pH one, showing however a small shoulder (at about 500 nm) corresponding to the deprotonated form. Clearly the protonated form still prevails at neutral pH. However, the computed spectrum shows two distinct bands, hence indicating a more balanced population of the protonated and deprotonated forms. This theory vs experiment difference is certainly rooted into rather small deviations (0.1/0.2 units) between the calculated pK_a value and the experimental one. Given the very qualitative level of theory used in the QM/MM calculations, the small number of titrating residues and the rather short length of the CpHMD trajectories, the calculated spectrum is surprisingly in qualitative agreement with the experimental one.

According to the CpHMD results (Table 1), the phenol-methoxy does not titrate, nor does AMP. Accordingly, its absorption spectrum (Figure 11) should be mostly pH-independent. This isn't the case when looking at the experimental spectra. A single band appears at pH=6 and 7.5, with a maximum at 378 nm. Going to basic pH, the spectrum presents a large band, extending on more than 150 nm, with a maximum at 394 nm and a shoulder close

to 440 nm. The 16 nm gap between these maxima is equivalent to the one reported for this analogue in water²². Accordingly, the spectrum at pH=9 reflects the presence of both its protonated and deprotonated forms and that the phenol-methoxy pK_a is probably not very different from 9 (and similar to its value in water: 8.7), at variance with the CpHMD results. Because of this inaccurate calculated pK_a , the computed spectra only show a single band, very close to the experimental one for the protonated phenol-methoxy analogue. Nevertheless, the quasi perfect superposition of the spectra for acidic and neutral pH demonstrates that the titration of other amino-acids does not modify the photophysical properties of phenol-methoxy.

The methoxy-enol analogue does not titrate in the considered pH window (Table 1) and interacts with singly-deprotonated AMP. Moreover, it can co-exist with its tautomer form, methoxy-keto, which cannot titrate either. Accordingly, its absorption spectrum shall be pH-independent. Indeed, the experimental spectrum (Figure 12) confirms this finding, showing a single band with a maximum wavelength at 391 nm. The spectra of the methoxy-enol form computed at the 3 different pH values share the same shape: a single band with a maximum at 372 nm, hence 19 nm blue-shifted with respect with the experimental value. The computed spectra of the tautomer form is also reported in Figure 12. Its single band shape is further blue-shifted by 23 nm with respect to the methoxy-enol one. There is no direct way to estimate the relative ratio between the methoxy-enol and the methoxy-keto forms using the results obtained in the present study. However, the computed maxima wavelengths suggest the predominance of the enol form. As a matter of fact, the experimental spectra show the apparition of some kind of noisy shoulder at wavelengths shorter than 350 nm. This may indicate the existence of the analogue keto form.

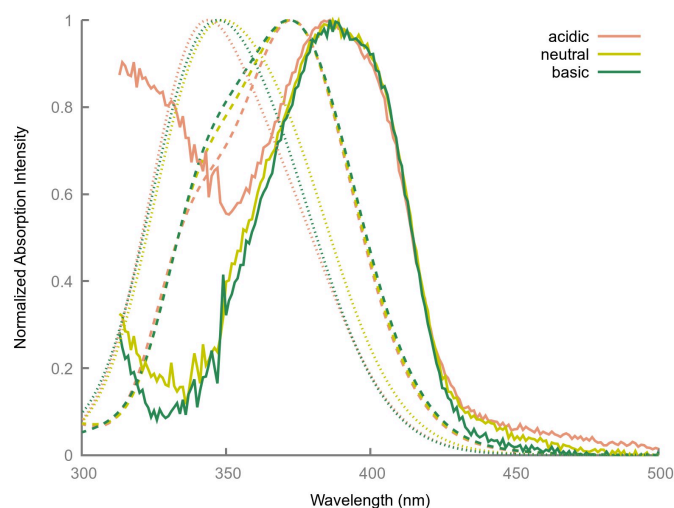


Fig. 12 Normalized experimental (full lines), calculated absorption spectra of methoxy-enol analogue (dashed lines) and its methoxy-keto tautomer (dotted lines). Experimental pH values: 6.0, 7.4 and 9.0; theoretical pH values: 6.5, 7.5 and 9.0.

4 Conclusions

Using steady-state absorption spectroscopy and the CpHMD-then-QM/MM computational protocol, we have investigated the pH-dependent properties of three different oxyluciferin analogues inside luciferase, the enzyme involved in the light emission of firefly bioluminescence.

At variance with results already obtained with the same analogues in water^{17,22}, the present results evidence different behaviors for each analogue in the 6 to 9 pH range. Showing a pH-dependent spectrum in water and in luciferase, the phenol-keto analogue is titrating in this pH window. However, while AMP is also titrating, this molecule co-exists in neutral and singly-deprotonated forms in luciferase, instead of singly- and doubly-deprotonated forms in water. Indeed, the AMP second deprotonation is disfavoured in the protein because of the strong interaction between AMP and the negatively charged glutamate E344. The same applies to the other analogues for which the doubly-deprotonated AMP never exists.

In luciferase, the phenol-methoxy analogue spectrum is modified with the pH the same way it is in water. However, AMP remains always fully protonated for pH ranging from 6 to 9. While the CpHMD pK_a value of this analogue in luciferase is proposed to be much larger than 9, the modification observed in its experimental spectrum indicates a pK_a value not so different from 9.

The behavior of the third analogue, methoxy-enol, strongly depends on its environment. While it is titrating in water, this is no longer the case in luciferase: the enolate form is absent at any considered pH value. AMP does not titrate either, it is always singly-deprotonated. Accordingly, the absorption spectrum of this analogue, even if its methoxy-keto tautomer form is taken into account, does not change with the pH.

The absorption spectrum of the natural oxyluciferin in luciferase is pH-dependent⁷. According to our present results, especially the pH-independent absorption spectrum of the methoxy-

enol analogue, we would then suggest that the oxyluciferin enolate form does not exist as a product of the chemical reaction responsible for firefly bioluminescence. Nevertheless, we want to stress that the replacement of oxyluciferin with one analogue induces a significant reorganization of the flexible luciferase cavity, as the distance analysis has shown in the present work. Further developments would imply the characterization of the possible pH-dependency of the analogue fluorescence. However, the direct application of the CpHMD-then-QM/MM protocol is tedious, since it would require tens of thousands of excited state geometry optimizations. Progress along this line will be reported soon.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

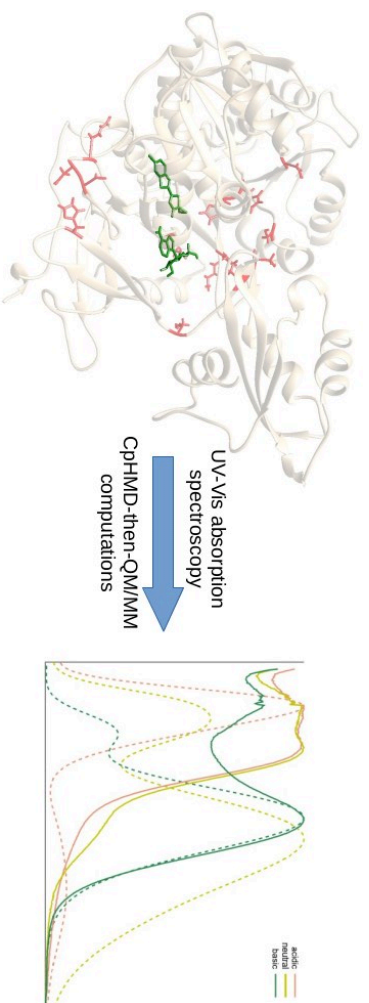
All the authors thank the French Agence Nationale de la Recherche for funding (grant ANR-16-CE29-0013-01, project BI-OLUM). Centre de Calcul Intensif d'Aix-Marseille is acknowledged for granting access to its high performance computing resources.

Notes and references

- 1 F. McCapra and M. J. Manning, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1973, 467 – 468.
- 2 B. Branchini, S. Daunert, L. Blum, L. J. Kricka, G. Zomer, J. W. Hastings, F. Berthold, A. Lundin, A. M. G. Campana, R. Niessner, T. K. Christopolous and C. Lowik, *Chemiluminescence and Bioluminescence*, The Royal Society of Chemistry, 2011, pp. P001 – 590.
- 3 J. Lee, *Photochem. Photobiol.*, 2017, **93**, 389–404.
- 4 M. Vacher, I. F. Galván, B.-W. Ding, S. Schramm, R. Berraud-Pache, P. Naumov, N. Ferré, Y.-J. Liu, I. Navizet, D. Roca-Sanjuán, W. J. Baader and R. Lindh, *Chem. Rev.*, 2018, **118**, 6927–6974.
- 5 P. Naumov, Y. Ozawa, K. Ohkubo and S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 11590–11605.
- 6 E. E. Dahlke and C. J. Cramer, *J. Phys. Org. Chem.*, 2003, **16**, 336–347.
- 7 Y. Ando, K. Niwa, N. Yamada, T. Enomoto, T. Irie, H. Kubota, Y. Ohmiya and H. Akiyama, *Nat. Photonics*, 2007, **2**, 44–47.
- 8 T. Nakatsu, S. Ichiyama, J. Hiratake, A. Saldanha, N. Kobashi, K. Sakata and H. Kato, *Nature*, 2006, **440**, 372–376.
- 9 T. Hirano, H. Nagai, T. Matsushashi, Y. Hasumi, S. Iwano, K. Ito, S. Maki, H. Niwa and V. R. Viviani, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, **11**, 1281–1284.
- 10 I. Navizet, Y.-J. Liu, N. Ferré, D. Roca-Sanjuán and R. Lindh, *ChemPhysChem*, 2011, **12**, 3064–3076.
- 11 G. Orlova, J. D. Goddard and L. Y. Brovko, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 6962–6971.
- 12 L. P. da Silva and J. C. E. da Silva, *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, **7**, 809–817.
- 13 L. P. da Silva and J. C. G. E. da Silva, *J. Phys. Chem. B*, 2015, **119**, 2140–2148.
- 14 V. R. Viviani, G. V. M. Gabriel, V. R. Bevilaqua, A. F. Simões, T. Hirano and P. S. L. de Oliveira, *Sci. Rep.*, 2018, **8**, 17594.

- 15 M. Rebarz, B.-M. Kukovec, O. V. Maltsev, C. Ruckebusch, L. Hintermann, P. Naumov and M. Sliwa, *Chem. Sci.*, 2013, **4**, 3803–3809.
- 16 X. Q. Ran, X. Zhou and J. D. Goddard, *ChemPhysChem*, 2014, **16**, 396–402.
- 17 A. Ghose, M. Rebarz, O. V. Maltsev, L. Hintermann, C. Ruckebusch, E. Fron, J. Hofkens, Y. Mély, P. Naumov, M. Sliwa and P. Didier, *J. Phys. Chem. B*, 2015, **119**, 2638–2649.
- 18 Y.-Y. Cheng and Y.-J. Liu, *J. Chem. Theory Comput.*, 2015, **11**, 5360–5370.
- 19 A. Ghose, O. V. Maltsev, N. Humbert, L. Hintermann, Y. Arntz, P. Naumov, Y. Mély and P. Didier, *J. Phys. Chem. B*, 2017, **121**, 1566–1575.
- 20 C.-G. Min, Q.-B. Liu, Y. Leng, S.-J. Huang, C.-X. Liu, X.-K. Yang, A.-M. Ren and L. P. da Silva, *Comput. Theor. Chem.*, 2018, **1133**, 18–24.
- 21 C. García-Iriepa, P. Gosset, R. Berraud-Pache, M. Zemmouche, G. Taupier, K. D. Dorkenoo, P. Didier, J. Léonard, N. Ferré and I. Navizet, *J. Chem. Theory Comput.*, 2018, **14**, 2117–2126.
- 22 N. M. de Almeida Barbosa, M. Zemmouche, P. Gosset, C. García-Iriepa, V. Ledentu, I. Navizet, P. Didier and N. Ferré, *ChemPhotoChem*, 2019, 1219–1230.
- 23 P. Gosset, G. Taupier, O. Crégut, J. Brazard, Y. Mély, K.-D. Dorkenoo, J. Léonard and P. Didier, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2020, 3653–3659.
- 24 C. García-Iriepa, M. Zemmouche, M. Ponce-Vargas and I. Navizet, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2019, **21**, 4613–4623.
- 25 E. Pieri, V. Ledentu, M. Huix-Rotllant and N. Ferré, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, **20**, 23252–23261.
- 26 E. Pieri, V. Ledentu, M. Sahlin, F. Dehez, M. Olivucci and N. Ferré, *J. Chem. Theory Comput.*, 2019, **15**, 4535–4546.
- 27 J. M. Swails and A. E. Roitberg, *J. Chem. Theory Comput.*, 2012, **8**, 4393–4404.
- 28 J. M. Swails, D. M. York and A. E. Roitberg, *J. Chem. Theory Comput.*, 2014, **10**, 1341–1352.
- 29 H. M. Senn and W. Thiel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 1198–1229.
- 30 C. Carrasco-López, J. C. Ferreira, N. M. Lui, S. Schramm, R. Berraud-Pache, I. Navizet, S. Panjkar, P. Naumov and W. M. Rabeh, *Life Science Alliance*, 2018, **1**, e201800072.
- 31 J. A. Sundlov, D. M. Fontaine, T. L. Southworth, B. R. Branchini and A. M. Gulick, *Biochemistry*, 2012, **51**, 6493–6495.
- 32 C. García-Iriepa and I. Navizet, *Molecules*, 2019, **24**, 1565.
- 33 D. Case, I. Ben-Shalom, S. Brozell, D. Cerutti, I. T.E. Cheatham, V. Cruzeiro, T. Darden, R. Duke, D. Ghorishi, M. Gilson, H. Gohlke, A. Goetz, D. Greene, R. Harris, N. Homeyer, Y. Huang, S. Izadi, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, D. Mermelstein, K. Merz, Y. Miao, G. Monard, C. Nguyen, H. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, F. Pan, R. Qi, D. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C. Simmerling, J. Smith, R. Salomon-Ferrer, J. Swails, R. Walker, J. Wang, H. Wei, R. Wolf, X. Wu, L. Xiao, D. York and P. Kollman.
- 34 J. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. Hauser and C. Simmerling, *J. Chem. Theory Comput.*, 2015, **11**, 3696–3713.
- 35 M. Stenrup, E. Pieri, V. Ledentu and N. Ferré, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **19**, 14073–14084.
- 36 E. Bombarda and G. M. Ullmann, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 1994–2003.
- 37 C. R. Sndergaard, M. H. M. Olsson, M. Rostkowski and J. H. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, **7**, 2284–2295.
- 38 D. R. Armstrong, R. Fortune, P. G. Perkins and J. J. P. Stewart, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1972, **68**, 1839.
- 39 J. J. P. Stewart, *MOPAC 2016*, <http://openmopac.net/>, 2016.
- 40 M. Barbatti, M. Ruckebauer, F. Plasser, J. Pittner, G. Granucci, M. Persico and H. Lischka, *Rev.: Comput Mol Sci.*, 2014, **4**, 26–33.

pH-induced changes in luciferase UV-visible absorption spectrum are experimentally and computationally investigated, using three different oxyluciferin analogues.



Partie VII

Références

Bibliographies

- (1) Seliger, H. H.; McElroy, W. D. The Colors Of Firefly Bioluminescence: Enzyme Configuration And Species Specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1964**, 52 (1), 75–81.
- (2) Seliger, H. H.; McElroy, W. D.; White, E. H.; Field, G. F. STEREOSPECIFICITY AND FIREFLY BIOLUMINESCENCE, A COMPARISON OF NATURAL AND SYNTHETIC LUCIFERINS. *BIOCHEMISTRY* **1961**, 47, 6.
- (3) Woodland, J.; Gibson, H. Intermediates in the Bioluminescent Oxidation of Reduced Flavin Mononucleotide. *The Journal Of Biological Chemistry* **1963**, 238 (7), 2537–2554.
- (4) Duchatelet, L.; Claes, J. M.; Mallefet, J. Embryonic Expression of Encephalopsin Supports Bioluminescence Perception in Lanternshark Photophores. *Marine Biology* **2019**, 166 (21). <https://doi.org/10.1007/s00227-019-3473-9>.
- (5) Lindström, J.; Grebner, W.; Rigby, K.; Selander, E. Effects of Predator Lipids on Dinoflagellate Defence Mechanisms - Increased Bioluminescence Capacity. *Scientific Reports* **2017**, 7 (13104). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13293-4>.
- (6) Lee, J. Perspectives on Bioluminescence Mechanisms. *Photochemistry and Photobiology* **2017**, 93 (2), 389–404. <https://doi.org/10.1111/php.12650>.
- (7) Hastings, J. W. Biological Diversity, Chemical Mechanisms, and the Evolutionary Origins of Bioluminescent Systems. *J Mol Evol* **1983**, 19 (5), 309–321. <https://doi.org/10.1007/BF02101634>.
- (8) White, E. H.; Wörther, H.; Seliger, H. H.; McElroy, W. D. Amino Analogs of Firefly Luciferin and Biological Activity Thereof ¹. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88 (9), 2015–2019. <https://doi.org/10.1021/ja00961a030>.
- (9) Viviani, V. R. Fireflies (Coleoptera: Lampyridae) from Southeastern Brazil: Habitats, Life History, and Bioluminescence. *an* **2001**, 94 (1), 129–145. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2001\)094\[0129:FCLFSB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2001)094[0129:FCLFSB]2.0.CO;2).
- (10) Blum, M. *Sexual Selection and Reproductive Competition in Insects*; Elsevier, 2012.
- (11) Fraga, H. Firefly Luminescence: A Historical Perspective and Recent Developments. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7 (2), 146. <https://doi.org/10.1039/b719181b>.
- (12) Seliger, H. H.; McElroy, W. D. Chemiluminescence of Firefly Luciferin without Enzyme. *Science* **1962**, 132, 683–685.
- (13) White, B. Modification of Firefly Luciferase with a Luciferin Analog. Red Light Producing Enzyme. *Journal of the American Chemical Society* **1975**.
- (14) McCapra, F. Chemical Mechanisms in Bioluminescence. *Accounts of Chemical Research* **1976**, 9 (6), 201–208. <https://doi.org/10.1021/ar50102a001>.
- (15) McCAPRA, F. Mechanism and Function of Bioluminescent Systems. *Biochemical Society Transactions* **1979**, 7 (6), 1239–1246. <https://doi.org/10.1042/bst0071239>.
- (16) Mccapra, F. The Chemistry of Bioluminescence. *Proceedings of the Royal Society of London Serie B* **1982**, 215, 247–272.
- (17) Gomi, K.; Kajiyama, N. Oxyluciferin, a Luminescence Product of Firefly Luciferase, Is Enzymatically Regenerated into Luciferin. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (39), 36508–36513. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105528200>.
- (18) Okada, K.; Iio, H.; Kubota, I.; Coto, T. FIREFLY BIOLUMINESCENCE III. CONVERSION OF OKYLUCIFERIN TO LUCIFERIN IN FIREFLY. *Tetrahedron Letters* **1974**, No. 32, 2771–2774.

- (19) Nakatsu, T.; Ichiyama, S.; Hiratake, J.; Saldanha, A.; Kobashi, N.; Sakata, K.; Kato, H. Structural Basis for the Spectral Difference in Luciferase Bioluminescence. *Nature* **2006**, *440* (7082), 372–376. <https://doi.org/10.1038/nature04542>.
- (20) White, E. H. The Chemi and Bioluminescence of Firefly Luciferin : An Efficient Chemical Production of Electronically Excited States. *Bioorganic* **1971**, *1* (1–2), 92–122.
- (21) Branchini, B. R.; Murtiashaw, M. H.; Magyar, R. A.; Portier, N. C.; Ruggiero, M. C.; Stroh, J. G. Yellow-Green and Red Firefly Bioluminescence from 5,5-Dimethyloxyluciferin. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (10), 2112–2113. <https://doi.org/10.1021/ja017400m>.
- (22) Ando, Y.; Niwa, K.; Yamada, N.; Enomoto, T.; Irie, T.; Kubota, H.; Ohmiya, Y.; Akiyama, H. Firefly Bioluminescence Quantum Yield and Colour Change by PH-Sensitive Green Emission. *Nature Photonics* **2008**, *2* (1), 44–47. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2007.251>.
- (23) Naumov, P.; Ozawa, Y.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S. Structure and Spectroscopy of Oxyluciferin, the Light Emitter of the Firefly Bioluminescence. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (32), 11590–11605. <https://doi.org/10.1021/ja904309q>.
- (24) Branchini, B. R.; Southworth, T. L.; Fontaine, D. M.; Kohrt, D.; Welcome, F. S.; Florentine, C. M.; Henricks, E. R.; DeBartolo, D. B.; Michelini, E.; Cevenini, L.; Roda, A.; Grossel, M. J. Red-Emitting Chimeric Firefly Luciferase for in Vivo Imaging in Low ATP Cellular Environments. *Analytical Biochemistry* **2017**, *534*, 36–39. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.001>.
- (25) Ghose, A.; Maltsev, O. V.; Humbert, N.; Hintermann, L.; Arntz, Y.; Naumov, P.; Mély, Y.; Didier, P. Oxyluciferin Derivatives: A Toolbox of Environment-Sensitive Fluorescence Probes for Molecular and Cellular Applications. *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121* (7), 1566–1575. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b12616>.
- (26) Li, J.; Chen, L.; Du, L.; Li, M. Cage the Firefly Luciferin! – A Strategy for Developing Bioluminescent Probes. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (2), 662–676. <https://doi.org/10.1039/C2CS35249D>.
- (27) Roura, S.; Gálvez-Montón, C.; Bayes-Genis, A. Bioluminescence Imaging: A Shining Future for Cardiac Regeneration. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2013**, *17* (6), 693–703. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12018>.
- (28) Minekawa, T.; Ohkuma, H.; Abe, K.; Maekawa, H.; Arakawa, H. Practical Application of Bioluminescence Enzyme Immunoassay Using Enhancer for Firefly Luciferin-Luciferase Bioluminescence. *Luminescence* **2011**, *26* (3), 167–171. <https://doi.org/10.1002/bio.1200>.
- (29) Takakura, H.; Kojima, R.; Urano, Y.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T. Aminoluciferins as Functional Bioluminogenic Substrates of Firefly Luciferase. *Chemistry - An Asian Journal* **2011**, *6* (7), 1800–1810. <https://doi.org/10.1002/asia.201000873>.
- (30) Kaskova, Z. M.; Tsarkova, A. S.; Yampolsky, I. V. 1001 Lights: Luciferins, Luciferases, Their Mechanisms of Action and Applications in Chemical Analysis, Biology and Medicine. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (21), 6048–6077. <https://doi.org/10.1039/C6CS00296J>.
- (31) Sun, Y.-Q.; Liu, J.; Wang, P.; Zhang, J.; Guo, W. D-Luciferin Analogues: A Multicolor Toolbox for Bioluminescence Imaging. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (34), 8428–8430. <https://doi.org/10.1002/anie.201203565>.

- (32) Greer, L. F.; Szalay, A. A. Imaging of Light Emission from the Expression of Luciferases in Living Cells and Organisms: A Review. *Luminescence* **2002**, *17* (1), 43–74. <https://doi.org/10.1002/bio.676>.
- (33) Shinde, R.; Perkins, J.; Contag, C. H. Luciferin Derivatives for Enhanced in Vitro and in Vivo Bioluminescence Assays. *Biochemistry* **2006**, *45* (37), 11103–11112. <https://doi.org/10.1021/bi060475o>.
- (34) Tian, X.; Li, Z.; Lau, C.; Lu, J. Visualization of in Vivo Hydrogen Sulfide Production by a Bioluminescence Probe in Cancer Cells and Nude Mice. *Analytical Chemistry* **2015**, *87* (22), 11325–11331. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03712>.
- (35) Buckley, S. M. K.; Delhove, J. M. K. M.; Perocheau, D. P.; Karda, R.; Rahim, A. A.; Howe, S. J.; Ward, N. J.; Birrell, M. A.; Belvisi, M. G.; Arbuthnot, P.; Johnson, M. R.; Waddington, S. N.; McKay, T. R. In Vivo Bioimaging with Tissue-Specific Transcription Factor Activated Luciferase Reporters. *Scientific Reports* **2015**, *5* (11842). <https://doi.org/10.1038/srep11842>.
- (36) Yao, Z.; Zhang, B. S.; Prescher, J. A. Advances in Bioluminescence Imaging: New Probes from Old Recipes. *Current Opinion in Chemical Biology* **2018**, *45*, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.05.009>.
- (37) Ikeda, Y.; Nomoto, T.; Hiruta, Y.; Nishiyama, N.; Citterio, D. Ring-Fused Firefly Luciferins: Expanded Palette of Near-Infrared Emitting Bioluminescent Substrates. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (6), 4235–4243. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04562>.
- (38) Foucault, M.-L.; Thomas, L.; Goussard, S.; Branchini, B. R.; Grillot-Courvalin, C. In Vivo Bioluminescence Imaging for the Study of Intestinal Colonization by Escherichia Coli in Mice. *Applied and Environmental Microbiology* **2010**, *76* (1), 264–274. <https://doi.org/10.1128/AEM.01686-09>.
- (39) Conley, N. R.; Dragulescu-Andrasi, A.; Rao, J.; Moerner, W. E. A Selenium Analogue of Firefly D-Luciferin with Red-Shifted Bioluminescence Emission. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (14), 3350–3353. <https://doi.org/10.1002/anie.201105653>.
- (40) Ukuku, D. O.; Sapers, G. M.; Fett, W. F. ATP Bioluminescence Assay for Estimation of Microbial Populations of Fresh-Cut Melon†. *Journal of Food Protection* **2005**, *68* (11), 2427–2432. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.11.2427>.
- (41) Sakakibara, T.; Murakami, S.; Eisaki, N.; Nakajima, M.; Imai, K. An Enzymatic Cycling Method Using Pyruvate Orthophosphate Dikinase and Firefly Luciferase for the Simultaneous Determination of ATP and AMP (RNA). *Analytical Biochemistry* **1999**, *268* (1), 94–101. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.3028>.
- (42) Gandelman, O. A.; Brovko, L. Yu.; Ugarova, N. N.; Chikishev, A. Yu.; Shkurimov, A. P. Oxyluciferin Fluorescence Is a Model of Native Bioluminescence in the Firefly Luciferin—Luciferase System. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1993**, *19* (3), 187–191. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)87083-Y](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)87083-Y).
- (43) White, E. H.; Roswell, D. F. Analogs and Derivatives of Firefly Oxyluciferin, the Light Emitter in Firefly Bioluminescence. *Photochemistry and Photobiology* **1991**, *53* (1), 131–136. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1991.tb08478.x>.
- (44) Cheng, Y.-Y.; Liu, Y.-J. What Exactly Is the Light Emitter of a Firefly? *Journal of Chemical Theory and Computation* **2015**, *11* (11), 5360–5370. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00659>.

- (45) Kakiuchi, M.; Ito, S.; Yamaji, M.; Viviani, V. R.; Maki, S.; Hirano, T. Spectroscopic Properties of Amine-Substituted Analogues of Firefly Luciferin and Oxyluciferin. *Photochemistry and Photobiology* **2017**, *93* (2), 486–494. <https://doi.org/10.1111/php.12654>.
- (46) White, E. H.; Wörther, H.; Field, G. F.; McElroy, W. D. Analogs of Firefly Luciferin. *The Journal of Organic Chemistry* **1965**, *30* (7), 2344–2348. <https://doi.org/10.1021/jo01018a054>.
- (47) Solntsev, K. M.; Laptinok, S. P.; Naumov, P. Photoinduced Dynamics of Oxyluciferin Analogues: Unusual Enol “Super” Photoacidity and Evidence for Keto–Enol Isomerization. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (40), 16452–16455. <https://doi.org/10.1021/ja3045212>.
- (48) Ran, X. Q.; Zhou, X.; Goddard, J. D. The Spectral-Structural Relationship of a Series of Oxyluciferin Derivatives. *ChemPhysChem* **2015**, *16* (2), 396–402. <https://doi.org/10.1002/cphc.201402611>.
- (49) García-Iriepa, C.; Gosset, P.; Berraud-Pache, R.; Zemmouche, M.; Taupier, G.; Dorkenoo, K. D.; Didier, P.; Léonard, J.; Ferré, N.; Navizet, I. Simulation and Analysis of the Spectroscopic Properties of Oxyluciferin and Its Analogues in Water. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2018**, *14* (4), 2117–2126. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b01240>.
- (50) Song, C.; Rhee, Y. M. Dynamics on the Electronically Excited State Surface of the Bioluminescent Firefly Luciferase–Oxyluciferin System. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (31), 12040–12049. <https://doi.org/10.1021/ja201752p>.
- (51) Silva, L. P. da; Silva, J. C. G. E. da. Computational Investigation of the Effect of PH on the Color of Firefly Bioluminescence by DFT. *ChemPhysChem* **2011**, *12* (5), 951–960. <https://doi.org/10.1002/cphc.201000980>.
- (52) Ghose, A.; Rebarz, M.; Maltsev, O. V.; Hintermann, L.; Ruckebusch, C.; Fron, E.; Hofkens, J.; Mély, Y.; Naumov, P.; Sliwa, M.; Didier, P. Emission Properties of Oxyluciferin and Its Derivatives in Water: Revealing the Nature of the Emissive Species in Firefly Bioluminescence. *The Journal of Physical Chemistry B* **2014**, *119* (6), 2638–2649. <https://doi.org/10.1021/jp508905m>.
- (53) Erez, Y.; Presiado, I.; Gepshtein, R.; Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G.; Huppert, D. Comparative Study of the Photoprotolytic Reactions of D-Luciferin and Oxyluciferin. *The Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *116* (28), 7452–7461. <https://doi.org/10.1021/jp301910p>.
- (54) Snellenburg, J. J.; Laptinok, S. P.; DeSa, R. J.; Naumov, P.; Solntsev, K. M. Excited-State Dynamics of Oxyluciferin in Firefly Luciferase. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138* (50), 16252–16258. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b05078>.
- (55) Kitada, N.; Saito, R.; Obata, R.; Iwano, S.; Karube, K.; Miyawaki, A.; Hirano, T.; Maki, S. A. Development of Near-Infrared Firefly Luciferin Analogue Reacted with Wild-Type and Mutant Luciferases. *Chirality* **2020**, 1–10. <https://doi.org/10.1002/chir.23236>.
- (56) Vreven, T.; Miller, S. C. Computational Investigation into the Fluorescence of Luciferin Analogues. *Journal of Computational Chemistry* **2019**, *40* (2), 527–531. <https://doi.org/10.1002/jcc.25745>.
- (57) Li, Z.-S.; Min, C.-G.; Ren, A.-M.; Zou, L.-Y.; Xu, Z. TDDFT Investigation of Fluorescence Properties of Luciferin and Oxyluciferin Analogs Bearing an Amino Group. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2012**, *243*, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.05.024>.

- (58) Cheng, Y.-Y.; Liu, Y.-J. Theoretical Development of Near-Infrared Bioluminescent Systems. *Chemistry – A European Journal* **2018**, *24* (37), 9340–9352. <https://doi.org/10.1002/chem.201800416>.
- (59) Woodhouse, J. L.; Assmann, M.; Parkes, M. A.; Grounds, H.; Pacman, S. J.; Anderson, J. C.; Worth, G. A.; Fielding, H. H. Photoelectron Spectroscopy of Isolated Luciferin and Infraluciferin Anions in Vacuo : Competing Photodetachment, Photofragmentation and Internal Conversion. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2017**, *19* (34), 22711–22720. <https://doi.org/10.1039/C7CP04815G>.
- (60) Reddy, G. R.; Thompson, W. C.; Miller, S. C. Robust Light Emission from Cyclic Alkylaminoluciferin Substrates for Firefly Luciferase. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (39), 13586–13587. <https://doi.org/10.1021/ja104525m>.
- (61) Min, C.-G.; Leng, Y.; Yang, X.-K.; Huang, S.-J.; Ren, A.-M. Systematic Color Tuning of a Family of Firefly Oxyluciferin Analogues Suitable for OLED Applications. *Dyes and Pigments* **2016**, *126*, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2015.12.004>.
- (62) Min, C.-G.; Leng, Y.; Zhu, Y.-Q.; Yang, X.-K.; Huang, S.-J.; Ren, A.-M. Modification of Firefly Cyclic Amino Oxyluciferin Analogues Emitting Multicolor Light for OLED and Near-Infrared Biological Window Light for Bioluminescence Imaging: A Theoretical Study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2017**, *336*, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.12.029>.
- (63) Min, C.-G.; Liu, Q.-B.; Leng, Y.; Huang, S.-J.; Liu, C.-X.; Yang, X.-K.; Ren, A.-M.; Pinto da Silva, L. Development of Firefly Oxyluciferin Derivatives as PH Sensitive Fluorescent Probes: A DFT/TDDFT Study. *Computational and Theoretical Chemistry* **2018**, *1133*, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2018.04.008>.
- (64) Hirano, T.; Hasumi, Y.; Ohtsuka, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Yamaji, M.; Hashizume, D. Spectroscopic Studies of the Light-Color Modulation Mechanism of Firefly (Beetle) Bioluminescence. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (6), 2385–2396. <https://doi.org/10.1021/ja808836b>.
- (65) Cheng, Y.-Y.; Zhu, J.; Liu, Y.-J. Theoretical Tuning of the Firefly Bioluminescence Spectra by the Modification of Oxyluciferin. *Chemical Physics Letters* **2014**, *591*, 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2013.11.023>.
- (66) Rebarz, M.; Kukovec, B.-M.; Maltsev, O. V.; Ruckebusch, C.; Hintermann, L.; Naumov, P.; Sliwa, M. Deciphering the Protonation and Tautomeric Equilibria of Firefly Oxyluciferin by Molecular Engineering and Multivariate Curve Resolution. *Chemical Science* **2013**, *4* (10), 3803–3809. <https://doi.org/10.1039/c3sc50715g>.
- (67) Noguchi, Y.; Hiayama, M.; Shiga, M.; Akiyama, H.; Sugino, O. Photoabsorption Spectra of Aqueous Oxyluciferin Anions Elucidated by Explicit Quantum Solvent. *J. Chem. Theory Comput.* **2019**, *15* (10), 5474–5482. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00392>.
- (68) Hiayama, M.; Akiyama, H.; Wang, Y.; Koga, N. Theoretical Study for Absorption Spectra of Oxyluciferin in Aqueous Solutions. *Chemical Physics Letters* **2013**, *577*, 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2013.05.053>.
- (69) Hiayama, M.; Noguchi, Y.; Akiyama, H.; Yamada, K.; Koga, N. Vibronic Structures in Absorption and Fluorescence Spectra of Firefly Oxyluciferin in Aqueous Solutions. *Photochemistry and Photobiology* **2015**, *91* (4), 819–827. <https://doi.org/10.1111/php.12463>.
- (70) Hiayama, M.; Mochizuki, T.; Akiyama, H.; Koga, N. Analysis of Oxyluciferin Photoluminescence Pathways in Aqueous Solutions. *Photochemistry and Photobiology* **2015**, *91* (1), 74–83. <https://doi.org/10.1111/php.12370>.

- (71) Chen, S.-F.; Liu, Y.-J.; Navizet, I.; Ferré, N.; Fang, W.-H.; Lindh, R. Systematic Theoretical Investigation on the Light Emitter of Firefly. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, 7 (3), 798–803. <https://doi.org/10.1021/ct200045q>.
- (72) DeLuca, M.; Wannlund, J.; McElroy, W. D. Factors Affecting the Kinetics of Light Emission from Crude and Purified Firefly Luciferase. *Analytical Biochemistry* **1979**, 95 (1), 194–198. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90204-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90204-5).
- (73) DeLuca, M.; McElroy, W. D. Two Kinetically Distinguishable ATP Sites in Firefly Luciferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1984**, 123 (2), 764–770.
- (74) da Silva, L. P.; Esteves da Silva, J. C. G. Kinetics of Inhibition of Firefly Luciferase by Dehydroluciferyl-Coenzyme A, Dehydroluciferin and l-Luciferin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, 10 (6), 1039. <https://doi.org/10.1039/c0pp00379d>.
- (75) Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G. Study of Firefly Luciferin Oxidation and Isomerism as Possible Inhibition Pathways for Firefly Bioluminescence. *Chemical Physics Letters* **2014**, 592, 188–191. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2013.12.047>.
- (76) Wood, K. V. Luc Genes: Introduction of Colour into Bioluminescence Assays. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* **1990**, 5 (2), 107–114. <https://doi.org/10.1002/bio.1170050206>.
- (77) Conti, E.; Franks, N. P.; Brick, P. Crystal Structure of Firefly Luciferase Throws Light on a Superfamily of Adenylate-Forming Enzymes. *Structure* **1996**, 4 (3), 287–298. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00033-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00033-0).
- (78) Viviani, V. R.; Bechara, E. J. H.; Ohmiya, Y. Cloning, Sequence Analysis, and Expression of Active *Phrixothrix* Railroad-Worms Luciferases: Relationship between Bioluminescence Spectra and Primary Structures^{†, ‡}. *Biochemistry* **1999**, 38 (26), 8271–8279. <https://doi.org/10.1021/bi9900830>.
- (79) Navizet, I.; Liu, Y.-J.; Ferré, N.; Xiao, H.-Y.; Fang, W.-H.; Lindh, R. Color-Tuning Mechanism of Firefly Investigated by Multi-Configurational Perturbation Method. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (2), 706–712. <https://doi.org/10.1021/ja908051h>.
- (80) Ugarova, N. N.; Brovko, L. Y. Protein Structure and Bioluminescent Spectra for Firefly Bioluminescence. *Luminescence* **2002**, 17 (5), 321–330. <https://doi.org/10.1002/bio.688>.
- (81) Vieira, J.; Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G. Advances in the Knowledge of Light Emission by Firefly Luciferin and Oxyluciferin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2012**, 117, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.08.017>.
- (82) da Silva, L. P.; Esteves da Silva, J. C. G. Computational Studies of the Luciferase Light-Emitting Product: Oxyluciferin. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2011**, 7 (4), 809–817. <https://doi.org/10.1021/ct200003u>.
- (83) Viviani, V. R.; Gabriel, G. V. M.; Bevilaqua, V. R.; Simões, A. F.; Hirano, T.; Lopes-de-Oliveira, P. S. The Proton and Metal Binding Sites Responsible for the PH-Dependent Green-Red Bioluminescence Color Tuning in Firefly Luciferases. *Sci Rep* **2018**, 8 (1), 17594. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33252-x>.
- (84) Carrasco-López, C.; Ferreira, J. C.; Lui, N. M.; Schramm, S.; Beraud-Pache, R.; Navizet, I.; Panjikar, S.; Naumov, P.; Rabeh, W. M. Beetle Luciferases with Naturally Red- and Blue-Shifted Emission. *Life Sci. Alliance* **2018**, 1 (4), e201800072. <https://doi.org/10.26508/lsa.201800072>.

- (85) Saleh, N.; Suwaid, A. R. B.; Alhalabi, A.; Abuibaid, A. Z. A.; Maltsev, O. V.; Hintermann, L.; Naumov, P. Bioinspired Molecular Lantern: Tuning the Firefly Oxyluciferin Emission with Host–Guest Chemistry. *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, *120* (31), 7671–7680. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.6b06557>.
- (86) Silva, L. P. D.; Da Silva, J. C. G. E. Theoretical Modulation of the Color of Light Emitted by Firefly Oxyluciferin. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32* (12), 2654–2663. <https://doi.org/10.1002/jcc.21845>.
- (87) Nakatani, N.; Hasegawa, J.; Nakatsuji, H. Artificial Color Tuning of Firefly Luminescence: Theoretical Mutation by Tuning Electrostatic Interactions between Protein and Luciferin. *Chemical Physics Letters* **2009**, *469* (1–3), 191–194. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.12.062>.
- (88) Fujii, H.; Noda, K.; Asami, Y.; Kuroda, A.; Sakata, M.; Tokida, A. Increase in Bioluminescence Intensity of Firefly Luciferase Using Genetic Modification. *Analytical Biochemistry* **2007**, *366* (2), 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.04.018>.
- (89) Branchini, B. R.; Southworth, T. L.; Khattak, N. F.; Michelini, E.; Roda, A. Red- and Green-Emitting Firefly Luciferase Mutants for Bioluminescent Reporter Applications. *Analytical Biochemistry* **2005**, *345* (1), 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.07.015>.
- (90) Branchini, B. R.; Southworth, T. L.; Murtiashaw, M. H.; Magyar, R. A.; Gonzalez, S. A.; Ruggiero, M. C.; Stroh, J. G. An Alternative Mechanism of Bioluminescence Color Determination in Firefly Luciferase. *Biochemistry* **2004**, *43* (23), 7255–7262. <https://doi.org/10.1021/bi036175d>.
- (91) Koksharov, M. I.; Ugarova, N. N. Strategy of Mutual Compensation of Green and Red Mutants of Firefly Luciferase Identifies a Mutation of the Highly Conservative Residue E457 with a Strong Red Shift of Bioluminescence. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12* (11), 2016. <https://doi.org/10.1039/c3pp50242b>.
- (92) Orlova, G.; Goddard, J. D.; Brovko, L. Yu. Theoretical Study of the Amazing Firefly Bioluminescence: The Formation and Structures of the Light Emitters. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (23), 6962–6971. <https://doi.org/10.1021/ja021255a>.
- (93) Viviani, V. R.; Neves, D. R.; Amaral, D. T.; Prado, R. A.; Matsushashi, T.; Hirano, T. Bioluminescence of Beetle Luciferases with 6'-Amino- D -Luciferin Analogues Reveals Excited Keto-Oxyluciferin as the Emitter and Phenolate/Luciferin Binding Site Interactions Modulate Bioluminescence Colors. *Biochemistry* **2014**, *53* (32), 5208–5220. <https://doi.org/10.1021/bi500160m>.
- (94) Naumov, P.; Kochunnonny, M. Spectral–Structural Effects of the Keto–Enol–Enolate and Phenol–Phenolate Equilibria of Oxyluciferin. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (33), 11566–11579. <https://doi.org/10.1021/ja102885g>.
- (95) Liu, Y.-J.; De Vico, L.; Lindh, R. Ab Initio Investigation on the Chemical Origin of the Firefly Bioluminescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2008**, *194* (2–3), 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.08.022>.
- (96) Nakatani, N.; Hasegawa, J.; Nakatsuji, H. Red Light in Chemiluminescence and Yellow-Green Light in Bioluminescence: Color-Tuning Mechanism of Firefly, *Photinus Pyralis* , Studied by the Symmetry-Adapted Cluster–Configuration Interaction Method. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (28), 8756–8765. <https://doi.org/10.1021/ja0611691>.
- (97) Min, C.-G.; Ren, A.-M.; Guo, J.-F.; Zou, L.-Y.; Goddard, J. D.; Sun, C.-C. Theoretical Investigation on the Origin of Yellow-Green Firefly Bioluminescence by Time-

- Dependent Density Functional Theory. *Chem. Eur. J. of Chem. Phys.* **2010**, *11* (10), 2199–2204. <https://doi.org/10.1002/cphc.200900821>.
- (98) Milne, B. F.; Marques, M. A. L.; Nogueira, F. Fragment Molecular Orbital Investigation of the Role of AMP Protonation in Firefly Luciferase PH-Sensitivity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (42), 14285. <https://doi.org/10.1039/c0cp00932f>.
- (99) Silva, L. P. da; Silva, J. C. G. E. da. Study on the Effects of Intermolecular Interactions on Firefly Multicolor Bioluminescence. *ChemPhysChem* **2011**, *12* (16), 3002–3008. <https://doi.org/10.1002/cphc.201100389>.
- (100) Sakai, H.; Wada, N. Full-Quantum Chemical Calculations of the Absorption Maxima of Oxyluciferin in the Catalytic Center of Firefly Luciferase Containing Adenosine Monophosphate. *Computational and Theoretical Chemistry* **2014**, *1045*, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2014.07.001>.
- (101) Garcia-Iriepa, C.; Navizet, I. Effect of Protein Conformation and AMP Protonation State on Fireflies' Bioluminescent Emission. *Molecules* **2019**, *24* (8), 1565. <https://doi.org/10.3390/molecules24081565>.
- (102) Manuel de Almeida Barbosa, N.; Zemmouche, M.; Gosset, P.; García-Iriepa, C.; Ledentu, V.; Navizet, I.; Didier, P.; Ferré, N. PH-Dependent Absorption Spectrum of Oxyluciferin Analogues in the Presence of Adenosine Monophosphate. *ChemPhotoChem* **2019**, *3* (12), 1219–1230. <https://doi.org/10.1002/cptc.201900150>.
- (103) Kuchlyan, J.; Banik, D.; Roy, A.; Kundu, N.; Sarkar, N. Excited-State Proton Transfer Dynamics of Firefly's Chromophore D-Luciferin in DMSO–Water Binary Mixture. *The Journal of Physical Chemistry B* **2014**, *118* (48), 13946–13953. <https://doi.org/10.1021/jp510389d>.
- (104) Cherednikova, E. Y.; Chikishev, A. Y.; Kosobokova, O. V.; Mizuno, M.; Sakai, M.; Takahashi, H. Picosecond Time-Resolved Absorption Spectroscopy of Luciferin. *Chemical Physics Letters* **1999**, *308* (5–6), 369–372. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(99\)00625-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(99)00625-9).
- (105) Erez, Y.; Huppert, D. Excited-State Intermolecular Proton Transfer of the Firefly's Chromophore D-Luciferin. *The Journal of Physical Chemistry A* **2010**, *114* (31), 8075–8082. <https://doi.org/10.1021/jp103264y>.
- (106) Presiado, I.; Erez, Y.; Huppert, D. Excited-State Intermolecular Proton Transfer of the Firefly's Chromophore D-Luciferin. 2. Water–Methanol Mixtures. *The Journal of Physical Chemistry A* **2010**, *114* (35), 9471–9479. <https://doi.org/10.1021/jp1059837>.
- (107) Erez, Y.; Presiado, I.; Gepshtein, R.; Huppert, D. Excited-State Intermolecular Proton Transfer of Firefly Luciferin IV. Temperature and PH Dependence. *The Journal of Physical Chemistry A* **2011**, *115* (9), 1617–1626. <https://doi.org/10.1021/jp110889v>.
- (108) Presiado, I.; Erez, Y.; Huppert, D. Excited-State Intermolecular Proton Transfer of Firefly Luciferin III. Proton Transfer to a Mild Base. *The Journal of Physical Chemistry A* **2010**, *114* (51), 13337–13346. <https://doi.org/10.1021/jp107360d>.
- (109) Presiado, I.; Gepshtein, R.; Erez, Y.; Huppert, D. Excited-State Intermolecular Proton Transfer of Firefly Luciferin V. Direct Proton Transfer to Fluoride and Other Mild Bases. *The Journal of Physical Chemistry A* **2011**, *115* (26), 7591–7601. <https://doi.org/10.1021/jp203487j>.
- (110) Presiado, I.; Erez, Y.; Simkovitch, R.; Shomer, S.; Gepshtein, R.; Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G.; Huppert, D. Excited-State Proton Transfer of Firefly Dehydroluciferin. *The Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *116* (44), 10770–10779. <https://doi.org/10.1021/jp308818r>.

- (111) Chung, S.; Choi, S. M.; Rhee, Y. M. Exploring the Possibility of Excited State Keto-Enolate Transformation of the Oxyluciferin-Luciferase Complex with QM/MM Free Energy Simulations. *ChemPhotoChem* **2019**, 3 (9), 804–813. <https://doi.org/10.1002/cptc.201900114>.
- (112) Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G. Chemiexcitation Induced Proton Transfer: Enolate Oxyluciferin as the Firefly Bioluminophore. *The Journal of Physical Chemistry B* **2015**, 119 (6), 2140–2148. <https://doi.org/10.1021/jp5036458>.
- (113) Pinto da Silva, L.; Simkovitch, R.; Huppert, D.; Esteves da Silva, J. C. G. Oxyluciferin Photoacidity: The Missing Element for Solving the Keto-Enol Mystery? *ChemPhysChem* **2013**, 14 (15), 3441–3446. <https://doi.org/10.1002/cphc.201300402>.
- (114) Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G. Theoretical Analysis of the Color Tuning Mechanism of Oxyluciferin and 5-Hydroxyoxyluciferin. *Computational and Theoretical Chemistry* **2012**, 988, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2012.02.029>.
- (115) Hosseinkhani, S. Molecular Enigma of Multicolor Bioluminescence of Firefly Luciferase. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2011**, 68 (7), 1167–1182. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0607-0>.
- (116) Hiayama, M.; Akiyama, H.; Koga, N. Theoretical Insights into the Effect of PH Values on Oxidation Processes in the Emission of Firefly Luciferin in Aqueous Solution. *Luminescence* **2017**, 32 (6), 1100–1108. <https://doi.org/10.1002/bio.3308>.
- (117) Branchini, B. R.; Behney, C. E.; Southworth, T. L.; Fontaine, D. M.; Gulick, A. M.; Vinyard, D. J.; Brudvig, G. W. Experimental Support for a Single Electron-Transfer Oxidation Mechanism in Firefly Bioluminescence. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, 137 (24), 7592–7595. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b03820>.
- (118) Silva, L. P. da; Silva, J. C. G. E. da. Firefly Chemiluminescence and Bioluminescence: Efficient Generation of Excited States. *ChemPhysChem* **2012**, 13 (9), 2257–2262. <https://doi.org/10.1002/cphc.201200195>.
- (119) Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G. Theoretical Fingerprinting of the Photophysical Properties of Four Firefly Bioluminophores. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, 12 (11), 2028. <https://doi.org/10.1039/c3pp50203a>.
- (120) Pinto da Silva, L.; Santos, A. J. M.; Esteves da Silva, J. C. G. Efficient Firefly Chemi/Bioluminescence: Evidence for Chemiexcitation Resulting from the Decomposition of a Neutral Firefly Dioxetanone Molecule. *The Journal of Physical Chemistry A* **2013**, 117 (1), 94–100. <https://doi.org/10.1021/jp311711p>.
- (121) Pinto da Silva, L.; Simkovitch, R.; Huppert, D.; Esteves da Silva, J. C. G. Theoretical Study of the Efficient Fluorescence Quenching Process of the Firefly Luciferin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2013**, 266, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2013.06.001>.
- (122) Kim, H. W.; Rhee, Y. M. On the PH Dependent Behavior of the Firefly Bioluminescence: Protein Dynamics and Water Content in the Active Pocket. *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117 (24), 7260–7269. <https://doi.org/10.1021/jp4024553>.
- (123) Wang, Y.; Hayamizu, Y.; Akiyama, H. Spectroscopic Study of Firefly Oxyluciferin in an Enzymatic Environment on the Basis of Stability Monitoring. *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118 (8), 2070–2076. <https://doi.org/10.1021/jp411476p>.
- (124) Pinto da Silva, L.; Esteves da Silva, J. C. G. Theoretical Study of the Nontraditional Enol-Based Photoacidity of Firefly Oxyluciferin. *ChemPhysChem* **2015**, 16 (2), 455–464. <https://doi.org/10.1002/cphc.201402533>.

- (125) Noguchi, Y.; Hiyama, M.; Shiga, M.; Sugino, O.; Akiyama, H. Reverse Stability of Oxyluciferin Isomers in Aqueous Solutions. *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, *120* (34), 8776–8783. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b04963>.
- (126) Maltsev, O. V.; Nath, N. K.; Naumov, P.; Hintermann, L. Why Is Firefly Oxyluciferin a Notoriously Labile Substance? *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53* (3), 847–850. <https://doi.org/10.1002/anie.201307972>.
- (127) Berraud-Pache, R.; Garcia-Iriepa, C.; Navizet, I. Modeling Chemical Reactions by QM/MM Calculations: The Case of the Tautomerization in Fireflies Bioluminescent Systems. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 116. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00116>.
- (128) Falklöf, O.; Durbeej, B. Distinguishing between Keto–Enol and Acid–Base Forms of Firefly Oxyluciferin through Calculation of Excited-State Equilibrium Constants. *Journal of Computational Chemistry* **2014**, *35* (30), 2184–2194. <https://doi.org/10.1002/jcc.23735>.
- (129) Lakowicz, J. R.; Masters, B. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition. *J. Biomed. Opt.* **2008**, *13* (2), 029901. <https://doi.org/10.1117/1.2904580>.
- (130) Gilbreath, J. J.; West, A. L.; Pich, O. Q.; Carpenter, B. M.; Michel, S.; Merrell, D. S. Fur Activates Expression of the 2-Oxoglutarate Oxidoreductase Genes (*OorDABC*) in *Helicobacter Pylori*. *J. Bacteriol.* **2012**, *194* (23), 6490–6497. <https://doi.org/10.1128/JB.01226-12>.
- (131) Rullière, C. *Femtosecond Laser Pulses: Principles and Experiments*, New York: Springer.; 2005.
- (132) Fork, R. L.; Martinez, O. E.; Gordon, J. P. Negative Dispersion Using Pairs of Prisms. *Opt. Lett.* **1984**, *9* (5), 150. <https://doi.org/10.1364/OL.9.000150>.
- (133) Rudd, J. V.; Korn, G.; Kane, S.; Squier, J. Chirped-Pulse Amplification of 55-Fs Pulses at a 1-KHz Repetition Rate in a Ti:A1203 Regenerative Amplifier. *Optical Society of America* **1993**, *3*.
- (134) Bradler, M.; Baum, P.; Riedle, E. Femtosecond Continuum Generation in Bulk Laser Host Materials with Sub-MJ Pump Pulses. *Appl. Phys. B* **2009**, *97* (3), 561–574. <https://doi.org/10.1007/s00340-009-3699-1>.
- (135) Yu, Z.; Weng, Y. Interference Pattern Generation and Simulation in the Single Beam of a White Light Continuum. *Sci. China Phys. Mech. Astron.* **2010**, *53* (6), 1060–1064. <https://doi.org/10.1007/s11433-010-4015-0>.
- (136) Montagna, M. Brillouin and Raman Scattering from the Acoustic Vibrations of Spherical Particles with a Size Comparable to the Wavelength of the Light. *Phys. Rev. B* **2008**, *77* (4), 045418. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.77.045418>.
- (137) Coen, S.; Chau, A. H. L.; Leonhardt, R.; Harvey, J. D.; Knight, J. C.; Wadsworth, W. J.; Russell, P. St. J. Supercontinuum Generation by Stimulated Raman Scattering and Parametric Four-Wave Mixing in Photonic Crystal Fibers. *J. Opt. Soc. Am. B* **2002**, *19* (4), 753. <https://doi.org/10.1364/JOSAB.19.000753>.
- (138) Strickler, S. J.; Berg, R. A. Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules. *The Journal of Chemical Physics* **1962**, *37* (4), 814–822. <https://doi.org/10.1063/1.1733166>.
- (139) Suzuki, N.; Goto, T. FIREFLY BIOLUMINESCENCE II. IDENTIFICATION OF 2-(6'-HYDROXYBRNZOTHAZOL-2'-YL)- 4-HYDROXYTHIAZOLE AS A PRODUCT IN THE BIOLUMINESCENCE OF FIREFLY LANTERNS AND AS A PRODUCT IN THE CHEMILUMINESCENCE OF FIREFLY LUCIFERIN IN DMSO. *Tetrahedron Letters* **1971**, No. 22, 2021–2024.

- (140) Cheng, Y.-Y.; Liu, Y.-J. Luciferin Regeneration in Firefly Bioluminescence via Proton-Transfer-Facilitated Hydrolysis, Condensation and Chiral Inversion. *ChemPhysChem* **2019**, *20* (13), 1719–1727. <https://doi.org/10.1002/cphc.201900306>.
- (141) White, E. H.; Rapaport, E.; Hopkins, T. A.; Seliger, H. H. Chemi- and Bioluminescence of Firefly Luciferin. *Journal of the American Chemical Society* **1969**, *3*.

Pauline GOSSET
**ETUDE DES PROPRIETES
OPTIQUES DE
L'OXYLUCIFERINE ET DE SES
ANALOGUES**

Résumé

La bioluminescence est un phénomène naturel au cours duquel des organismes vivants convertissent de l'énergie chimique en lumière. Dans le cas de la luciole, la réaction implique une réaction d'oxydation de la luciférine, catalysée par la luciférase, produisant le photoproduit oxyluciférine dans son premier état excité. L'oxyluciférine peut ensuite émettre une lumière pouvant varier du jaune-vert au rouge par relaxation vers son état fondamental. Le photoproduit peut exister sous six formes chimiques différentes provenant d'une conversion kéto/enol et de déprotonations des groupes phénols ou énols. La première partie de la thèse consistera à étudier les propriétés optiques des différentes formes chimiques en solution aqueuse, ainsi qu'à résoudre la dynamique des transferts de proton existant à l'état excité à l'aide de la spectroscopie pompe-sonde. Dans la dernière partie nous avons déterminé la nature de l'espèce produisant la bioluminescence en formant des complexes avec les formes chimiques synthétisées et la luciférase.

Mots clés : Oxyluciférine, luciférase, spectroscopie à l'état stationnaire, résolue en temps, ESPT

Abstract

Bioluminescence is a natural phenomenon during which living organisms convert chemical energy into light. The light is emitted through luciferase-catalysed reaction of D-luciferin substrate resulting in the formation of oxyluciferin (OxyLH₂) in its first singlet excited state, which later decays radiatively to the ground state. OxyLH₂ emits visible light with an emission that can vary from green to red. It can exist under six different chemical forms resulting from keto/enol tautomerization and deprotonation of phenol and/or enol moieties. In the first part of this work, we characterized the optical properties of OxyLH₂ and its derivatives in aqueous buffer and we deciphered its photoluminescence pathway by monitoring the excited state proton transfer using pump-probe spectroscopy. We finally characterized the absorption and emission of OxyLH₂'s forms inside the protein. These results were compared to those obtained on the complex formed after the bioluminescence reaction with D-luciferin. The goal of this part is to determine the nature of the emitter which produce the bioluminescence.

Keywords: Oxyluciferin, luciferase, spectroscopy steady-state, time-resolved, ESPT