

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A TROIS-RIVIÈRES

THÈSE PRÉSENTÉE A

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

ANDRÉ DÉSORMEAUX

SPECTROSCOPIE PHOTOACOUSTIQUE DE LA CHLOROPHYLLE A

DANS DIFFÉRENTS ENVIRONNEMENTS

MAI 1986

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

A mes parents

## REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je voudrais remercier mon directeur de thèse, monsieur Roger M. Leblanc pour ses judicieux conseils ainsi que pour l'aide et le support apportés lors de mes travaux de maîtrise.

J'aimerais également remercier monsieur Alain Tessier pour son aide en ce qui a trait à la partie expérimentale de ce travail et monsieur Gaétan Munger pour l'isolation et la purification de la chlorophylle a ayant servie à cette étude.

Finalement, je voudrais souligner la collaboration de monsieur Robert Carpentier pour ce qui est de l'interprétation des résultats entourant les systèmes in vivo.

## TABLE DES MATIÈRES

	Page
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
<b>CHAPITRES</b>	
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Objectifs du travail.....	1
1.2 Relation entre la chlorophylle <u>a</u> et la photosyn-	
thèse.....	5
1.3 Spectroscopie photoacoustique.....	9
1.3.1 Historique.....	9
1.3.2 Théorie de l'effet photoacoustique dans les	
solides.....	13
i) Équations du flux de chaleur.....	13
ii) Distribution de la température dans la	
cellule.....	18
iii) Production du signal acoustique.....	20
iv) Cas spéciaux.....	23
2. MATERIEL ET MÉTHODES.....	31
2.1 Produits utilisés.....	31
2.2 Extraction et purification de la chlorophylle <u>a</u> .....	31
2.3 Spectromètre photoacoustique.....	33
2.4 Spectromètre UV-visible.....	35

	Page
2.5 Description des méthodes.....	36
2.5.1 Préparation des films solides de chlorophylle <u>a</u> .....	36
2.5.2 Préparation des solutions solides de chlorophylle <u>a</u> .....	37
2.5.3 Préparation des films monomoléculaires de chlorophylle <u>a</u> .....	37
2.5.4 Systèmes <u>in vivo</u> .....	38
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	40
3.1 Films solides de chlorophylle <u>a</u> .....	40
3.1.1 Paramètres expérimentaux.....	42
3.1.2 Propriétés spectrales.....	43
3.1.3 Interactions eau-chlorophylle <u>a</u> .....	53
3.2 Solutions solides de chlorophylle <u>a</u> .....	59
3.2.1 Paramètres expérimentaux.....	59
3.2.2 Propriétés spectrales.....	60
3.3 Films monomoléculaires de chlorophylle <u>a</u> .....	65
3.3.1 Monocouches de chlorophylle <u>a</u> .....	65
i) Paramètres expérimentaux.....	67
ii) Propriétés spectrales.....	67
3.3.2 Multicouches de chlorophylle <u>a</u> .....	73
i) Paramètres expérimentaux.....	73
ii) Propriétés spectrales.....	74

	Page
iii) Variation de l'absorbance et de l'intensité du signal acoustique en fonction du nombre de monocouches.....	85
3.4 Systèmes <u>in vivo</u> .....	93
3.4.1 Effet de l'intensité du faisceau actinique sur le signal acoustique.....	95
3.4.2 Variation du signal acoustique en fonction de la fréquence de modulation.....	95
3.4.3 Variation du signal acoustique en fonction du temps.....	99
3.4.4 Variation du signal acoustique en fonction de la phase.....	105
4. CONCLUSION.....	108
BIBLIOGRAPHIE.....	119

#### ANNEXES

A. Détermination des coefficients pour les composantes ac et dc de la distribution de la température dans la cellule.....	113
B. Développement de la formule de la variation de pression sinusoïdale dans la cellule.....	115
C. Application de la loi de Beer aux films monomoléculaires.....	117

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableaux	
1. Caractéristiques des produits utilisés.....	32
2. Paramètres expérimentaux et propriétés des spectres photoacoustiques de films solides de chlorophylle <u>a</u> .....	45
3. Paramètres expérimentaux et propriétés des spectres électroniques de films solides de chlorophylle <u>a</u> .....	50
4. Paramètres expérimentaux et propriétés des spectres photoacoustiques de solutions solides de chlorophylle <u>a</u> .....	62
5. Paramètres expérimentaux et propriétés des spectres électroniques de solutions solides de chlorophylle <u>a</u> .....	63
6. Paramètres expérimentaux et propriétés des spectres photoacoustiques de monocouches de chlorophylle <u>a</u> .....	70
7. Propriétés des spectres électroniques de monocouches de chlorophylle <u>a</u> .....	71

	Page
8. Propriétés des spectres photoacoustiques de multicouches de chlorophylle <u>a</u> .....	77
9. Propriétés des spectres électroniques de multicouches de chlorophylle <u>a</u> .....	80

## LISTE DES FIGURES

	Page
FIGURES	
1. Diagramme d'un chloroplaste.....	7
2. Structure moléculaire de la chlorophylle <u>a</u> .....	8
3. Schéma de l'intérieur d'une cellule photoacoustique cylindrique.....	14
4. Répartition de la température dans la couche gazeuse adjacente à l'interface solide-gaz pour différentes valeurs de $\omega t$ .....	22
5. Représentation schématique de l'effet photoacoustique dans les solides.....	25
6. Diagramme schématique du spectromètre photoacoustique.....	34
7. Spectres photoacoustique (—) et électronique (---) d'un film solide de chlorophylle <u>a</u> .....	44
8. Spectre électronique d'un film solide de chlorophylle <u>a</u> ....	54

	Page
9. Spectres photoacoustiques et électroniques d'un film solide de chlorophylle <u>a</u> enregistrés sous différentes conditions. (—) film original, (----) film humide et (---) film asséché.....	56
10. Spectres photoacoustique (—) et électronique (----) de la chlorophylle <u>a</u> dans une solution solide de lécithine (chl <u>a</u> : PC, 1:200).....	61
11. Spectres photoacoustique (—) et électronique (----) d'une monocouche de chlorophylle <u>a</u> .....	68
12. Spectres photoacoustique (—) et électronique (----) d'une multicouche de chlorophylle <u>a</u> (12 monocouches).....	75
13. Spectres électroniques de la chlorophylle <u>a</u> pour différents nombres de monocouches. (—) 1 monocouche, (----) 4 monocouches, (---) 8 monocouches, (----) 30 monocouches et (....) 50 monocouches.....	84
14. Intensité du signal acoustique (-0-0-) et de l'absorbance (-x-x-) à 440 nm en fonction du nombre de monocouches de chlorophylle <u>a</u> .....	86

	Page
15. Intensité du signal acoustique (-0-0-) et de l'absorbance (-x-x-) à 680 nm en fonction du nombre de monocouches de chlorophylle <u>a</u> .....	87
16. Intensité du signal acoustique (-0-0-) et de l'absorbance (-x-x-) à 625 nm en fonction du nombre de monocouches de chlorophylle <u>a</u> .....	88
17. Spectre de différence (---) pour les spectres électroni- ques d'une monocouche de chlorophylle <u>a</u> (—) et de 50 monocouches de chlorophylle <u>a</u> (----).....	91
18. Effet de l'intensité du faisceau actinique sur le pourcen- tage de diminution de l'intensité du signal acoustique de la feuille d' <u>Impatiens petersiana</u> .....	96
19. Effet du faisceau actinique sur le signal acoustique de la feuille d' <u>Impatiens petersiana</u> en fonction de la fré- quence de modulation.....	97
20. Variation de l'intensité du signal acoustique de la feuil- le d' <u>Impatiens pertersiana</u> en fonction du temps. (↑) en présence et (↓) en absence du faisceau actinique .....	100

	Page
21. Spectres photoacoustiques de la feuille d' <u>Impatiens</u> <u>petersiana</u> en présence (—) et en absence (----) du faisceau actinique.....	103
22. Intensité du signal acoustique de la feuille d' <u>Impatiens</u> <u>petersiana</u> en présence (—) et en absence (----) du faisceau actinique en fonction de la phase.....	106

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

#### 1.1 Objectifs du travail

Dans la membrane interne du chloroplaste, il existe un état particulier de la chl a qui serait à l'origine de l'efficacité de la séparation de charges. Or, les molécules de chl a ont de grandes possibilités associatives afin de former des structures hautement ordonnées (Gurinovich et Strelkova, 1968; Krasnovsky et Bystrova, 1980). Distinctement, elles peuvent s'associer de trois façons (Seely, 1977): par les chaînes phytol de la molécule, par des interactions de dispersion des anneaux conjugués des porphyrines et par l'association de l'atome de magnésium avec les groupes carbonyles et/ou avec une ou des molécule(s) de solvant (Seely et Jensen, 1965; Mazurek et al., 1982). Le déplacement vers le rouge ("red shift"), que l'on retrouve dans les spectres électroniques de chlorophylle dans différents environnements, a toujours été attribué à différents types d'agrégats de chlorophylle ou à diverses interactions. Il est donc raisonnable de croire que l'interprétation de spectres pour les systèmes in vitro contribuerait à une meilleure compréhension de l'état de la chlorophylle dans les plantes. Ainsi, des spectres photoacoustiques et électroniques de chl a dans différentes conditions ont été obtenus afin d'étudier les types d'agrégats que l'on pourrait retrouver dans ces systèmes. Les systèmes modèles étudiés portent sur les films solides, les solutions solides et les mono- et multicouches de chl a.

L'étape suivante était de comparer les résultats spectroscopiques obtenus pour ces systèmes modèles avec ceux retrouvés in vivo afin de caractériser l'état de la chl a. Toutefois, notre recherche fut plutôt axée sur une étude plus originale soit celle de la perte photochimique en utilisant des feuilles d'Impatiens petersiana. Cette étude porte principalement sur la dépendance de cette perte photochimique en fonction de la variation de l'intensité des faisceaux modulé et actinique, de même qu'en fonction de la fréquence de modulation et de la phase. La spectroscopie photoacoustique constitue une méthode unique et originale pour cette étude, car contrairement à la spectroscopie optique conventionnelle, l'opacité du matériel utilisé (feuille) n'affecte pas la mesure expérimentale.

Les mesures optiques constituent une méthode non-destructive très importante pour l'investigation des solides. Les techniques les plus communes pour effectuer de tels types de mesures sont les spectroscopies électronique, de réflexion et de fluorescence. Toutefois, certains matériaux organiques et inorganiques tels les poudres, gels, huiles, composés amorphes, milieux opaques et diffusants ne peuvent être étudiés par les méthodes conventionnelles. Au cours des années, plusieurs techniques furent développées pour l'étude de ces composés, mais la plupart comportait d'importants inconvénients.

Les différentes voies de dissipation énergétique des molécules suite à l'absorption lumineuse sont les voies radiatives, non-radiatives et photochimiques. En spectroscopie de fluorescence, on est limité aux substances pour lesquelles l'absorption de lumière est suivie d'une

émission radiative, ce qui n'est pas toujours le cas pour les échantillons solides. Cependant, dans la plupart des cas, l'énergie lumineuse absorbée est transformée en chaleur par des transitions non-radiatives. Ainsi, la spectroscopie photoacoustique, basée sur les mesures des transitions non-radiatives des molécules, fut récemment développée afin de combler aux manques des méthodes optiques conventionnelles (Rosencwaig, 1973; Rosencwaig, 1975a; Rosencwaig, 1975b). Cette technique permet de mesurer la production de chaleur d'un échantillon lorsque celui-ci absorbe les irradiations d'un faisceau lumineux modulé. Son principal avantage réside dans le fait que l'on peut examiner des matériaux solides ou semi-solides, et les spectres photoacoustiques de ces échantillons apportent des données complémentaires à celles obtenues en spectroscopie électronique. De plus, la diffusion de lumière qui constitue un sérieux problème dans les méthodes optiques conventionnelles représente peu de difficultés en spectroscopie photoacoustique (Helander et al., 1980). Cette méthode spectroscopique constitue un outil supplémentaire très important pour l'investigation des solides et on compte déjà de nombreuses applications non seulement en chimie et physique, mais également dans le domaine de la biologie et de la médecine.

En spectroscopie photoacoustique des solides, l'échantillon est placé dans une cellule contenant un gaz et un microphone sensible. L'échantillon est alors illuminé avec un faisceau lumineux modulé. Si l'échantillon吸吸 une partie de cette énergie incidente, certains niveaux énergétiques des molécules seront excités. Le mode le plus commun de dissipation énergétique étant le mode non-radiatif, alors l'excitation optique périodique de l'échantillon résulte en un débit de

chaleur périodique de l'échantillon au gaz environnant dans la cellule photoacoustique. Ceci a pour effet de produire des oscillations de pression dans la cellule qui sont détectées par le microphone. Si on omet les phénomènes de saturation, l'intensité du signal acoustique est proportionnelle à la quantité de lumière absorbée par l'échantillon, car seule la lumière absorbée peut produire un signal; d'où la correspondance entre un spectre photoacoustique et un spectre électronique conventionnel. Il est à noter que, dans la spectroscopie électronique, certaines des radiations du faisceau lumineux incident sont absorbées et manquent dans la composition spectrale de la lumière après avoir traversé la cellule de mesure. Cependant, dans la technique photoacoustique, les radiations caractéristiques sont déterminées, non pas par leurs absences, mais en quelque sorte par les variations de pression auxquelles leur absorption donne naissance. L'étude photoacoustique ne requiert que de faibles quantités de substance, ce qui en fait une technique favorable pour les études de surfaces et de couches minces (Rosencwaig et Hall, 1975; Castleden et al., 1979; Fishman et Bard, 1981; Lloyd et al., 1982). De plus, cette technique peut être très utile dans l'investigation des propriétés optiques de divers échantillons. Certaines études ont démontré que l'effet photoacoustique peut être utilisé pour la détermination de coefficient d'absorption optique (Hordvik et Schlossberg, 1977; Wetsel et McDonald, 1977; McDonald, 1979; Carpentier et al., 1983a). Une étude plus approfondie de l'effet photoacoustique est présentée ultérieurement dans la section traitant de l'aspect théorique.

## 1.2 Relation entre la chlorophylle a et la photosynthèse

La photosynthèse est le processus par lequel les plantes, les algues et certaines bactéries absorbent l'énergie solaire et la conver-tissent efficacement sous forme d'énergie chimique. Le processus de base de la photosynthèse est relié à l'extraction d'électrons et de protons à partir d'un donneur, en particulier la molécule d'eau (Barber, 1978). En fait, une série de transfert de charge a lieu et l'accepteur final de l'électron est le bioxyde de carbone. Cet échange électron/proton donne lieu à la formation de bioxyde de carbone réduit, lequel constituant sert de molécule de base à la synthèse d'hydrates de carbone. Ces hydrates de carbone constituent la source d'énergie qui conduit aux différentes réactions chimiques favorisant la croissance et le développement des plantes.

En 1905, Blackman démontra que la photosynthèse pouvait être divi-sée en deux (2) types de réactions, soit

1) celles survenant dans la phase lumineuse qui consiste en l'absorption de l'énergie lumineuse couplée à la migration jusqu'au piège d'excitons, suivie d'une série de transfert de charge menant à la formation d'oxygène moléculaire et de produits chimiques hautement éner-gétiques (ATP et NADPH), ainsi que

2) celles qui ont lieu en phase sombre où les produits énergé-tiques formés sont utilisés pour réduire le bioxyde de carbone en hydra-tes de carbone via des séries couplées de réactions biochimiques connues sous le nom de cycle de Calvin (Gregory, 1971).

Dans les plantes vertes, le processus de la photosynthèse prend place dans une organelle spécialisée, le chloroplaste. Cette organelle comporte une membrane externe et une membrane interne avec un espace intermembranaire intermédiaire (figure 1). La membrane interne entoure une matrice (stroma) qui contient des enzymes solubles et des structures membranaires sous forme de sacs aplatis, les thylacoïdes. L'empilement des ces sacs lamellaires forment les grana. Dans les chloroplastes, les réactions lumineuses ont lieu dans les thylacoïdes tandis que les réactions sombres se présentent dans le stroma.

La chlorophylle a (chl a) est l'un des pigments les plus importants de la photosynthèse. Sa structure moléculaire est représentée à la figure 2. Sa structure est composée d'une porphyrine constituée de quatre unités pyrroles substituées (Mauzerall, 1977). Les doubles liaisons conjuguées formant le système d'électrons de la molécule serait l'unité importante favorisant une forte absorption de la lumière. La chl a吸吸ue principalement la lumière dans la région bleue (420-440 nm) et dans la région rouge (660-680 nm) du spectre visible. La chlorophylle n'agit pas seulement comme antenne réceptrice de l'énergie lumineuse, mais également comme donneur primaire dans le centre réactionnel. D'autres pigments se retrouvent dans les organismes photosynthétiques, on les appelle pigments accessoires. Les principales classes sont les caroténoïdes et les phycobilines.

L'efficacité de la photosynthèse est uniforme dans la plus grande partie du spectre, mais diminue significativement dans le rouge, soit à des longueurs d'onde supérieures à 680 nm (Radmer et Kok, 1977).

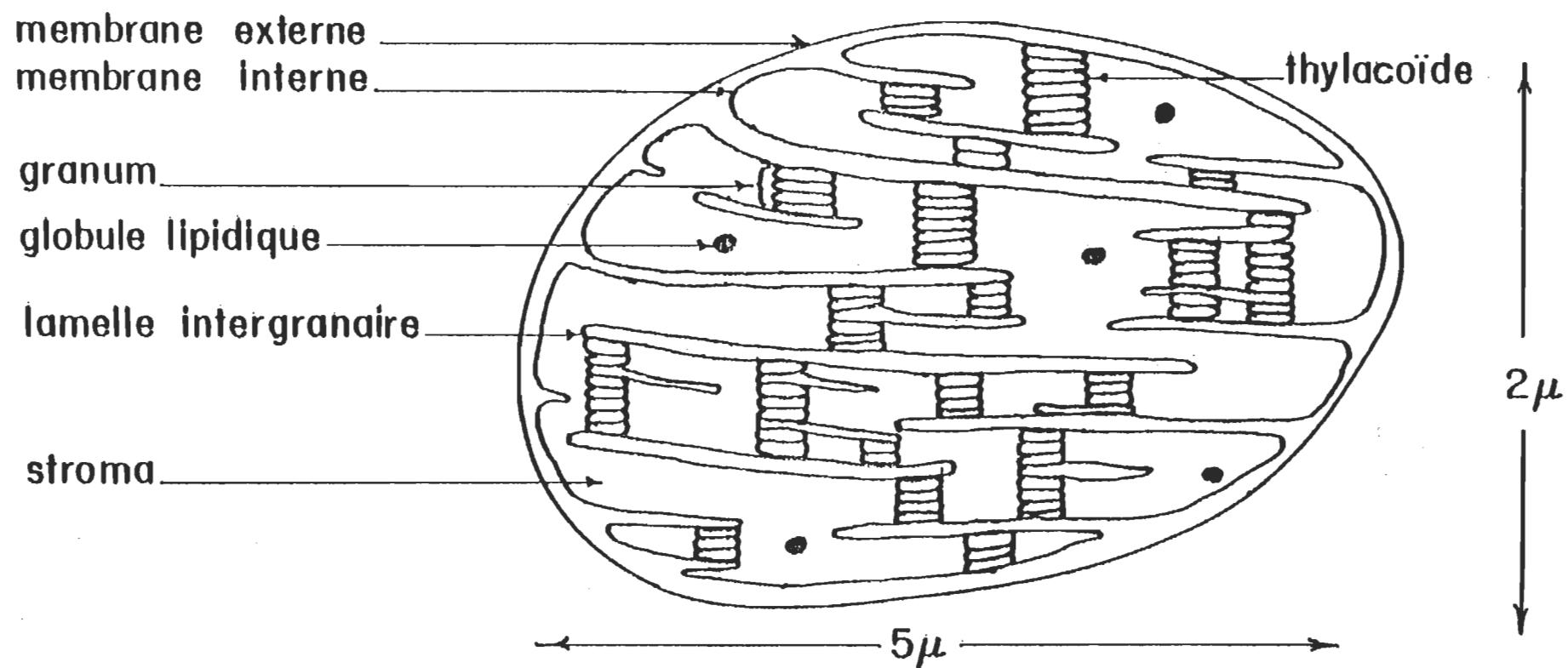


Figure 1. Diagramme d'un chloroplaste.

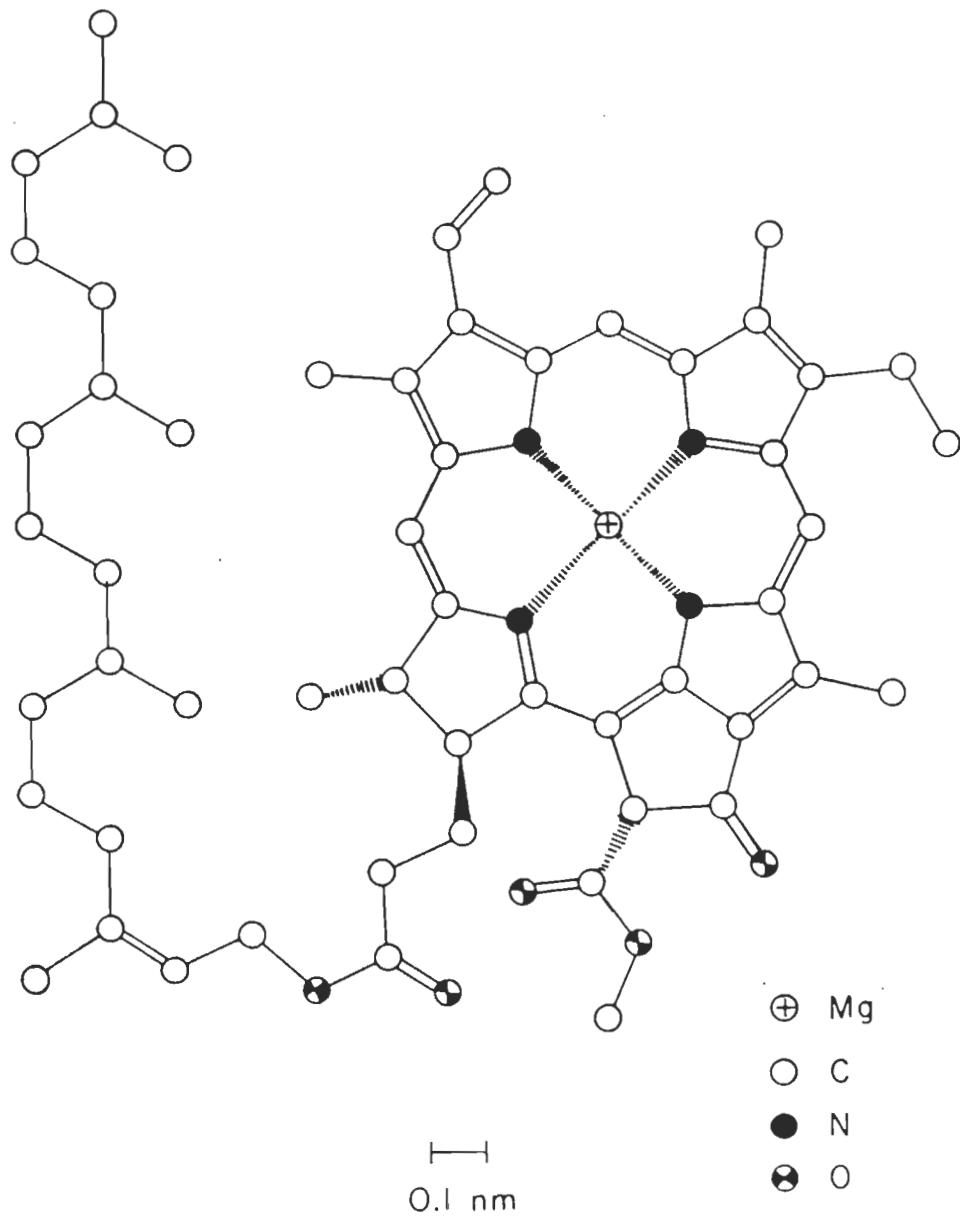


Figure 2. Structure moléculaire de la chlorophylle a.

Toutefois, Emerson a démontré que si on ajoute à la lumière de longueur d'onde 710 nm celle d'une lumière de plus courte longueur d'onde, l'efficacité quantique de la photosynthèse dans le rouge redevient normale (Emerson, 1958). Ces découvertes suggèrent que deux réactions lumineuses différentes sont nécessaires pour obtenir une efficacité photochimique maximale. En 1961, Duysens a établi que l'activité photosynthétique en présence d'une lumière de longueur d'onde élevée, attribuée au photosystème I, est associée à la chl a et n'est pas accompagnée d'une libération d'oxygène (Duysens et al, 1961). Le photosystème II, qui est activé par des longueurs d'onde plus courtes, est nécessaire à la libération d'oxygène.

Ainsi, chez les plantes vertes, il existe deux centres réactionnels différents ayant de la chlorophylle qui montre des changements caractéristiques d'absorption lumineuse. Les maxima de ces changements d'absorption, dans la région rouge du spectre, sont environ à 680 nm pour une forme appelée P680 et à 700 nm pour l'autre forme connue comme étant le P700. La conversion de la lumière en énergie chimique est accomplie via une série de transfert d'électron entre ces deux centres réactionnels (Velthuys, 1980).

### 1.3 Spectroscopie photoacoustique

#### 1.3.1 Historique

Bien que l'effet photoacoustique repose sur des concepts relativement anciens, ce n'est que depuis 1973 que cet effet fut

développé en un outil spectroscopique maintenant largement utilisé. L'effet photoacoustique fut découvert par Bell en 1880 lors de ses travaux sur le photophone, appareil permettant la transmission des sons à distance au moyen de rayons lumineux (Bell, 1881). Bell observa que lorsqu'un faisceau lumineux modulé était focalisé sur un solide placé dans une cellule close, un son audible pouvait être entendu à l'aide d'un tube-écouteur rattaché à la cellule. Suite à une série d'expériences, Bell démontra que la nature des rayons produisant l'effet sonore dans diverses substances dépendait de la nature des substances exposées au faisceau lumineux, et que pour chaque substance, les sons détectés étaient dus à l'absorption de l'énergie électromagnétique. Il nota que les signaux les plus intenses provenaient de substances poreuses, sombres et spongieuses. Bell a attribué la provenance du signal acoustique d'un solide spongieux à un processus cyclique par lequel des pulses d'air étaient expulsés et réabsorbés par les pores du solide en réponse au cycle de chauffage et de refroidissement du solide par le faisceau lumineux modulé. Motivés par la découverte de Bell, Roentgen et Tyndall ont découvert qu'un signal acoustique peut également être produit lorsqu'un gaz dans une cellule close est illuminé par une lumière modulée (Roentgen, 1881; Tyndall, 1881). Dans le cas où le solide est sous forme d'une mince membrane ou d'un disque flexible, Bell acceptait la théorie basée sur l'hypothèse que la source primaire du signal acoustique soit due à la vibration mécanique du disque résultant du chauffage inégal du disque suite à l'absorption de l'énergie lumineuse. Toutefois, Preece suggéra que le signal audible était essentiellement dû aux changements de volume dans les gaz ou vapeurs, changements produits par la dissipation et l'absorption de la chaleur dans l'espace aérifère.

(Preece, 1881). Mercadier qui expérimenta également l'effet photoacoustique à cette époque, proposa que le son provenait du mouvement de vibration engendré par le chauffage et le refroidissement alternés suite à l'absorption de la radiation intermittente, principalement dans la couche gazeuse adhérant à la surface solide (Mercadier, 1881).

Suite à ces travaux préliminaires, l'expérimentation sur l'effet photoacoustique a été mise en veilleuse. Ce n'est que cinquante ans plus tard que cet effet fut réexaminé suite à la découverte du microphone qui permettait de détecter un signal acoustique. En 1938, Viengerov utilisa l'effet photoacoustique pour étudier l'absorption de la lumière infra-rouge dans les gaz afin d'évaluer les concentrations d'espèces gazeuses d'un mélange (Viengerov, 1938). Une année plus tard, les expériences de Pfund ont présenté un intérêt additionnel à la technique photoacoustique. En effet, il observa des changements de pression dans la cellule grâce à l'emploi d'une thermopile pour mesurer directement les changements correspondants de la température du gaz (Pfund, 1939). En 1946, Gorelik fut le premier à proposer que la mesure de la phase dans le signal acoustique peut être utilisée pour examiner la vitesse de transfert d'énergie entre les degrés de liberté vibrationnels et translationnels des molécules gazeuses (Gorelik, 1946). En effet, si le temps d'irradiation est long comparativement au temps requis pour le transfert d'énergie, alors essentiellement toute l'énergie absorbée apparaîtra sous forme de chaleur et les fluctuations de pression résultantes seront en phase avec la radiation incidente périodique. Toutefois, en choisissant une fréquence de modulation du faisceau lumineux telle que le temps d'irradiation soit moindre que le temps requis pour

que le transfert d'énergie ait lieu, nous verrons apparaître une partie de l'énergie absorbée sous forme de chaleur périodique et la phase de la fluctuation de pression sera différente de la radiation incidente.

L'effet photoacoustique était principalement utilisé pour l'étude du temps de vie vibrationnel et autres aspects de dissipation énergétique dans les systèmes gazeux. L'avènement du laser dans les années 1970 produisit un essor majeur pour la spectroscopie photoacoustique des gaz étant donné le fait que le signal acoustique varie proportionnellement à la puissance du rayonnement incident. Les lasers de haute puissance permettaient ainsi l'analyse d'espèces gazeuses en faibles concentrations dans un mélange gazeux. A partir d'une série d'expériences, Kreuzer démontra qu'il était possible de détecter et d'identifier des espèces gazeuses en concentration aussi faibles que des parties par billion (ppb) (Kreuzer, 1971; Kreuzer et Patel, 1971; Kreuzer et al., 1972). L'étude photoacoustique des processus de dissipation énergétique dans les systèmes gazeux a été poursuivie activement par les travaux du groupe de Robin (Harshbarger et Robin, 1973a; Harshbarger et Robin, 1973b; Kaya et al., 1974; Robin et Kuebler, 1975; Kaya et al., 1975). Ce groupe a utilisé les nouvelles techniques optiques et électroniques pour étudier les effets cinétiques et photochimiques dans les gaz.

Contrairement à l'application de la spectroscopie photoacoustique dans les gaz qui compte plusieurs années d'expertise, la technique photoacoustique appliquée aux solides fut mise à part depuis les premières expériences de Bell et ce n'est qu'environ quatre-vingt-

dix ans plus tard qu'elle réapparaissait. Pendant ce temps, aucun développement mathématique de l'effet photoacoustique n'a été élaboré et il semble que la première tentative à ce chapitre fut effectuée par Parker en 1973 (Parker, 1973). Suite à ses travaux, Parker proposa que le type de gaz employé dans la cellule photoacoustique ne jouait pas un rôle important.

Depuis la dernière décennie, l'effet photoacoustique des solides a fortement progressé pour devenir une technique spectroscopique moderne, extrêmement utile pour l'investigation des matériaux non-gazeux.

### 1.3.2 Théorie de l'effet photoacoustique dans les solides

La théorie de l'effet photoacoustique appliquée aux solides fut développée par Allan Rosencwaig et Allen Gersho (Rosencwaig et Gersho, 1976; Rosencwaig, 1978a; Rosencwaig, 1978b). Cette théorie est basée sur l'hypothèse que la source primaire du signal acoustique provient du débit périodique de chaleur du solide au gaz environnant.

i) Équations du flux de chaleur Il est connu que toute lumière absorbée par un solide est convertie en partie ou entièrement en chaleur par un processus de dissipation énergétique non-radiatif dans le solide. Rosencwaig et Gersho formulèrent un modèle unidimensionnel de flux de chaleur dans la cellule résultant de l'énergie lumineuse absorbée. Considérons une cellule photoacoustique cylindrique (figure 3) de diamètre D et de longueur L. On suppose que la longueur L est petite comparée à la longueur d'onde du signal acoustique. L'échantillon est considéré

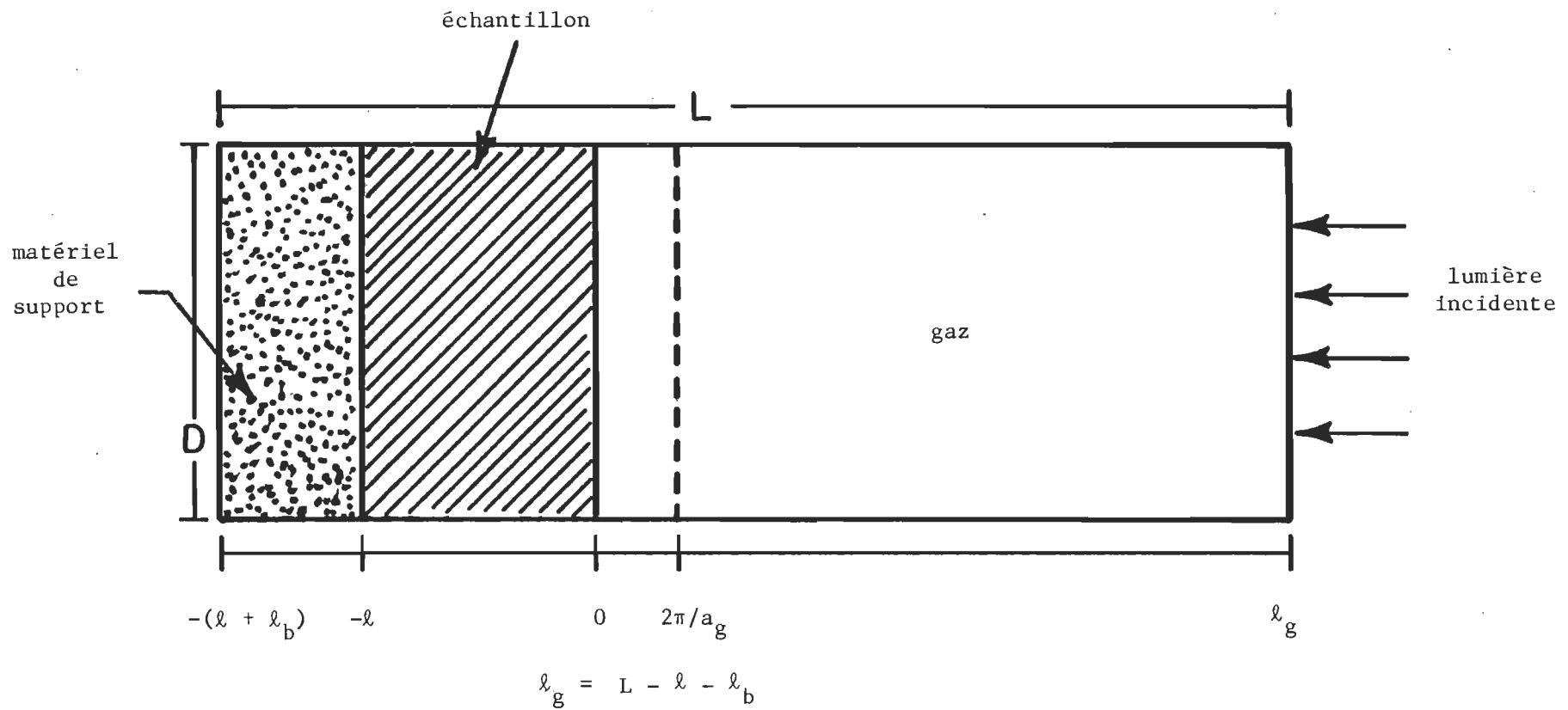


Figure 3. Schéma de l'intérieur d'une cellule photoacoustique cylindrique.

comme ayant la forme d'un disque de diamètre  $D$  et d'épaisseur  $\ell$ . Le matériel de support constitue un conducteur thermique pauvre d'épaisseur  $\ell_b$  et la longueur de la colonne de gaz dans la cellule est représentée par  $\ell_g$  dont l'expression est la suivante:

$$\ell_g = L - \ell - \ell_b$$

Définissons les paramètres suivants:

$K_j$ : conductivité thermique du matériel  $j$  ( $\text{cal cm}^{-1} \text{sec}^{-1} {}^\circ\text{C}^{-1}$ )

$\rho_j$ : densité du matériel  $j$  ( $\text{g cm}^{-3}$ )

$C_j$ : chaleur spécifique du matériel  $j$  ( $\text{cal gm}^{-1} {}^\circ\text{C}^{-1}$ )

$\alpha_j = (K_j / \rho_j C_j)$ : diffusivité thermique du matériel  $j$  ( $\text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$ )

$a_j = (\omega / 2\alpha_j)^{\frac{1}{2}}$ : coefficient de diffusion thermique du matériel  $j$  ( $\text{cm}^{-1}$ )

$\mu_j = 1/a_j$ : longueur de diffusion thermique du matériel  $j$  ( $\text{cm}$ )

où  $j$  peut être remplacé respectivement par la lettre  $s$ ,  $g$  ou  $b$  pour le solide, le gaz et le matériel de support;  $\lambda$  dénote la fréquence de modulation du faisceau lumineux incident en radians par seconde.

Supposons une source lumineuse modulée sinusoïdalement avec une longueur d'onde incidente  $\lambda$  sur le solide, l'intensité est alors exprimée par la relation

$$I = \frac{1}{2} I_0 (1 + \cos \omega t) \quad (1)$$

où  $I_0$  correspond au flux lumineux incident ( $\text{W cm}^{-2}$ ).

Soit  $\beta$ , le coefficient d'absorption optique ( $\text{cm}^{-1}$ ) de l'échantillon solide pour la longueur d'onde  $\lambda$ , alors la densité de chaleur produite à n'importe quel point  $x$  due à la lumière absorbée à ce point est donnée par la relation suivante:

$$\frac{1}{2}\beta I_0 e^{\beta x} (1 + \cos \omega t) \quad (2)$$

L'étape suivante dans l'approche de Rosencwaig et Gersho est d'établir les équations de diffusion thermique. Tenant compte de la distribution de la source de chaleur, l'équation pour le solide peut être écrite sous la forme

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha_s} \frac{\partial \phi}{\partial t} - A e^{\beta x} (1 + e^{i\omega t}) \quad \text{pour } -\ell \leq x \leq 0 \quad (3)$$

où  $\phi$  correspond à la température,  $i$  à  $\sqrt{-1}$  et  $A$  à  $\beta I_0 \eta / 2K_j$ .  $\eta$  est l'efficacité de la conversion de la lumière absorbée en chaleur par les processus de dissipation énergétique non-radiatifs à la longueur d'onde  $\lambda$ . Pour le matériel de support et le gaz, les équations de diffusion thermique sont respectivement les suivantes:

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha_b} \frac{\partial \phi}{\partial t} \quad \text{pour } -(\ell + \ell_b) \leq x \leq -\ell \quad (4)$$

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha_g} \frac{\partial \phi}{\partial t} \quad \text{pour } 0 \leq x \leq l_g \quad (5)$$

Le second terme dans l'équation (3) est absent pour les équations relatives au matériel de support et au gaz, car on les assume optiquement transparents. La partie réelle de la solution du terme complexe de  $\phi(x,t)$  représente la température dans la cellule relativement à la température ambiante en fonction de la position et du temps. Ainsi, la température réelle dans la cellule photoacoustique est donnée par l'expression

$$T(x,t) = \text{Re}[\phi(x,t)] + \Phi$$

où  $\text{Re}$  dénote "la partie réelle de" et  $\Phi$  est la température ambiante.

La solution des équations (3-5) est obtenue en appliquant les conditions limites appropriées. Ces conditions limites doivent satisfaire les exigences de température et de continuité du flux de chaleur aux frontières de l'échantillon (i.e., à  $x = 0$  et  $x = -l$ ) aussi bien qu'aux frontières des parois de la cellule (i.e., à  $x = l_g$  et  $x = -(l + l_b)$ ) qui sont considérées à température ambiante.

ii) Distribution de la température dans la cellule L'intérêt du traitement porte sur la connaissance de la variation de la température,  $\phi(x,t)$ , dans la cellule en fonction de la position et du temps. La solution générale pour  $\phi(x,t)$  peut être écrite comme suit:

(6)

$$\phi(x,t) = \begin{cases} 1/\lambda_b (x + \ell + \lambda_b)W_0 + We[\sigma_b(x+\ell) + i\omega t] & \text{pour } -( \ell + \lambda_b) \leq x \leq -\ell \\ e_1 + e_2 x + de^{\beta x} + [Ue^{\sigma_s x} + Ve^{-\sigma_s x} - Ee^{\beta x}]e^{i\omega t} & \text{pour } -\ell \leq x \leq 0 \\ (1 - x/\lambda_g)\theta_0 + \theta e^{(-\sigma_g x + i\omega t)} & \text{pour } 0 \leq x \leq \lambda_g \end{cases}$$

où  $W$ ,  $U$ ,  $V$ ,  $E$  et  $\theta$  sont des constantes de valeurs complexes;  $e_1$ ,  $e_2$ ,  $d$ ,  $W_0$  et  $\theta_0$  sont des constantes de valeurs réelles et  $\sigma_j = (1 + i)a_j$  avec  $a_j = (\omega/2\alpha_j)^{\frac{1}{2}}$ . Il est à noter que  $\theta$  et  $W$  représentent respectivement les amplitudes complexes des températures périodiques à la frontière gaz-échantillon ( $x = 0$ ) et à la frontière échantillon-matériel de support ( $x = -\ell$ ) tandis que les quantités  $W_0$  et  $\theta_0$  dénotent respectivement les composantes dc de la température aux frontières  $x = -\ell$  et  $x = 0$ . Les quantités  $E$  et  $d$  déterminées par la fonction en (3) sont données par les expressions suivantes:

$$d = -A/\beta^2 \quad (7)$$

$$E = A/(\beta^2 - \sigma_s^2) = \beta I_0/2K_s (\beta^2 - \sigma_s^2) \quad (8)$$

avec  $\eta = 1$

Ainsi, la distribution de température dépendante du temps dans la cellule comporte une composante ac et dc de même qu'une composante exponentielle croissante. Toutefois, ce dernier terme n'est pas présent

dans la solution générale (6) pour le gaz et le matériel de support, car pour toutes les fréquences  $\omega$  d'intérêt, la longueur de diffusion thermique ( $\mu_j$ ) est petite comparativement à la longueur du matériel dans le gaz ( $\ell_g$ ) et dans le matériel de support ( $\ell_b$ ). Ainsi, les composantes sinusoïdales de ces solutions sont suffisamment atténueées pour qu'aux parois de la cellule, elles soient effectivement nulles.

En établissant les conditions frontières aux surfaces gaz-échantillon et matériel de support-échantillon et en effectuant les opérations obtenues sur les composantes dc de l'équation (6), il est possible de déterminer les coefficients  $e_1$ ,  $e_2$ ,  $d$ ,  $W_0$  et  $\theta_0$ . De la même façon, en appliquant les opérations sur les composantes ac de l'équation (6), les coefficients  $E$ ,  $U$ ,  $V$ ,  $W$  et  $\theta$  pourront être déterminés. Ces solutions (voir Annexe A) permettent d'évaluer la distribution de température dans la cellule en terme de paramètres optiques, thermiques et géométriques du système. Il est à mentionner que seulement la partie ac est importante pour la production du signal acoustique. Ainsi, la solution explicite de  $\theta$ , qui correspond à l'amplitude complexe de la température à la frontière gaz-échantillon ( $x = 0$ ), est donnée par l'expression

(9)

$$\theta = \frac{\beta I_0}{2K_s(\beta^2 - \sigma_s^2)} \left[ \frac{(r - 1)(b + 1)e^{\sigma_s \ell} - (r + 1)(b - 1)e^{-\sigma_s \ell} + 2(b - r)e^{-\beta \ell}}{(g + 1)(b + 1)e^{\sigma_s \ell} - (g - 1)(b - 1)e^{-\sigma_s \ell}} \right]$$

$$\text{où } b = K_b a_b / K_s a_s$$

$$g = K_g a_g / K_s a_s$$

$$r = (1 - i)\beta / 2a_s$$

L'équation (9) est évaluée pour des valeurs de paramètres spécifiques donnant un nombre complexe comportant les parties réelle et imaginaire  $\theta_1$  et  $\theta_2$  qui déterminent respectivement les composantes en phase et en quadrature pour la variation de température périodique à la surface  $x = 0$ . Spécifiquement, la température actuelle à  $x = 0$  est donnée par la relation

$$T(0, t) = \Phi + \theta_o + \theta_1 \cos \omega t - \theta_2 \sin \omega t \quad (10)$$

où  $\Phi$  est la température ambiante et  $\theta_o$  est l'augmentation de la température due à la composante de l'état stationnaire de la chaleur absorbée.

iii) Production du signal acoustique La variation de température périodique dans le gaz est donnée par la composante sinusoïdale (ac) de la solution (6)

$$\theta_{ac}(x, t) = \theta \exp(-\sigma_g x + i\omega t) \quad (11)$$

En prenant la partie réelle de (11), on obtient la variation de température physique actuelle dans le gaz qui est donnée par l'expression

$$T_{ac}(x, t) = e^{-\alpha_g x} [\theta_1 \cos(\omega t - \alpha_g x) - \theta_2 \sin(\omega t - \alpha_g x)] \quad (12)$$

La variation de la température dépendante du temps dans la phase gazeuse en fonction de la distance de la surface de l'échantillon est présentée à la figure 4. On remarque que la variation de température s'atténue rapidement de zéro jusqu'à la distance  $2\pi\mu_g$ . La couche d'épaisseur  $2\pi\mu_g$  de la surface du solide est alors définie comme la couche pouvant répondre thermiquement à la température périodique. Le gaz dans cette couche s'expand et se contracte périodiquement et agit comme un piston sur le reste de la colonne de gaz.

En mesure de déterminer le déplacement  $\delta x(t)$  de cette limite, il est nécessaire de connaître la température moyenne  $\bar{\phi}(t)$  dans cette couche, c'est-à-dire

$$\bar{\phi}(t) = \frac{1}{2\pi\mu_g} \int_0^{2\pi\mu_g} \phi_{ac}(x, t) dx$$

$$\bar{\phi}(t) \approx \frac{1}{2\pi\sqrt{2}} \theta e^{i(\omega t - \pi/4)} \quad (13)$$

A partir de la loi des gaz parfaits, le déplacement de ce piston gazeux est exprimé par la relation

$$\frac{\delta x(t)}{\bar{\phi}(t)} = \frac{2\pi\mu_g}{T_0}$$

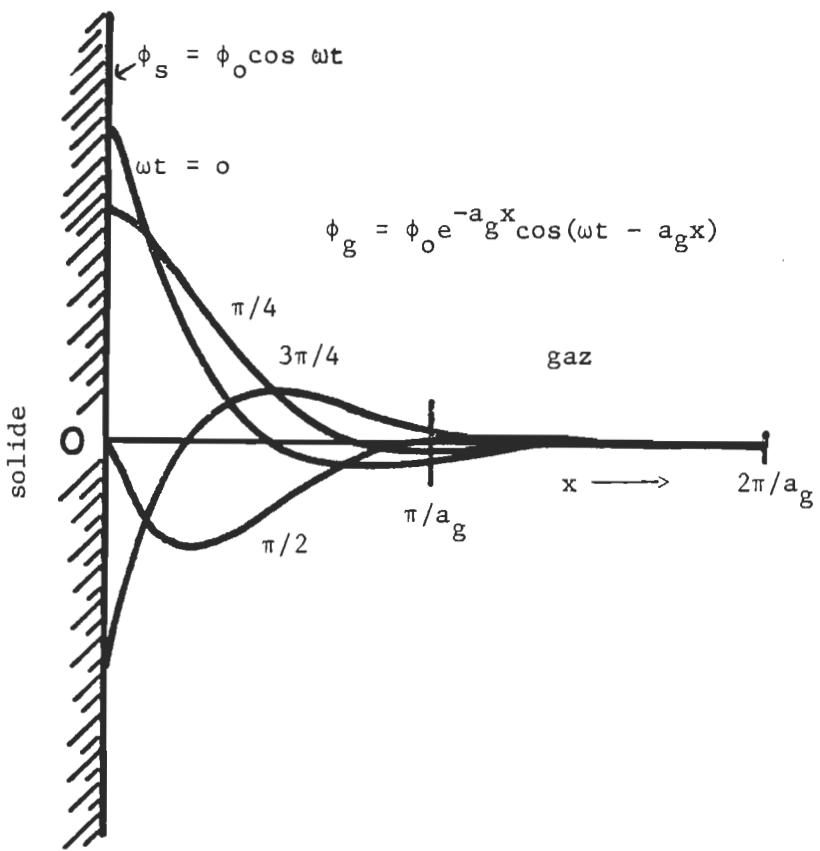


Figure 4. Répartition de la température dans la couche gazeuse adjacente à l'interface solide-gaz pour différentes valeurs de  $\omega t$ .

$$\text{d'où } \delta x(t) = \frac{\theta \mu g}{T_0 \sqrt{2}} e^{i(\omega t - \pi/4)} \quad (14)$$

où  $T_0$  est la somme de la température ambiante et de la composante de la température à la surface solide. En assumant que la colonne de gaz répond à l'action du piston de façon adiabatique (sans échange de chaleur) et en utilisant la variation de pression actuelle  $\Delta p(t)$ , on obtient une formule explicite correspondant à la variation de pression sinusoïdale (voir Annexe B)

$$Q = \frac{\beta I_o \gamma P_o}{2 K_s \lambda_g a_g T_o (\beta^2 - \sigma_s^2) \sqrt{2}} \left[ \frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma s^{\lambda}} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma s^{\lambda}} + 2(b-r)e^{-\beta s^{\lambda}}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma s^{\lambda}} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma s^{\lambda}}} \right] \quad (15)$$

Aux températures les plus courantes,  $T_o \approx \Phi$ , les composantes de la distribution de température n'ont pas besoin d'être évaluées. Ainsi, le développement de Rosencwaig et Gersho permet de déterminer l'amplitude et la phase de l'onde de pression acoustique produite dans la cellule par effet photoacoustique.

iv) Cas spéciaux L'expression de  $\delta P(t)$  est difficile d'interprétation due à la formule complexe de Q. Toutefois, en considérant certains cas spéciaux, l'expression de Q peut devenir relativement simple; c'est le but que se sont fixés Rosencwaig et Gersho en groupant ces différents cas selon l'opacité optique des solides. Pour chaque catégorie d'opacité optique, trois cas ont été considérés en fonction de

l'amplitude relative de la longueur de diffusion thermique ( $\mu_s$ ), de l'épaisseur de l'échantillon ( $\ell$ ) et de la longueur d'absorption optique ( $\mu_\beta$ ). Dans tous les cas considérés, on suppose que  $g < b$  et  $b \approx 1$ ; c'est-à-dire que  $K_g a_g < K_b a_b$  et  $K_b a_b \approx K_s a_s$ . Pour les six cas illustrés à la figure 5, on définit

$$Y = \frac{\gamma P_0 I_0}{2 \ell g T_0 \sqrt{2}}$$

un terme constant apparaissant dans l'expression de Q.

1) Solides optiquement transparents ( $\mu_\beta > \ell$ ) Dans ce cas, la lumière est absorbée sur toute la longueur de l'échantillon et une partie de la lumière est transmise à travers le solide.

A) Solides thermiquement minces ( $\mu_s > \ell$ ;  $\mu_s > \mu_\beta$ )

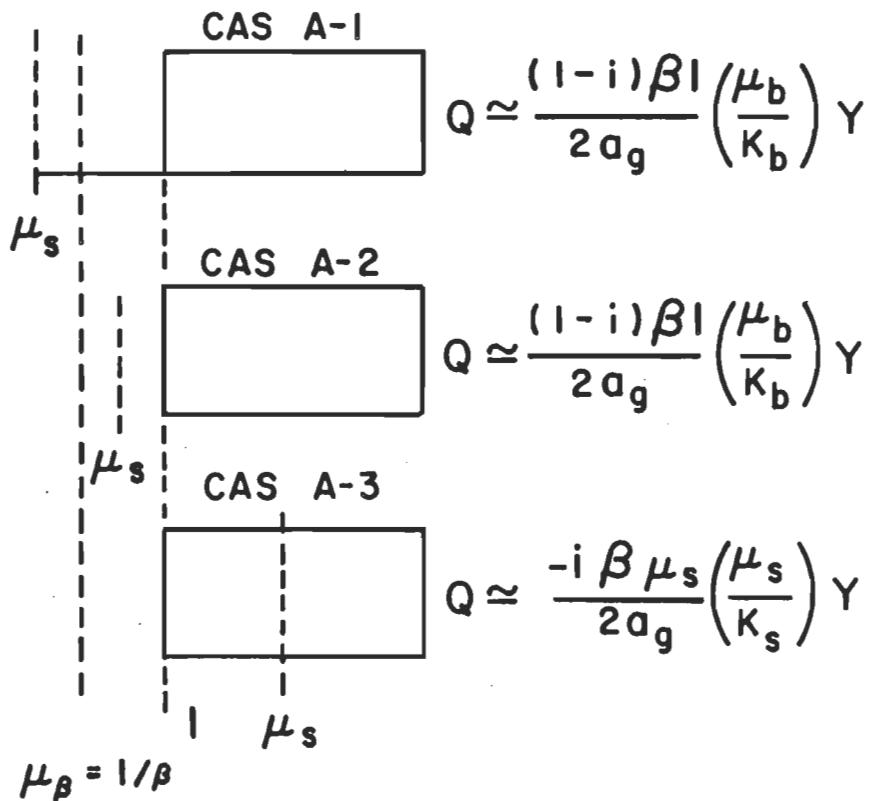
Dans ce cas, on pose comme approximation que

$$e^{-\beta \ell} \approx 1 - \beta \ell, e^{\pm \sigma_s \ell} \approx 1 \text{ et } |r| > 1$$

En remplaçant ces termes dans l'équation (15), on obtient comme expression:

$$Q = \frac{\ell Y}{2 a_g a_b K_b} (\beta - 2 a_s b - i\beta) \approx \frac{(1-i)\beta \ell}{2 a_g} \frac{(\mu_b)}{(K_b)} Y \quad (16)$$

Solides optiquement transparents ( $\mu_\beta > 1$ )



Solides optiquement opaques ( $\mu_\beta \ll 1$ )

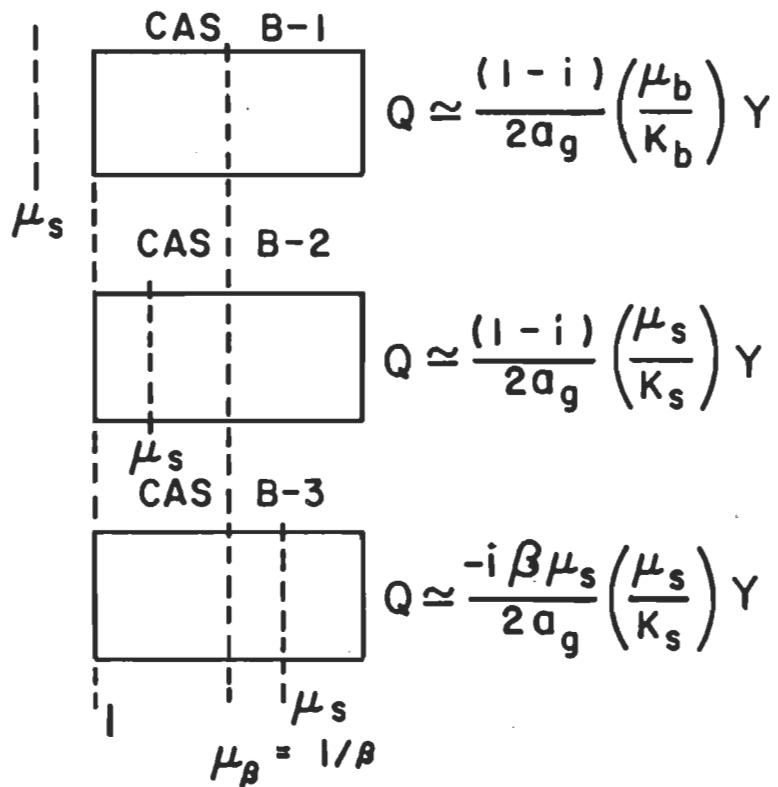


Figure 5. Représentation schématique de l'effet photoacoustique dans les solides.

Le signal acoustique est donc proportionnel à  $\beta l$  et varie selon  $\omega^{-1}$ . De plus, les propriétés thermiques du matériel de support sont considérées dans l'expression de Q.

B) Solides thermiquement minces ( $\mu_s > \beta l$ ;  $\mu_s < \mu_\beta$ )

Ici, on pose

$$e^{-\beta l} \approx 1 - \beta l, \quad e^{\pm \sigma_s l} \approx 1 \pm \sigma_s l \text{ et } |r| < 1$$

Le signal acoustique devient alors

$$Q = \frac{\beta l Y}{4K_s a_g a_s^3 b} [(\beta^2 + 2a_s^2) + i(\beta^2 - 2a_s^2)]$$

$$Q \approx \frac{(1-i)\beta l}{2a_g} \frac{(\mu_b)}{(K_b)} Y \quad (17)$$

Le signal est proportionnel à  $\beta l$  et varie selon  $\omega^{-1}$ .

De plus, l'expression de Q dépend des propriétés thermiques du matériel de support.

C) Solides thermiquement épais ( $\mu_s < \beta l$ ;  $\mu_s \ll \mu_\beta$ )

En appliquant pour ce cas les approximations

$$e^{-\beta l} \approx 1 - \beta l, \quad e^{-\sigma_s l} \approx 0 \text{ et } |r| \ll 1$$

dans l'équation (15), nous obtiendrons l'expression suivante du signal acoustique,

$$Q \approx \frac{-i\beta\mu_s}{2a_g} \frac{(\mu_s)}{(K_s)} Y \quad (18)$$

Le signal est donc proportionnel à  $\beta\mu_s$ , ainsi, seulement la lumière absorbée dans les premières couches de l'échantillon contribue au signal en dépit du fait que la lumière est absorbée sur toute la longueur de l'échantillon. De plus, étant donné que  $\mu_s < \ell$ , les propriétés thermiques du matériel de support sont remplacées par celles du solide et l'expression de  $Q$  varie selon  $\omega^{-3/2}$ .

2) Solides optiquement opaques ( $\mu_\beta < \ell$ ) Dans ce cas, la plupart de la lumière est absorbée sur une faible distance comparativement à la longueur de l'échantillon et essentiellement aucune lumière n'est transmise.

A) Solides thermiquement minces ( $\mu_s \gg \ell$ ;  $\mu_s \gg \mu_\beta$ )

Ici, on pose que

$$e^{-\beta\ell} \approx 0, e^{\pm\sigma_s\ell} \approx 1 \text{ et } |r| \gg 1$$

et on obtient pour l'expression de  $Q$  la relation

$$Q \approx \frac{(1-i)}{2a_g} \frac{(\mu_b)}{(K_b)} Y \quad (19)$$

Dans ce cas, on est en présence d'un phénomène de saturation optique dans le sens que le signal acoustique est indépendant de  $\beta$ . L'expression de  $Q$  dépend des propriétés thermiques du matériel de support et varie selon  $\omega^{-1}$ .

B) Solides thermiquement épais ( $\mu_s < \ell$ ,  $\mu_s > \mu_\beta$ )

On pose que

$$e^{-\beta\ell} \approx 0, e^{-\sigma_s\ell} \approx 0 \text{ et } |r| > 1$$

et on obtient

$$Q \approx \frac{Y}{2a_g a_s K_s \beta} (\beta - 2a_s - i\beta) \approx \frac{(1-i)}{2a_g} \frac{(\mu_s)}{(K_s)} Y \quad (20)$$

L'équation (20) est analogue à l'équation (19), sauf que les paramètres thermiques du matériel de support sont remplacés par ceux du solide.

C) Solides thermiquement épais ( $\mu_s \ll \ell$ ;  $\mu_s < \mu_\beta$ )

Ici, on pose que

$$e^{-\beta\ell} \approx 0, e^{-\sigma_s\ell} \approx 0 \text{ et } |r| < 1$$

et en remplaçant ces expressions dans l'équation (15) on obtient

$$Q = \frac{-i\beta Y}{4a_g a_s^3 K_s} (2a_s - \beta + i\beta) = \frac{-i\beta \mu_s (\mu_s)}{2a_g (K_s)} Y \quad (21)$$

Optiquement, nous sommes en présence d'un solide très opaque ( $\beta l \gg 1$ ). Toutefois, il est à noter que pour  $\beta \mu_s < 1$  (i.e.,  $\mu_s < \mu_\beta$ ), le solide n'est pas en saturation optique et tout comme le cas C du point 1), seulement la lumière absorbée dans les premières couches contribuera au signal acoustique. Ainsi, même si le solide est optiquement opaque, le signal acoustique est proportionnel à  $\beta \mu_s$ . De plus, le signal est dépendant des propriétés thermiques du solide et varie selon  $\omega^{-3/2}$ .

L'effet photoacoustique repose donc sur une théorie qui est fonction des trois paramètres suivants: l'épaisseur de l'échantillon ( $l$ ), la longueur d'absorption optique ( $\mu_\beta$ ) et la longueur de diffusion thermique ( $\mu_s$ ). Dans certaines situations où les caractéristiques de ces paramètres ne sont pas comprises dans les cas spéciaux décrits ci-haut, il est nécessaire d'utiliser l'expression exacte développée par Rosencwaig et Gersho (15) pour déterminer le signal acoustique. Cependant, il est à noter que l'épaisseur de l'échantillon et la longueur de diffusion thermique sont ajustables; le premier lors de la préparation de l'échantillon, le second par l'intermédiaire de la fréquence de modulation. Il est donc possible de fixer les conditions

expérimentales, de sorte que nous puissions apporter une interprétation de nos données expérimentales sur une base satisfaisant les principes théoriques.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Produits utilisés

La pureté des produits utilisés joue un rôle déterminant dans cette étude, particulièrement lors des expériences sur les mono- et multicouches de chl a. En effet, la réussite des manipulations entourant cette technique dépend fortement de la qualité des produits employés. La provenance des produits de même que leurs propriétés et/ou puretés sont indiquées dans le tableau 1.

#### 2.2 Extraction et purification de la chlorophylle a

L'extraction et la purification de la chl a, provenant de feuilles d'épinards, furent effectuées selon la méthode d'Omata et Murata (Omata et Murata, 1980). La première étape de cette méthode consiste à extraire partiellement la chl a par précipitation au dioxane et dans une seconde partie, la chl a est séparée des autres pigments par chromatographie sur colonne. Dans cette dernière étape, deux types de colonnes sont utilisées pour isoler et pour purifier la chl a: dans un premier temps, le DEAE-sépharose CL-6B est utilisé dans la colonne pour éliminer les caroténoïdes et certains lipides, puis une seconde colonne contenant le sépharose CL-6B permet de séparer la chl a de la chl b.

Tableau 1

## CARACTÉRISTIQUES DES PRODUITS UTILISÉS

Produit	Provenance	Propriété et/ou pureté
acide arachidique	Applied Science Lab Inc.	≥ 99%
acide sulfochromique	Fisher Sci. Co.	
benzène	Anachemia Chem. Ltd	99.5% - distillé*
chloroforme	J.T. Baker	réactif A.C.S. 99.5% - distillé*
chlorophylle <u>a</u>	Extraction (voir section 2.2)	
chlorure de cadmium	J.T. Baker	99.2% - anhydre
eau	Lab. U.Q.T.R.	distillée*-déminéralisée résistivité: 18 meg-ohms.cm tension superficielle: ≥ 70 ± 1 dynes cm <sup>-1</sup>
éthanol	BDH Chemicals Ltd	95.0%
éther éthylique	BDH Chemicals Ltd	99.7%
feuilles (plante)	<u>Impatiens petersiana</u>	
hydroxyde de sodium	Fisher Sci. Co.	réactif A.C.S.
lécithine bovine	Applied Science Lab. Inc.	
méthanol	Anachemia Chem Ltd	réactif A.C.S. 99.8% - distillé*
paraffine	Fisher Sci. Co.	point de fusion: 57-62°C
tampon trizma HCl	Sigma	
tampon trizma base	Sigma	

\* produit distillé dans nos laboratoires.

Plusieurs méthodes expérimentales sont utilisées pour vérifier la pureté de la chl a. Les principales techniques sont les suivantes: la chromatographie sur couche mince, la chromatographie liquide à haute-performance (HPLC) et les isothermes de pression de surface. Cette dernière technique consiste à mesurer l'aire moléculaire d'une monocouche de chl a déposée à l'interface air-eau sous une pression de surface déterminée.

La technique d'extraction de la chl a développée par Omata et Murata a l'avantage de séparer la chl a des autres pigments photosynthétiques avec un très bon rendement et un haut niveau de pureté.

### 2.3 Spectromètre photoacoustique

Un spectromètre photoacoustique à simple faisceau avec une lampe au Xénon de 1000 W (Schoeffel Inst. Corp.) est utilisé dans cette étude. Le diagramme schématique du spectromètre photoacoustique est représenté à la figure 6. Le faisceau lumineux provenant de la lampe passe à travers un monochromateur à réseau (Schoeffel Inst. Corp. GMA250) de distance focale 25 cm et d'une dispersion de  $3.6 \text{ nm mm}^{-1}$ . Le faisceau monochromatique est modulé à une fréquence variant de 25 à 1000 Hz à l'aide d'un disque rotatif mécanique relié à un contrôleur de fréquence (Bentham 218F). Le faisceau lumineux est ensuite focalisé et réfléchi à l'aide d'un miroir (distance focale 15 cm) sur la cellule photoacoustique qui contient l'échantillon. Le signal acoustique détecté par le microphone est préamplifié avant d'être acheminé à un amplificateur

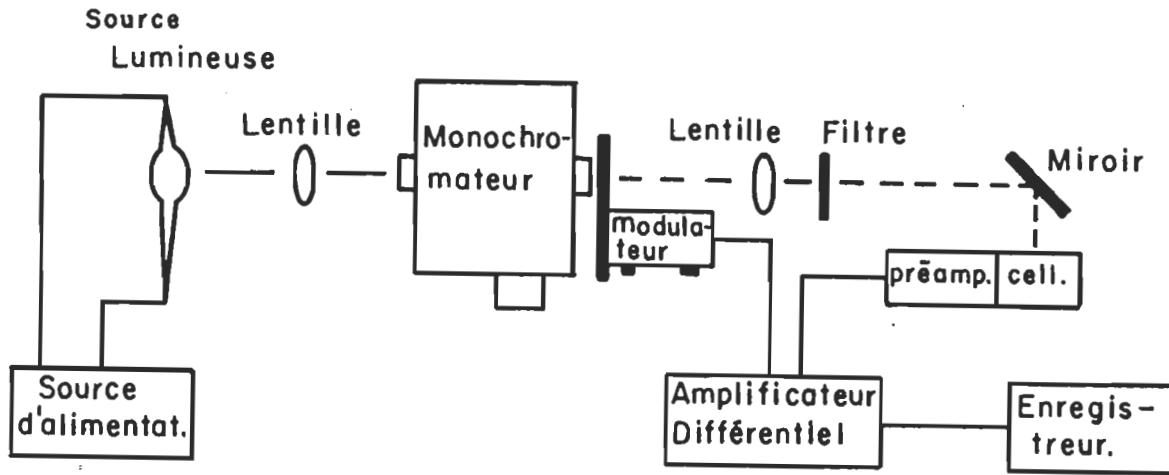


Figure 6. Diagramme schématique du spectromètre photoacoustique.

synchrone (Ithaco/Dynatrac modèle 393) qui est directement relié au contrôleur de fréquence. Le signal provenant de l'amplificateur peut alors être traité à l'aide d'un micro-ordinateur (Challenger II).

Pour les spectres photoacoustiques, le signal mesuré correspond au signal acoustique provenant de l'échantillon divisé par le signal acoustique provenant du noir de charbon, utilisé comme référence. Le noir de charbon est un milieu entièrement absorbant qui dissipe sous forme de chaleur toute absorption lumineuse. De cette façon, les variations dans l'intensité lumineuse de la lampe au Xe en fonction du temps à différentes longueurs d'onde sont considérées dans la mesure du signal acoustique. Dans certaines mesures, la phase du signal est ajustée afin d'obtenir le signal maximum provenant de l'échantillon. En utilisant une intensité lumineuse de  $1 \text{ mW cm}^{-2}$  à 100 Hz avec le noir de charbon comme référence, nous obtenons un rapport signal/bruit se situant à 2500 comparativement à la valeur déterminée ultérieurement, soit de 3600 (Ducharme et al., 1979). Les spectres photoacoustiques de la chl a dans différents systèmes modèles ont été déterminés en faisant varier, dans certains cas, les paramètres suivants: vitesse de balayage, ouverture des fentes et le temps de réponse. Le choix des paramètres employés sera justifié dans la partie Résultats et discussion.

#### 2.4 Spectromètre UV-visible

Les spectres électroniques pour chacun des échantillons des systèmes étudiés ont été déterminés en utilisant un spectrophotomètre à

double faisceau Cary 17D. Dans la plupart des cas, ces spectres furent enregistrés avant et après les mesures photoacoustiques afin de vérifier l'éventuelle possibilité d'une dégradation de la chl a.

## 2.5 Description des méthodes

2.5.1 Préparation des films solides de chlorophylle a En premier lieu, la chl a est mise en solution dans différents solvants à des concentrations variant de 1.2 à  $6.2 \times 10^{-4}$  M, afin d'étudier les interactions entre la chl a et les molécules de solvants. Les solvants utilisés dans cette étude sont le benzène, l'éther éthylique et le chloroforme. Par la suite, de 15 à 50 µl de la solution est déposée sur des lamelles de verre ou de quartz préalablement rendues hydrophiles, par un lavage à l'éthanol bouillant et immersion dans de l'acide sulfochromique, ou hydrophobes, par un lavage à l'éthanol. Les films solides se forment sur les lamelles en laissant évaporer le solvant sous différentes conditions: soit à l'air libre, sous un jet d'azote ou sur une plaque chauffante.

Lors de l'étude des interactions eau-chlorophylle, les films solides de chl a furent placés dans un contenant en verre clos dans lequel un bêcher d'eau fut placé afin d'obtenir un milieu humide à température ambiante qui favoriserait les interactions entre les molécules de chl a et d'eau. La pression de vapeur d'eau dans le contenant se situe à 17.54 mm de Hg à la température ambiante (20°C) (CRC Handbook of chemistry and physics, 66 ed., 1985-1986, p. D-190). Pour assécher

le même échantillon, ce dernier est placé dans un dessicateur contenant du P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> pendant environ vingt-quatre heures. Cette procédure n'élimine toutefois pas la totalité des molécules d'eau présentes dans les films solides de chl a.

2.5.2 Préparation des solutions solides de chlorophylle a Semblable à la technique des films solides de chl a, les solutions solides sont formées sur lamelles de quartz hydrophiles en déposant un volume, variant de 75 à 200 µl, d'un mélange chl a:phosphatidylcholine (bovine) dans des proportions molaires 1:25 et 1:200. Le solvant employé pour les solutions de chl a et de lécithine bovine est le chloroforme et les solutions solides de chl a sont formées en évaporant le solvant avec un jet d'azote. Ce jet est dirigé directement vers l'échantillon à l'aide d'un entonnoir inversé.

2.5.3 Préparation des films monomoléculaires de chlorophylle a Les mono- et multicoques de chl a furent déposées sur des lamelles de quartz de forme circulaire (diamètre 2.5 cm) en suivant la technique de Langmuir-Blodgett (Langmuir, 1917). Les diverses caractéristiques entourant l'utilisation du système, pour l'étude des monocouches à l'interface air-eau ainsi que de la déposition des films monomoléculaires sur un support solide, ont été expliquées antérieurement (Munger, 1979). Les lamelles de quartz, préalablement rendues hydrophiles par un lavage dans de l'éthanol bouillant puis par immersion dans de l'acide sulfo-chromique, furent assemblées 2 x 2 à l'aide de paraffine afin d'obtenir une mono- et une multicoque de chl a sur un seul côté de la lamelle.

Les monocouches de chl a ont été déposées sur des lamelles de quartz hydrophiles et dans certains cas, ces dernières furent neutralisées avec une solution NaOH, 0.01N, pour éviter la dégradation possible de la chl a en phéophytine au contact des lamelles acides. Pour ce qui a trait aux multicoches de chl a, celles-ci ont été déposées sur une base hydrophobe qui est constituée de cinq (5) monocouches d'arachidate de cadmium. La déposition de la monocouche du sel de l'acide gras fut effectuée à une pression de surface de  $30 \text{ mN m}^{-1}$  en utilisant un tampon Tris-HCl  $10^{-3} \text{ M}$  (pH 8.5) comme sous-phase, tandis que les mono- et multicoches de chl a ont été déposées à une pression de surface de  $20 \text{ mN m}^{-1}$  avec l'utilisation du même tampon comme sous-phase. Seulement les lamelles ayant des rapports de déposition de  $1.0 \pm 0.1$  ont été utilisées pour les études spectroscopiques.

Toutes les expériences ont été menées en prenant soin de conserver les mêmes conditions expérimentales (température ambiante, température de la sous-phase, pourcentage d'humidité, vitesse de déposition ...) afin d'assurer une reproductibilité dans les résultats expérimentaux. Finalement, la normalisation de certains spectres électroniques a été effectuée à l'aide d'un traitement informatique afin de comparer les résultats spectroscopiques entre échantillons possédant différents nombres de monocouches de chl a.

2.5.4 Systèmes in vivo Pour les expériences mettant en jeu des mesures photoacoustiques de feuilles provenant d'Impatiens petersiana, un cercle de 1.8 cm de diamètre fut découpé dans la feuille. Cet

échantillon a été directement introduit dans la cellule photoacoustique. Pour la croissance de l'Impatiens petersiana, quatre lampes au néon de 35 W chacune, placées à une distance d'environ un mètre de la plante, furent utilisées en prenant soin de régler le temps d'exposition à huit heures/jour. Dans quelques expériences, un faisceau actinique d'une lampe tungstène-quartz halogène était ajouté au faisceau modulé afin de saturer l'effet photochimique de la feuille. Les raisons de ce phénomène seront expliquées ultérieurement. Le faisceau actinique, directement focalisé sur l'échantillon, a une intensité lumineuse maximale de  $32 \text{ W m}^{-2}$  et son spectre possède un maximum à 680 nm. A l'occasion, des filtres sont employés pour diminuer l'intensité du faisceau actinique. Afin de maintenir l'intensité lumineuse constante au cours des expériences, une plaquette d'aluminium a été insérée dans le parcours du faisceau actinique afin d'éviter d'éteindre et d'allumer constamment la lampe.

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Films solides de chlorophylle a

La chl a en état solide constitue une étude particulièrement importante, car la chl a dans cette forme simule plusieurs des propriétés de la chlorophylle in vivo. Dans les films solides, les mouvements moléculaires sont restreints et en général, si une orientation spécifique des molécules est requise pour qu'une interaction particulière survienne, celle-ci aura lieu seulement si ces molécules sont correctement orientées l'une par rapport à l'autre ou si seulement de faibles changements dans l'orientation des molécules sont requis. Les phénomènes dans les films sont donc très sensibles aux conditions auxquelles ils sont formés, et spécialement dans le cas de la chlorophylle, ceci devrait refléter l'état de la chl a dans les solvants auquel le film solide fut formé. C'est pourquoi dans cette étude on portera une attention particulière sur les conditions expérimentales lors de la formation du film solide de la chl a.

L'état de la chl a est largement déterminé par les propriétés de coordination de l'atome central de magnésium. Dans la structure moléculaire de la chl a, l'atome de magnésium est lié aux quatre atomes d'azote des anneaux pyrroles de la molécule à l'aide de quatre liens de

coordination (figure 2). Toutefois, des études par spectroscopie électronique (Fong et al., 1977a; Brace et al., 1978; Cotton et al., 1978; Warshel, 1979), infra-rouge (Katz et al., 1963; Ballschmiter et Katz, 1969; Shipman et al., 1976) et résonnance magnétique nucléaire (Closs et al., 1963; Katz et al., 1972; Katz et Janson, 1972; Trifunac et Katz, 1974; Abraham et Smith, 1983) ont montré que dans la plupart des systèmes étudiés, l'atome central de magnésium possédait un nombre de coordination supérieur à quatre. La spectroscopie photoacoustique fut utilisée afin de vérifier si, par des mesures de dissipation thermique de la molécule suite à l'absorption de l'énergie lumineuse, des informations supplémentaires ne pourraient être tirées sur les types d'agrégats formés dans les films solides de chl a.

De nombreuses études furent effectuées sur les états d'agrégation de la chl a en films solides (Ballschmiter et al., 1969; Ballschmiter et Katz, 1972; Fong et Koester, 1975) de même que sur les interactions eau-chlorophylle (Strouse, 1973; Fong et Koester, 1976; Fong et al., 1977b; Fong et al., 1978). Le modèle le plus fréquemment proposé pour les agrégats de chl a hydratés est une interaction entre une molécule de chl a et une molécule d'eau résultant d'une part, de la coordination de l'oxygène d'une molécule d'eau avec l'atome de magnésium d'une molécule de chl a et d'autre part, des liens entre les atomes d'hydrogène de cette même molécule d'eau et les fonctions ester (C-10) et cétone (C-9) d'une autre molécule de chl a.

Le groupe de Katz a démontré que ces types d'interactions peuvent former des agrégats de grandes dimensions qui montre un fort déplacement vers le rouge dans le spectre électronique (Katz et al., 1968). Pour ce qui est des agrégats anhydres de chl a, le modèle couramment accepté est une interaction chl a-chl a mettant en jeu une liaison intermoléculaire de la fonction cétone avec l'atome de magnésium.

3.1.1 Paramètres expérimentaux Un des nombreux avantages de la spectroscopie photoacoustique est la possibilité d'obtenir des spectres d'émission de chaleur d'un échantillon à différentes profondeurs en variant la fréquence de modulation du faisceau lumineux incident. En effet, la longueur de diffusion thermique de l'échantillon ( $\mu_s$ ) augmente lorsqu'on diminue la fréquence de modulation ( $\omega$ ) comme le démontre la formule suivante:

$$\mu_s = \sqrt{\frac{2\alpha_s}{\omega}}$$

où  $\alpha_s$  correspond à la diffusivité thermique de l'échantillon.

Basé sur cette propriété, plusieurs études du profil de profondeurs furent publiées sur divers échantillons (Adams et Kirkbright, 1977; Carpentier et al., 1983b; Yun et Seo, 1983; Cesar et al., 1983). Une faible fréquence de modulation entraîne donc une augmentation du signal acoustique. Ainsi, afin d'obtenir une bonne intensité du signal, tous les spectres ont été enregistrés à une fréquence de modulation relativement faible, soit celle de 85 Hz. L'ouverture des fentes a

été fixée à 1.5 ou 2.0 mm selon le cas, pour combiner la résolution de la bande passante et l'intensité de l'énergie lumineuse. La vitesse de balayage et le temps de réponse étant des paramètres qui sont directement reliés l'un par rapport à l'autre, ces derniers furent déterminés afin d'obtenir les conditions spectroscopiques optimums.

3.1.2 Propriétés spectrales La figure 7 montre un spectre photoacoustique et électronique d'un film solide de chl a formé à partir de l'évaporation de 20  $\mu$ l d'une solution  $4.86 \times 10^{-4}$  M de chl a dans le benzène. On remarque sur le spectre photoacoustique qu'en plus des bandes principales situées vers 440 et 678 nm pour les régions bleue et rouge du spectre visible, quelques épaulements sont présents dont les amplitudes varient selon l'échantillon étudié. On ne retrouve pas toujours d'épaulements sur les spectres photoacoustiques des films solides de chl a, toutefois, lors de la présence de ces derniers, leurs positions sont sensiblement les mêmes d'un spectre à l'autre. Il est à mentionner que dans certains cas, une moyenne variant de trois à dix spectres a été effectuée pour le même échantillon afin de bien différencier ces épaulements de l'éventuelle possibilité qu'il ne s'agisse que de bruit de fond.

Les tableaux 2 et 3 présentent la position des bandes principales et de leurs épaulements, s'il y a lieu, respectivement pour les spectres photoacoustiques et électroniques des films solides de chl a déterminés sous différentes conditions. Il est à noter que les spectres photoacoustiques ont été enregistrés seulement pour la région rouge du spectre afin de diminuer la possibilité d'une dégradation de la chl a.

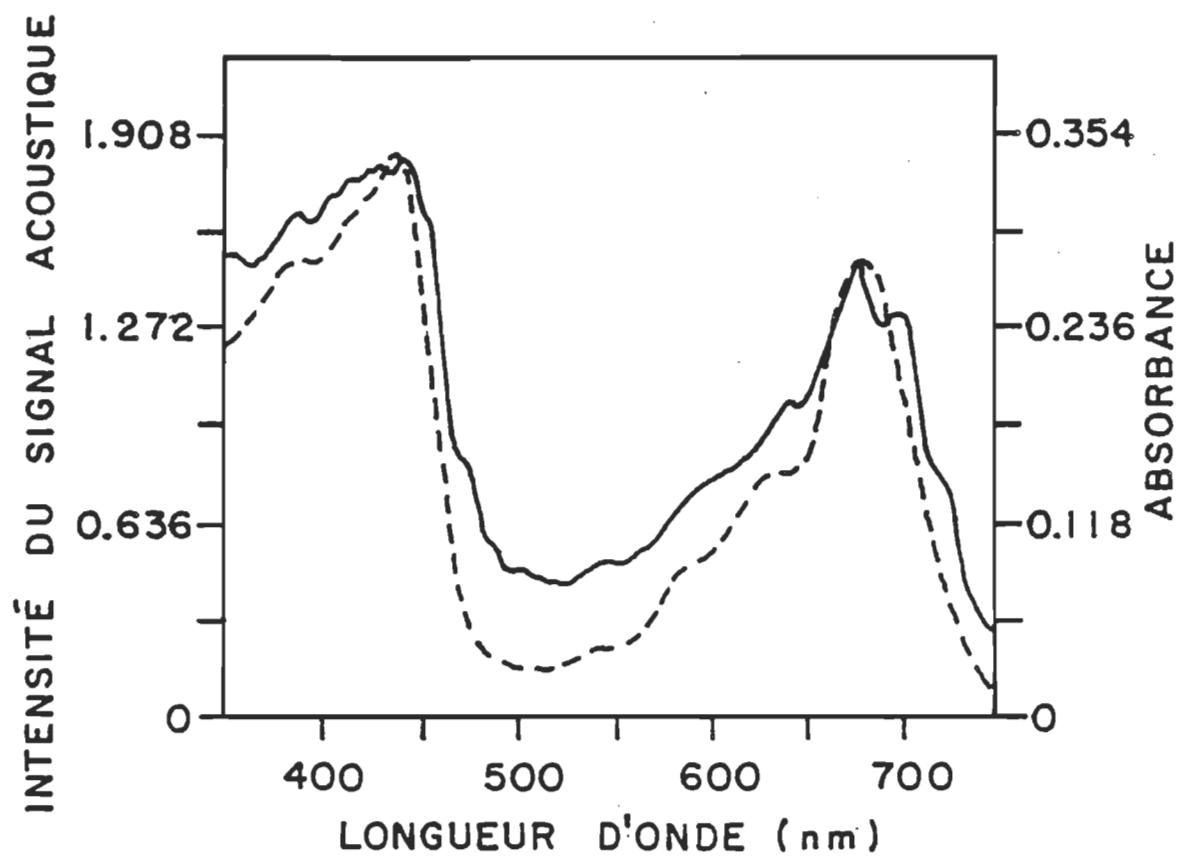


Figure 7. Spectres photoacoustique (—) et électronique (----) d'un film solide de chlorophylle a.

Tableau 2

PARAMÈTRES EXPÉIMENTAUX ET PROPRIÉTÉS DES SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DE  
FILMS SOLIDES DE CHLOROPHYLLE A

Solvant	Concentration chl a	Ouverture de fentes (mm)	Vitesse de balayage (nm min <sup>-1</sup> )	Temps de réponse (s)	Position du maximum (nm)	Épaulements (nm)	
benzène	20 µl 3.7 X 10 <sup>-4</sup> M	2.0	25	4.00	676	694,716	(4)*
benzène	10 µl 3.7 X 10 <sup>-4</sup> M	2.0	25	1.25	677	---	
benzène	10 µl 3.7 X 10 <sup>-4</sup> M	2.0	25	1.25	678	---	
benzène	20 µl 3.7 X 10 <sup>-4</sup> M	2.0	25	4.00	678	692,720	
benzène	20 µl 3.7 X 10 <sup>-4</sup> M	2.0	25	4.00	679	694,720	(6)
benzène	20 µl 3.7 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	679	694,721	
benzène	20 µl 3.7 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	25	4.00	679	---	(7)
benzène	20 µl 3.7 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	676	694,720	(3)
benzène	20 µl 3.7 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	678	694,718	(10)
benzène	20 µl 3.9 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	678	---	(3)

Tableau 2 (suite)

Solvant	Concentration chl <u>a</u>	Ouverture	Vitesse	Temps de	Position	Épaulements
		de	de	réponse	du	
		fentes	balayage		maximum	
		(mm)	(nm min <sup>-1</sup> )	(s)	(nm)	(nm)
benzène	20 µl 3.9 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	676	---
benzène	20 µl 4.4 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	675	---
benzène	20 µl 4.3 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	677	694,718 (10)
benzène	20 µl 6.0 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	675	---
benzène	20 µl 6.0 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	676	---
benzène	20 µl 3.3 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	678	694,718
benzène	20 µl 3.3 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	678	694,718 (3)
benzène	20 µl 3.3 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	678	694,718 (6)
benzène	25 µl 4.4 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	675	---
benzène	20 µl 4.1 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	10	4.00	675	---
benzène	25 µl 6.2 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	25	4.00	675	---

Tableau 2 (suite)

Solvant	Concentration chl a	Ouverture de fentes (mm)	Vitesse de balayage (nm min <sup>-1</sup> )	Temps de réponse (s)	Position du maximum (nm)	Épaulements (nm)
benzène	20 µl 3.9 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	678	694,719 (10)
benzène	18 µl 6.2 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	25	4.00	675	---
éther éthylique	10 µl 3.7 X 10 <sup>-4</sup> M	2.0	5	4.00	676	---
éther éthylique	10 µl 3.7 X 10 <sup>-4</sup> M	2.0	25	4.00	677	694,716
éther éthylique	10 µl 3.7 X 10 <sup>-4</sup> M	2.0	25	1.25	676	---
éther éthylique	20 µl 6.0 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	679	---
éther éthylique	5 µl 3.7 X 10 <sup>-4</sup> M	2.0	25	4.00	676	720
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	675	---

Tableau 2 (suite)

Solvant	Concentration chl a	Ouverture de fentes (mm)	Vitesse de balayage (nm min <sup>-1</sup> )	Temps de réponse (s)	Position du maximum (nm)	Épaulements (nm)
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	675	---
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	676	---
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	676	---
éther éthylique	10 µl 8.0 X 10 <sup>-4</sup> M	2.0	25	4.00	677	716 nm
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	676	---
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	677	---
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	25	4.00	675	695, 716 nm (3)
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	5	12.50	675	---

Tableau 2 (suite)

Solvant	Concentration chl <u>a</u>	Ouverture de fentes	Vitesse de balayage	Temps de réponse	Position du maximum	Épaulements	
		(mm)	(nm min <sup>-1</sup> )	(s)	(nm)	(nm)	
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	25	4.00	675	---	(3)
éther éthylique	15 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	10	4.00	675	---	
éther éthylique	25 µl 1.6 X 10 <sup>-4</sup> M	1.5	25	4.00	675	---	

\* indique le nombre de spectre d'un même échantillon. La position des épaulements représente une valeur moyenne.

Tableau 3

PARAMÈTRES EXPÉIMENTAUX ET PROPRIÉTÉS DES SPECTRES ÉLECTRONIQUES  
DE FILMS SOLIDES DE CHLOROPHYLLE A

Solvant	Concentration	Bandes principales	Rapport
		chl a	bleu/rouge
		(nm)	
benzène	10 µl $3.7 \times 10^{-4}$ M	436-677	1.24
benzène	10 µl $3.7 \times 10^{-4}$ M	437-678	1.27
benzène	10 µl $3.7 \times 10^{-4}$ M	437-678	1.21
benzène	25 µl $4.4 \times 10^{-4}$ M	437-678	1.26
benzène	25 µl $4.4 \times 10^{-4}$ M	436-677	1.20
benzène	25 µl $6.2 \times 10^{-4}$ M	435-675	1.27
benzène	25 µl $6.2 \times 10^{-4}$ M	436-678	1.21
benzène	18 µl $6.2 \times 10^{-4}$ M	437-678	1.24
benzène	18 µl $6.2 \times 10^{-4}$ M	435-676	1.36
benzène	20 µl $6.0 \times 10^{-4}$ M	437-678	1.29
benzène	10 µl $3.7 \times 10^{-4}$ M	437-678	1.21
éther éthylique	20 µl $4.9 \times 10^{-4}$ M	436-677	1.18
éther éthylique	20 µl $4.9 \times 10^{-4}$ M	436-676	1.12
éther éthylique	20 µl $4.9 \times 10^{-4}$ M	435-675	1.17
éther éthylique	20 µl $4.9 \times 10^{-4}$ M	435-676	1.10
éther éthylique	20 µl $4.9 \times 10^{-4}$ M	436-677	1.24
éther éthylique	20 µl $4.9 \times 10^{-4}$ M	438-678	1.21

Tableau 3 (suite)

Solvant	Concentration	Bandes principales (nm)	Rapport bleu/rouge
	chl a		
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	436-675	1.18
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	435-676	1.23
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	434-676	1.14
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	434-676	1.24
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	435-676	1.20
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	436-677	1.23
éther éthylique	20 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	435-676	1.19
éther éthylique	15 µl 4.9 X 10 <sup>-4</sup> M	436-677	1.17

suite à une longue irradiation lumineuse. Si on établit une comparaison à partir de l'ensemble des résultats présentés dans ces tableaux, on remarque que peu importe la méthode spectroscopique utilisée, on retrouve toujours une même variation de la position de la longueur d'onde de la bande principale dans le rouge et ce, quelque soit le solvant d'évaporation employé. Cette position se situe, selon les conditions utilisées, à  $677 \pm 2$  nm pour les spectres photoacoustiques et entre 675 et 678 nm pour les spectres électroniques. La position des épaulements dans les spectres photoacoustiques pour la partie rouge du spectre visible se situe principalement à 694 et 718 nm ce qui dénote un état d'agrégation particulier de la chl a en films solides. Cette présence d'épaulements, qu'on ne retrouve pas en spectroscopie électronique, confère à la technique photoacoustique une méthode spectroscopique importante pour l'investigation de l'état d'agrégation de pigments biologiques.

Les agrégats de chlorophylle se retrouvent dans une large variété de formes spectrales. Il fut proposé que les différents types de chlorophylle présents in vivo sont caractérisés par la position des bandes électroniques dans le rouge à 673, 683, 695 et 705 nm. Certaines observations suggèrent que certains de ces maxima électroniques ne viendrait pas d'un couplage de la chlorophylle à un lipide ou une protéine (Kreutz, 1970). De plus, parmi ces formes, seulement la bande à 695 nm montre un fort dichroïsme et cette forme devait être orientée en majeure partie parallèlement au plan lamellaire. Ainsi, il demeure possible que les épaulements observés en spectroscopie photoacoustique soient reliés à différents états d'agrégation de la chl a in vivo.

3.1.3 Interactions eau-chlorophylle a Dans les spectres électroniques des films solides de chl a, le rapport des bandes principales bleu/rouge varie de 1.10 à 1.36. De plus, aucune bande ou épaulement évident(e) ne fut détecté(e) aux longueurs d'onde supérieures à 680 nm, sauf dans le cas où la présence de fines gouttelettes d'eau fut observée sur un échantillon formé à partir de l'évaporation de 20 µl d'une solution  $4.8 \times 10^{-4}$  M de chl a dans l'éther éthylique. Le spectre correspondant (figure 8) montre clairement une bande d'absorption à 743 nm qui correspond à une interaction eau-chlorophylle comme le démontre le modèle de chl a hydraté proposé par d'autres chercheurs (Sherman et Wang, 1966; Sherman et Linschitz, 1967; Katz et al., 1976; Krasnovsky et Bystrova, 1980). En effet, dans le cas où les films solides de chl a furent traités en présence de vapeurs d'eau, ils ont noté une apparition de bandes dans la région spectrale de 715 à 720 nm ainsi qu'à 740 nm. De plus, lorsque la concentration de vapeurs d'eau était moins intense, des bandes à 722 et 736 nm ont été observées (Sherman et Linschitz, 1967). Or, le déplacement vers le rouge ne semble pas encore établi et il semblerait que selon les différentes conditions de pression de vapeur, de température et de temps auxquels les films solides sont exposés aux vapeurs d'eau, un déplacement continu dans le spectre visible entre les limites extrêmes d'un film solide de chl a anhydre (672 nm) et humide (743 nm) peut être obtenu.

Afin de vérifier cette possibilité d'interactions eau-chl a, nous avons déterminé les spectres photoacoustiques et électroniques de films solides de chl a sous différentes conditions d'humidité. Dans un

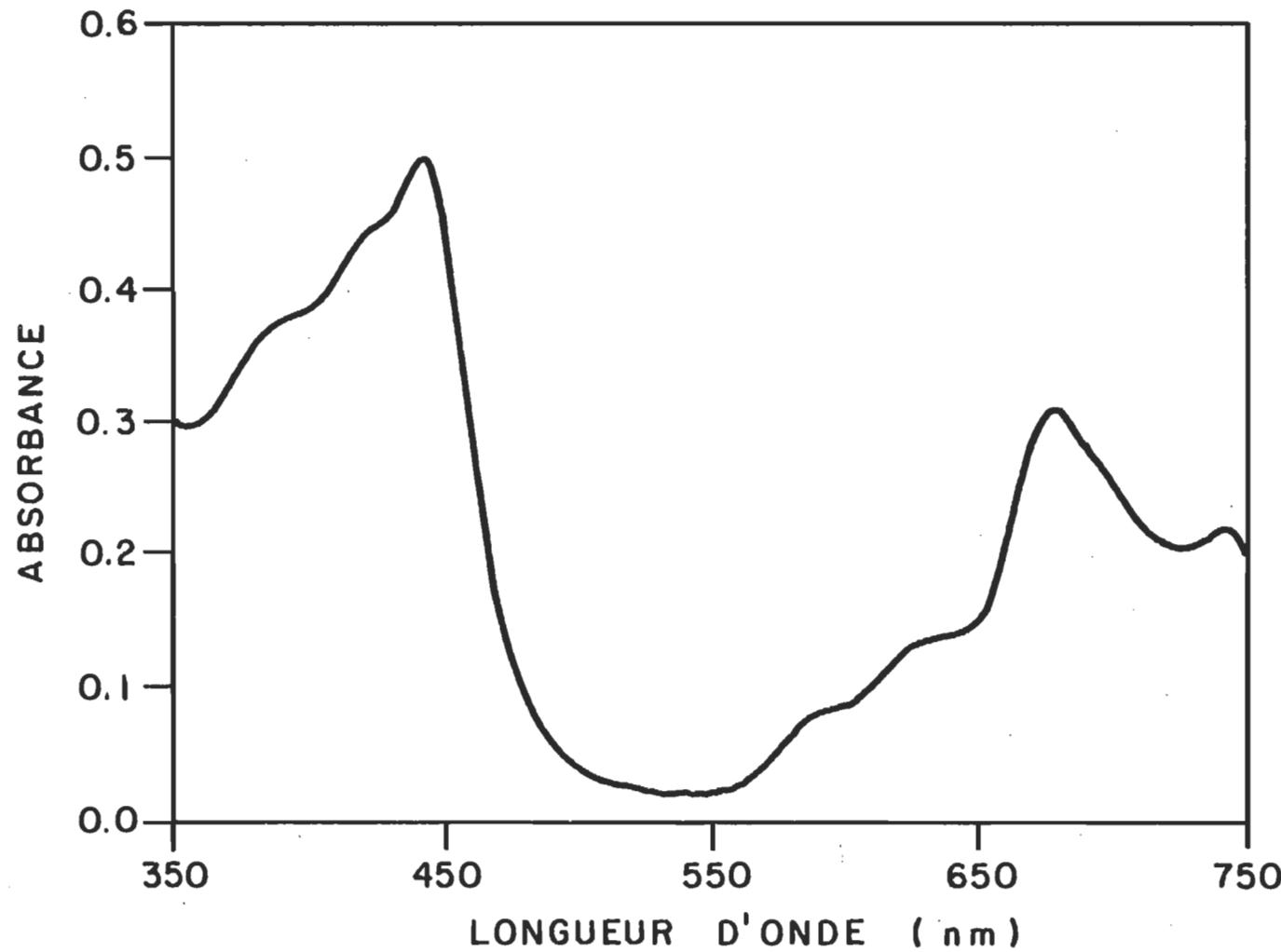


Figure 8. Spectre électronique d'un film solide de chlorophylle a.

premier temps, les films solides de chl a furent placés dans un contenant clos avec un bécher d'eau à l'intérieur afin d'augmenter le taux d'humidité du système. Ces derniers étaient formés à partir de l'évaporation de 20  $\mu$ l d'une solution  $5.4 \times 10^{-4}$  M de chl a dans le benzène. Les échantillons ont été placés dans le milieu humide pendant quelques heures. En considérant le système à l'équilibre, la pression de vapeur d'eau dans l'enceinte close se situe à 17.54 mm de Hg à la température ambiante ( $20^{\circ}\text{C}$ ). Par la suite, les films solides de chl a furent déposés dans un dessicateur contenant du  $\text{P}_2\text{O}_5$  durant vingt-quatre heures. La figure 9 regroupe les spectres photoacoustiques et électroniques de la région rouge du spectre visible pour les films solides de chl a enregistrés sous ces différentes conditions. Dans les spectres électroniques, on peut remarquer que la bande principale dans le rouge est plus large pour le film traité dans les conditions humides. Or, étant donné que la largeur de bande à mi-hauteur est directement relié à la dimension des agrégats des molécules, on doit s'attendre à un plus fort pourcentage d'agrégation pour ce qui est des films traités dans des conditions humides. Le spectre électronique de l'échantillon placé au dessicateur montre une largeur de bande à mi-hauteur plus faible que le film humide. Il est à noter que ce phénomène d'élargissement de la bande en milieu humide et l'amincissement dans un milieu plus sec est réversible. De plus, le film traité au  $\text{P}_2\text{O}_5$  montre une bande moins large que le film original dénotant une présence d'humidité dans le film solide original, film n'ayant subi aucun traitement. Il est à noter que pour les trois spectres électroniques, la longueur d'onde du maximum d'absorption dans le rouge (677 nm) ne varie pas.

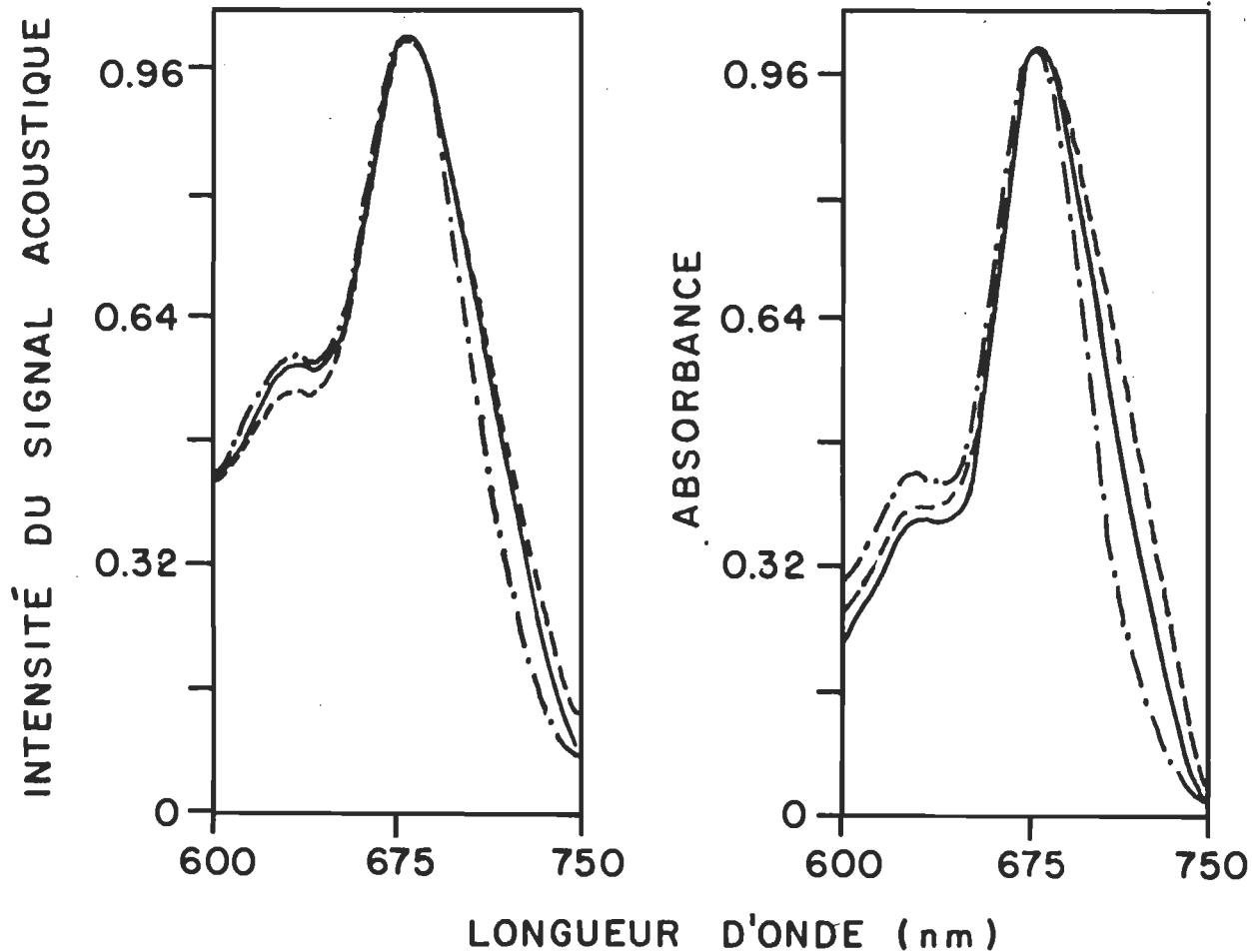


Figure 9. Spectres photoacoustiques et électroniques d'un film solide de chlorophylle a enregistrés sous différentes conditions. (—) film original, (---) film humide et (···) film asséché.

Pour ce qui est des spectres photoacoustiques de ces mêmes échantillons, on observe que parallèlement à la spectroscopie électronique, le film solide de chl a enregistré dans les conditions humides montre une plus grande largeur de bande à mi-hauteur que l'échantillon n'ayant subi aucun traitement. Également, le spectre du film solide de chl a asséché au dessicateur a une largeur de bande plus faible que le film original. Étant donné que seulement la présence ou non d'humidité dans les films cause les variations des spectres obtenus, il semble évident qu'il existe dans les films solides de chl a n'ayant subi aucun traitement, outre l'évaporation du solvant à partir des solutions originales, une présence d'eau interstitielle ou des interactions eau-chlorophylle qui peuvent être plus ou moins importantes selon les conditions expérimentales (solvant d'évaporation, humidité de la pièce, etc.).

La présence d'humidité sur les films solides originaux serait due à un phénomène physique. En effet, les solvants utilisés étant très volatiles, ces derniers utilisent un apport calorifique provenant de la lamelle afin de faciliter leurs évolutions. Or, l'évaporation du solvant a pour effet d'abaisser la température de la lamelle, et ainsi, l'humidité de l'air ambiant a tendance à se déposer sur cette lamelle pour augmenter la température jusqu'à celle ambiante. Donc, il est raisonnable de croire qu'il existe toujours un certain pourcentage d'humidité dans les films solides de chl a.

Les spectres électroniques et photoacoustiques sont donc caractéristiques des différentes formes de chlorophylle présentes dans

le système. L'hydratation de films, où la mobilité est restreinte, doit refléter l'orientation des molécules de chlorophylle dans un film particulier et celle-ci sera affectée par le solvant d'évaporation, la vitesse d'évaporation et autres conditions expérimentales difficiles à contrôler. Les épaulements obtenus en spectroscopie photoacoustique vers 694 et 718 nm peuvent refléter un état d'agrégation spécifique de la chl a. Or, il est proposé que la production de formes de chlorophylle absorbant à de longues longueurs d'onde requiert l'interaction de deux ou plusieurs molécules de chlorophylle (Ballschmiter et Katz, 1972). Ces formes résultent d'une interaction coopérative par interaction directe de molécules de chlorophylle ou par une interaction mettant en jeu un ligand bifonctionnel tel l'eau (Kreutz, 1970).

L'interprétation des bandes électroniques de chlorophylle dans les systèmes in vivo en termes d'agrégation entre molécules de chlorophylle ou avec des molécules d'eau est fortement étudié. Malgré les modèles proposés, les résultats disponibles sur l'état de la chlorophylle sont insuffisants pour démontrer la spécificité d'un modèle. Toutefois, on suggère que plusieurs bandes électroniques peuvent être attribuées aux dimères et aux oligomères de chlorophylle ainsi qu'aux interactions entre la chlorophylle et les ligands bifonctionnels (Brown, 1972).

### 3.2 Solutions solides de chlorophylle a

Suite à de nombreuses études sur les propriétés spectrales de la chl a en solution et dans les films solides, les couches monomoléculaires constituent le principal modèle pour reproduire les conditions des systèmes in vivo. Les résultats entourant les mono- et multicouches de chl a seront analysés dans la prochaine section. Une étude préalable à celle des propriétés monomoléculaires se situe au niveau de l'examen des solutions solides de chl a dans une matrice de lécithine. Ce système modèle, tiré des travaux du groupe de Porter (Porter et Strauss, 1966; Kelly et Porter, 1970; Beddard et al., 1975), consiste à dissoudre dans le chloroforme des quantités appropriées de deux constituants, en l'occurrence la chl a et la lécithine de boeuf, puis une certaine quantité de cette solution est déposée sur une lamelle de quartz. Le solvant est alors évaporé en présence d'un faible jet d'azote. La lécithine est utilisée dans ce système, car en plus de sa présence dans les systèmes in vivo, elle a pour effet de solvater les molécules de chl a et ainsi empêcher la formation d'agrégats. Ainsi, l'emploi de solutions solides permet l'analyse des caractéristiques spectrales de la chl a à l'état monomère lorsque les conditions expérimentales sont appropriées.

3.2.1 Paramètres expérimentaux Les spectres photoacoustiques des solutions solides ont tous été déterminés à une fréquence de modulation du faisceau lumineux de 85 Hz et une ouverture de fentes de 1.5 mm. De plus, toutes les solutions solides ont été examinées en utilisant le chloroforme comme solvant. Les mesures spectroscopiques des

échantillons furent effectuées avec deux proportions molaires de chl a-lécithine, soit 1:25 ou 1:200. L'homogénéité des échantillons a été vérifiée en notant l'absorption des solutions solides à différents endroits de la lamelle de quartz.

3.2.2 Propriétés spectrales La figure 10 montre les spectres photoacoustique et électronique de la chl a dans une solution solide de lécithine dans des proportions molaires de 1:200. On note que les spectres photoacoustique et électronique montrent des caractéristiques spectrales sensiblement identiques en considérant la position des bandes principales situées à 435 et 667 nm. Il y a donc un déplacement de la longueur d'onde de la bande principale dans le rouge de plus de 10 nm vers le bleu comparativement aux films solides de chl a. De plus, la largeur de bande à mi-hauteur principale dans le rouge est particulièrement étroite, et ce, pour les deux méthodes spectroscopiques.

Les tableaux 4 et 5 donnent respectivement les caractéristiques des spectres photoacoustiques et électroniques pour les solutions solides de chl a déterminées sous différentes conditions. On remarque que la position des bandes principales pour les spectres photoacoustiques varie de 435 à 438 nm pour la bande de Soret, tandis que la bande dans le rouge se situe principalement à 668 nm. Pour ce qui est des spectres électroniques, on note une très bonne reproductibilité des résultats; la position des bandes principales se situant à 434-435 nm et 667-668 nm pour les régions bleue et rouge du spectre visible. De plus, pour les deux méthodes spectroscopiques, le rapport des bandes principa-

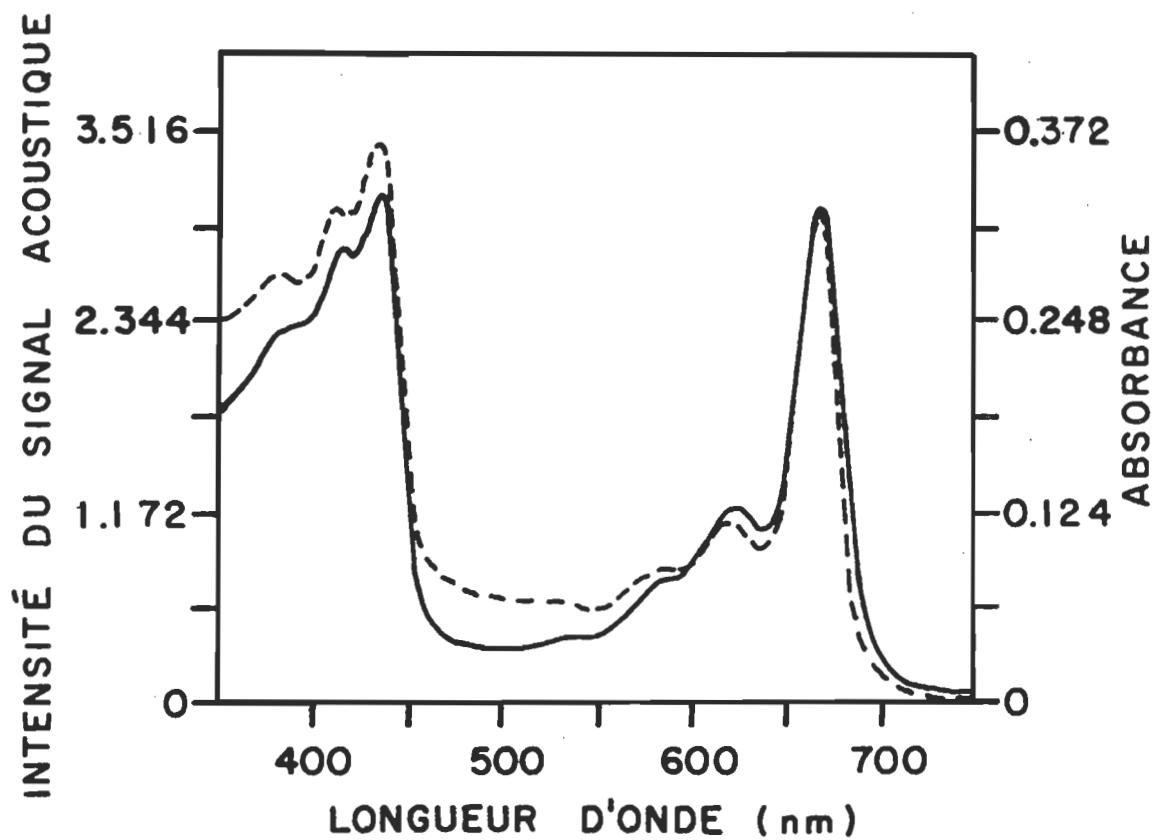


Figure 10. Spectres photoacoustique (—) et électronique (----) de la chlorophylle a dans une solution solide de lécithine (chl a: PC, 1:200).

Tableau 4

## PARAMÈTRES EXPÉRIMENTAUX ET PROPRIÉTÉS DES SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DE SOLUTIONS SOLIDES DE CHLOROPHYLLE A

Quantité (μl)	Solution chl a:lécithine*	Vitesse de balayage (nm min <sup>-1</sup> )	Temps de réponse (s)	Bandes principales (nm)	Largeur mi-hauteur (nm)	Rapport bleu/rouge
200	1:25	5	12.5	436,667	---	0.96
200	1:25	25	4.0	436,668	39.37	1.05
200	1:25	25	4.0	438,668	---	1.06
175	1:25	25	4.0	436,668	---	1.10
175	1:25	5	12.5	435,668	---	1.02
200	1:200	25	4.0	436,668	32.09	1.06
130	1:200	25	4.0	437,668	33.86	1.09
75	1:200	10	4.0	435,666	29.92	1.02
175	1:25	25	4.0	436,668	---	1.09
150	1:25	25	4.0	437,668	39.76	1.05

\* = proportions molaires

Tableau 5

PARAMÈTRES EXPÉRIMENTAUX ET PROPRIÉTÉS DES SPECTRES ÉLECTRONIQUES  
DE SOLUTIONS SOLIDES DE CHLOROPHYLLE A

Quantité (μl)	Solution	Bandes principales (nm)	Rapport
	chl a:lécithine*		bleu/rouge
200	1:25	435,668	1.04
175	1:25	435,668	1.07
175	1:25	434,667	1.05
200	1:200	434,667	1.03
75	1:200	434,668	1.12
175	1:25	435,668	1.07
150	1:25	435,668	1.08

\* = proportions molaires

les bleu/rouge sont similaires, ce rapport varie de 0.96 à 1.12. Dans les spectres photoacoustiques, il est à mentionner que pour certains échantillons, l'absorbance au niveau de la bande satellite dans le spectre de la chl a près de 625 nm étant très élevé, il était impossible de déterminer la largeur de bande à mi-hauteur. Toutefois, en se basant sur les résultats obtenus, on a noté une largeur de bande à mi-hauteur pour la bande principale dans le rouge, beaucoup plus faible que celles dans les films solides de chl a (voir section précédente). Ainsi, étant donné que la largeur de bande à mi-hauteur est reliée à la nature de l'état d'agrégation de la chlorophylle, la chl a serait à l'état monomère dans les solutions solides diluées. Il est normal d'obtenir de tels résultats, car dans les solutions solides, la lécithine a pour effet de solvater les molécules de chl a pour ainsi minimiser la possibilité d'une formation d'agrégats de chl a. Toutefois, les résultats expérimentaux montrent une largeur de bande à mi-hauteur plus faible pour les solutions solides contenant une plus forte proportion molaire en lécithine. Ainsi, en augmentant le nombre de molécules de lécithine, dans les solutions solides, il est possible que les molécules de chl a soient plus solvatées pour ainsi augmenter le nombre de molécules monomères.

Les solutions solides constituent donc un autre système modèle important pour l'investigation des états d'agrégation de différentes molécules. Dans notre étude, l'état monomérique de la chl a est caractérisé par un fort déplacement de la bande principale du rouge vers le bleu et par une largeur de bande à mi-hauteur fort réduite par rapport aux données expérimentales sur les films solides.

### 3.3 Films monomoléculaires de chlorophylle a

La chl a sous forme de couches monomoléculaires constitue une étude particulièrement importante, car dans ce type de système, le pigment est disposé en état ordonné comme dans les modèles de membranes biologiques artificielles. Dans la présente étude, nous analyserons dans un premier temps les résultats obtenus sur les monocouches de chl a, puis dans une seconde étape les résultats portant sur les multicoches de chl a, soit de deux à cinquante couches monomoléculaires.

3.3.1. Monocouches de chlorophylle a Le premier travail publié sur les films monomoléculaires a été effectué en 1917 par Irving Langmuir (Langmuir, 1917). A partir de ses travaux, Langmuir concluait que les molécules, étalées à l'interface air/eau, étaient orientées avec les groupements fonctionnels polaires immersés dans l'eau et les longues chaînes non-polaires dirigées à peu près de façon verticale par rapport à la surface aqueuse.

Depuis le développement de la technique des couches monomoléculaires, les propriétés des films monomoléculaires de chl a furent étudiées de façon sporadique. Plusieurs travaux ont été publiés sur des mélanges de pigments photosynthétiques en monocouches afin de mieux reproduire les conditions retrouvées dans les systèmes in vivo (Colmano, 1962; Trosper et Sauer, 1968; Aghion et Leblanc, 1978). Jusqu'à maintenant, la spectroscopie électronique constitue la principale méthode spectroscopique pour étudier les propriétés des monocouches de chl a.

Par ce travail, nous verrons que la technique photoacoustique constitue une méthode sensible qui permet de déterminer des spectres d'émission de chaleur provenant de monocouches, et de plus, les résultats obtenus sont comparables à ceux observés en spectroscopie électronique.

L'état et les propriétés des couches monomoléculaires déposées à l'interface air/eau sont principalement reliés à la structure moléculaire du composé formant le film monomoléculaire, la température, la composition de la sous-phase ainsi que la pression de surface. Par exemple, Jacobs et al. (Jacobs et al., 1954) ont démontré que la présence d'ions  $\text{Ca}^{++}$  dans la sous-phase résultait en la formation d'une monocouche de chl a dont le spectre électronique montrait une absorption de plus du double par rapport à celui d'une couche du même pigment formé sur une surface d'eau distillée. De plus, Sperling et Ke (Sperling et Ke, 1966a) ont montré que l'absorbance par monocouche de chl a augmentait en fonction de l'accroissement de la pression de surface de dépôt de la chl a. Ainsi, pour caractériser un tel système par les propriétés spectroscopiques, il est important de porter une attention particulière sur les conditions expérimentales utilisées afin d'assurer une reproductibilité dans nos résultats. Pour une meilleure compréhension des principes et des applications entourant la technique des mono- et multicouches, le livre de G.L. Gaines Jr. constitue une bonne revue (Gaines, 1966).

i) Paramètres expérimentaux Tous les spectres photoacoustiques des monocouches de chl a ont été déterminés avec une ouverture de fentes fixée à 1.5 mm et une fréquence de modulation de 85 Hz. En suivant la même procédure que celle des films solides, on a effectué une moyenne de deux à douze spectres pour quelques échantillons afin d'obtenir un spectre résultant exempt de bruit de fond.

ii) Propriétés spectrales Les spectres photoacoustique et électronique d'un monocouche de chl a sont présentés à la figure 11. On note sur le spectre photoacoustique qu'en plus des bandes principales à 440 et 678 nm, quelques épaulements sont présents. Ces épaulements ne sont toutefois pas reproductible d'un échantillon à l'autre et il est encore difficile d'interpréter ces résultats étant donné le faible signal acoustique provenant d'une monocouche de chl a. En considérant l'emploi d'un même échantillon lors de la mesure successive de plusieurs spectres, il est possible que cela puisse produire une certaine dégradation de la chl a sous l'influence d'un longue irradiation lumineuse. Or, cette éventuelle possibilité de dégradation de la chl a en phéophytine a peut causer des changements dans le rapport des bandes bleu/rouge et le signal à 508 nm peut être augmenté dans les spectres photoacoustiques. Toutefois, en se basant sur les caractéristiques spectrales des échantillons étudiés, il ne semble pas y avoir de dégradation de la chl a en phéophytine a. De plus, les spectres électroniques enregistrés avant et après les mesures photoacoustiques n'ont démontré aucune différence significative. Pour ce qui est du spectre électronique de la monocouche

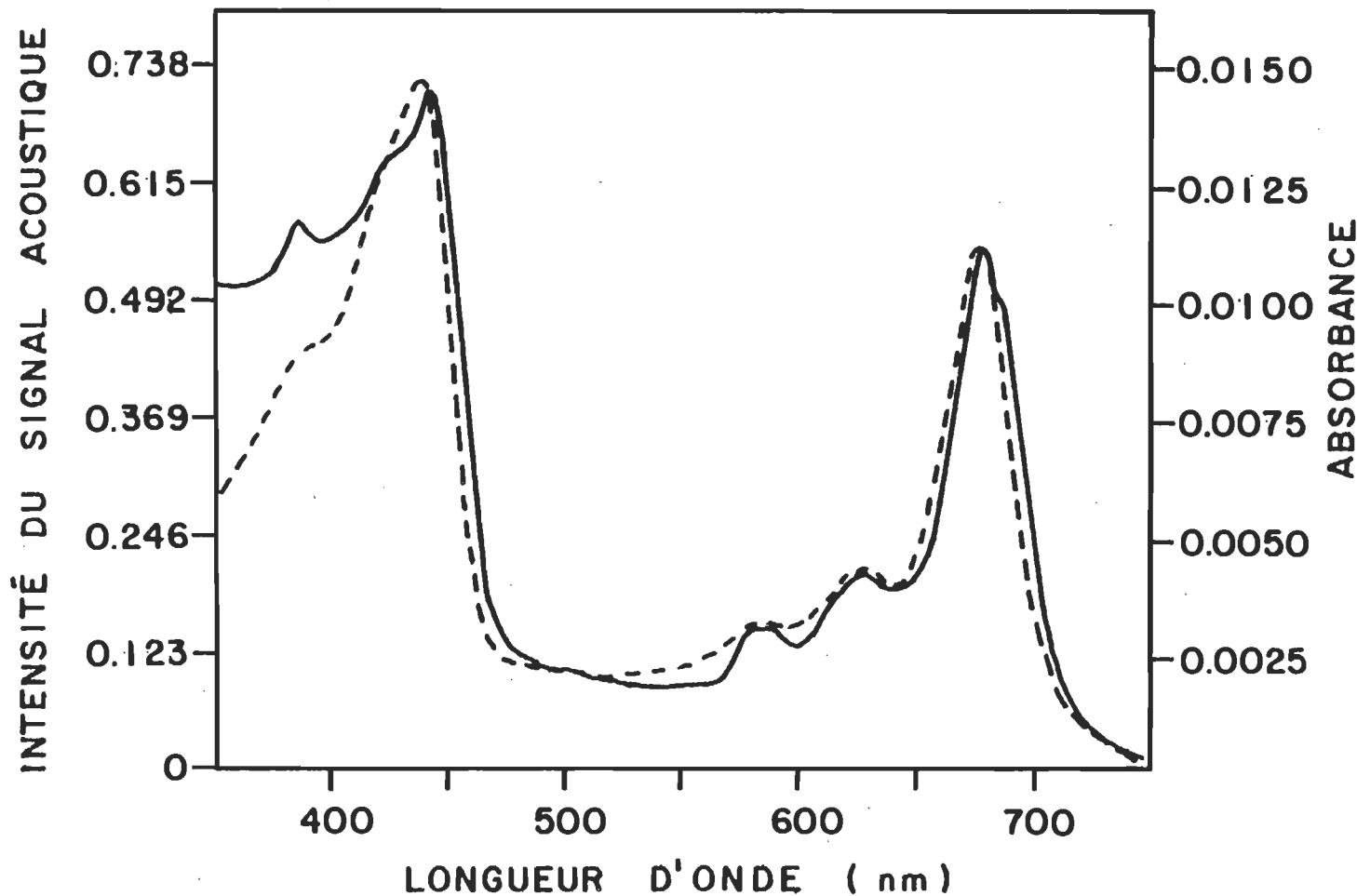


Figure 11. Spectres photoacoustique (—) et électronique (----)  
d'une monocouche de chlorophylle a.

de chl a correspondant, les positions des maxima sont légèrement déplacés vers le bleu, soit à 439 et 678 nm.

Les tableaux 6 et 7 montrent respectivement les caractéristiques spectrales des spectres photoacoustiques et électroniques de monocouches de chl a. A partir des résultats présentés dans ces tableaux, on observe une très forte reproductibilité des résultats expérimentaux, et ce, pour les deux techniques spectroscopiques. En effet, les positions des bandes principales pour les spectres photoacoustiques sont respectivement localisées à 440-441 et 678-680 nm, tandis que dans les spectres électroniques, les positions de ces maxima sont situées à 436-439 et 675-678 nm. En ce qui concerne la largeur de bande à mi-hauteur de la bande principale dans le rouge, les valeurs trouvées sont sensiblement les mêmes pour les deux méthodes spectroscopiques, soit entre 32 et 37 nm. De la même façon, le rapport des bandes bleu/rouge varie de façon similaire pour les deux techniques.

Dans nos expériences, les lamelles de quartz sont rendues hydrophiles par un lavage dans l'éthanol bouillant, puis par immersion dans de l'acide sulfochromique durant quelques jours. Or, il est possible que suite à ce traitement, l'acidité des lamelles puisse interagir avec le magnésium central des molécules de chl a pour causer une dégradation en phéophytine a. Afin de vérifier cette possibilité, on a procédé à des mesures expérimentales pour des monocouches de chl a déposées sur des lamelles de quartz neutralisées avec une solution de NaOH 0.01 N. On remarque que les résultats identifiés par un double

Tableau 6

PARAMÈTRES EXPÉIMENTAUX ET PROPRIÉTÉS DES SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES DE  
MONOCOUCHES DE CHLOROPHYLLE A

Vitesse de balayage (nm min <sup>-1</sup> )	Temps de réponse (s)	Bandes principales (nm)	Largeur bande mi-hauteur (nm)	Rapport bleu/rouge (rouge)	
5	12.5	441,678	31.89	1.37	
5	12.5	440,678	35.79	1.30	
5	12.5	441,680	34.55	1.31	
5	12.5	441,680	37.38	1.35	
5	12.5	440,678	35.43	1.38	
5	12.5	441,679	35.43	1.37	
5	12.5	440,679	32.78	1.37	(3)*
5	12.5	440,680	35.83	1.44	(3)
25	4.0	440,679	35.43	1.49	(8)
25	4.0	440,678	37.40	1.52	(10)
25	4.0	440,679	37.79	1.30	(12)
** 25	4.0	440,679	35.04	1.42	(6)
** 5	12.5	440,678	35.63	1.50	(2)
** 5	12.5	441,678	33.86	1.32	(2)
** 25	4.0	441,678	33.07	1.40	(6)

\* indique le nombre de spectre d'un même échantillon. La position des bandes principales représente une valeur moyenne.

\*\* lamelles de quartz neutralisées.

Tableau 7

## PROPRIÉTÉS DES SPECTRES ÉLECTRONIQUES DE MONOCOUCHES DE CHLOROPHYLLE A

Bandes principales	Absorbance			Largeur bande mi-hauteur (nm)	Rapport bleu/rouge
	Bleu	Rouge	Satellite		
				(rouge)	
438,677	.0155	.0107	.0032	35.43	1.45
438,678	.0138	.0104	.0026	33.07	1.33
437,677	.0146	.0107	.0029	35.43	1.36
436,675	.0134	.0101	.0027	34.48	1.33
437,677	.0143	.0102	.0025	34.25	1.40
436,677	.0149	.0109	.0039	37.41	1.37
439,678	.0157	.0115	.0033	33.31	1.37
* 438,678	.0147	.0107	.0031	35.00	1.37
* 439,677	.0157	.0115	.0039	32.13	1.37
* 438,677	.0139	.0100	.0032	34.00	1.39

\* lamelles de quartz neutralisées

astérisque dans les tableaux 6 et 7 ne montrent aucune différence dans les caractéristiques spectrales comparativement aux spectres de monocouches de chl a enregistrés avec des lamelles non-neutralisées.

L'absorbance moyenne pour les monocouches de chl a aux bandes principales, dans les régions bleue et rouge et à la bande satellite située à 625 nm, sont respectivement de .0146, .0110 et .0030. A partir de ces valeurs moyennes et en appliquant la loi de Beer pour les films monomoléculaires (voir Annexe C), on évalue le coefficient d'extinction molaire ( $\varepsilon$ ) et le coefficient d'absorption optique ( $\beta$ ) pour les monocouches de chl a à ces différentes longueurs d'onde. En prenant comme approximation que l'épaisseur d'une monocouche de chl a est de 15 Å, les valeurs déterminées sont les suivantes:

$$(\text{max. bleu}) \quad \varepsilon = 8.17 \times 10^4 \text{ 1 mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\beta = 9.73 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}, \mu_\beta = .103 \mu\text{m}$$

$$(\text{max. rouge}) \quad \varepsilon = 6.00 \times 10^4 \text{ 1 mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\beta = 7.13 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}, \mu_\beta = .140 \mu\text{m}$$

$$(\text{bande sat.}) \quad \varepsilon = 1.74 \times 10^4 \text{ 1 mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\beta = 2.07 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}, \mu_\beta = .483 \mu\text{m}$$

où  $\mu_\beta = 1/\beta$  est la longueur d'absorption optique.

La longueur d'absorption optique ( $\mu_\beta$ ) est donc supérieure à l'épaisseur d'une monocouche de chl a pour les trois longueurs d'onde analysées, et comme le prédit la théorie photoacoustique pour les solides optiquement transparents ( $\mu_\beta > \lambda$ ), le signal acoustique dépend du

coefficient d'absorption optique de l'échantillon, de l'épaisseur de l'échantillon et des propriétés thermiques du matériel de support utilisé (i.e. lamelles de quartz).

La spectroscopie photoacoustique constitue donc une méthode très sensible permettant d'examiner les monocouches de pigments photosynthétiques. De plus, nous avons démontré que les caractéristiques spectrales des monocouches de chl a étaient similaires à celles obtenues par la spectroscopie électronique. Il est toutefois difficile de comparer nos résultats à ceux obtenus dans des études antérieures, car tel que souligné précédemment, les propriétés des couches monomoléculaires dépendent de divers paramètres. Ainsi, les conditions expérimentales doivent être identiques afin de comparer les résultats expérimentaux. On peut tout de même mentionner que dans les études antérieures, où les conditions expérimentales différaient des nôtres (pression de surface, nature de l'interface, composition de la sous-phase), les positions des bandes principales des monocouches de chl a varient entre 435 et 440 nm ainsi qu'entre 675 et 680 nm (Trurnit et Colmano, 1959; Bellamy et al., 1963; Sperling et Ke, 1966b; Costa et al., 1972). Nos résultats se comparent relativement bien à ces données publiées.

### 3.3.2 Multicouches de chlorophylle a

i) Paramètres expérimentaux Toutes les multicouches de chl a sont déposées sur lamelles de quartz préalablement rendues hydrophobes par la déposition de cinq monocouches d'arachidate de cadmium. Les couches d'arachidate de cadmium ont été déposées à une pression de

surface de  $30 \text{ mN m}^{-1}$  en utilisant comme sous-phase, un tampon Tris-HCl  $10^{-3} \text{ M}$  ( $\text{pH} = 8.5$ ) pour lequel  $3 \times 10^{-4} \text{ mole l}^{-1}$  de chlorure de cadmium était ajouté. Seulement les lamelles ayant un rapport de déposition de  $1.0 \pm 0.1$  ont été employées. La chl a fut déposée à une pression de surface de  $20 \text{ mN m}^{-1}$  en utilisant le même tampon comme sous-phase. Les propriétés spectroscopiques enregistrées pour chacun des échantillons furent déterminées en soustrayant du spectre original, le spectre d'une lamelle de quartz en présence de la base hydrophobe. Les spectres photoacoustiques des multicoques de chl a ont tous été enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales, c'est-à-dire à une fréquence de modulation de 85 Hz et à une ouverture de fentes de 1.5 mm. La vitesse de balayage et le temps de réponse furent ajustés afin d'obtenir les conditions optimales pour chacun des échantillons.

ii) Propriétés spectrales Afin de représenter le type de spectres obtenus pour les multicoques, la figure 12 montre les spectres photoacoustique et électronique de douze monocouches de chl a. Ces spectres furent normalisés à 680 nm afin de mieux relever les différences spectrales entre les deux techniques spectroscopiques. On remarque que les caractéristiques spectrales sont sensiblement les mêmes, soit une position des bandes principales localisée à 438 nm et 678 nm pour les deux spectres. On note toutefois une différence en ce qui a trait au rapport de ces bandes. En effet, ce rapport est plus élevé dans le spectre électronique. Il est à noter que, contrairement aux films solides de chl a, on ne retrouve dans aucun cas une présence d'épaulements dans la région rouge du domaine spectral.

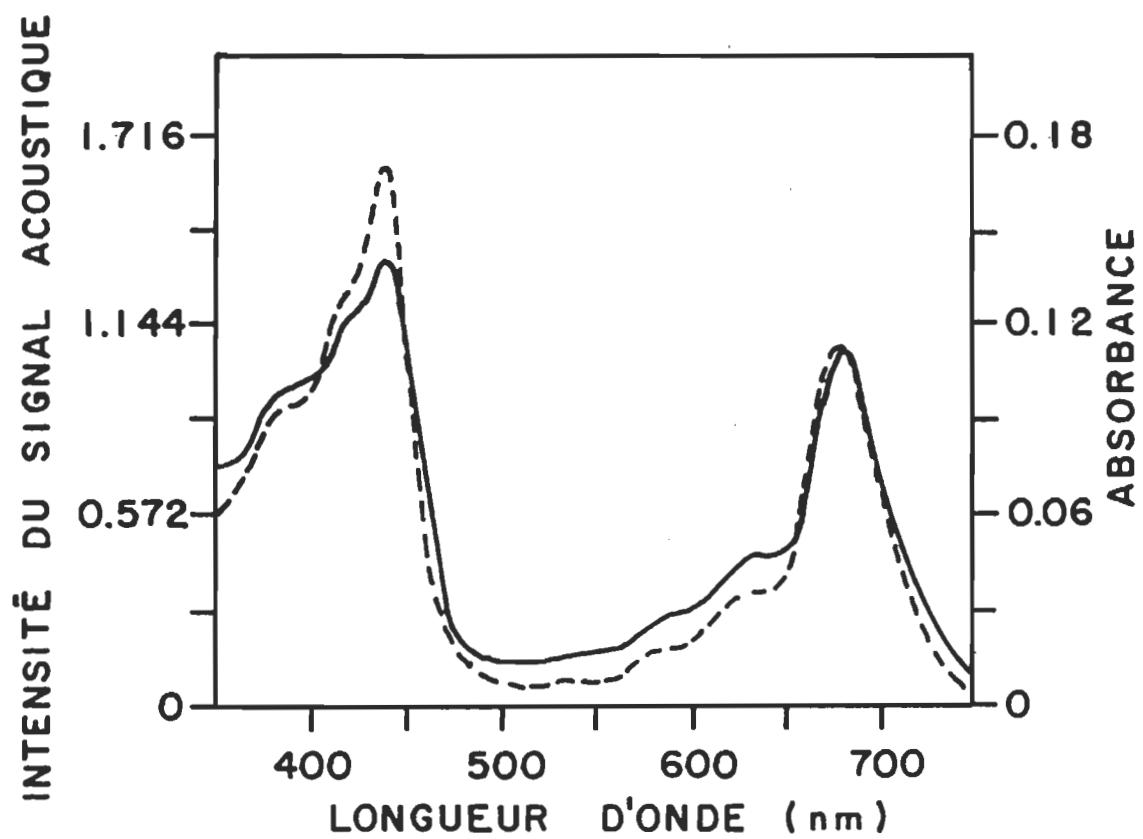


Figure 12. Spectres photoacoustique (—) et électronique (----) d'une multicouche de chlorophylle a (12 monocouches).

De façon plus générale, les tableaux 8 et 9 montrent les caractéristiques des spectres photoacoustiques et électroniques pour les multicoches de chl a comprenant de deux à cinquante couches monomoléculaires. On note que la position des bandes principales varie de façon similaire pour les deux techniques spectroscopiques, soit entre 436-439 nm et 676-680 nm. De plus, dans la plupart des cas, les positions de ces bandes sont relativement identiques pour les deux techniques si on considère un même échantillon. Dans les spectres électroniques, les rapports entre les intensités des bandes principales dans les régions bleue et rouge, ainsi qu'avec la bande satellite à 625 nm ne semblent pas varier en fonction du nombre de monocouches. Ces rapports de bandes varient toutefois considérablement dans le cas des spectres photoacoustiques. En effet, bien que le rapport des intensités des bandes bleu/rouge ne varie pas beaucoup, ceux des bandes bleu/satellite et rouge/satellite diminuent fortement en fonction du nombre de monocouches. Ce phénomène sera analysé ultérieurement dans ce chapitre.

La figure 13 montre la variation des spectres électroniques en fonction du nombre de monocouches. Ces spectres furent normalisés par rapport au spectre d'une monocouche de chl a, déposée sur une lamelle hydrophile, afin de mieux noter les différences spectrales pour les différentes multicoches considérées. On observe très bien sur cette figure, un élargissement de la bande principale dans la région rouge qui a tendance à augmenter avec le nombre de monocouches. Des résultats similaires sont observés dans les spectres photoacoustiques. La largeur de bande à mi-hauteur étant reliée à la nature des agrégats formés, l'élargissement de bande laisse présager un état d'agrégation

Tableau 8

PROPRIÉTÉS DES SPECTRES PHOTOACOUSTIQUES  
DE MULTICOUCHES DE CHLOROPHYLLE A

Nombre de monocouches	Bandes principales (nm)	Largeur bande mi-hauteur (rouge) (nm)	Rapport de bandes		
			Bleu/ rouge	Bleu/ satellite	Rouge/ satellite
2	438,678	38.98	1.34	4.52	3.37
2	438,678	42.32	1.42	4.93	3.47
2	438,677	41.73	1.33	3.94	2.94
4	438,677	45.28	1.46	3.99	2.73
4	438,678	43.31	1.41	4.37	3.11
4	438,678	47.63	1.40	4.39	3.12
6	439,678	49.21	1.30	3.87	2.97
6	438.678	47.24	1.43	4.54	3.17
6	437,677	45.67	1.37	3.73	2.73
8	438,679	42.32	1.43	4.32	2.97
8	439,678	46.85	1.44	3.75	2.60
8	438.678	50.39	1.37	4.10	2.99
8	438,678	50.39	1.36	3.96	2.92
10	438,678	46.65	1.35	4.24	3.15
10	438,679	46.26	1.35	4.10	3.03
10	439,678	48.82	1.38	4.06	2.94

Tableau 8 (suite)

Nombre de monocouches	Bandes principales (nm)	Largeur bande mi-hauteur (nm) (rouge)	Rapport de bandes		
			Bleu/ rouge	Bleu/ satellite	Rouge/ satellite
10	437,677	47.83	1.33	3.78	2.84
12	438,679	47.64	1.28	3.65	2.85
12	438,680	49.21	1.30	3.63	2.78
12	437,678	49.21	1.33	3.66	2.76
12	436,677	48.82	1.29	3.68	2.86
16	439,678	54.33	1.36	3.77	2.77
16	439,678	51.18	1.36	3.75	2.76
16	437,677	49.80	1.30	3.56	2.73
20	438,679	61.81	1.32	3.62	2.73
20	437,680	57.48	1.29	3.32	2.58
20	436,677	53.74	1.25	3.17	2.53
20	438,678	54.13	1.30	3.34	2.58
24	438,678	61.62	1.24	3.18	2.57
24	438,678	54.92	1.28	3.34	2.61
24	436,676	56.50	1.23	3.03	2.46
30	436,677	57.48	1.25	2.85	2.29
30	436,677	54.33	1.22	2.79	2.28
30	437,677	59.06	1.22	2.77	2.28

Tableau 8 (suite)

Nombre de monocouches	Bandes principales (nm)	Largeur bande mi-hauteur (nm) (rouge)	Rapport de bandes		
			Bleu/ rouge	Bleu/ satellite	Rouge/ satellite
36	437,678	59.45	1.19	2.61	2.20
36	437,678	60.63	1.22	2.67	2.18
36	438,679	62.01	1.27	2.70	2.16
44	436,676	64.96	1.30	2.75	2.11
44	436,676	65.95	1.29	2.62	2.03
50	439,679	65.35	1.27	2.56	2.01
50	438,679	61.02	1.27	2.48	1.96

Tableau 9

PROPRIÉTÉS DES SPECTRES ÉLECTRONIQUES DE MULTICOUCHE<sup>S</sup> DE CHLOROPHYLLE A

Nombre de monocouches	Bandes principales (nm)	Largeur bande mi-hauteur (nm) (rouge)	Absorbance			Rapport de bandes		
			Bleu	Rouge	Satellite	Bleu/ rouge	Bleu/ satellite	Rouge/ satellite
2	438,678	41.34	.0285	.0198	.0058	1.44	4.91	3.41
2	437,678	38.98	.0282	.0203	.0053	1.39	5.32	3.83
2	437,676	37.80	.0278	.0192	.0053	1.45	5.25	3.63
4	437,677	44.29	.0570	.0386	.0113	1.48	5.04	3.42
4	437,677	44.88	.0580	.0392	.0120	1.48	4.83	3.27
4	438,679	52.91	.0625	.0398	.0117	1.57	5.34	3.40
6	439,680	56.69	.0972	.0594	.0174	1.64	5.59	3.41
6	438,679	52.56	.0986	.0600	.0180	1.64	5.47	3.33
6	438,679	46.29	.0962	.0618	.0188	1.56	5.12	3.29
6	438,678	43.46	.0878	.0564	.0152	1.56	5.78	3.71
8	438,679	46.30	.1148	.0752	.0220	1.53	5.22	3.42
8	438,679	47.48	.1190	.0774	.0236	1.54	5.04	3.28

Tableau 9 (suite)

Nombre de monocouches	Bandes principales (nm)	Largeur bande mi-hauteur (nm) (rouge)	Absorbance			Rapport de bandes		
			Bleu	Rouge	Satellite	Bleu/ rouge	Bleu/ satellite	Rouge/ satellite
8	437,679	52.09	.1196	.0754	.0220	1.59	5.44	3.43
8	437,678	51.97	.1210	.0756	.0230	1.60	5.26	3.29
10	438,679	46.06	.1506	.0998	.0276	1.51	5.46	3.62
10	438,680	53.03	.1518	.0974	.0266	1.56	5.71	3.66
10	438,679	49.02	.1494	.0976	.0296	1.53	5.05	3.30
10	438,678	46.30	.1496	.0992	.0308	1.51	4.86	3.22
12	438,679	50.70	.1698	.1140	.0364	1.49	4.66	3.29
12	439,680	51.38	.1720	.1132	.0344	1.52	5.00	3.29
12	438,678	53.15	.1720	.1100	.0365	1.56	4.71	3.01
12	437,678	49.02	.1696	.1100	.0346	1.54	4.90	3.18
16	438,679	53.15	.2240	.1465	.0450	1.53	4.98	3.26
16	438,679	52.56	.2225	.1450	.0440	1.53	5.06	3.30
16	437,679	60.83	.2370	.1510	.0445	1.57	5.33	3.39
20	439,680	65.55	.2890	.1765	.0525	1.64	5.50	3.36

Tableau 9 (suite)

Nombre de monocouches	Bandes principales (nm)	Largeur bande mi-hauteur (nm) (rouge)	Absorbance			Rapport de bandes		
			Bleu	Rouge	Satellite	Bleu/ rouge	Bleu/ satellite	Rouge/ satellite
20	438,680	60.24	.2765	.1790	.0520	1.54	5.32	3.44
20	437,678	49.61	.2545	.1715	.0515	1.48	4.94	3.33
20	438,679	50.20	.2490	.1670	.0510	1.49	4.88	3.28
24	438,679	60.24	.3235	.2085	.0575	1.55	5.62	3.63
24	438,679	60.24	.3215	.2085	.0595	1.54	5.40	3.50
24	438,679	57.87	.3125	.2030	.0580	1.54	5.39	3.50
24	438,678	56.46	.3170	.2065	.0570	1.54	5.56	3.62
30	437,679	53.86	.3690	.2475	.0710	1.49	5.20	3.49
30	437,677	50.08	.3380	.2340	.0705	1.44	4.80	3.32
30	437,678	50.32	.3400	.2335	.0705	1.46	4.83	3.31
36	437,679	56.69	.4095	.2770	.0790	1.48	5.18	3.51
36	437,679	56.10	.4100	.2785	.0785	1.47	5.22	3.58
36	438,679	54.45	.3730	.2595	.0835	1.44	4.47	3.11
36	438,680	56.46	.4095	.2780	.0760	1.47	5.39	3.66

Tableau 9 (suite)

Nombre de monocouches	Bandes principales (nm)	Largeur bande mi-hauteur (nm) (rouge)	Absorbance			Rapport de bandes		
			Bleu	Rouge	Satellite	Bleu/ rouge	Bleu/ satellite	Rouge/ satellite
44	437,677	54.92	.4490	.2990	.0860	1.50	5.22	3.48
44	437,677	55.28	.4470	.3005	.0875	1.49	5.11	3.43
44	437,678	63.90	.4760	.3180	.0880	1.50	5.41	3.61
50	437,678	52.08	.4950	.3430	.0970	1.44	5.10	3.54
50	437,678	59.06	.4660	.3140	.0940	1.48	4.96	3.34
50	437,678	60.24	.5410	.3580	.0950	1.51	5.69	3.77

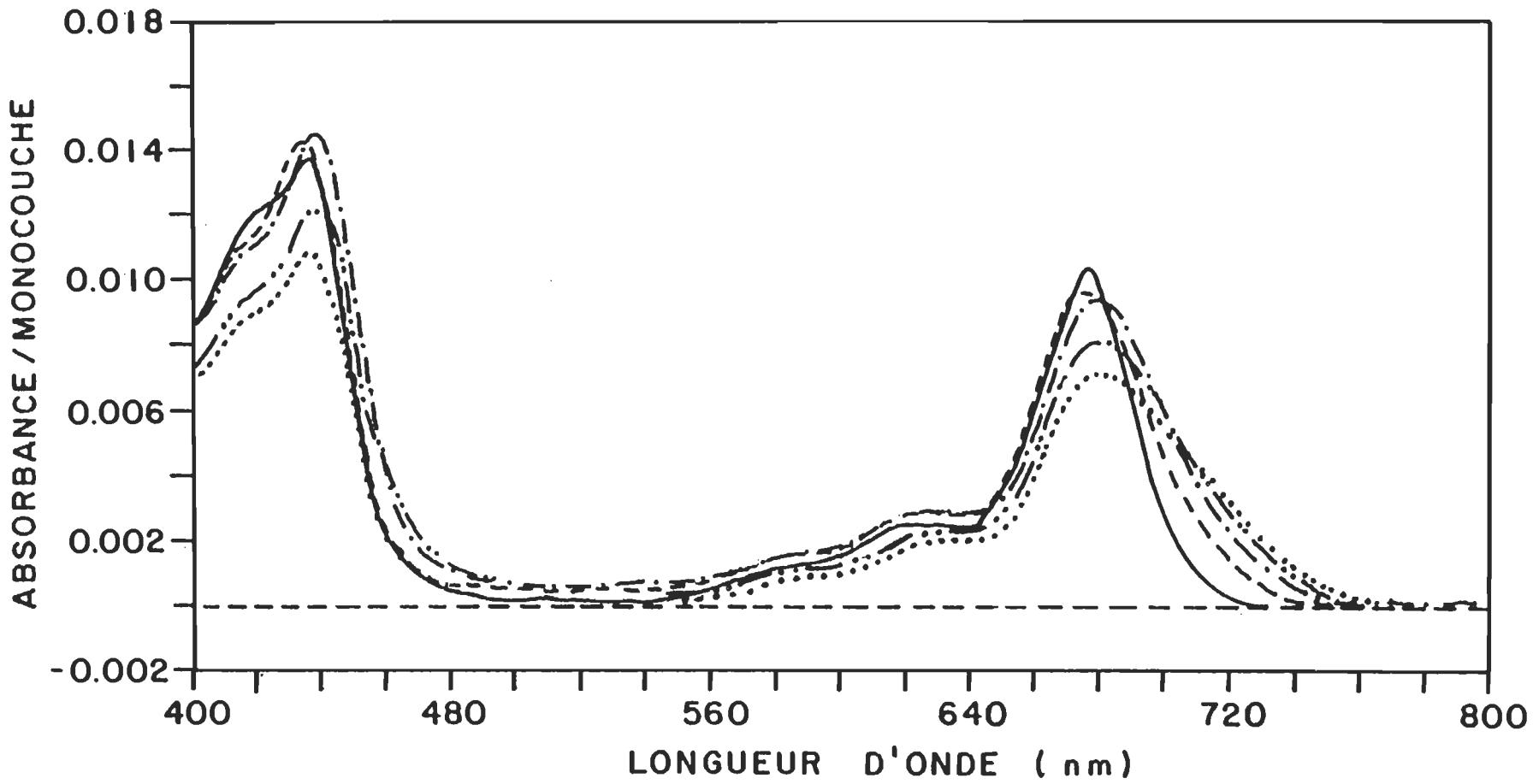


Figure 13. Spectres électroniques de la chlorophylle *a* pour différents nombres de monocouches. (—) 1 monocouche, (----) 4 monocouches, (···) 8 monocouches, (-·-) 30 monocouches et (····) 50 monocouches.

différent de la chl a selon le nombre de couches monomoléculaires. De plus, on remarque une forte diminution de l'absorbance par monocouche lorsqu'on augmente le nombre de monocouches. Malgré cette forte variation de l'absorbance, les rapports des bandes demeurent sensiblement les mêmes pour tous les échantillons considérés.

iii) Variation de l'absorbance et de l'intensité du signal acoustique en fonction du nombre de monocouches Afin de mieux observer cette diminution générale de l'absorbance, en particulier dans le cas d'un nombre élevé de monocouches, les figures 14, 15 et 16 montrent la relation de l'absorbance et de l'intensité du signal acoustique en fonction du nombre de monocouches pour trois longueurs d'onde différentes, soit 440, 680 et 625 nm. Dans un premier temps, nous allons considérer la relation obtenue pour les mesures de l'absorbance pour ensuite analyser les résultats obtenus pour les mesures photoacoustiques.

Une relation non-linéaire entre l'absorbance et le nombre de monocouches est donc observée, et ce, pour les trois longueurs d'onde considérées. Ces résultats n'appuient qu'en partie ceux observés par Sperling et Ke où une relation linéaire était observée entre l'absorbance et le nombre de monocouches (jusqu'à vingt couches monomoléculaires). Cependant, nous devons préciser que nous observons une telle dépendance si nous considérons les résultats obtenus pour les échantillons avec un faible nombre de monocouches. De façon générale, la non-linéarité obtenue constitue une déviation de la loi de Beer qui stipule que l'absorbance d'une espèce est directement proportionnelle à sa concentration. La loi de Beer est toutefois effective pour de faibles concentrations et des déviations à cette loi sont fréquemment observées.

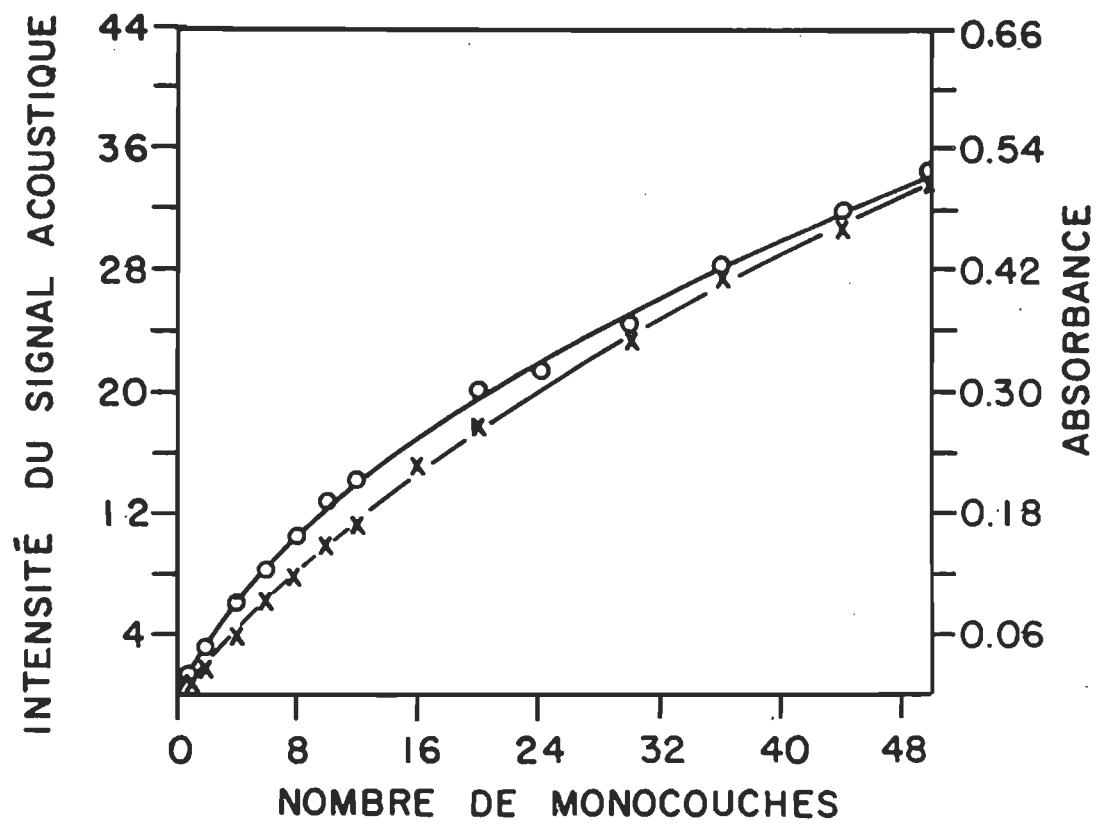


Figure 14. Intensité du signal acoustique (-0-0-) et de l'absorbance (-x-x-) à 440 nm en fonction du nombre de monocouches de chlorophylle a.

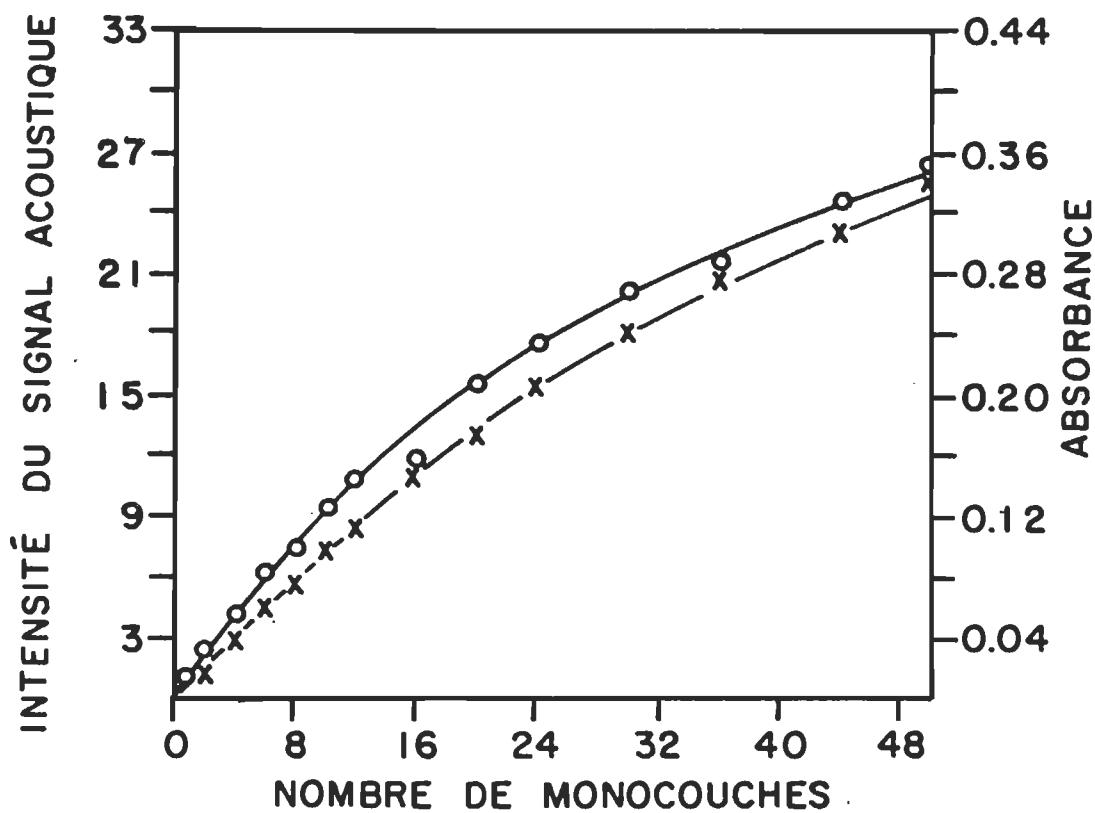


Figure 15. Intensité du signal acoustique (-0-0-) et de l'absorbance (-x-x-) à 680 nm en fonction du nombre de monocouches de chlorophylle a.

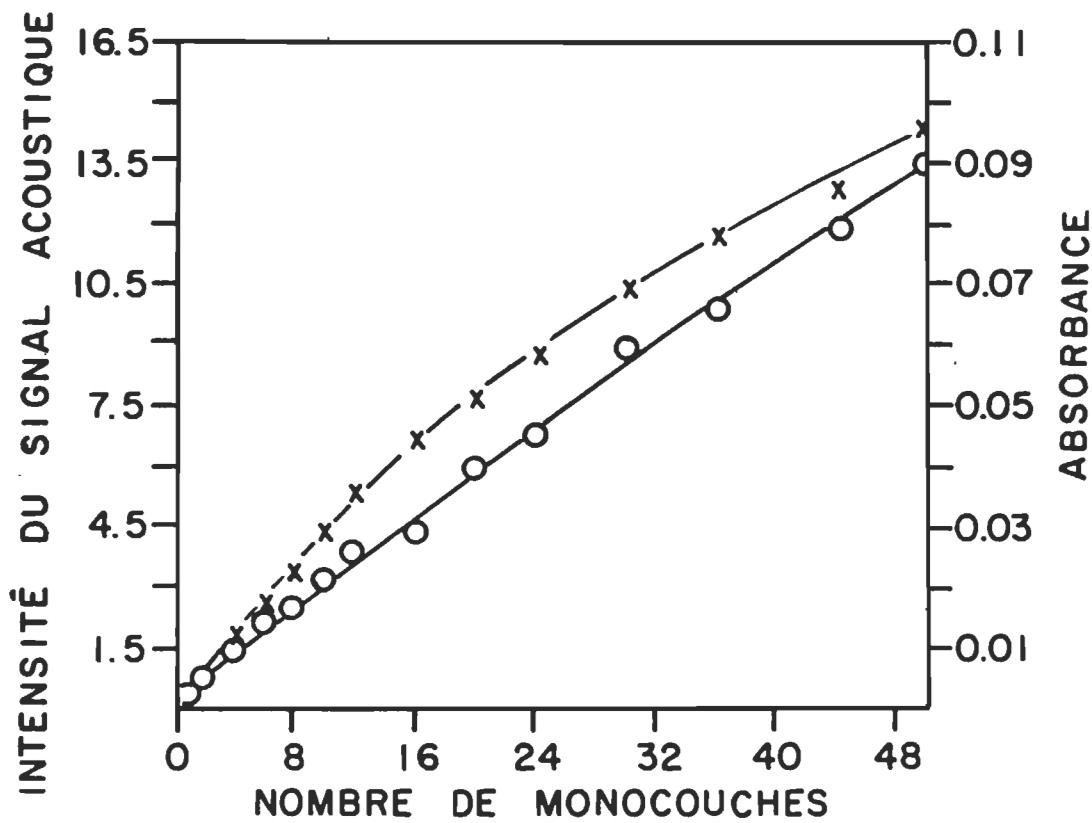


Figure 16. Intensité du signal acoustique (-0-0-) et de l'absorbance (-x-x-) à 625 nm en fonction du nombre de monocouches de chlorophylle a.

Ainsi, pour de hautes concentrations, la distance moyenne entre les espèces responsables de l'absorption de l'énergie lumineuse est diminuée à un point tel que chaque espèce affecte la distribution de charges de celles environnantes. Ce type d'interaction peut ainsi altérer l'absorption à une longueur d'onde donnée pour causer une déviation dans la relation linéaire entre l'absorbance et la concentration. (Skoog et West, 1980).

Un autre point important, qui pourrait expliquer la déviation obtenue, est la possibilité d'une formation d'agrégats de chl a, pour les échantillons ayant un nombre élevé de couches monomoléculaires, qui absorberait différemment. Il a été proposé, suite à des études par spectroscopie infra-rouge, que les molécules de chl a dans les monocouches et dans les multicouches ont différents états d'agrégation (Chapados et Leblanc, 1977). Le modèle proposé pour l'organisation moléculaire d'une multicouche de chl a consiste en un polymère de molécules de chl a. Ces molécules sont liées entre elles par l'intermédiaire de liens de coordination C = O---Mg. De plus, de part et d'autre du plan de l'anneau porphyrine, deux molécules d'eau forment un lien de coordination Mg---O d'un côté et un lien hydrogène OH---π de l'autre (Chapados et al., 1980). Cette étude portait sur des échantillons comportant quarante monocouches de chl a. Pour ce qui est du modèle de monocouche proposé, celui-ci consiste en deux ensembles de dimères de molécules d'eau situés de chaque côté d'une molécule de chl a. Ces molécules d'eau sont liées à la sous-phase par l'entremise de liens hydrogènes (Chapados et Leblanc, 1983).

Pour appuyer cette hypothèse de la formation d'un agrégat au nombre élevé de monocouches, la figure 17 montre le spectre de différence pour les spectres électroniques d'une monocouche de chl a déposée sur une lamelle hydrophile et de cinquante monocouches de chl a déposées sur une lamelle hydrophobe. On peut noter, suite à la sous-traction de ces spectres, l'apparition d'une bande ayant un maximum aux environs de 705 nm. Ces différences de spectres furent effectuées pour plusieurs échantillons et dans chacun des cas, nous avons retrouvé cette bande dans la même région de longueur d'onde, ce qui indique la formation d'une nouvelle espèce. Il faut toutefois noter que l'intensité de cette bande augmente avec le nombre de monocouches. Il est donc possible qu'un plus fort pourcentage de cette espèce soit formée dans les échantillons comportant un grand nombre de couches de chl a.

Si on considère maintenant les spectres photoacoustiques des multicoches de chl a, on observe sur les figures 14, 15 et 16 une relation non-linéaire entre l'intensité du signal acoustique et le nombre de monocouches. Il est à noter que la courbe à 625 nm est beaucoup moins prononcée que celles observées aux longueurs d'onde 440 et 680 nm. Deux facteurs doivent être principalement considérés afin d'expliquer cette diminution du signal acoustique avec le nombre de monocouches. L'intensité du dégagement thermique en spectroscopie photoacoustique étant directement reliée à la quantité de photons absorbés par l'échantillon, la plus faible absorption d'énergie lumineuse notée dans le cas d'un grand nombre de monocouches impliquerait un plus faible dégagement thermique. De plus, un effet de saturation optique partielle qui serait plus ou moins retardée selon le coefficient d'absorption

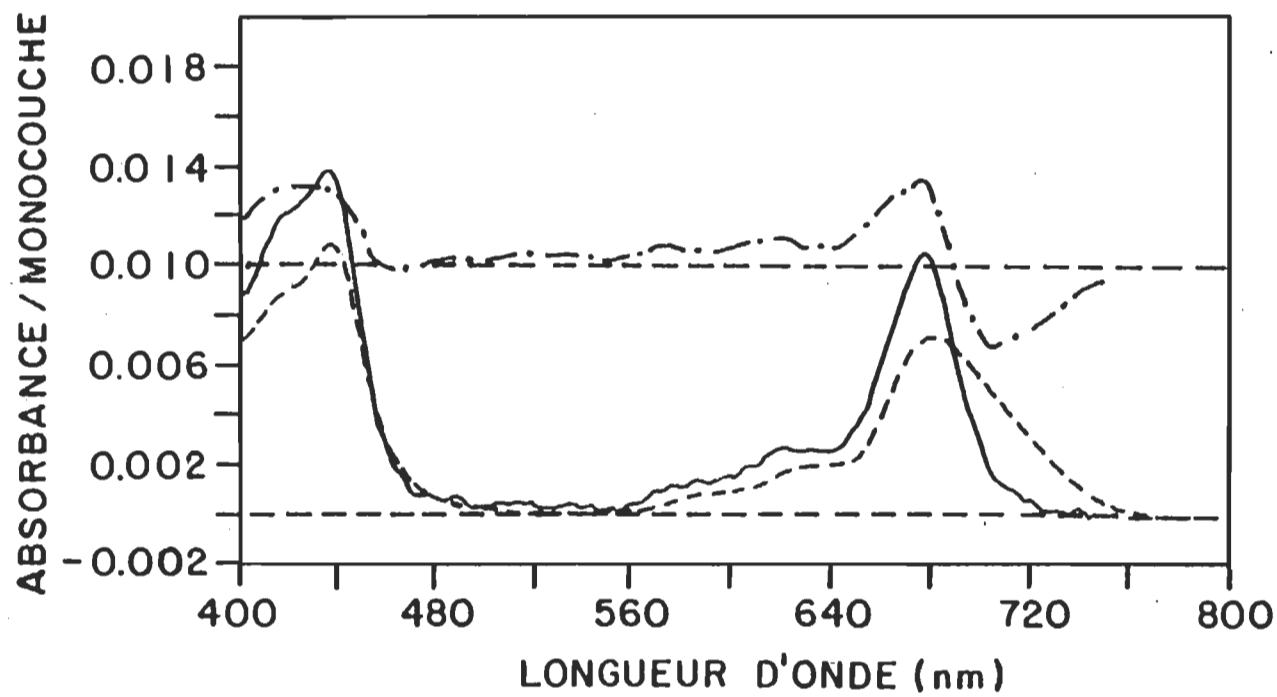


Figure 17. Spectre de différence (---) pour les spectres électroniques d'une monocouche de chlorophylle a (—) et de 50 monocouches de chlorophylle a (----).

optique de la chl a aux longueurs d'onde considérées expliquerait également, en partie, la non-linéarité observée entre l'intensité du signal acoustique et le nombre de monocouches.

La saturation optique partielle vient du fait que lorsqu'on augmente le nombre de monocouches, il vient un point où le faisceau lumineux incident est atténué avant d'atteindre les couches inférieures de l'échantillon. Ainsi, aux longueurs d'onde 440 et 680 nm, où le coefficient d'absorption optique est élevé, le signal acoustique provient principalement des premières couches de l'échantillon qui absorbent fortement le faisceau lumineux incident. Les couches inférieures de l'échantillon, qui subissent une plus faible irradiation lumineuse, contribuent plus faiblement au signal acoustique. Cette saturation optique partielle survient plus rapidement dans les régions où le coefficient d'absorption optique est élevé et devient plus important avec l'augmentation du nombre de monocouches. Pour tenir compte d'un tel type de saturation, il est important de mentionner que pour toutes les multicouches utilisées dans nos expériences, la longueur de diffusion thermique est considérée comme étant plus élevée que l'épaisseur de l'échantillon (voir section 1.3.2).

Comparativement aux longueurs d'onde 440 et 680 nm, le coefficient d'absorption optique de la chl a à 625 nm est relativement faible, par conséquent, il faut un plus grand nombre de couches de chl a dans cette région pour retrouver cet effet de saturation optique partielle. Ceci expliquerait la courbe beaucoup moins prononcée observée

dans la relation entre l'intensité du signal acoustique et le nombre de monocouches à 625 nm, comparativement à celles observées aux bandes principales. En effet, aux longueurs d'onde 440 et 680 nm, la diminution de l'absorption d'énergie lumineuse et l'effet de saturation optique partielle contribuent principalement à la diminution du signal acoustique avec l'augmentation du nombre de monocouches. On ne retrouve toutefois pas, ou très peu, cette saturation optique partielle à 625 nm, ce qui a pour effet de réduire la diminution du signal acoustique. Ainsi, ce phénomène permettrait d'expliquer la diminution des rapports de l'intensité des bandes bleu/satellite et rouge/satellite en fonction du nombre de monocouches.

### 3.4 Systèmes in vivo

Suite aux études de la chl a dans différents systèmes modèles, nous avons pensé souhaitable de terminer notre programmation de recherche en examinant un système in vivo à l'aide de la spectroscopie photoacoustique, en l'occurrence les feuilles intactes de la plante Impatiens peter-siana. La spectroscopie photoacoustique peut être très utile dans ce type d'étude, car l'opacité du matériel utilisé n'affecte pas la mesure expérimentale. Ainsi, cette technique permet l'étude des processus primaires de conversion énergétique dans la photosynthèse.

Dans le cas d'un échantillon photochimiquement actif, le signal acoustique dépendra de la quantité relative de l'énergie des photons qui sont emmagasinée en terme d'intermédiaires photochimiques durant chaque

cycle de modulation. Il est possible d'évaluer cette emmagasinage énergétique en comparant le signal d'un échantillon photochimiquement actif à celui provenant d'un échantillon inactif. Dans le cas des systèmes photosynthétiques, une référence idéale est l'échantillon de mesure. Ainsi, lorsqu'un faisceau actinique de haute intensité (non-modulé) est ajouté au faisceau modulé, la photochimie de l'échantillon est saturée et pratiquement toute la lumière modulée absorbée est convertie en chaleur, ce qui résulte en un signal acoustique maximal.

Dans les systèmes photosynthétiques, le signal acoustique en présence du faisceau modulé seulement,  $Q_m$ , est composé de deux contributions différentes:  $Q_t$ , la contribution due à la dissipation thermique modulée et  $Q_o$ , à la pression modulée directement induite par le dégagement d'oxygène provenant de la photosynthèse. Toutefois, en irradiant l'échantillon avec un faisceau actinique saturant, on ne retrouve pas le signal  $Q_o$ . Le signal total,  $Q_{ma}$ , contient alors une participation thermique additionnelle  $Q_p$ , proportionnelle à l'énergie normalement emmagasinée sous formes d'intermédiaires photochimiques. Ces différents paramètres peuvent être inter-reliés de la manière suivante:

$$Q_m = Q_t + Q_o,$$

$$Q_{ma} = Q_t + Q_p.$$

Nous verrons ultérieurement que la fréquence de modulation employée influencera le rapport entre  $Q_o$  et  $Q_p$  pour ainsi déterminer la

direction de l'effet induit par le faisceau actinique sur l'intensité du signal acoustique.

3.4.1 Effet de l'intensité du faisceau actinique sur le signal acoustique L'effet de l'intensité du faisceau actinique sur le signal acoustique à 680 nm et à une fréquence de modulation de 100 Hz pour une feuille d'Impatiens petersiana est démontré à la figure 18. A cette fréquence de modulation, l'application du faisceau actinique sur la feuille cause une atténuation du signal acoustique. On observe que l'augmentation de l'intensité du faisceau actinique a pour effet d'augmenter le pourcentage de diminution du signal acoustique pour finalement atteindre un plateau aux environs de  $25 \text{ W m}^{-2}$ . A cette intensité, toute la photochimie de la feuille devient saturée par le faisceau actinique. Donc, afin de minimiser les dommages causés par les radiations lumineuses sur les feuilles, toutes les expériences subséquentes ont été effectuées au minimum de l'intensité saturante du faisceau actinique. A cet effet, un filtre permettant de transmettre 70% de l'intensité lumineuse maximale du faisceau actinique a été utilisé, ce qui correspond à une intensité de  $22.4 \text{ W m}^{-2}$ .

3.4.2 Variation du signal acoustique en fonction de la fréquence de modulation L'effet du faisceau actinique sur le signal acoustique provenant de la feuille (c'est-à-dire:  $(Q_{\text{ma}} - Q_{\text{m}}) \times 100$ ) à 680 nm en fonction de la fréquence de modulation est présenté à la figure 19. On remarque pour les fréquences supérieures à 200 Hz le

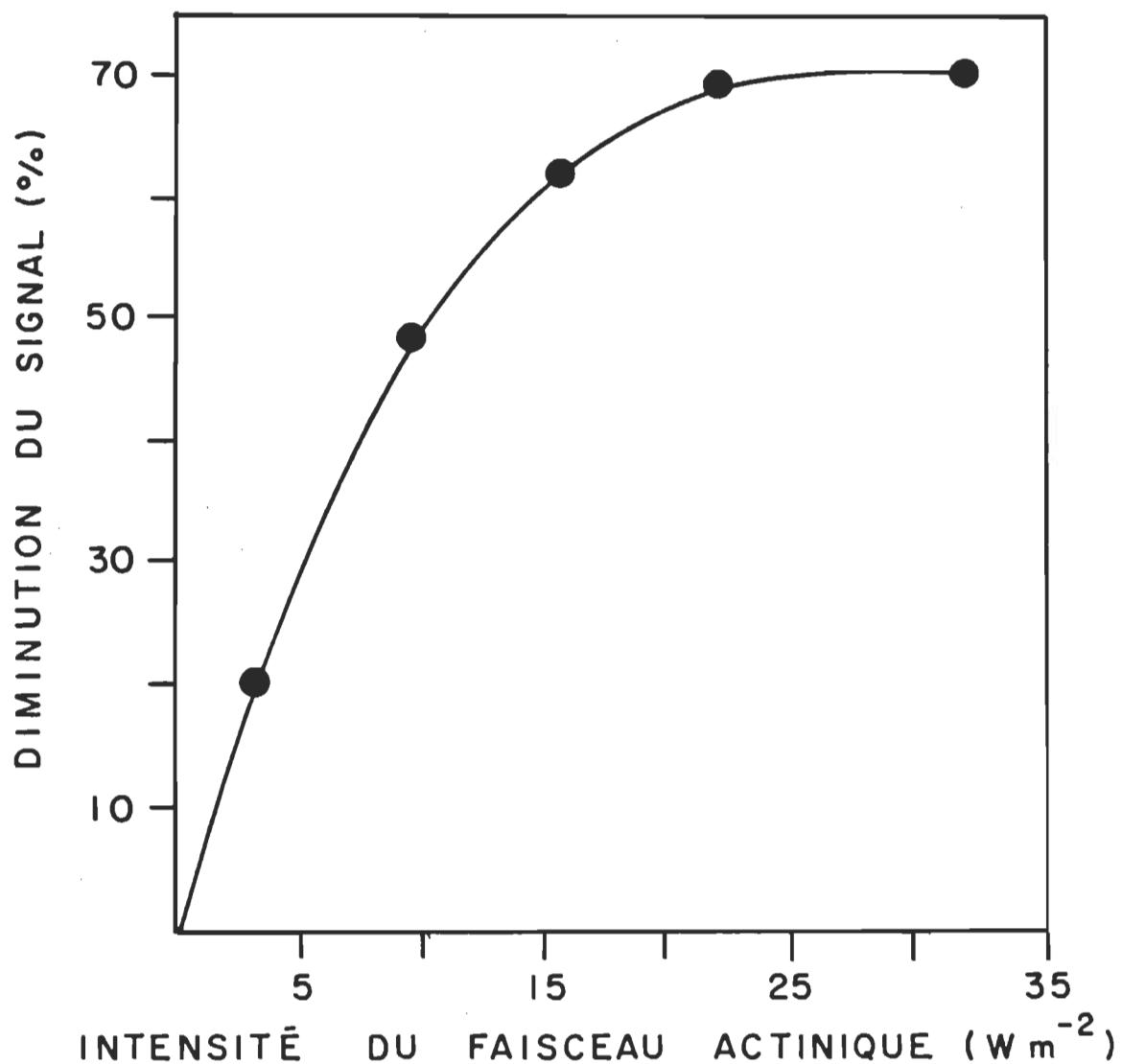


Figure 18. Effet de l'intensité du faisceau actinique sur le pourcentage de diminution de l'intensité du signal acoustique de la feuille d'Impatiens petersiana.

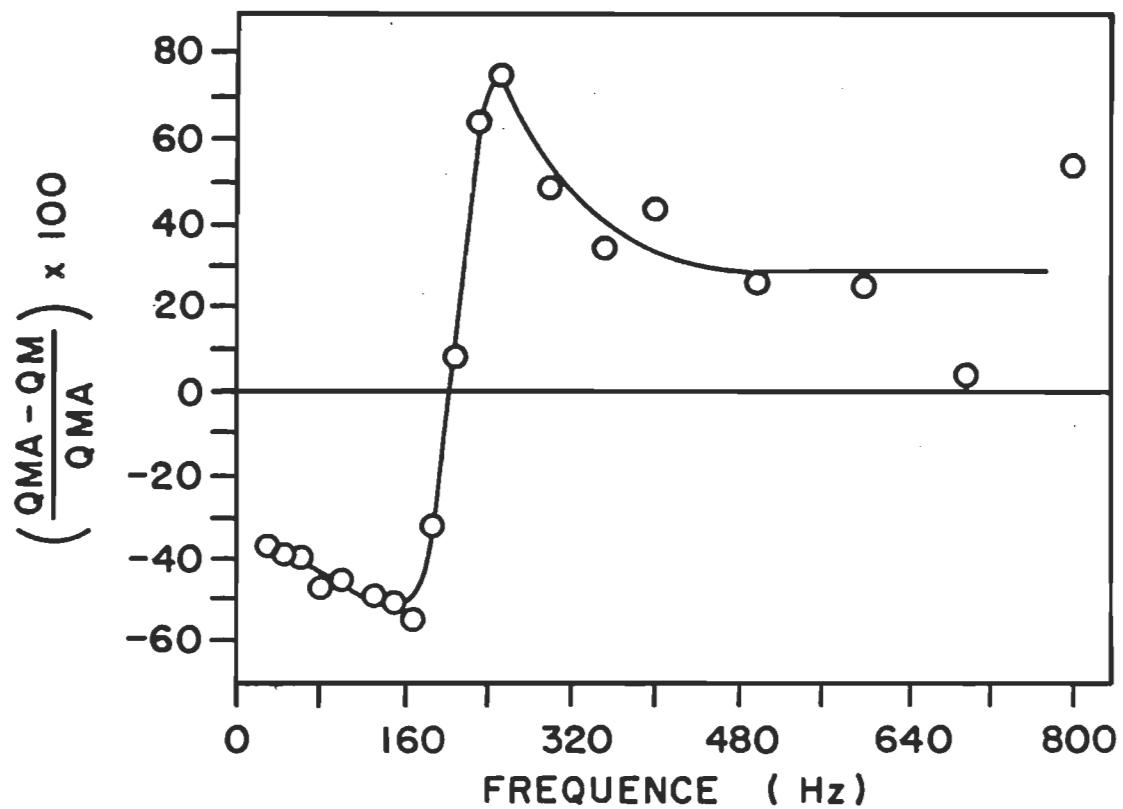


Figure 19. Effet du faisceau actinique sur le signal acoustique de la feuille d'Impatiens petersiana en fonction de la fréquence de modulation.

phénomène attendu au sujet de la perte photochimique, c'est-à-dire que l'application du faisceau actinique cause une augmentation du signal acoustique. Toutefois, pour des fréquences inférieures à 200 Hz, l'illumination de la feuille par le faisceau actinique cause une diminution de l'intensité du signal acoustique. Ces résultats sont en accord avec ceux observés sur des feuilles de tabac (Bults et al., 1981; Bults et al., 1982). Dans notre cas, les valeurs des fréquences auxquelles on observe le maximum d'effet de diminution et d'augmentation du signal sont respectivement de 140 et 250 Hz. A la fréquence de 200 Hz, on observe aucune variation de l'intensité du signal acoustique suite à l'application du faisceau actinique.

Cet effet de diminution du signal aux basses fréquences de modulation s'interprète par le fait que dans cette région de fréquences, le signal est principalement dû au dégagement d'oxygène qui diffuse rapidement par les espaces aérifères de la feuille. Le dégagement thermique est pour sa part retardée dans son trajet dû à la grande capacité calorifique des domaines aqueux de la feuille, lesquels retiennent la chaleur avant d'être dégagés à la surface pour contribuer au signal acoustique. Cependant, aux hautes fréquences de modulation, la composante du dégagement d'oxygène n'est pas assez rapide pour être détectée produisant ainsi un signal thermique qui a pour effet d'augmenter l'intensité du signal acoustique. La composante du dégagement d'oxygène est donc progressivement atténuée en augmentant la fréquence de modulation étant donné le temps requis pour la diffusion de l'oxygène des chloroplastes vers la phase gazeuse.

Une description plus complète de la variation de l'intensité du signal acoustique en fonction de la fréquence de modulation a été récemment proposée. On considère que les deux contributions du signal acoustique sont prises comme une somme de composantes vectorielles (Poulet et al., 1983). Cette étude est principalement basée sur des mesures de la phase de chacune des contributions prises séparément. On a montré que les vecteurs des signaux, provenant du dégagement d'oxygène et du dégagement thermique, varient en grandeur et en direction avec la fréquence de modulation. La somme de ces vecteurs va causer l'effet de diminution ou d'augmentation de l'intensité du signal acoustique. Des expériences ont démontrées que le signal acoustique varie selon la nature de la feuille de même que du côté auquel la feuille est placée dans la cellule photoacoustique (Buschmann et Prehn, 1981; Buschmann et Prehn, 1983). Ainsi, il faut noter que la variation du signal, suite à l'application du faisceau actinique en fonction de divers paramètres, peut varier selon le type de feuilles utilisées.

**3.4.3 Variation du signal acoustique en fonction du temps** Le signal acoustique provenant des feuilles varie également en fonction du temps. La figure 20 montre la variation du signal acoustique à 680 nm à une fréquence de modulation de 100 Hz en présence (↑) et en absence (↓) du faisceau actinique, en fonction du temps. Étant donné la prédominance du dégagement d'oxygène à basse fréquence, on observe une diminution du signal lors de l'ajout du faisceau actinique au faisceau modulé. De plus, on remarque une augmentation du signal en fonction du temps, ce signal croît rapidement dans les trente premières minutes pour ensuite se stabiliser. De façon générale, pour toutes les feuilles d'Impatiens

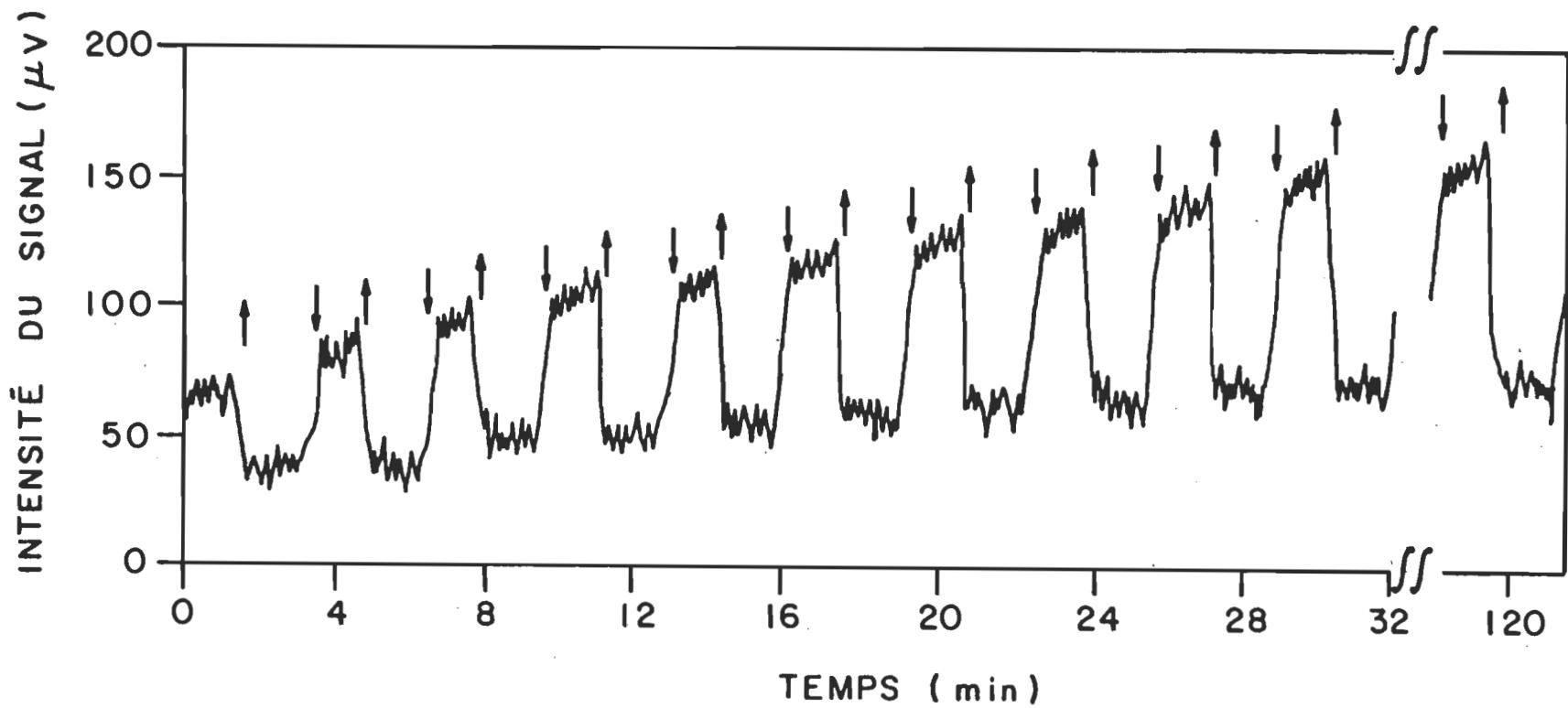


Figure 20. Variation de l'intensité du signal acoustique de la feuille d'*Impatiens petersiana* en fonction du temps. (↑) en présence et (↓) en absence du faisceau actinique.

petersiana étudiées, on ne retrouve aucune variation de l'intensité des signaux, en présence et en absence du faisceau actinique, après quarante minutes d'illumination. Cette augmentation du signal acoustique en fonction du temps est indépendante des faisceaux lumineux appliqués sur la feuille. En effet, que ce soit en présence ou non des faisceaux actinique et modulé, on observe une même variation du signal acoustique en fonction du temps, et l'obtention du plateau se situe toujours dans le même ordre de temps. Afin d'avoir l'effet maximum de diminution du signal suite à l'application du faisceau actinique, toutes les expériences qui suivront ont été effectuées dans des conditions où la stabilité de l'intensité du signal acoustique a été atteinte (soit après quarante minutes).

Il est à noter que l'augmentation du signal en fonction du temps est plus prononcée si on considère seulement le signal obtenu en absence du faisceau actinique (157%) que celui obtenu en présence du faisceau actinique (117%). Cette augmentation générale de l'intensité du signal acoustique en fonction du temps et la plus forte augmentation notée dans le signal  $Q_0$  sont expliquées en terme d'une évaporation de l'eau dans les tissus de la feuille. On a constaté au moment où les feuilles furent retirées de la plante, un pourcentage moyen de diminution en poids de l'ordre de 3% après quinze minutes et de 9% après quarante-cinq minutes. Cette perte serait principalement due à une évaporation de l'eau dans les cellules de la feuille et dans les régions interstitielles. Ce phénomène rend la diffusion de l'oxygène plus aisée et réduit la longueur de diffusion de l'onde thermique. La participation du dégagement d'oxygène sur le signal acoustique en fonction du

temps est favorisée étant donné que la vitesse de diffusion de l'oxygène dans l'eau à  $25^{\circ}\text{C}$  ( $2.31 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ ) (Windrem et Plachy, 1980) est beaucoup plus lente que la vitesse de diffusion thermique ( $1.4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ ) (Touloukian et al., 1973). Ainsi, étant donné la forte contribution du dégagement d'oxygène à basse fréquence, l'évaporation d'eau dans la feuille entraîne une plus forte augmentation du signal en absence du faisceau actinique (signal contenant le dégagement d'oxygène et le dégagement thermique) que celui obtenu en présence du faisceau actinique (signal thermique).

Il est à noter que le poids des feuilles continue de diminuer même si nous avons atteint le plateau. L'existence de ce plateau devrait donc être relié à une limitation de pénétration optique. Le plateau devrait être obtenu quand la plus grande partie de l'eau est évaporée dans la couche correspondant à la longueur de pénétration optique. Le fait qu'une faible perte de poids d'environ 6% entraîne une augmentation du signal acoustique de façon très considérable (de 100 à 160%) pourrait refléter la situation précédente.

Les spectres photoacoustiques pour une même feuille d'Imantia petersiana en présence et en absence du faisceau actinique à une fréquence de modulation de 50 Hz sont présentés à la figure 21. On peut observer que l'application du faisceau actinique sur la feuille induit une diminution de l'intensité du signal acoustique pour la majorité des longueurs d'onde considérées. Dû à l'opacité du matériel

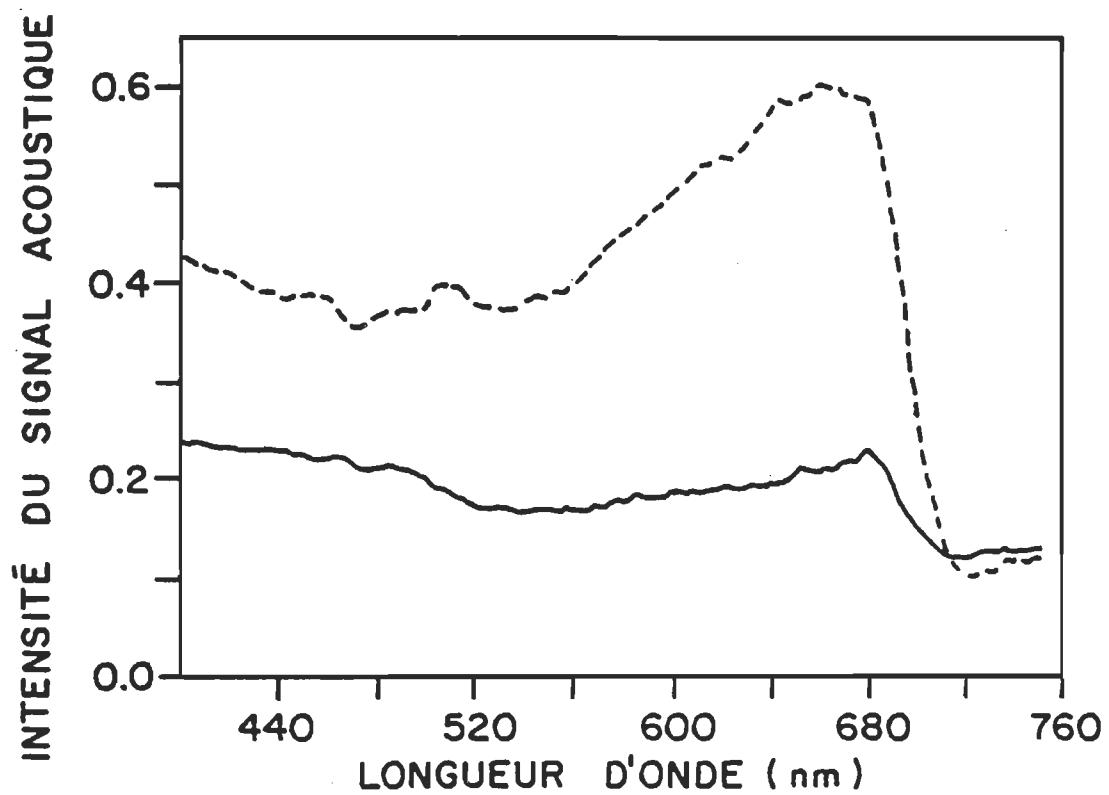


Figure 21. Spectres photoacoustiques de la feuille d'Impatiens petersiana en présence (—) et en absence (----) du faisceau actinique.

utilisé, ce spectre constitue un bon exemple des effets de saturation d'absorption optique (McClelland et Kniseley, 1976; Lin et Dudek, 1979).

L'effet du faisceau actinique sur le spectre est beaucoup plus considérable aux longueurs d'onde comprises entre 600 et 680 nm, ce qui indique un fort rendement photosynthétique dans cette région du spectre. Toutefois, nous devons noter que le fait d'observer une plus faible diminution du signal en présence du faisceau actinique entre 400 et 500 nm, n'implique pas nécessairement une plus faible activité photosynthétique dans ces régions. En effet, plusieurs facteurs doivent être considérés dans les résultats obtenus. Selon l'intensité du faisceau modulé utilisée, une variation dans le rapport entre les signaux en présence et en absence du faisceau actinique en fonction de la longueur d'onde était observée (Larue et Leblanc, non-publié). De plus, la longueur de diffusion thermique vers la surface de la feuille varie avec la longueur d'onde et la possibilité de réflexions multiples dans la feuille peuvent causer des effets importants sur le signal acoustique. Il a été démontré que la fraction de l'énergie absorbée qui est emmagasinée en intermédiaires photochimiques dépend entre autres des rendements quantiques des processus photochimiques, des niveaux d'énergie des divers intermédiaires et de leur vitesse de dissipation énergétique (Malkin et Cahen, 1979; Garty et al., 1980). De plus, la variation de l'intensité du signal acoustique en présence de différents inhibiteurs dans un système photochimiquement actif dépend de la longueur d'onde. La perte photochimique sera donc fonction de l'activité des

photosystèmes I et II (Cahen et al., 1980; Lasser-Ross et al., 1980; Malkin et al., 1981; Carpentier et al., 1984; Yamagishi et Katoh, 1984).

Il devient alors évident que le spectre photoacoustique d'une feuille ne doit pas être considéré comme un spectre électronique comme on l'a déjà proposé (Veeranjaneyulu et Das, 1982). Même si la photosynthèse est inhibée par le faisceau actinique, plusieurs paramètres doivent être corrigés dans le spectre photoacoustique. Il demeure difficile d'effectuer des corrections sur les spectres étant donné le matériel hétérogène utilisé. Toutefois, le spectre de rendement quantique peut être évalué à partir des effets causés par le faisceau actinique sur le signal acoustique enregistré à basses et à hautes fréquences de modulation (Bults et al., 1981; Kanstad et al., 1983). Cependant, cette procédure ne permet pas d'élucider la variation du rapport  $Q_p/Q_o$  en fonction de la longueur d'onde.

#### 3.4.4 Variation du signal acoustique en fonction de la phase

La dernière étape de cette étude sur les systèmes in vivo consiste à étudier la relation entre le signal acoustique, enregistré avec et sans faisceau actinique, en fonction de la phase. Ces expériences ont été effectuées avec une fréquence de modulation de 100 Hz à 680 nm. Les expériences mettant en jeu des mesures de phase du signal acoustique sont considérablement employées étant donné les nombreuses informations qui peuvent en être tirées (Adams et Kirkbright, 1976; Mandelis et al., 1979; Helander et Lundström, 1981; Moore et al., 1983). On peut observer sur la figure 22 qu'il existe un décalage dans la phase pour le

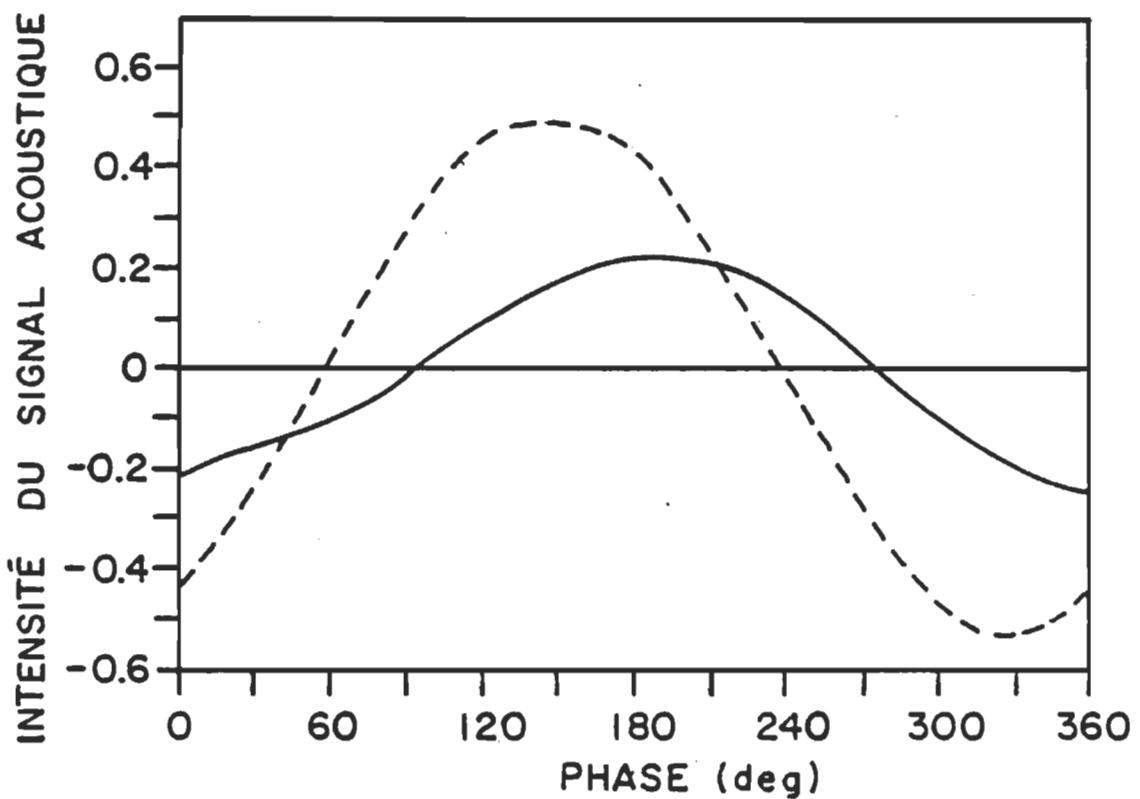


Figure 22. Intensité du signal acoustique de la feuille d'Impatiens petersiana en présence (—) et en absence (----) du faisceau actinique en fonction de la phase.

signal acoustique maximum enregistré sans faisceau actinique comparativement à celui en présence du faisceau actinique. L'explication de ce phénomène serait qu'en présence du faisceau actinique (signal thermique), la chaleur dégagée est retenue par les cellules aqueuses de la feuille. Le signal acoustique correspondant est alors déphasé par rapport au signal en absence du faisceau actinique qui résulte de la superposition des deux ondes acoustiques ayant des angles de phase différentes. Le temps de décalage entre les ondes acoustiques  $Q_m$  et  $Q_{ma}$  est donné par la différence entre les angles de phase des deux maxima à laquelle peut s'ajouter un ou plusieurs pulses lumineux.

## CHAPITRE 4

### CONCLUSION

La chl a constitue le pigment essentiel dans les plantes vertes pour la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique par le mécanisme photosynthétique. De nombreuses études spectroscopiques sur les systèmes modèles de chl a ont été effectuées au cours des dernières années afin de caractériser l'état de la chl a responsable de la haute efficacité de la séparation de charges. L'interprétation de spectres de chl a dans les systèmes in vitro permettrait ainsi l'acquisition de nouvelles connaissances qui pourrait mener à la caractérisation de l'état de la chl a retrouvé dans les plantes.

A partir des méthodes spectroscopiques électronique et photoacoustique, nous avons observé que les caractéristiques spectrales de la chl a variaient fortement selon le système modèle étudié. Dans les films solides de chl a, ce système modèle est caractérisé par une "auto-agrégation" des molécules de chl a. Les spectres des films solides de chl a sont caractérisés par une largeur de bande à mi-hauteur relativement élevée et par une présence d'épaulements sur les spectres photoacoustiques de certains échantillons. Ces phénomènes seraient reliés à un état d'agrégation particulier de la chl a. La spectroscopie photoacoustique permet donc de tirer des informations supplémentaires sur les

types d'agrégats formés dans les films solides de chl a. Les caractéristiques spectrales sont toutefois fortement dépendantes des conditions expérimentales utilisées dans nos expériences. Il est ainsi possible que, selon les conditions expérimentales, divers agrégats de chl a soient formés avec des propriétés optiques et thermiques différentes. Pour ce qui est des solutions solides, l'état monomérique de la chl a est caractérisé par un fort déplacement de la bande principale dans le rouge vers les longueurs d'onde de plus grande énergie et par une largeur de bande à mi-hauteur beaucoup plus faible. De plus, les caractéristiques spectrales des solutions solides sont sensiblement les mêmes pour les deux techniques spectroscopiques.

L'étude spectroscopique de la chl a en mono- et multicouches constitue une étude particulièrement importante, car ce système modèle simule l'orientation des systèmes membranaires. Une relation non-linéaire est observée entre l'absorbance et l'intensité du signal acoustique en fonction du nombre de monocouches. Dans le cas des spectres électroniques, en plus de la déviation de la loi de Beer, la possibilité d'une formation d'agrégats de chl a pour les échantillons avec un nombre élevé de monocouches expliquerait la diminution de l'augmentation de l'absorbance avec le nombre de monocouches. Pour ce qui est des mesures photoacoustiques, la non-linéarité observée peut s'expliquer par la diminution de l'augmentation de l'absorbance avec le nombre de monocouches et par un effet de saturation optique partielle qui serait plus ou moins retardée selon le coefficient d'absorption optique du pigment aux longueurs d'onde considérées. Le signal acoustique enregistré peut être

fortement influencé par les processus de dissipations radiatives des molécules, telle la fluorescence. Nous n'avons toutefois pas considéré ce phénomène dans les résultats obtenus étant donné le faible rendement quantique de luminescence de la chl a en mono- et multicouches.

La technique de déconvolution de spectres pourrait s'avérer très utile dans la détermination des états d'agrégation de la chl a dans différents environnements. Les intensités relatives des composantes gaussiennes utilisées dans la déconvolution de spectres peuvent en effet être reliées à la dimension et à la conformation des agrégats de chl a (Cotton et al, 1974). De plus, l'utilisation de la spectroscopie photoacoustique infra-rouge constituerait une méthode importante pour l'investigation des agrégats de chl a. Par cette technique, des informations sur les transitions vibrationnelles des molécules pourraient être obtenues.

L'utilisation de la spectroscopie photoacoustique est très avantageuse pour l'étude des propriétés spectroscopiques de matériaux biologiques. Souvent, les techniques spectroscopiques conventionnelles ne permettent pas l'étude de tels matériaux étant limitées par l'opacité du matériel, les phénomènes de diffusion, les propriétés hétérogènes de la surface, etc. La technique photoacoustique constitue donc une méthode d'investigation très importante pour l'étude des propriétés optiques et thermiques des systèmes in vivo. Dans le cas des feuilles intactes, des informations quantitatives peuvent être obtenues sur l'emmagasinage d'énergie photochimique et sur le dégagement d'oxygène provenant de la

photosynthèse. De plus, en comparant le signal acoustique d'une feuille photochimiquement active avec celui où différents processus photosynthétiques sont inhibés, une évaluation des rendements quantiques de ces processus peut être obtenue.

A partir des mesures photoacoustiques sur les feuilles d'Impatiens petersiana, l'effet de la perte photochimique a pu être observé en fonction de la fréquence de modulation. Ainsi, on a constaté aux hautes fréquences de modulation ( $>200\text{ Hz}$ ), un accroissement du signal acoustique en présence du faisceau actinique comme le prédisait la théorie. Un effet contraire est toutefois observé aux faibles fréquences de modulation dénotant ainsi la prédominance du dégagement d'oxygène. De plus, le rapport entre la participation thermique et le dégagement d'oxygène au signal acoustique est influencé par le degré d'hydratation de la feuille, l'angle de phase de chacune des contributions et la longueur d'onde. Tout ces effets devront être pris en considération lors de l'utilisation de la spectroscopie photoacoustique pour l'étude de l'activité photosynthétique dans les feuilles intactes.

La spectroscopie photoacoustique demeure un outil important qui permet d'élargir la puissance des analyses spectroscopiques. Cette technique non-destructive peut être efficacement appliquée à l'étude des divers processus de bases impliqués dans la photosynthèse des plantes. Ceci peut inclure entre autres, les comparaisons des effets photosynthétiques obtenus à partir de feuilles intactes et de suspensions de chloroplastes en général, la détermination des rendements quantiques,

l'étude de la fixation du bioxyde de carbone sur les réactions primaires et les effets de diverses conditions ambiantes sur l'activité photosynthétique. La technique photoacoustique ouvre la voie à la recherche et au développement de connaissances nouvelles qui mènera à une meilleure compréhension du mécanisme photosynthétique.

## ANNEXE A

Détermination des coefficients pour les composantes ac et dc de la distribution de la température dans la cellule.

La température à la surface gaz-échantillon est donnée par l'expression

$$\phi_g(0,t) = \phi_s(0,t) \quad (9a)$$

$$K_g \frac{\partial \phi_g}{\partial x}(0,t) = K_s \frac{\partial \phi_s}{\partial x}(0,t) \quad (9b)$$

De même, la température à la surface matériel de support-échantillon est exprimée sous la forme

$$\phi_b(-\ell,t) = \phi_s(-\ell,t) \quad (9c)$$

$$K_b \frac{\partial \phi_b}{\partial x}(-\ell,t) = K_s \frac{\partial \phi_s}{\partial x}(-\ell,t) \quad (9d)$$

où s, b et g réfère à l'équation (6) pour la température dans le solide, le matériel de support et le gaz. En effectuant ces opérations (9a-d)

sur les composantes dc (valeurs réelles) de la solution générale de  $\phi(x,t)$  à l'équation (6), on obtient

$$\theta_0 = e_1 + d \quad (9a')$$

$$\frac{-K_g}{\ell_g} \theta_0 = K_s e_2 + K_s \beta d \quad (9b')$$

$$W_0 = e_1 - e_2 \ell + d e^{-\beta \ell} \quad (9c')$$

$$\frac{K_b}{\ell_b} W_0 = K_s e_2 + K_s \beta d e^{-\beta \ell} \quad (9d')$$

Les équations (9a'-d') permettent ainsi de déterminer les coefficients  $e_1$ ,  $e_2$ ,  $d$ ,  $W_0$  et  $\theta_0$  pour les composantes indépendantes du temps (dc) de la solution. En réappliquant les opérations (9a-d), cette fois pour les composantes sinusoïdales (ac) de la solution, on obtient

$$\theta = U + V - E \quad (9a'')$$

$$-K_g \sigma_g \theta = K_s \sigma_s U - K_s \sigma_s V - K_s \beta E \quad (9b'')$$

$$W = e^{-\sigma_s \ell} U + e^{\sigma_s \ell} V - e^{-\beta \ell} E \quad (9c'')$$

$$K_b \sigma_b W = K_s \sigma_s e^{-\sigma_s \ell} U - K_s \sigma_s e^{\sigma_s \ell} V - K_s \beta e^{-\beta \ell} E \quad (9d'')$$

A l'aide de ces équations, il est possible de déterminer les coefficients  $E$ ,  $U$ ,  $V$ ,  $W$  et  $\theta$ .

## ANNEXE B

Développement de la formule de la variation de  
pression sinusoïdale dans la cellule.

En assumant que le reste du gaz agit de façon adiabatique, alors la pression acoustique dans la cellule due au déplacement gazeux est dérivée de la loi des gaz adiabatique  $PV^\gamma = \text{cte}$ , où  $\gamma$  constitue le rapport des chaleurs spécifiques. Ainsi, l'incrément de pression est donné par la relation suivante :

$$\delta P(t) = \frac{\gamma P_0}{V_0} \delta V = \frac{\gamma P_0}{\frac{l}{g}} \delta x(t)$$

et à l'aide de l'équation (14), on obtient la relation

$$\delta P(t) = \frac{\gamma P_0 \theta}{T_0 \frac{l}{g} a_g \sqrt{2}} e^{i(\omega t - \pi/4)}$$

$$\delta P(t) = Q e^{i(\omega t - \pi/4)}$$

$$\text{où } Q = \frac{\gamma P_0 \theta}{\frac{l}{g} a_g T_0 \sqrt{2}}$$

La variation de pression actuelle,  $\Delta P(t)$ , est donnée par la partie réelle de  $\Delta P(t)$ , d'où

$$\begin{aligned}\Delta P(t) &= Q_1 \cos(\omega t - \pi/4) - Q_2 \sin(\omega t - \pi/4) \\ \Delta P(t) &= q \cos(\omega t - \psi - \pi/4)\end{aligned}$$

où  $Q_1$  et  $Q_2$  sont respectivement les parties réelles et imaginaires de  $Q$  avec  $q$  et  $\psi$  qui correspondent à l'amplitude et à la phase de  $Q$ , c'est-à-dire

$$Q = Q_1 + iQ_2 = q e^{-i\psi}$$

En combinant les équations (9) et (14b), on obtient la formule explicite de la variation de pression sinusoïdale

$$Q = \frac{\beta I_0^\gamma P_0}{2K_s g^a g T_0 (\beta^2 - \sigma_s^2) \sqrt{2}} \left[ \frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma_s \ell} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_s \ell} + 2(b-r)e^{-\beta \ell}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s \ell} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s \ell}} \right]$$

## ANNEXE C

Application de la loi de Beer aux films monomoléculaires

La loi de Beer appliquée aux chromophores dissous dans un milieu transparent est donnée par la relation suivante:

$$A = \epsilon cl \quad \text{où } A = \text{absorbance}$$

$\epsilon$  = coefficient d'extinction molaire ( $1 \text{ mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

c = concentration ( $\text{mole l}^{-1}$ )

l = longueur du parcours optique (cm)

Quant à la loi de Beer appliquée aux mono- et multicoches à une longueur d'onde  $\lambda$  et à une pression de surface  $\pi$ , elle est donnée par l'expression

$$A_{n,\lambda,\pi} = \frac{\epsilon_{n,\lambda,\pi} \cdot n}{aN} \frac{\text{cm}^3}{10^{-3}}$$

où n représente le nombre de monocouches, a, l'aire moléculaire de la molécule ( $\text{cm}^2 \text{ molécule}^{-1}$ ) et N, le nombre d'Avogadro. Le coefficient d'absorption optique ( $\beta$ ) est obtenu en divisant la valeur de l'absorbance de n monocouches par l'épaisseur des couches monomoléculaires (1.5 nm pour une monocouche de chl a).

$$\beta = \frac{A_{n,\lambda,\pi}}{d_n} = \frac{\epsilon_{n,\lambda,\pi} \cdot n}{a \cdot n \cdot d_n} \frac{\text{cm}^3}{10^{-3} \text{ l}}$$

où  $d_n$  est l'épaisseur de  $n$  monocouches. Finalement, la longueur d'absorption optique ( $\mu_\beta$ ) est donnée par l'inverse du coefficient d'absorption optique ( $\beta$ ):

$$\mu_\beta = \frac{1}{\beta}$$

BIBLIOGRAPHIE

Abraham, R.J., et Smith, K.M. Novel proton NMR characterized structures for chlorophyll a and b aggregates in solution. Tetrahedron Lett., 1983, 24, 2681-2684.

Adams, M.J., et Kirkbright, G.F. Phase analysis in solid-sample optoacoustic spectrometry. Spectrosc. Lett., 1976, 9, 255-264.

Adams, M.J., et Kirkbright, G.F. Thermal diffusivity and thickness measurements for solid samples utilising the optoacoustic effect. Analyst, 1977, 102, 678-682.

Aghion, J., et Leblanc, R.M. Interactions of photosynthetic pigments in monolayers at a water-air interface. J. Membr. Biol., 1978, 42, 189-198.

Ballschmiter, K., Cotton, T.M., Strain, H.H., et Katz, J.J. Chlorophyll-water interactions hydration, dehydration and hydrates of chlorophyll. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 180, 347-359.

Ballschmiter, K., et Katz, J.J. An infrared study of chlorophyll-chlorophyll and chlorophyll-water interactions. J. Am. Chem. Soc., 1969, 91, 2661-2677.

Ballschmiter, K., et Katz, J.J. Chlorophyll-chlorophyll and chlorophyll-water interactions in the solid state. Biochim. Biophys. Acta, 1972, 256, 307-327.

Barber, J. Biophysics of photosynthesis. Rep. Prog. Phys., 1978, 41, 1157-1199.

Beddard, G.S., Porter, G., F.R.S. et Weese, G.M. Model systems for photosynthesis V. Electron transfer between chlorophyll and quinones in a lecithin matrix. Proc. R. Soc. London, Ser. A., 1975, 342, 317-325.

Bell, A.G. Upon the production of sound by radiant energy. Philos. Mag., 1881, 11, 510-528.

Bellamy, W.D., Gaines, G.L., Jr., et Tweet, A.G. Preparation and properties of monomolecular films of chlorophyll a and pheophytin a. J. Chem. Phys., 1963, 39, 2528-2538.

Brace, J.G., Fong, F.K., Harweik, D.H., Koester, V.J., Shepard, A., et Winograd, N. Stoichiometric determination of chlorophyll a-water aggregates and photosynthesis. Symbiotic roles of the magnesium atom and the ring V cyclopentanone group in the structural and photochemical properties of chlorophyll a monohydrate and dihydrate. J. Am. Chem. Soc., 1978, 100, 5203-5207.

Brown, J.S. Forms of chlorophyll in vivo. Ann. Rev. Plant Physiol., 1972 23, 73-86.

Bults, G., Horwitz, B.A., Malkin, S., et Cahen, D. Frequency-dependent photoacoustic signals from leaves and their relation to photosynthesis, FEBS Lett., 1981, 129, 44-46.

Bults, G., Horwitz, B.A., Malkin, S., et Cahen, D. Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in whole leaves. Photochemistry and gas exchange. Biochim. Biophys. Acta, 1982, 679, 452-465.

Buschmann, C., et Prehn, H. In vivo studies of radiative and non-radiative de-excitation processes of pigments in Raphanus seedlings by photoacoustic spectroscopy. Photobiochem. Photobiophys., 1981, 2, 209-215.

Buschmann, C., et Prehn, H. In vivo photoacoustic spectra of Raphanus and Tradescantia leaves taken at different chopping frequencies of the excitation light. Photobiochem. Photobiophys., 1983, 5, 63-69.

Cahen, D., Bults, G., Garty, H., et Malkin, S. Photoacoustics in life sciences. J. Biochem. Biophys. Methods, 1980, 3, 293-310.

Carpentier, R., Larue, B., et Leblanc, R.M. Photoacoustic spectroscopy of Anacystis nidulans I. Effect of sample thickness on the photoacoustic signal. Arch. Biochem. Biophys., 1983, 222, 403- 410. (a)

Carpentier, R., Larue, B., et Leblanc, R.M. Photoacoustic spectroscopy of Anacystis nidulans II. Characterization of pigment holochroms and thermal deactivation spectrum. Arch. Biochem. Biophys., 1983, 222, 411-415. (b)

Carpentier, R. Larue, B., et Leblanc R.M. Photoacoustic spectroscopy of Anacystis nidulans III. Detection of photosynthetic activities. Arch. Biochem. Biophys., 1984, 228, 534-543.

Castleden, S.L., Elliott, C.M., Kirkbright, G.F., et Spillane, D.E.M. Quantitative examination of thin-layer chromatography plates by photoacoustic spectroscopy. Anal. Chem., 1979, 51, 2152-2153.

Cesar, C.L., Vargas, H., Filho, J.M., et Miranda, L.C.M. Photoacoustic determination of thermal diffusivity of solids: Application to CdS. Appl. Phys. Lett., 1983, 43, 555-557.

Chapados, C., et Leblanc, R.M. Aggregation of chlorophylls in monolayers. Infrared study of chlorophyll a in a mono- and multilayer arrays. Chem. Phys. Lett., 1977, 49, 180-182.

Chapados, C., Germain, D., et Leblanc, R.M. Aggregation of chlorophylls in monolayers. Part IV. The reorganisation of chlorophyll a in multilayer arrays. Biophys. Chem., 1980, 12, 189-198.

Chapados, C., et Leblanc, R.M. Aggregation of chlorophylls in monolayers V. The effect of water on chlorophyll a and chlorophyll b in mono-and multilayer arrays. Biophys. Chem., 1983, 17, 211-244.

Closs, G.L., Katz, J.J., Pennington, F.C., Thomas, M.R., et Strain, H.H. Nuclear magnetic resonance spectra and molecular association of chlorophylls a and b, methyl chlorophyllides, pheophytins, and methyl pheophorbides. J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 3809-3821.

Colmano, G. Visible absorption spectrum of chlorophyll a, b and  $\beta$ -carotene molecules mixed in monolayers at a water-air interface. Nature, 1962, 193, 1287-1288.

Costa, S.M. de B., Froines, J.R., Harris, J.M., Leblanc, R.M., Orger, B.H., et Porter, G., F.R.S. Model systems for photosynthesis III. Primary photoprocesses of chloroplast pigments in monomolecular arrays on solid surfaces. Proc. R. Soc. London, Ser. A., 1972, 326, 503-519.

Cotton, T.M., Loach, P.A., Katz, J.J., et Ballschmiter, K. Studies of chlorophyll-chlorophyll and chlorophyll-ligand interactions by visible absorption and infrared spectroscopy at low temperatures. Photochem. Photobiol., 1978, 27, 735-749.

Cotton, T.M., Trifunac, A.D., Ballschmiter, K., et Katz, J.J. State of chlorophyll a in vitro and in vivo from electronic transition spectra, and the nature of antenna chlorophyll. Biochim. Biophys. Acta, 1974, 368, 181-198.

Ducharme, D., Tessier, A., et Leblanc, R.M. Design and characteristics of a cell for photoacoustic spectroscopy of condensed matter. Rev. Sci. Instrum., 1979, 50, 1461-1462.

Duysens, L.N.M., Amesz, J., et Kamp, B.M. Two photochemical systems in photosynthesis. Nature, 1961, 190, 510-511.

Emerson, R. Quantum yield of photosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol., 1958, 9, 1-24.

Fishman, V.A., et Bard, A.J. Open-ended photoacoustic spectroscopy cell for thin-layer chromatography and other applications. Anal. Chem., 1981, 53, 102-105.

Fong, F.K., Hoff, A.J., et Brinkman, F.A. Electron spin resonance observation of the photooxidation of hydrated chlorophyll a dimers by water. In vitro photochemical characterization of reaction centers in photosynthesis. J. Am. Chem. Soc., 1978, 100, 619-621.

Fong, F.K., et Koester, V.J. Bonding interactions in anhydrous and hydrated chlorophyll a. J. Am. Chem. Soc., 1975, 97, 6888-6890.

Fong, F.K., et Koester, V.J. In vitro preparation and characterization of a 700 nm absorbing chlorophyll-water adduct according to the proposed primary molecular unit in photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 423, 52-64.

Fong, F.K., Koester, V.J., et Galloway, L. Endo and exo carbomethoxy carbonyl bonding in hydrated chlorophyll a dimers. Experimental criteria for the determination of the P700 structure in photosynthesis. J. Am. Chem. Soc., 1977, 99, 2372-2375. (a)

Fong, F.K., Polles, J.S., Galloway, L., et Fruge, D.R. Far red photogalvanic splitting of water by chlorophyll a dihydrate. A new model of plant photosynthesis. J. Am. Chem. Soc., 1977, 99, 5802-5804. (b)

Gaines, G.L., Jr. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. New York: Interscience, 1966.

Garty, H., Cahen, D., et Caplan, S.R. Photoacoustic calorimetry of Halobacterium Halobium photocycle. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1980, 97, 200-206.

Gorelik, G. A method for studying the time of energy exchange among the various degrees of freedom of gaseous molecules. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 1946, 54, 779-780.

Gregory, R.P.F. Biochemistry of photosynthesis (2nd ed). New York: Wiley-Interscience, 1971, 75-91.

Gurinovich, G.P., et Strelkova, T.I. The mechanism of association of chlorophyll and its analogues. Biofizika, 1968, 13, 782-792.

Harshbarger, W.R., et Robin, M.B. The opto-acoustic effect: Revival of an old technique for molecular spectroscopy. Acc. Chem. Res., 1973, 6, 329-334. (a)

Harshbarger, W.R., et Robin, M.B. The quenching of excited iodine atoms by oxygen molecules as studied by opto-acoustic spectroscopy. Chem. Phys. Lett., 1973, 21, 462-465. (b)

Helander, P., Lundström, I., et McQueen, D. Light scattering effects in photoacoustic spectroscopy. J. Appl. Phys., 1980, 51, 3841-3847.

Helander, P., et Lundström, I. Photoacoustic study of layered samples. J. Appl. Phys., 1981, 52, 1146-1151.

Hordvik, A., et Schlossberg, H. Photoacoustic technique for determining optical absorption coefficients in solids. Appl. Opt., 1977, 16, 101-107.

Jacobs, E.E., Holt, A.S. et Rabinowitch, E. The absorption spectra of monomolecular layers of chlorophyll a and ethyl chlorophyllide a. J. Chem. Phys., 1954, 22, 142-143.

Kanstad, S.O., Cahen, D., et Malkin, S. Simultaneous detection of photosynthetic energy storage and oxygen evolution in leaves by photothermal radiometry and photoacoustics. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 722, 182-189.

Katz, J.J., Ballschmiter, K., Garcia-Morin, M., Strain, H.H., et Uphaus, R.A. Electron paramagnetic resonance of chlorophyll-water aggregates. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1968, 60, 100-107.

Katz, J.J., Closs, G.L., Pennington, F.C., Thomas, M.R., et Strain, H.H. Infrared spectra, molecular weights, and molecular association of chlorophylls a and b, methyl chlorophyllides, and pheophytins in various solvents. J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 3801-3809.

Katz, J.J., et Janson, T.R. Chlorophyll-chlorophyll interactions from <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1972, 206, 579-603.

Katz, J.J., Janson, T.R., Kostka, A.G., Uphaus, R.A., et Closs, G.L. Chlorophyll-chlorophyll interactions. Ring V keto carbonyl donor properties from carbon-13 nuclear magnetic resonance. J. Am. Chem. Soc., 1972, 94, 2883-2885.

Katz, J.J., Oettmeier, W., et Norris, J.R. Organisation of antenna and photo-reaction centre chlorophylls on the molecular level. Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B, 1976, 273, 227-253.

Kaya, K., Chatelain, C.L., Robin, M.B. et Kuebler, N.A. Radiationless decay in the azabenzenes as studied by opto-acoustic spectroscopy. J. Am. Chem. Soc., 1975, 97, 2153-2161.

Kaya, K., Harshbarger, W.R., et Robin, M.B. Triplet states of biacetyl and energy transfer as revealed by opto-acoustic spectroscopy. J. Chem. Phys., 1974, 60, 4231-4236.

Kelly, A.R., et Porter, G., F.R.S. Model systems for photosynthesis I. Energy transfer and light harvesting mechanisms. Proc. R. Soc. London, Ser. A, 1970, 315, 149-161.

Krasnovsky, A.A., et Bystrova, M.I. Self-assembly of chlorophyll aggregated structures. Biosystems, 1980, 12, 181-194.

Kreutz, W. Advances in botanical research (vol 2)., R.D. Preston (Ed)., New York: Academic Press, 1970, 114.

Kreuzer, L.B. Ultralow gas concentration infrared absorption spectros-copy. J. Appl. Phys., 1971, 42, 2934-2943.

Kreuzer, L.B., Kenyon, N.D., et Patel, C.K.N. Air pollution: sensitive detection of ten pollutant gases by carbon monoxide and carbon dioxyde lasers. Science, 1972, 177, 347-349.

Kreuzer, L.B., et Patel, C.K.N. Nitric oxide air pollution: detection by optoacoustic spectroscopy. Science, 1971, 173, 45-47.

Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. J. Am. Chem. Soc., 1917, 39, 1848-1906.

Larue, B., et Leblanc, R.M. Résultats non-publiés.

Lasser-Ross, N., Malkin., S., et Cahen, D. Photoacoustic detection of photosynthetic activities in isolated broken chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 593, 330-341.

Lin, J. W-P., et Dudek, L.P. Signal saturation effect and analytical techniques in photoacoustic spectroscopy of solids. Anal. Chem., 1979, 51, 1627-1632.

Lloyd, L.B., Yeates, R.C, et Eyring, E.M. Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy in thin-layer chromatography. Anal. Chem., 1982, 54, 549-552.

Malkin, S., et Cahen, D. Photoacoustic spectroscopy and radiant energy conversion: theory of the effect with special emphasis on photosynthesis. Photochem. Photobiol., 1979, 29, 803-813.

Malkin, S., Lasser-Ross, N., Bults, G., et Cahen, D. Photoacoustic spectroscopy in photosynthesis. Photosynthesis III. Structure and molecular organisation of the photosynthetic apparatus. G. Akoyunoglou (Ed.), Philadelphie: Balaban International Science Services, 1981, 1031-1042.

Mandelis, A., Teng, Y.C., et Royce, B.S.H. Phase measurements in the frequency domain photoacoustic spectroscopy of solids. J. Appl. Phys., 1979, 50, 7138-7146.

Mauzerall, D. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series (vol. 5). A. Trebst et M. Avron (Eds.). New York: Springer-Verlag, 1977, 117-124.

Mazurek, M., Nadolski, B.D., North, A.M., Park, M.-Y., et Pethrick, R.A. Aggregation of chlorophyll I: spectroscopy study of solvent effects. J. Photochem., 1982, 19, 151-161.

McClelland, J.F., et Kniseley, R.N. Signal saturation effects in photoacoustic spectroscopy with applicability to solid and liquid samples. Appl. Phys. Lett., 1976, 28, 467-469.

McDonald, F.A. Photoacoustic determination of small optical absorption coefficients: extended theory. Appl. Opt., 1979, 18, 1363-1367.

Mercadier, M.E. Notes on radiophony. C.R. Hebd. Services Acad. Sci., 1881, 92, 409.

Moore, T.A., Benin, D., et Tom, R. Photoacoustic measurement of photophysical properties of photosynthetic pigments: porphyrins and chlorophylls. J. Phys., 1983, 44, C6-351-C6-353.

Munger, G. Détermination du poids moléculaire de protéine à l'interface air/eau par un nouveau système à faible pression de surface. Thèse, U.Q.T.R., 1979.

Omata, T., et Murata, N. A rapid and efficient method to prepare chlorophyll a and b from leaves. Photochem. Photobiol., 1980, 31, 183-185.

Parker, J.G. Optical absorption in glass: Investigation using an acoustic technique. Appl. Opt., 1973, 12, 2974-2977.

Pfund, A.H. Atmospheric contamination. Science, 1939, 90, 326-327.

Poulet, P., Cahen, D., et Malkin, S. Photoacoustic detection of photosynthetic oxygen evolution from leaves. Quantitative analysis by phase and amplitude measurements. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 724, 433-446.

Porter, G., F.R.S., et Strauss, G. Studies of triplet chlorophyll by microbeam flash photolysis. Proc. R. Soc., Ser. A, 1966, 295, 1-12.

Preece, W.H. On the conversion of radiant energy into sonorous vibrations. Proc. R. Soc. London, 1881, 31, 506.

Radmer, R.J., et Kok, B. Encyclopedia of Plant Physiology, News Series (vol. 5). A. Trebst et M. Avron (Eds.). New York: Springer-verlag, 1977, 125-135.

Robin, M.B., et Kuebler, N.A. Radiationless decay in the aromatic ketones as studied by opto-acoustic spectroscopy. J. Am. Chem. Soc., 1975, 97, 4822-4824.

Roentgen, W.C. On tones produced by the intermittent irradiation of a gas. Philos. Mag., 1881, 11, 308-311.

Rosencwaig, A. Photoacoustic spectroscopy of solids. Opt. Commun., 1973, 7, 305-308.

Rosencwaig, A. Photoacoustic spectroscopy. A new tool for investigation of solids. Anal. Chem., 1975, 47, 592A-604A. (a)

Rosencwaig, A. Photoacoustic spectroscopy of solids. Phys. Today, 1975, 28, 23-29. (b)

Rosencwaig, A. Theoretical aspects of photoacoustic spectroscopy. J. Appl. Phys., 1978, 49, 2905-2910. (a)

Rosencwaig, A. Photoacoustic spectroscopy. Adv. Electron. Electron Phys., 1978, 46, 207-311. (b)

Rosencwaig, A., et Gersho, A. Theory of the photoacoustic effect with solids. J. Appl. Phys., 1976, 47, 64-69.

Rosencwaig, A., et Hall, S.S. Thin-layer chromatography and photoacoustic spectrometry. Anal. Chem., 1975, 47, 548-549.

Seely, G.R. Topics in photosynthesis. Primary Processes of Photosynthesis (vol. 2). J. Barber (Ed.). New York: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1977, 55-97.

Seely, G.R., et Jensen, R.G. Effect of solvent on the spectrum of chlorophyll. Spectrochim. Acta, 1965, 21, 1835-1845.

Sherman, G., et Linschitz, H. Chlorophyll-water interactions in the solid state. Nature, 1967, 215, 511.

Sherman, G., et Wang, S.F. Effect of water on the visible spectrum of chlorophyll a in the solid state. Nature, 1966, 212, 588-590.

Shipman, L.L., Cotton, T.M., Norris, J.R., et Katz, J.J. New proposal for structure of special-pair chlorophyll. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1976, 73, 1791-1794.

Skoog, D.A., et West, D.M. Principles of instrumental analysis (2nd ed.). Philadelphie: Holt, Rinehart et Winston, 1980, 151-157.

Sperling, W., et Ke, B. Chlorophyll monolayers and multilayers. Methods of preparation and spectroscopic characterization. Photochem. Photobiol., 1966, 5, 857-863. (a)

Sperling, W., et Ke, B. Chlorophyll monolayers and multilayers II. Evidence for the presence of ordered aggregates. Photochem. Photobiol., 1966, 5, 865-876. (b)

Strouse, C.E. The crystal and molecular structure of ethyl chlorophyllide a. $2\text{H}_2\text{O}$  and its relationship to the structure and aggregation of chlorophyll a. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1973, 71, 325-328.

Touloukian, Y.S., Powell, R.W., Ho. C.Y., et Niclolan, M.C. (eds.) Thermophysical properties of matter (vol. 10). New York:: IFI/Plenum, 1973, 622-648.

Trifunac, A.D., et Katz, J.J. Structure of chlorophyll a dimers in solution from proton magnetic resonance and visible absorption spectroscopy. J. Am. Chem. Soc., 1974, 96, 5233- 5240.

Trospert, T., et Sauer, K. Chlorophyll a interactions with chloroplast lipids in vitro. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 162, 97-105.

Trurnit, H.J., et Colmano, G., Chloroplast studies I. Absorption spectra of chlorophyll monolayers at liquid interfaces. Biochim. Biophys. Acta, 1959, 31 434-447.

Tyndall, J. Action of an intermittent beam of radiant heat upon gaseous matter. Proc. R. Soc. London, 1881, 31, 307.

Veeranjaneyulu, K., et Das, V.S.R. Photoacoustic spectroscopy - Leaf absorption spectra. J. Exp. Bot., 1982, 33, 515-519.

Viengerov, M.L. A method for gas analysis, based on the Tyndall- Roentgen optical-acoustical phenomenon. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 1938, 19, 687-688.

Velthuys, B.R. Mechanisms of electron flow in photosystem II and toward photosystem I. Ann. Rev. Plant Physiol., 1980, 31, 545-67.

Warshel, A. On the origin of the red shift of the absorption spectra of aggregated chlorophyll. J. Am. Chem. Soc., 1979, 101, 744-746.

Wetsel, G.C., Jr., et McDonald, F.A. Photoacoustic determination of absolute optical absorption coefficient. Appl. Phys. Lett., 1977, 30, 252-254.

Windrem, D.A., et Plach, W.A. The diffusion-solubility of oxygen in lipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 600, 655-665.

Yamagishi, A., et Katoh, S. Photoacoustic measurements of the energy-conversion efficiency of photosynthesis in thalli of the green alga Bryopsis Maxima. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 766, 215-221.

Yun, S.I., et Seo, H.J. Photoacoustic measurements of thermal diffusivity of thickness of multi-layer solids. J. phys., 1983, 44, C6-459-C6-462.