

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIERES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN PHYSIQUE**

**PAR
ABDERRAHIM TAZI**

**ÉTUDE, À L'AIDE DE DICHROISME LINÉAIRE ET DE
FLUORESCENCE POLARISÉE, DE L'ORGANISATION DES PIGMENTS
PHOTOSYNTHÉTIQUES DES THYLACOIDES D'ORGE ALIGNÉS
DANS DES FILMS D'ALCOOL DE POLYVINYL**

AVRIL 1991

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.

RÉSUMÉ

La conversion énergétique de la lumière dans l'appareil photosynthétique consiste en une transformation de l'énergie des photons en énergie chimique. Sous l'influence de l'énergie solaire, les plantes produisent à partir de gaz carbonique et de l'eau, les hydrates de carbone et de l'oxygène. La membrane photosynthétique est faite d'une mosaïque de complexes (protéine-chlorophylle). L'arrangement spécifique des molécules de pigments à l'intérieur de ce complexe, détermine la haute efficacité photosynthétique. Ainsi, la description de ces structures macromoléculaires est une étape importante vers la compréhension des réactions primaires de la photosynthèse.

Afin de décrire l'orientation relative des pigments dans leurs complexes protéiniques, nous avons incorporé des thylacoïdes d'orge dans des films d'alcool de polyvinyl. Cela nous a permis de former deux types de milieux: un milieu isotrope dans lequel les thylacoïdes se trouvent non orientés (film non étiré) et un milieu anisotrope dans lequel les thylacoïdes sont orientés (film étiré).

A l'aide de la spectroscopie de la lumière polarisée (fluorescence polarisée, dichroïsme linéaire relatif), nous avons étudié l'effet de l'étirement sur l'orientation des dipôles d'absorption et d'émission. Les spectres d'absorption polarisée et les mesures du dichroïsme linéaire relatif, nous ont révélé que les pigments photosynthétiques s'orientent parfaitement par rapport à la direction de l'étirement. Ces résultats nous ont montré aussi que, lors de l'étirement à 300%, certains chromophores subissent une réorientation qui pourrait être due à une déformation dans le système protéïnique membranaire.

Les spectres de fluorescence polarisée et de l'anisotropie de fluorescence des thylacoïdes, nous ont montré que l'intensité de fluorescence varie de façon marquée en fonction de l'étirement et de la polarisation de la lumière. Cette variation est d'autant plus appréciable que l'étirement devient important. L'augmentation du degré d'anisotropie en fonction de l'étirement est due à un changement dans l'orientation des moments de transition. Ce changement pourrait altérer significativement le taux du transfert d'énergie entre le photosystème II et le photosystème I. Ces résultats nous montrent que la méthode d'étirement des films d'alcool de polyvinyl adoptée durant ce travail, joue un rôle important dans l'orientation des molécules à l'intérieur de la membrane des thylacoïdes. Ainsi, ces études nous ont permis de préciser l'orientation des dipôles de transition d'absorption et d'émission dans la membrane, afin de mieux

comprendre l'efficacité du mécanisme de transfert de l'énergie électromagnétique dans la membrane thylacoïdale.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de projet, le professeur Mário J. Fragata pour toute l'attention et le support inestimable qu'il a su m'apporter tout au long de ce travail.

Je tiens aussi à remercier tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire et dont l'aide au laboratoire m'a été précieuse. Plus précisément Alain Tessier, André Paquette et Jean-Luc Brousseau.

Merci à mes parents pour l'aide et le support constant tout au long de mes études.

TABLE DES MATIERES

	PAGE
RÉSUMÉ	i
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIERES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
A. Processus photosynthétique.....	1
B. Structure du chloroplaste	2
C. Structure de la membrane du thylacoïde.....	5
C.1 L'organisation des pigments photosynthétiques dans la membrane des thylacoïdes.....	5
C.2 Le transfert et la migration d'énergie à travers la membrane photosynthétique	9
C.3 Le diagramme énergétique.....	12
D. L'organisation des pigments photosynthétiques	14
E. But du travail.....	18

CHAPITRE 2: THÉORIE.....	21
A. Dichroïsme linéaire.....	21
B. Fluorescence polarisée.....	29
C. Définition de l'anisotropie de fluorescence.....	31
CHAPITRE 3: MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	34
A. Matériel biologique.....	34
A.1 Culture des plantes d'orge	34
A.2 Extraction des thylacoïdes.....	35
B. Préparation des milieux isotrope et anisotrope.....	37
C. Méthodes de mesure des spectres d'absorption et de fluorescence polarisée corrigée.....	41
C.1 Absoprtion.....	41
C.2 Fluorescence polarisée corrigée.....	42
C.3 Anisotropie de fluorescence.....	45
CHAPITRE 4: RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	49
A. Orientation des dipôles d'absorption.....	49
A.1 Spectres d'absorption polarisée.....	49
A.2 Spectres d'absorption polarisée des films étirés.....	52
A.3 Effet de l'étirement sur l'orientation des dipôles d'absorption.....	55
B. Orientation des dipôles d'émission.....	60

B.1 Spectres de fluorescence polarisée corrigés: effet de la calibration du système de détection sur l'intensité de fluorescence.....	60
B.2 Spectres de fluorescence polarisée corrigés des films étirés et non-étirés.....	63
C. Effet de l'étirement sur l'anisotropie de fluorescence.....	70
D. Effet de l'étirement sur la distribution d'énergie entre PSII et PSI.....	74
 CONCLUSIONS	76
RÉFÉRENCES	78

LISTE DES TABLEAUX

	PAGE
1. Composition chimique des solutions utilisées pour l'isolation des fragments de thylacoïdes.....	36
2. Effet de l'étirement sur l'intensité d'absorption des dipôles de transition des thylacoïdes incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl	54
3. Effet de l'étirement sur l'orientation des dipôles d'absorption des thylacoïdes incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl.....	56
4. Intensité de fluorescence polarisée corrigée des thylacoïdes dans des films d'alcool de polyvinyl étirés et non étirés, correspondant à la bande d'émission F683 et F735	68
5. Effet de l'étirement sur l'anisotropie de fluorescence correspondant à 683 et 735 nm.....	74

LISTE DES FIGURES

	PAGE
1. Schéma représentant les réactions des deux phases de la photosynthèse.....	3
2. Schéma représentant la membrane du chloroplaste.....	4
3. Structure de la molécule de chlorophylle-a (Tiré de Salisbury et Ross, 1978)	7
4. Spectre d'absorption des chlorophylles-a et b et des caroténoïdes (Tiré de Lenhiger, 1975)	8
5. Représentation schématique de la membrane photosynthétique (Tiré de Golbeck, 1987).....	10
6. Schéma en Z indiquant le potentiel rédox des réactions photosynthétiques pour les différents transporteurs d'électrons dans les thylacoïdes (Tiré de Nobel, 1983).....	11

7. Représentation schématique des énergies potentielles d'une molécule (Tiré de Govindjee, 1974)	13
8. Diagramme des énergies de transition associées à l'absorption de la lumière et à la fluorescence de la chlorophylle (Tiré de Govindjee, 1975)	17
9. Interaction de la lumière polarisée avec le moment de transition.....	24
10. La variation du paramètre d'ordre (S) en fonction de l'angle (α) de l'orientation (Tiré de Breton et Vermeglio, 1982).....	28
11. Distribution aléatoire de l'orientation des moments de transition.....	32
12. Schéma de la procédure d'isolation des thylacoïdes	38
13. Schéma de l'appareil servant à étirer les films d'alcool de polyvinyl.....	40
14. Schéma simplifié du spectrofluorimètre	43

15. Représentation schématique de la mesure de fluorescence polarisée. H et V représentent la polarisation horizontale et verticale.....	44
16. Courbe de correction obtenue avec lumière polarisée verticalement ou horizontalement à l'émission.....	46
17. Spectres d'absorption des thylacoïdes d'orge incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl non étirés, pris en lumière naturelle (n), polarisée parallèlement (II) ou perpendiculairement (⊥) à l'échantillon.....	50
18. Spectres d'absorption des thylacoïdes d'orge dans des films d'alcool de polyvinyl étirés à 100% (a) 200% (b) et 300% (c), pris en lumière polarisée parallèlement (II) ou perpendiculairement (⊥) à la direction de l'étirement.....	53
19. Spectres de fluorescence polarisée des thylacoïdes d'orge dans des films d'alcool de polyvinyl non étirés ($\lambda_{exc}=420$ nm), normalisés à 683 nm. H et V signifient respectivement la polarisation horizontale et verticale aux faisceaux d'excitation et d'émission	62
VVNC, VHNC, HHNC, HVNC : Spectres non corrigés	
VV, VH, HH, HV : Spectres corrigés	

20. Spectres de fluorescence polarisée corrigés des thylacoïdes d'orge dans des films isotropes (a) et anisotropes étirés à 100% (b), 200% (c) et 300% (d) pris en lumière polarisée verticalement à l'excitation et à l'émission (VV) et verticalement à l'excitation et horizontalement à l'émission (VH)	64
21. Spectres de fluorescence polarisée corrigés des thylacoïdes d'orge dans des films isotropes (a) et anisotropes étirés à 100% (b), 200% (c) et 300% (d) pris en lumière polarisée horizontalement à l'émission et à l'excitation (HH) et horizontalement à l'excitation et verticalement à l'émission (HV).....	66
22. Spectres de fluorescence polarisée des thylacoïdes de poids incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl non étirés (0%) et étirés (300%) (Tiré de Frackowiak, 1985)	70
23. Anisotropie de fluorescence des films non étirés (0%) et des films étirés à 100, 200 et 300%.....	72
24. Effet de l'étirement du film de PVA sur la distribution d'énergie entre PSII et PSI.....	76

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

A. Processus photosynthétique

La photosynthèse est le mécanisme par lequel les plantes vertes et les algues convertissent l'énergie lumineuse solaire en énergie chimique utilisable par les êtres vivants.

Sous l'effet de l'énergie solaire, les plantes vertes produisent, à partir de gaz carbonique et d'eau, les hydrates de carbone et de l'oxygène par le mécanisme de la photosynthèse. L'ensemble du processus de la photosynthèse peut être séparé en deux phases. La première phase (phase lumineuse) correspond à la capture de l'énergie lumineuse par des pigments absorbant la lumière et sa conversion en énergie chimique sous forme d'ATP et de NADPH. Dans la seconde phase de la photosynthèse (phase obscure), les produits riches en énergie de la première phase, NADPH et ATP, sont utilisés comme sources d'énergie pour effectuer la réduction du gaz carbonique en

glucose; simultanément le NADPH est oxydé en NADP⁺ et l'ATP est transformé en ADP et en phosphate. Le schéma réactionnel de l'ensemble des réactions des deux phases de la photosynthèse est représenté dans la figure 1.

B. Structure du chloroplaste

L'appareil photosynthétique des plantes vertes et des algues se localise dans un organe de la cellule appelé chloroplaste. Ce dernier est le siège de la photosynthèse. Le chloroplaste possède habituellement une forme globulaire ou discoïde. Sa taille varie dans un intervalle de un à dix micromètres de diamètre. Sa structure, telle que présentée dans la figure 2, se compose d'une membrane externe, d'une membrane interne et du stroma. La membrane interne est constituée d'une bicouche lipidique et de protéines transmembranaires. Dans le compartiment du stroma, on trouve le système membranaire tridimensionnel, appelé thylacoïdes. Ces derniers sont empilés transversalement dans le chloroplaste. Ces empilements sont appelés grana. Il existe de nombreux grana par chloroplaste, chaque grana est relié à un autre grana par une lamelle intergranaire. Les grana contiennent tous les pigments et enzymes nécessaires aux réactions primaires de la photosynthèse.

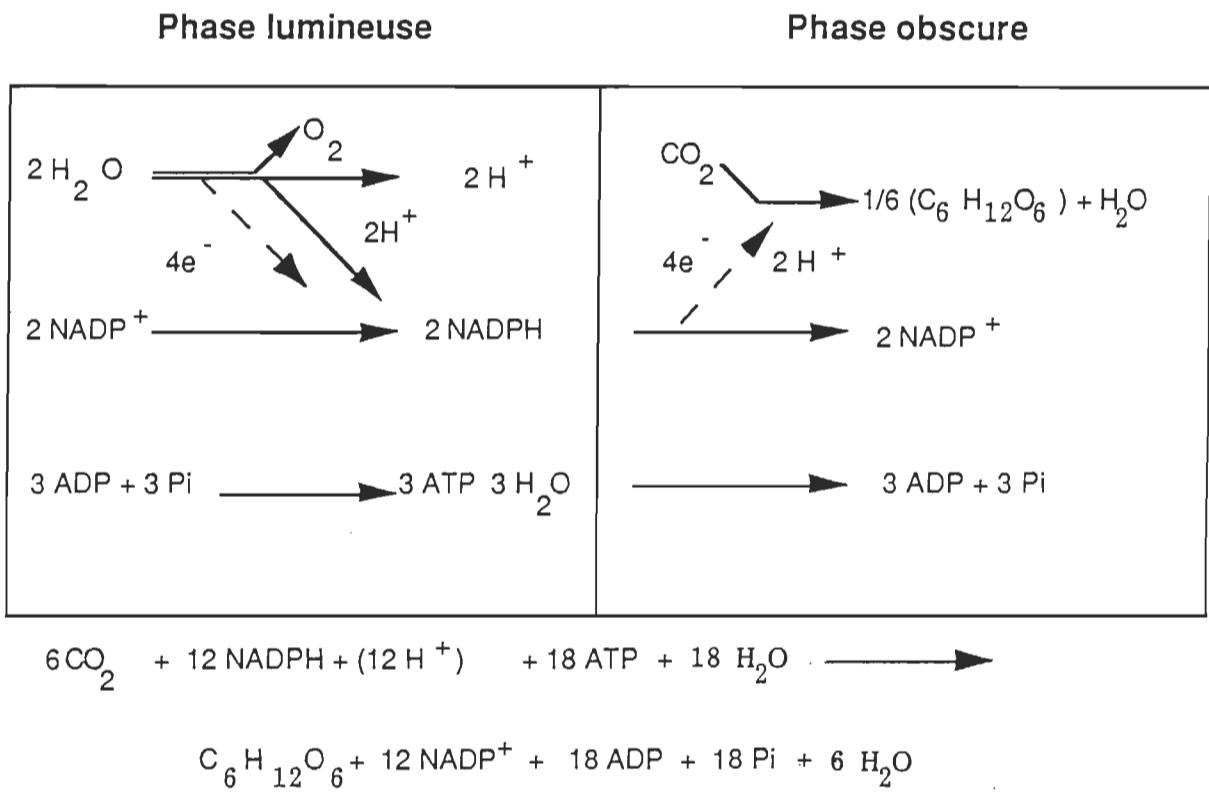


Figure 1. Schéma représentant les réactions des deux phases de la photosynthèse.

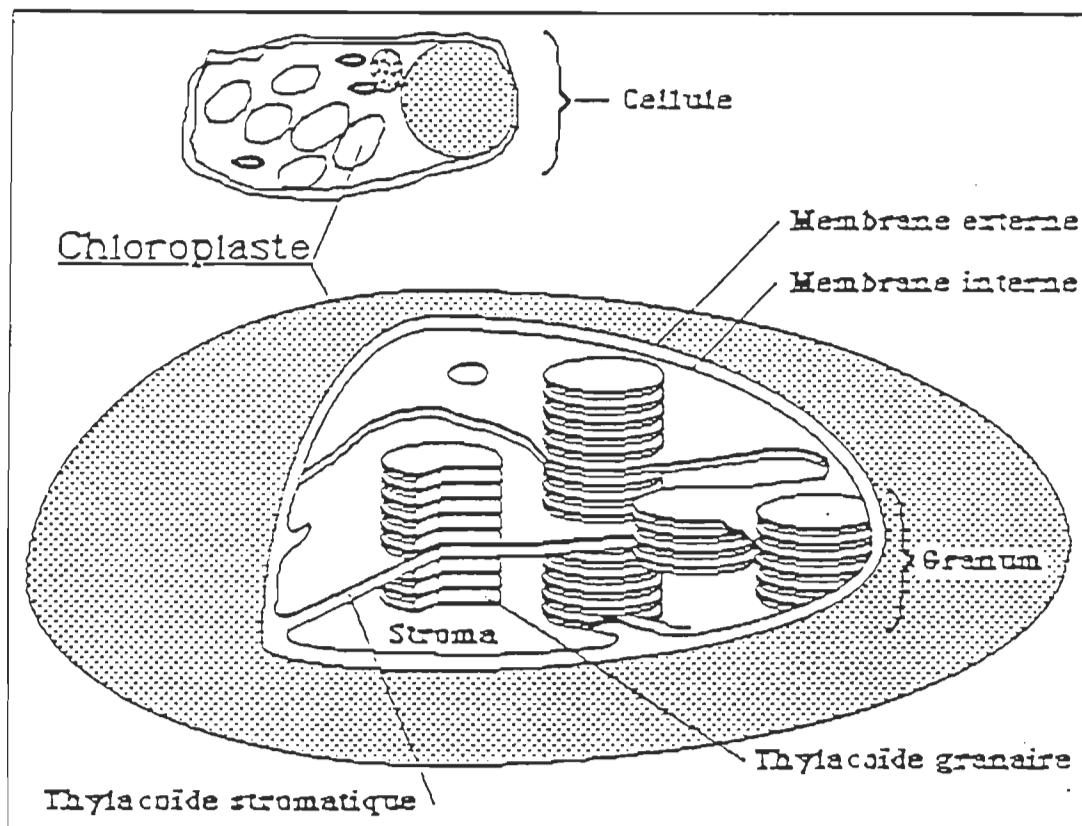


Figure 2. Schéma représentant la membrane du chloroplaste (Tiré de Robert, 1987).

C. Structure de la membrane du thylacoïde

Les thylacoïdes présentent une structure bien ordonnée à l'intérieur du système membranaire. Ils contiennent des lipides, des protéines et des pigments. Chaque thylacoïde contient à peu près 100 000 molécules de pigments photosynthétiques (Witt, 1975) dont la chlorophylle-a (chl-a), la chlorophylle-b (chl-b) et les caroténoïdes. L'ensemble des pigments est organisé en deux types de complexes thylacoïdaux, le photosystème I (PS I) et le photosystème II (PS II).

C.1 L'organisation des pigments photosynthétiques dans la membrane des thylacoïdes

Les cellules photosynthétiques produisant de l'oxygène (les plantes supérieures et les algues vertes) contiennent deux sortes de chlorophylles: la chl-a et la chl-b. Ces molécules sont solubles dans les solvants organiques et représentent 20 à 22% du poids des lipides dans les thylacoïdes (Hoober, 1984).

La chlorophylle-a est formée d'une porphyrine et d'une chaîne phytol. La porphyrine contient des noyaux appelés pyrrols. Ces noyaux sont disposés en une structure macrocyclique dans laquelle les quatre atomes d'azote centraux sont coordonnés au magnésium (Mg) pour

former une structure extrêmement stable, située dans un seul plan. Le phytol est une longue chaîne latérale hydrophobe terpénoïde formée d'un alcool (figure 3).

Les plantes vertes et les algues contiennent non seulement de la chlorophylle mais aussi des caroténoïdes, parmi lesquels le β -carotène est le plus commun. Ce sont des hydrocarbures qui représentent près de 3% du poids de l'ensemble des lipides. En plus de la chlorophylle et des caroténoïdes, on trouve d'autres pigments accessoires connus sous le nom de phycobilines et qui sont présents surtout chez les algues bleu-vertes et rouges. Les chlorophylles, les caroténoïdes, et les pigments accessoires absorbent efficacement la lumière visible. Ils ont des maxima d'absorption à des longueurs d'ondes différentes, qui s'échellonnent de 400 à 750 nm. Le spectre d'absorption des pigments photosynthétiques (figure 4), nous montre que les chlorophylles ont deux bandes d'absorption situées dans le bleu et le rouge. La majeure proportion des formes de la chl-a absorbant aux plus courtes longueurs d'ondes sont fluorescentes et se situent dans le PSII. Les autres formes de chl-a qui absorbent aux plus grandes longueurs d'ondes sont faiblement fluorescentes et se situent dans le PSI.

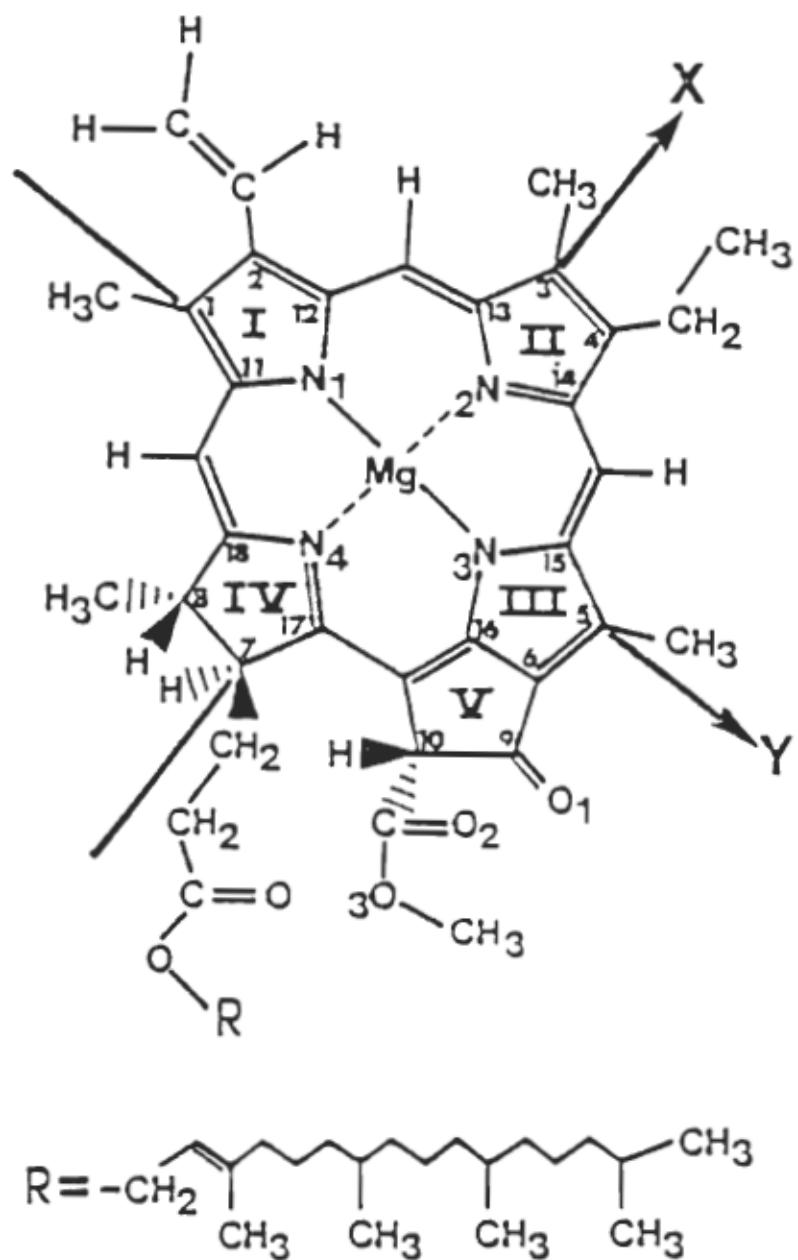


Figure 3. Structure de la molécule de chlorophylle-a (Tiré de Fragata et al., 1988).

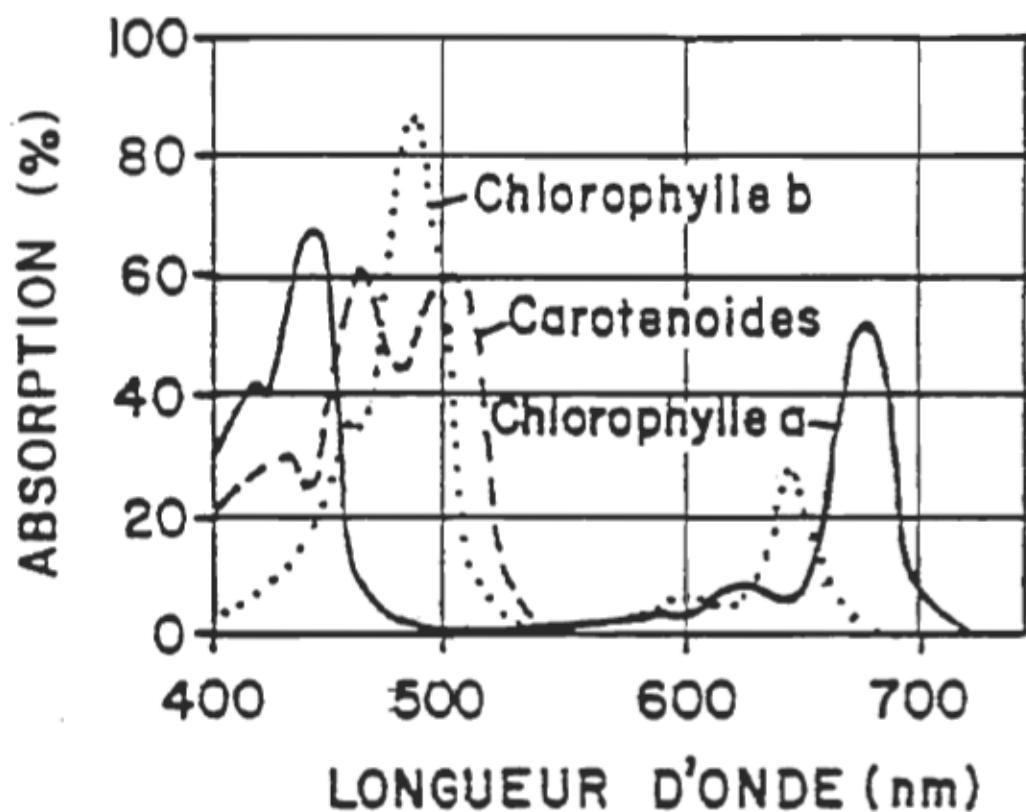


Figure 4. Spectre d'absorption des chlorophylles-a et b et des caroténoïdes (Tiré de Lenhiger, 1975).

C.2 Le transfert et la migration d'énergie à travers la membrane photosynthétique

Le rôle principal des pigments photosynthétiques est d'absorber l'énergie électromagnétique et de l'acheminer vers les centres réactionnels des photosystèmes. A chaque photosystème est associé un accepteur et un donneur d'électrons ayant des potentiels rédox différents. Le transport d'électrons dans le photosystème II (figure 5) est formé d'une "paire spéciale" de pigment chlorophyllien (donneur primaire d'électrons), d'un composé Z (donneur secondaire d'électrons) qui réduit la chlorophylle de la "paire spéciale", d'une phéophytine (accepteur primaire) qui accepte l'électron provenant de la chlorophylle, de la quinone Q_A qui accepte l'électron de la phéophytine, et de la quinone Q_B qui accepte l'électron de Q_A (Murata et Miyao, 1989). Grâce à leurs connexions aux chaînes caractéristiques de transport d'électrons (le cytochrome b, le cytochrome f et la plastocyanine), le transfert d'électrons s'ensuit vers le P700 (PS I) et on aboutit finalement à la synthèse de NADPH₂. Cela donne à ces pigments la capacité de convertir l'énergie lumineuse captée par les antennes collectrices en énergie chimique nécessaire à la réduction du gaz carbonique. Les processus chimiques dans lesquels les électrons sont transformés d'une molécule à l'autre, entre les deux photosystèmes, sont appelés réactions d'oxydoréduction. L'ensemble de ces réactions est représenté dans le schéma en Z de la figure 6.

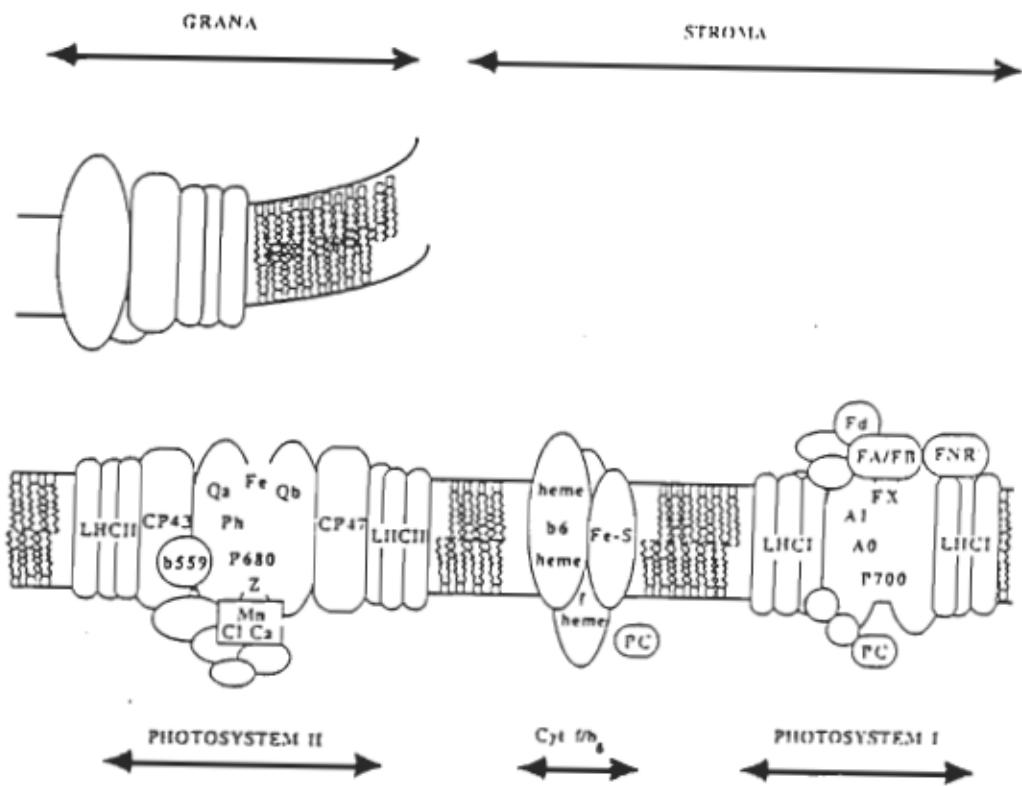


Figure 5. Représentation schématique de la membrane photosynthétique. (Tiré de Golbeck, 1987)

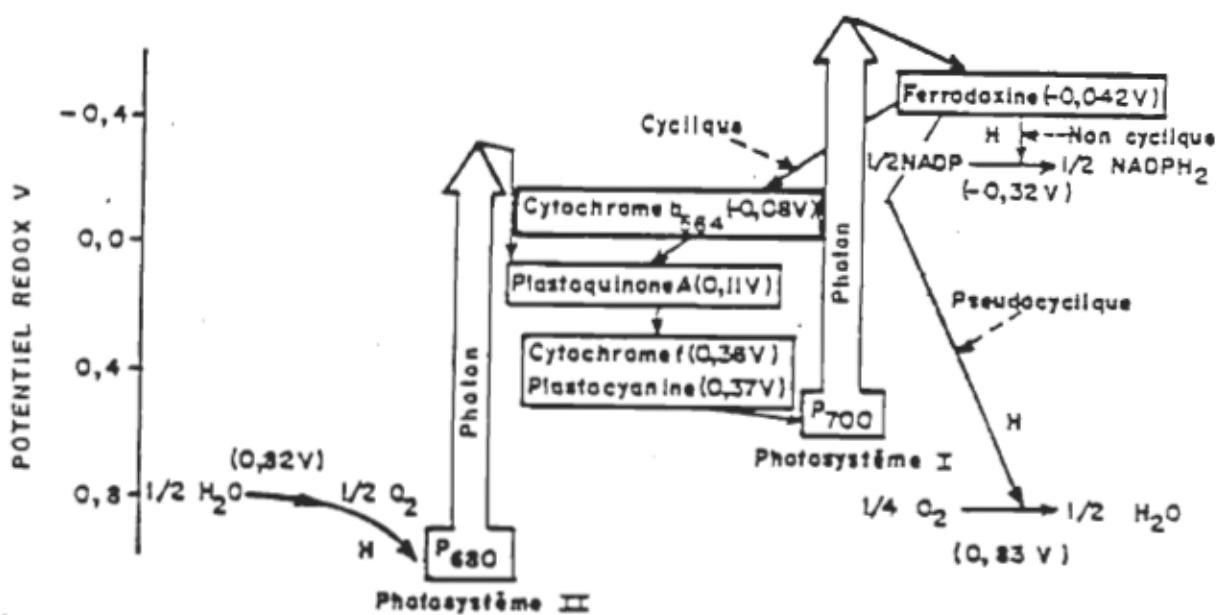


Figure 6. Schéma en Z indiquant le potentiel rédox des réactions photosynthétiques pour les différents transporteurs d'électrons dans les thylacoïdes (Tiré de Nobel, 1983).

C.3 Le diagramme énergétique

L'absorption d'un quantum de lumière par les pigments photosynthétiques se traduit par une transition électronique partant du niveau fondamental à un niveau excité. Les différents états énergétiques d'une molécule sont représentés par le diagramme de la figure 7. L'état fondamental se caractérise par une distribution particulière, la plus stable pour la molécule, associée aux configurations électronique et nucléaire de l'état fondamental. Il existe plusieurs niveaux vibrationnels, chacun étant caractérisé par une fréquence d'oscillation particulière, et chacun étant légèrement différent en énergie.

A la température de la pièce, la très grande majorité des molécules est dans le plus bas niveau vibrationnel de l'état électronique fondamental. L'état fondamental de la chlorophylle est généralement l'état singulet. L'absorption d'un photon d'énergie appropriée par une molécule de pigment, élève la molécule à un état excité. Ceci se fait en quelques 10^{-15} s (Pearlstein, 1982).

De façon générale, les molécules de chlorophylles excitées après l'absorption de l'énergie lumineuse peuvent retourner à l'état fondamental soit:

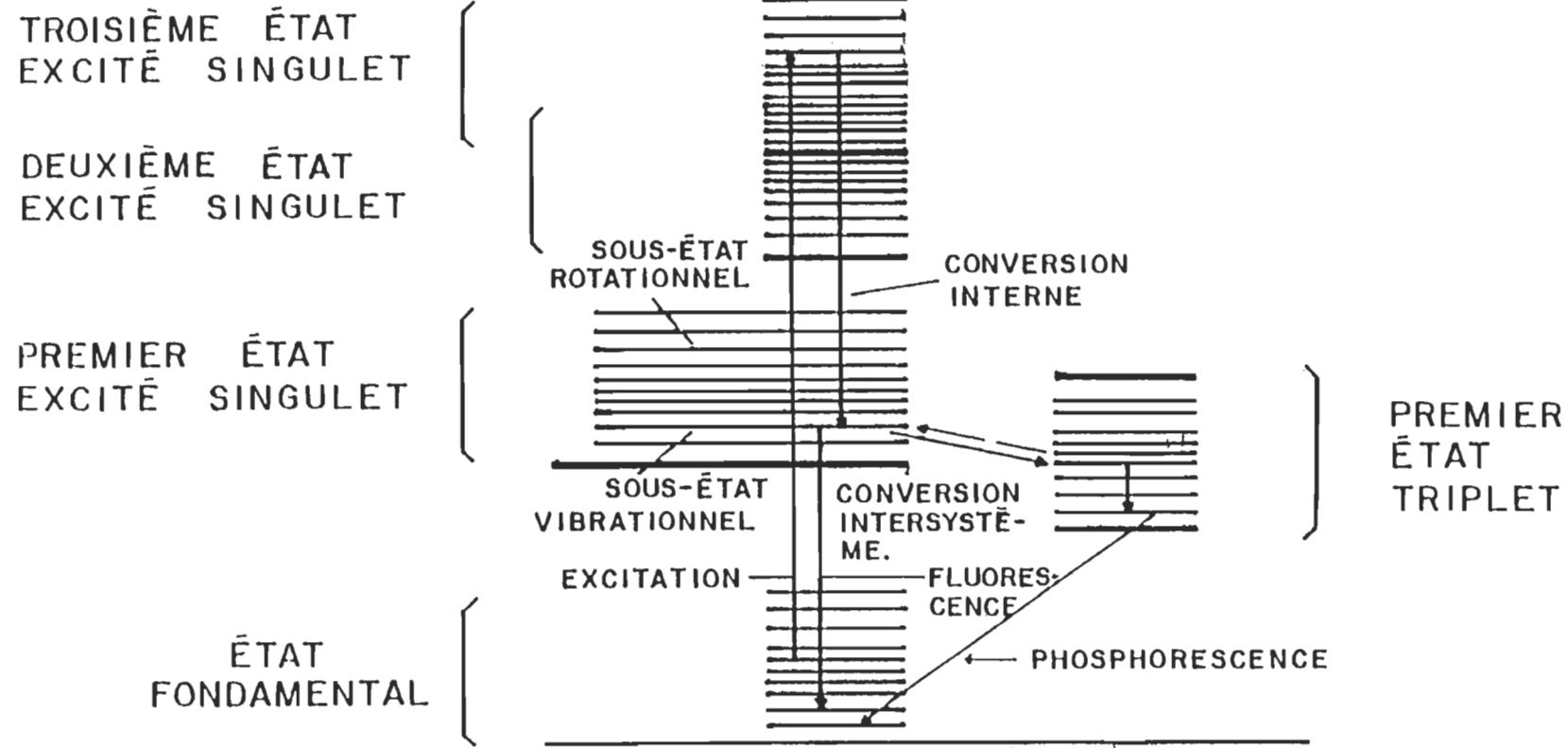


Figure 7. Représentation schématique des énergies potentielles d'une molécule (Tiré de Govindjee, 1974).

- 1) par dissipation radiative: émission de fluorescence
(Lavorel et al., 1986)
- 2) par dissipation non radiative: conversion interne
(Popovic et al., 1987b)
- 3) par transfert d'énergie aux molécules environnantes, pour se dissiper en phosphorescence ou en conversion interne
(Krause et Weis 1984)

L'énergie du pigment excité est généralement transférée par migration excitonique ou par transfert d'énergie de résonnance (type Förster) à travers le système de chlorophylle antenne vers les centres réactionnels des photosystèmes (PSI et PSII). Le taux du transfert d'énergie dépend plus étroitement de la distance entre les molécules et de l'orientation relative des dipôles de transition du donneur et de l'accepteur (Förster 1965, Frank et Teller 1938).

D. L'orientation des pigments photosynthétiques

La structure des membranes du thylacoïde pose une difficulté dans la compréhension du fonctionnement coordonné des deux photosystèmes.

Nous savons que les différents pigments photosynthétiques sont organisés en deux ensembles fonctionnels (PSI et PSII) et que ces

deux photosystèmes diffèrent l'un de l'autre par la composition peptidique (voir figure 5); cependant nous ne connaissons pas l'emplacement exact des chromophores (chlorophylles, phéophytine, caroténoïdes, etc.) dans les complexes protéiniques ainsi que l'état sous lequel ont les retrouve. La conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique dépend étroitement de l'organisation moléculaire des membranes photosynthétiques et plus particulièrement de l'architecture des complexes pigments-protéines (Thornber *et al.*, 1987).

La microscopie électronique nous montre que les chloroplastes ont généralement une forme ellipsoïdale dans laquelle les pigments exhibent une orientation identique à celle qu'ils ont dans la membrane du thylacoïde (Diner et Wollman, 1980) et qu'ils possèdent un axe majeur parallèle au plan des lamelles de chloroplastes. En orientant ces axes dans les directions parallèles, il est possible de détecter l'orientation des pigments.

Il existe plusieurs méthodes pour orienter les systèmes biologiques. L'orientation peut s'effectuer par:

- 1) Anisotropie de forme (Morita et Miyazaki, 1971; Rafferty et Clayton, 1978).
- 2) Champ magnétique (Breton, 1974).

- 3) Champ électrique (Gagliano et al., 1979).
- 4) Photosélection (Albrecht, 1961; Paillaton et al., 1979).

La méthode utilisée dans notre travail est celle de l'anisotropie de forme. Nous incorporons d'abord les thylacoïdes dans des films de polyvinyl alcool. Après séchage du film, nous obtenons un film sec isotrope. En étirant ces films nous formons un milieu anisotrope dans lequel les pigments se trouvent orientés. A l'aide des méthodes dichroïques nous pouvons déterminer la position des moments de transition des molécules rattachées aux protéines intrinsèques (Thornber et al., 1979). Cela nous permet d'obtenir des renseignements sur l'orientation des molécules dans la membrane photosynthétique des thylacoïdes.

L'absorption d'un quantum d'énergie $h\nu$, par une molécule de chl-a, amène la molécule de l'état fondamental au premier état excité ($E_0 \rightarrow E_1$). Cette transition est de type Q (Q_x et Q_y) et se situe le long des axes X et Y de la chlorophylle-a. Par contre, le passage de la molécule de chl-a de l'état fondamental E_0 au deuxième état excité E_2 correspond à une transition de type B (B_x et B_y) située dans la région de la bande de solet de la chl-a. Selon les caractéristiques de la molécule excitée et de son environnement (solvant, température...) les moments de transition peuvent avoir des valeurs différentes. Ces états correspondent aux bandes d'absorption de la chl-a (figure 8).

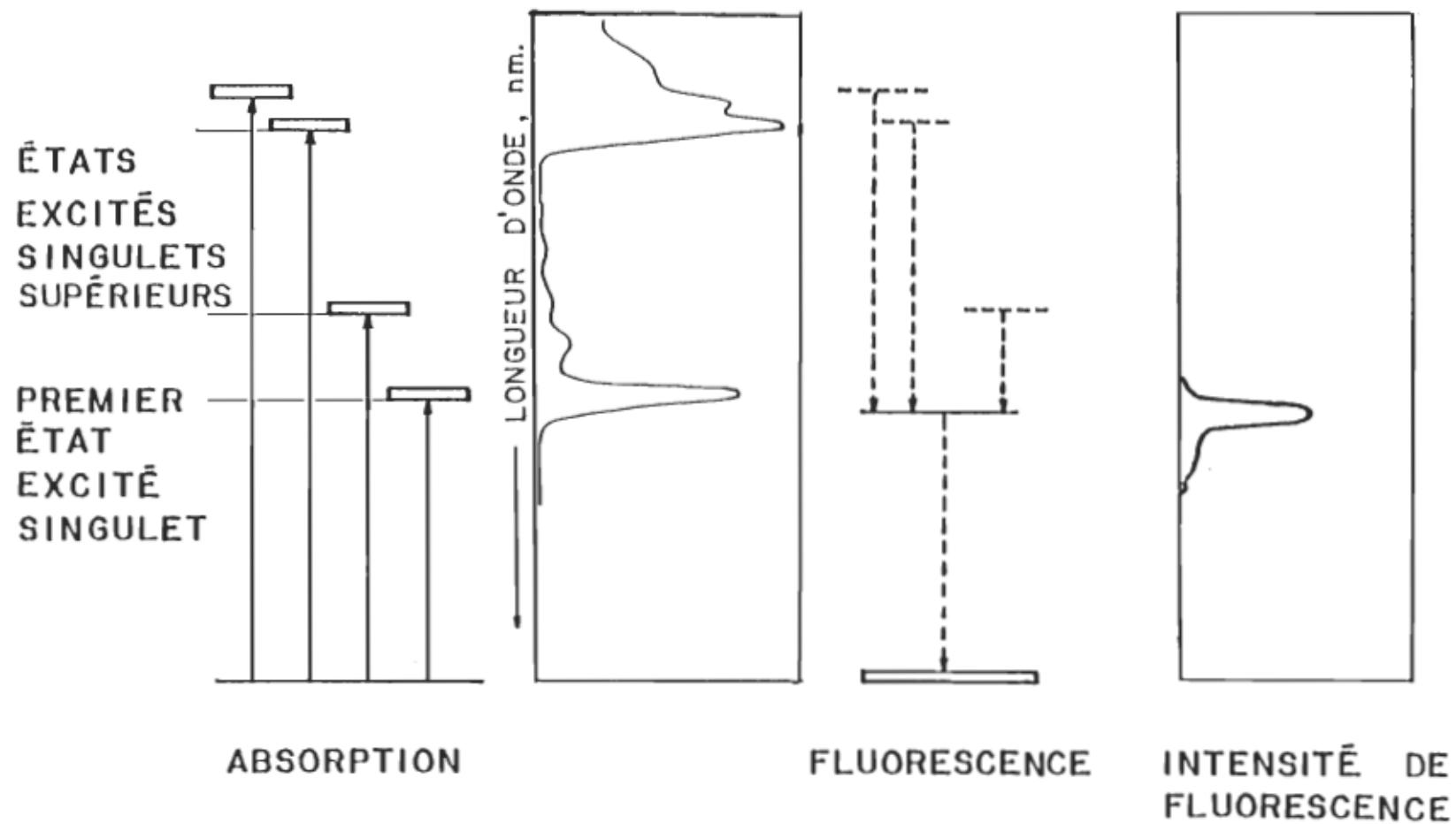


Figure 8. Diagramme des énergies de transition associées à l'absorption de la lumière et à la fluorescence de la chlorophylle (Tiré de Govindjee, 1975).

E But du travail

La membrane photosynthétique des plantes vertes et des algues, est faite d'une mosaïque de complexes protéine-chlorophylle. L'arrangement spécifique des molécules de pigment à l'intérieur du complexe détermine la haute efficacité photosynthétique. Ainsi la description de ces structures macromoléculaires est une étape importante vers la compréhension des réactions primaires de la photosynthèse.

Le présent travail est axé sur l'étude à l'aide de la spectroscopie de la lumière polarisée (dichroïsme linéaire, fluorescence polarisée corrigée) de l'organisation des pigments photosynthétiques dans les complexes pigments-protéines des membranes thylacoïdales des chloroplastes. Cela nous permettra de décrire l'orientation relative des pigments dans leurs complexes protéiniques, afin de mieux comprendre le transfert d'énergie électromagnétique parmi les chromophores des membranes photosynthétiques.

La réalisation de notre projet est basée sur l'incorporation des thylacoïdes d'orges dans des films d'alcool de polyvinyl (PVA). Notre but est de former deux types de milieux, un milieu isotrope dans lequel les thylacoïdes se trouvent non orientés (film non étiré) et un

milieu anisotrope dans lequel les thylacoïdes sont orientés (film orienté).

En irradiant ces complexes thylacoïdaux, alignés dans des matrices adéquates (film d'alcool de polyvinyl), avec de la lumière polarisée, nous pourrons déterminer l'orientation des pigments photosynthétiques en appliquant les méthodes dichroïques de la spectroscopie d'absorption et d'émission.

Dans ce travail, nous décrivons la technique de la méthode utilisée pour mesurer le dichroïsme linéaire et l'anisotropie de fluorescence des thylacoïdes orientés.

Nous rapportons des spectres d'absorption (750 - 350 mm) et de fluorescence polarisée (800 - 600 mm) de thylacoïdes d'orges orientés dans des matrices adéquates.

Nous interpréterons ces spectres en terme d'orientation des pigments photosynthétiques par rapport à la direction de la lumière polarisée.

Ces études nous permettront, d'une part, de préciser l'orientation des dipôles de transition d'absorption et d'émission dans la membrane.

D'autre part, de mieux comprendre l'efficacité du mécanisme de transfert de l'énergie électromagnétique dans la membrane thylacoïdale.

CHAPITRE 2

THÉORIE

A. Dichroïsme linéaire

La lumière est une onde électromagnétique, elle se compose d'un vecteur électrique \vec{E} et d'un vecteur magnétique \vec{H} . Ces deux vecteurs sont mutuellement perpendiculaires à la direction de propagation de la lumière et peuvent vibrer dans toutes les directions

Avec la lumière polarisée, on aborde les propriétés de la lumière et de la matière. En principe, pour comprendre à fond la polarisation, il faut se référer à la théorie électromagnétique. En effet la lumière sera polarisée si elle possède une direction préférentielle de vibration, c'est-à-dire, la lumière vibrera dans une direction particulière plutôt que dans toutes les directions.

L'absorption de la lumière polarisée par une molécule dépend en grande partie de l'orientation de celle-ci par rapport au plan de polarisation. L'intensité d'absorption est proportionnelle au carré du produit scalaire entre le vecteur électrique de la lumière polarisée et le vecteur du moment de transition de la molécule caractéristique (Schellman, 1975),

$$A = \epsilon \cdot C \cdot L \sim |E \cdot M|^2 \quad (1)$$

- A: L'absorbance
- ϵ : Coefficient d'absorption molaire
- C: Concentration de l'échantillon
- L : Trajet optique
- E: Vecteur électrique
- M: Moment de transition

Ainsi nous obtenons pour les composantes polarisées,

$$A_{||} \sim |E_{||} M_{||}|^2 \text{ et } A_{\perp} \sim |E_{\perp} M_{\perp}|^2 \quad (2)$$

$E_{||}$ et E_{\perp} représentent respectivement le vecteur électrique de la lumière polarisée parallèlement et perpendiculairement à la direction de l'étirement du film de PVA. Il est à signaler, que $M_{||}$ et M_{\perp} sont les moments de transition du chromophore des complexes

pigments-protéines. L'orientation de ces complexes par rapport à $E_{||}$ et E_{\perp} est obtenue lors de l'étirement du film de PVA.

Dans le cas où la lumière est polarisée parallèlement aux moments de transition des molécules, l'absorption est maximale. Par contre lorsque la lumière est polarisée perpendiculairement à la direction des moments de transition, l'absorption est nulle.

L'interaction de la lumière polarisée avec le moment de transition d'une molécule orientée de façon aléatoire est illustrée dans la figure 9. L'absorption de la lumière incidente, propagée le long de l'axe YY', polarisée linéairement avec le vecteur électrique parallèle à l'axe ZZ', est définie comme $A_{||}$ et celle polarisée linéairement avec le vecteur électrique parallèle à l'axe XX', est A_{\perp} . L'échantillon anisotrope (molécules orientées) peut cependant être caractérisé par $\varepsilon_x, \varepsilon_y, \varepsilon_z$. Ces derniers s'appellent les coefficients d'absorption molaire selon les axes X, Y et Z de la molécule. Dans ce cas l'absorption est définie comme:

$$\begin{aligned} A &= \frac{1}{3} (A_x + A_y + A_z) \\ &= \frac{1}{3} (2 A_{\perp} + A_{||}) \\ &= \varepsilon \cdot C \cdot L \end{aligned} \quad (3)$$

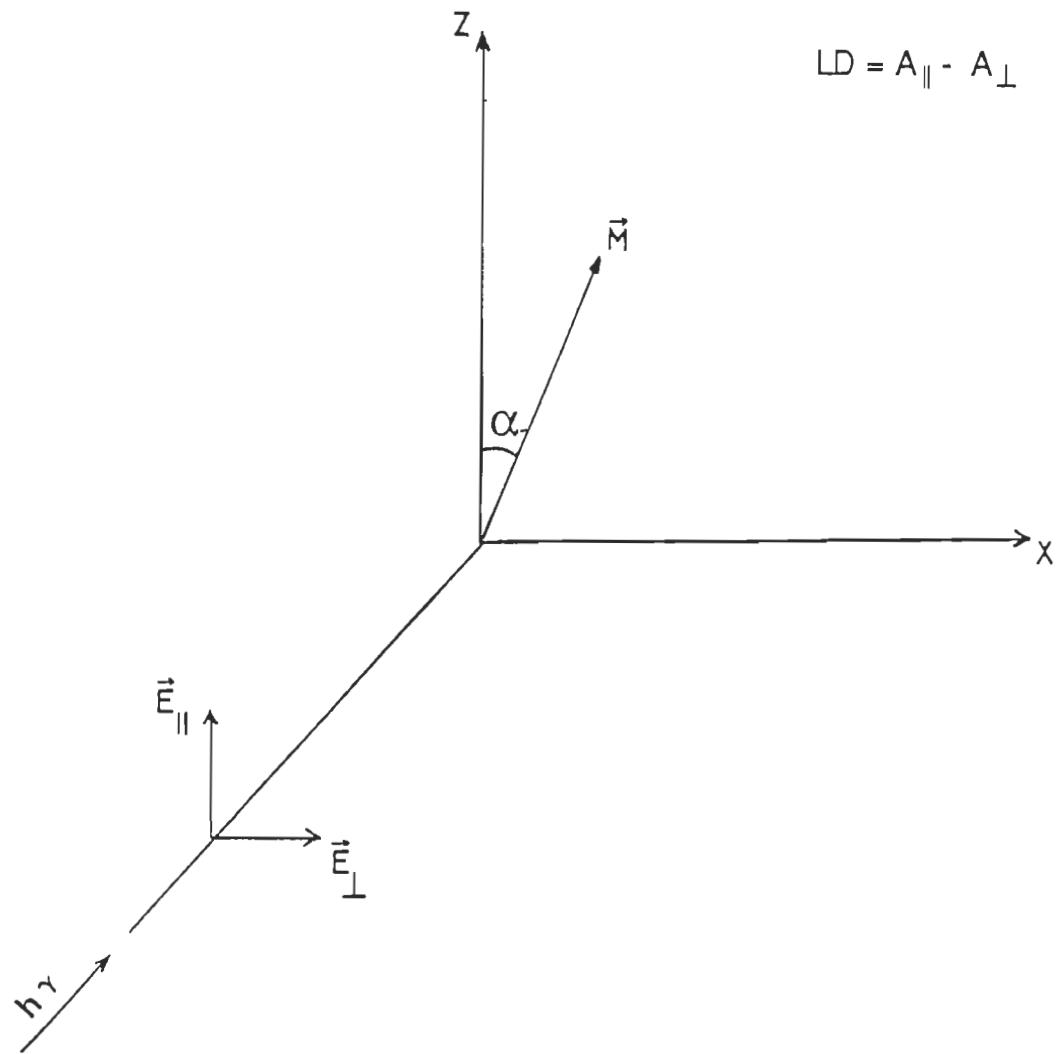


Figure 9. Interaction de la lumière polarisée avec le moment de transition.

avec,

$$\varepsilon = \sum_i \varepsilon_i (\cos^2 \alpha_i + \sin^2 \alpha_i), \quad i=x,y,z \quad (3a)$$

et

$$\varepsilon = 2\varepsilon_{\perp} + \varepsilon_{\parallel} \quad (3b)$$

Sachant que α_x , α_y et α_z sont respectivement les angles que fait le moment de transition M avec les axes X, Y et Z, alors les composantes polarisées peuvent s'écrire sous la forme suivante:

$$\varepsilon_{\parallel} = \varepsilon_x \cos^2 \alpha_x + \varepsilon_y \cos^2 \alpha_y + \varepsilon_z \cos^2 \alpha_z \quad (4)$$

$$\varepsilon_{\perp} = \frac{1}{2} (\varepsilon_x \sin^2 \alpha_x + \varepsilon_y \sin^2 \alpha_y + \varepsilon_z \sin^2 \alpha_z) \quad (5)$$

Le dichroïsme linéaire est le phénomène de l'anisotropie d'absorption de la lumière par des matériaux contenant des molécules orientées pour lesquels l'absorption varie selon la direction de la lumière et le degré de l'orientation.

On définit le dichroïsme linéaire (LD) comme une absorption différentielle:

$$LD = A_{\parallel} - A_{\perp} = (\varepsilon_{\parallel} - \varepsilon_{\perp}) \cdot C \cdot L \quad (6)$$

En remplaçant les expressions des composantes parallèle ($\epsilon_{||}$) et perpendiculaire (ϵ_{\perp}) données par les équations (4) et (5) dans l'équation (6), on obtient:

$$LD = CL (\epsilon_x S_x + \epsilon_y S_y + \epsilon_z S_z) \quad (7)$$

avec,

$$S_x = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \alpha_x - 1)$$

$$S_y = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \alpha_y - 1)$$

$$S_z = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \alpha_z - 1)$$

S_x , S_y et S_z sont les paramètres d'ordre des moments de transition de la molécule.

A partir du dichroïsme linéaire, nous pouvons définir le dichroïsme linéaire relatif (Norden, 1978) ou réduit comme suit:

$$LD' = \frac{LD}{A} = \frac{\epsilon_x S_x + \epsilon_y S_y + \epsilon_z S_z}{(1/3)(\epsilon_x + \epsilon_y + \epsilon_z)} \quad (8)$$

Dans le cas d'une molécule presque planaire ($\epsilon_z = 0$), comme la chlorophylle, les moments de transition sont orientés selon les axes X et Y (voir figure 3). Donc, l'équation 8 se réduit à la forme suivante:

$$\text{LD}^r = \frac{\text{LD}}{A} = \frac{\epsilon_x S_x + \epsilon_y S_y}{(1/3)(\epsilon_x + \epsilon_y)} \quad (9)$$

Durant notre travail, nous nous servons d'un spectrophotomètre et d'un polariseur pour mesurer les composantes d'absorption parallèle ($A_{||}$) et perpendiculaire (A_{\perp}). Cela nous permet de déterminer l'angle (α) que fait le moment de transition M avec la direction de l'orientation.

La figure 10 nous donne la variation du paramètre d'ordre en fonction de l'angle (α) de l'orientation. Cette variation signifie que la détermination du moment de transition dépend en grande partie de l'orientation de la molécule et de sa structure dans son environnement.

Durant les 20 dernières années, le dichroïsme linéaire a attiré un intérêt considérable. L'avantage de cette technique de mesure se situe au niveau de la grande information qu'elle peut nous fournir sur l'orientation des molécules quand les moments de transition sont connus (applications structurelles), ainsi que sur la direction des

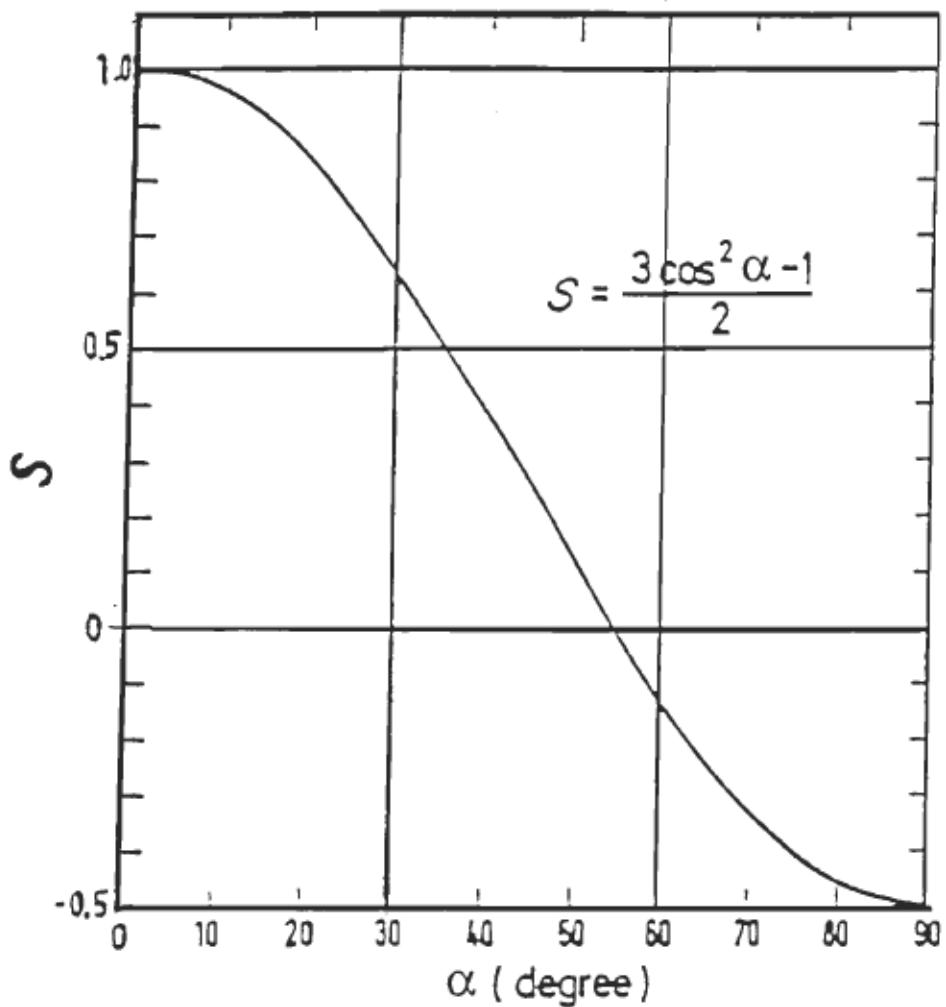


Figure 10: La variation du paramètre d'ordre (S) en fonction de l'angle (α) de l'orientation (Tiré de Breton et Vermeglio, 1982).

moments de transition quand l'orientation des molécules est connue (applications spectroscopiques).

Il existe un grand nombre de méthodes pour les mesures de dichroïsme linéaire, parmi lesquels on trouve:

- 1) La dispersion de la rotation optique (ORD) (Breton *et al.*, 1973)
- 2) Méthodes directes de mesure de dichroïsme linéaire: système de modulation
- 3) La spectroscopie d'absorption conventionnelle

La façon la plus simple pour mesurer le dichroïsme linéaire consiste à se servir d'un spectrophotomètre et d'un polariseur. Cette méthode nous permet d'obtenir une mesure spectrale séparée pour les composantes $A_{||}$ et A_{\perp} . Elle est excellente car elle fournit un simple outil pour l'étude de l'orientation des systèmes biologiques, mais elle devient imprécise pour des petits signaux dichroïques typiques pour des molécules orientées dans un champs électrique. Dans le passé, il a été difficile d'étudier le dichroïsme de tels systèmes, le progrès est maintenant possible à cause des développements instrumentaux permettant une mesure différentielle directe du signal (LD) avec une grande précision.

B. Fluorescence polarisée

L'absorption d'un quantum d'énergie $h\nu$ par une molécule amène la molécule de l'état fondamental à un état excité. Avant que le processus d'émission n'intervienne, les molécules tout en étant orientées dans un milieu liquide peuvent changer d'orientation par des mouvements de rotation. Dans ce cas, le moment de transition de l'absorption est différent de celui de l'émission. Par contre si les molécules sont orientées d'une façon aléatoire dans un milieu fixe, les mouvements de rotation ne peuvent pas avoir lieu. Dans ce cas les transitions moléculaires sont liées à la structure de la molécule et à son orientation.

Lorsqu'une molécule est excitée avec une lumière polarisée, la lumière émise par celle-ci est aussi polarisée. L'émission peut être dépolarisée par le phénomène de la diffusion rotationnelle du fluorophore. De même, lorsqu'un faisceau de lumière polarisée passe à travers une substance optiquement active, l'onde transmise est également linéairement polarisée mais dans un autre plan. Ainsi, la dépolarisation dépend de la nature de la substance traversée et de sa viscosité, ainsi que de la taille et la forme du fluorophore. Cela signifie qu'une variation de viscosité du solvant résultera un changement d'anisotropie de fluorescence.

C. Définition de l'anisotropie de fluorescence

Le degré de polarisation (P) et de l'anisotropie (r) de fluorescence sont définis comme suit:

$$P = \frac{F_{\parallel} - F_{\perp}}{F_{\parallel} + F_{\perp}} \quad (10)$$

$$r = \frac{F_{\parallel} - F_{\perp}}{F_{\parallel} + 2 F_{\perp}} \quad (11)$$

F_{\parallel} et F_{\perp} sont les intensités de fluorescence mesurées expérimentalement avec lumière polarisée parallèlement et perpendiculairement à la direction de l'étirement du film de PVA. Ces intensités peuvent être exprimées sous la forme suivante (Lakowicz, 1983) :

$$F_{\parallel} = \int_0^{\pi/2} f(\theta) \cos^2 \theta \, d\theta = \overline{\cos^2 \theta} \quad (12)$$

et

$$F_{\perp} = \frac{1}{2} \int_0^{\pi/2} f(\theta) \sin^2 \theta \, d\theta = \frac{1}{2} \overline{\sin^2 \theta} \quad (13)$$

où $f(\theta)$ est la fonction de distribution de l'orientation du dipôle M et $f(\theta) d\theta$ est la probabilité pour qu'un fluorophore soit orienté entre θ et $\theta + d\theta$ (figure 11).

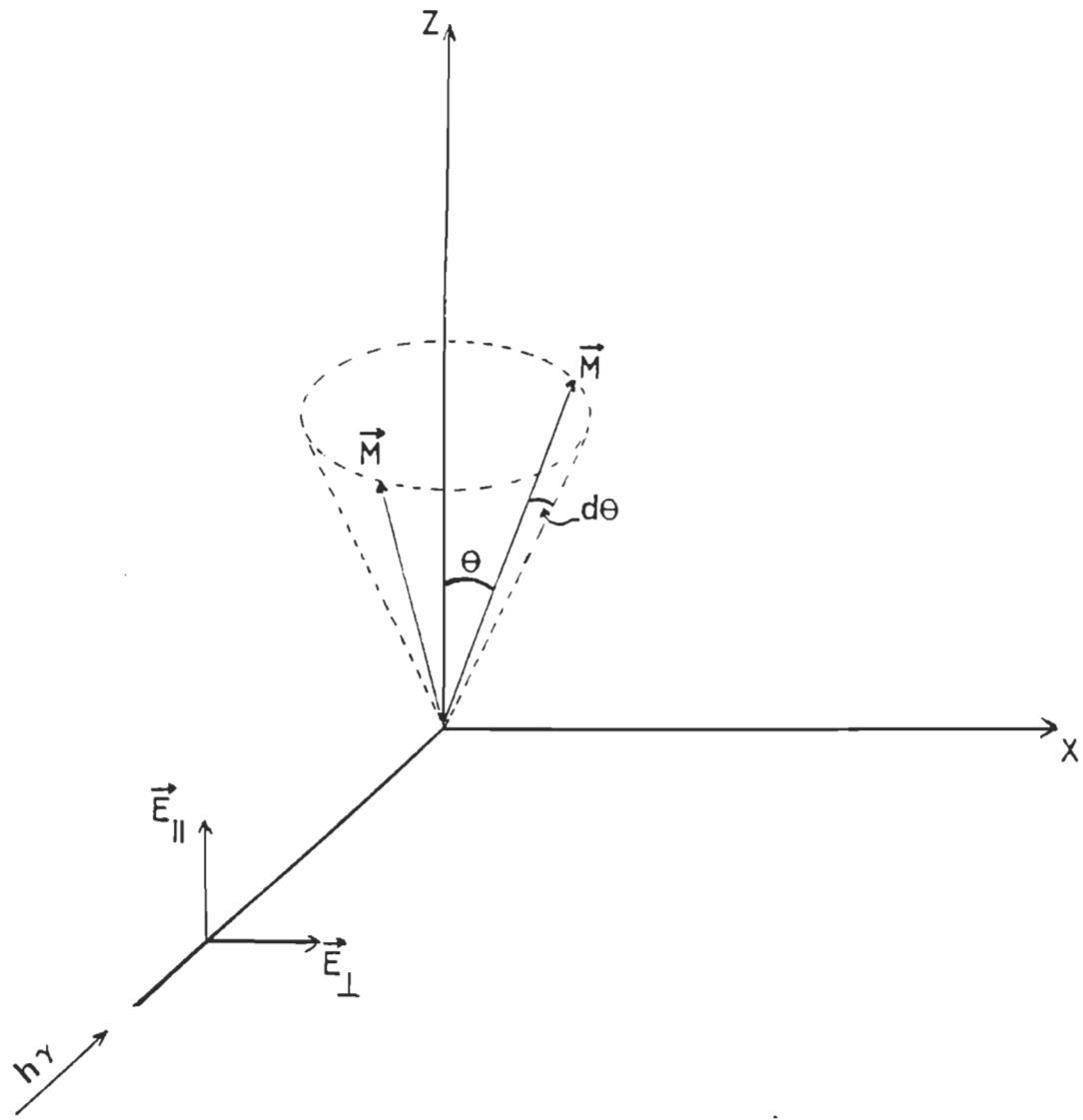


Figure 11. Distribution aléatoire de l'orientation des moments de transition

En remplaçant les équations (12) et (13) dans l'équation (11), on obtient:

$$r = \frac{\sqrt{3 \cos^2 \theta - 1}}{2}$$

où θ est l'angle que fait le dipôle d'émission avec l'axe des Z.

Pour $\theta = 0^\circ$, $r = 1$. Cela signifie que la lumière dispersée est complètement polarisée.

Pour $\theta = 54.7^\circ$, $r = 0$. Dans ce cas, on a un manque complet d'anisotropie. Ceci ne signifie pas que chaque fluorophore a tourné autour de l'axe des Z avec un angle de 54.7° , mais que c'est la valeur moyenne de l'ensemble des fluorophores. Dans ce cas on a ($\cos^2 \theta = 1/3$).

CHAPITRE 3

MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Matériel biologique

A.1 Culture des plantes d'orges

Les graines (*Hordeum vulgare*) utilisées proviennent du marché local. Les graines sont stérilisées superficiellement avec du peroxyde d'hydrogène 3% pendant 15 minutes et semées dans des bacs de vermiculite. Ces plantes sont arrosées quotidiennement avec l'eau du robinet et illuminées en permanence par une lampe au sodium à haute pression fournissant une intensité au niveau des plantes de 40mW/cm². La température à l'intérieur de la chambre de croissance varie entre 22 et 24°C. Sous ces conditions, les plantes peuvent croître normalement. Après huit jours de croissance les feuilles d'orge sont récoltées pour l'isolation des fragments de thylacoïdes.

A.2 Extraction des thylacoïdes

La méthode d'isolation des thylacoïdes utilisée dans ce travail est celle décrite par Berthold *et al.* (1981) modifiée selon la méthode utilisée par Ford et Evans (1983), Ghanotakis *et al.* (1985) et Ikeuchi et Inoue (1986).

Les feuilles d'orge (100g) sont rincées à l'eau distillée et coupées plus ou moins finement puis mélangées à 250ml de la solution de broyage à 4°C, dont la composition est donnée dans le tableau 1. Les segments de feuille sont broyés à la vitesse maximale pendant 20 secondes dans un broyeur domestique doté de lames additionnelles. Par la suite, nous filtrons la suspension résultante à travers un tissu constitué de huit couches de coton fromage afin d'éliminer les débris de feuilles. Le filtrat contenant les chloroplastes et les autres organelles du cytoplasme est centrifugé rapidement à 6 500xg pendant 90 secondes afin de séparer ceux-ci des enzymes libérés lors du broyage et aussi des débris cellulaires de petites dimensions. Les chloroplastes isolés sont ensuite resuspendus dans un milieu hypotonique (sans sorbitol). Cette étape permet aux chloroplastes de s'éclater et de libérer le compartiment stromatique et les fragments de thylacoïdes. Une dernière centrifugation, à 3 000xg pendant cinq minutes, permet de séparer les chloroplastes brisés du contenu stromatique. Cette dernière étape nous permet de récolter les

Tableau 1

Composition chimique des solutions utilisées pour
l'isolation des fragments de thylacoïdes

Milieux	Produits	Concentrations
A <u>Broyage</u> : pH 7.8	Tricine -----	50 mM
	Sorbitol -----	400 mM
	NaCl -----	10 mM
B <u>hypotonique</u> : pH 7.8	Tricine -----	10 mM
	Na Cl -----	10 mM
	Mg Cl ₂ -----	5 mM
C <u>conservation</u> : Ph 6.5	Sucrose -----	400 mM
	Na Cl -----	15 mM
	Mg Cl ₂ -----	5 mM
	M.E.S. -----	20 mM

fragments de thylacoïdes que nous remettons dans un volume minimal de solution de resuspension. Le rôle de celle-ci est de maintenir les thylacoïdes dans un milieu adéquat afin de préserver leur activité photosynthétique. Finalement nous congelons les thylacoïdes à -130°C jusqu'à leur utilisation.

La procédure d'isolation des thylacoïdes est détaillée en figure 12.

L'activité photosynthétique des thylacoïdes obtenue par les mesures du dégagement d'oxygène ($170 - 200 \mu\text{mol O}_2 / \text{mg chl.h}$) nous indique que les thylacoïdes d'orge obtenus sont de bonne qualité.

B. Préparation des milieux isotrope et anisotrope

Les principes de la méthode de préparation des milieux isotrope et anisotrope utilisés dans ce travail sont ceux décrits par Frackowiak et al. (1986b).

Nous mélangeons 100ml d'eau distillée et dix grammes d'alcool de polyvinyl (BDH) dans un récipient placé dans un bain thermostaté à 50°C, nous agitons le mélange pendant quatre heures

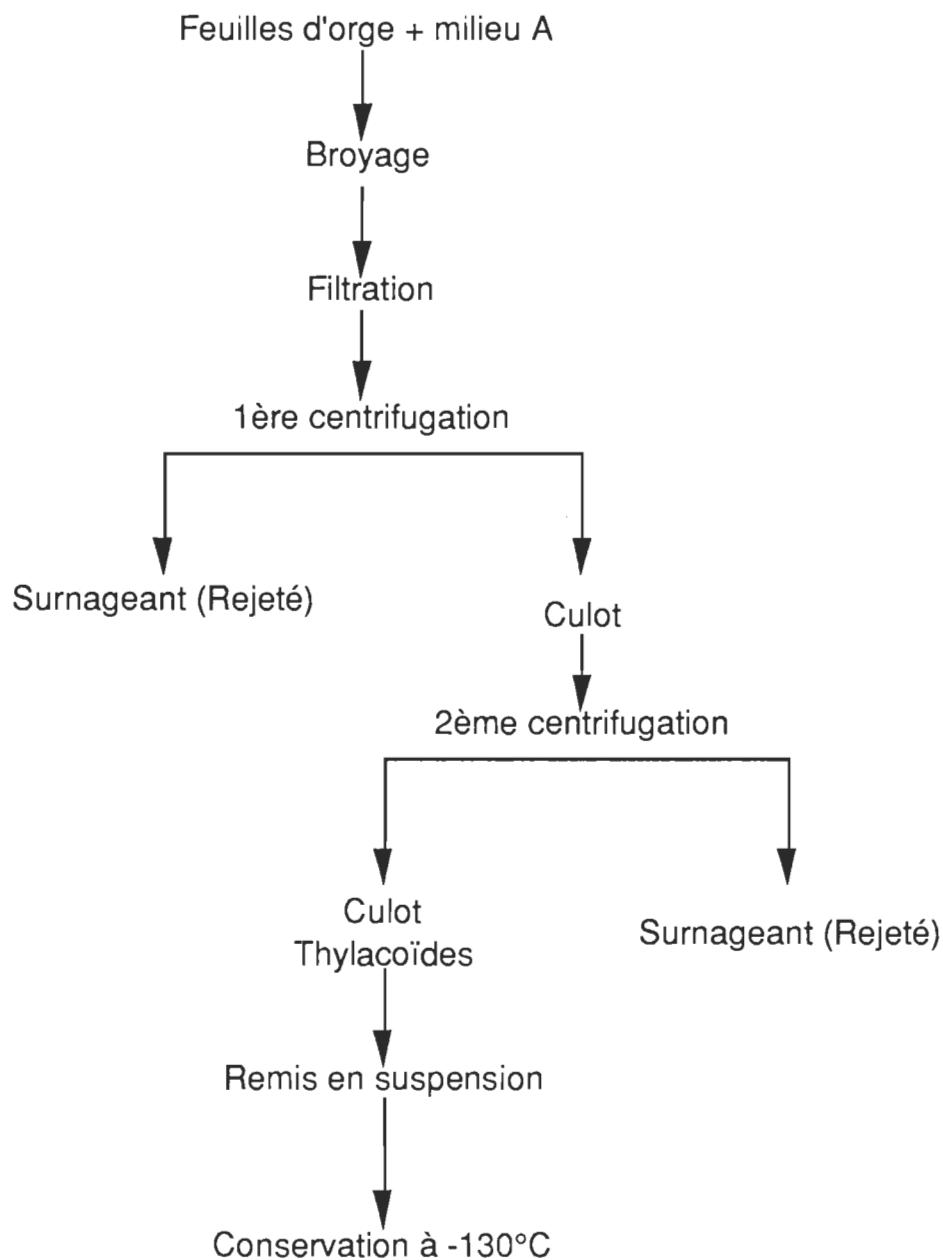


Figure 12: Schéma de la procédure d'isolation des thylacoïdes.

jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Celle-ci est filtrée deux fois à travers huit couches de coton fromage afin d'éliminer les fragments de polyvinyl non dissous durant l'agitation puis nous laissons refroidir le mélange jusqu'à température ambiante. Nous ajoutons les thylacoïdes en agitant à l'aide d'une tige de verre puis nous centrifugeons le mélange à 2 000xg pendant une minute (Lösche *et al.*, 1987) afin de permettre à l'air de s'échapper du polyvinyle alcool. Ensuite, nous déposons le mélange sur une lame de verre dans un dessicateur contenant de l'azote. Deux jours plus tard les thylacoïdes se trouvent incorporés dans un milieu isotrope (film de polyvinyle alcool sec).

En étirant le film isotrope, nous formons un milieu anisotrope (Lorrain *et al.*, 1987) dans lequel les thylacoïdes se trouvent orientés. Pour étirer les films d'alcool de polyvinyl, nous nous servons d'un support à deux barrières mobiles (figure 13) sur lesquelles nous fixons le film, à l'aide d'une vis nous déplaçons les deux barrières constamment et en même temps jusqu'au degré d'anisotropie désiré. L'étirement du film se fait dans un milieu saturé en vapeur d'eau pour l'humidifier afin de pouvoir l'étirer sans qu'il ne se déchire. Une fois que le film est étiré, nous le fixons sur un anneau de plexiglass (figure 13) à l'aide d'une colle forte de cyanoacrylate (Loctite 495) pour éviter les problèmes de relaxation qui peuvent modifier l'anisotropie du système orienté. Finalement, nous plaçons les films

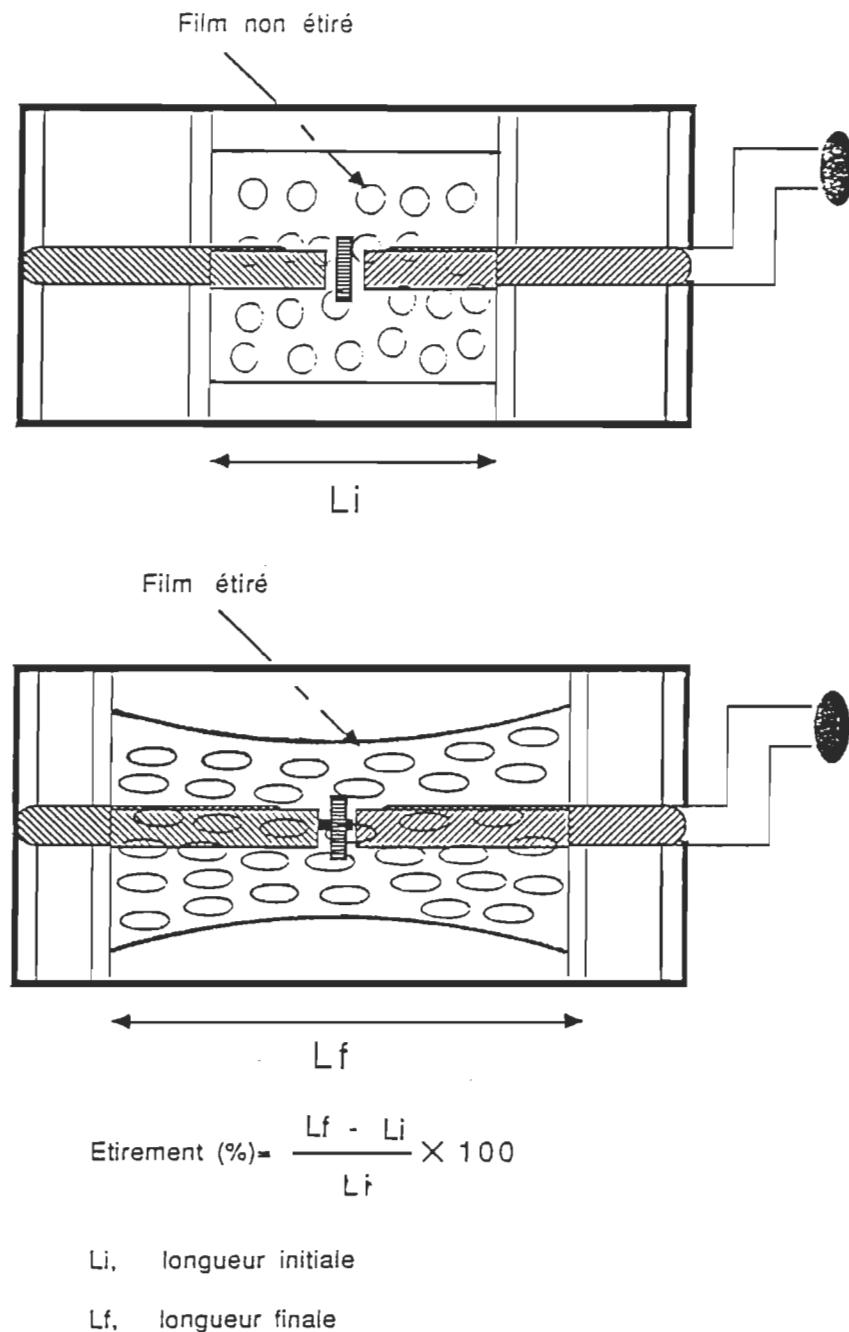


Figure 13. Schéma de l'appareil servant à étirer les films d'alcool de polyvinyl.

dans un milieu d'azote jusqu'à leur utilisation pour effectuer les mesures expérimentales.

C. Méthodes de mesure des spectres d'absorption et de fluorescence polarisée corrigée

C.1 Absorption

Les spectres d'absorption (750 - 350 nm) sont enregistrés avec un spectrophotomètre Perkin Elmer - 356. Les mesures spectrales pour les composantes ($A_{||}$) et (A_{\perp}) sont effectuées avec de la lumière polarisée parallèlement et perpendiculairement à la direction de l'étirement. Le spectre d'absorption (A) est pris avec de la lumière naturelle (non polarisée). Pour chaque échantillon, les spectres ($A_{||}$, A_{\perp} et A) sont pris relativement à la position de l'échantillon par rapport à la direction de la lumière incidente.

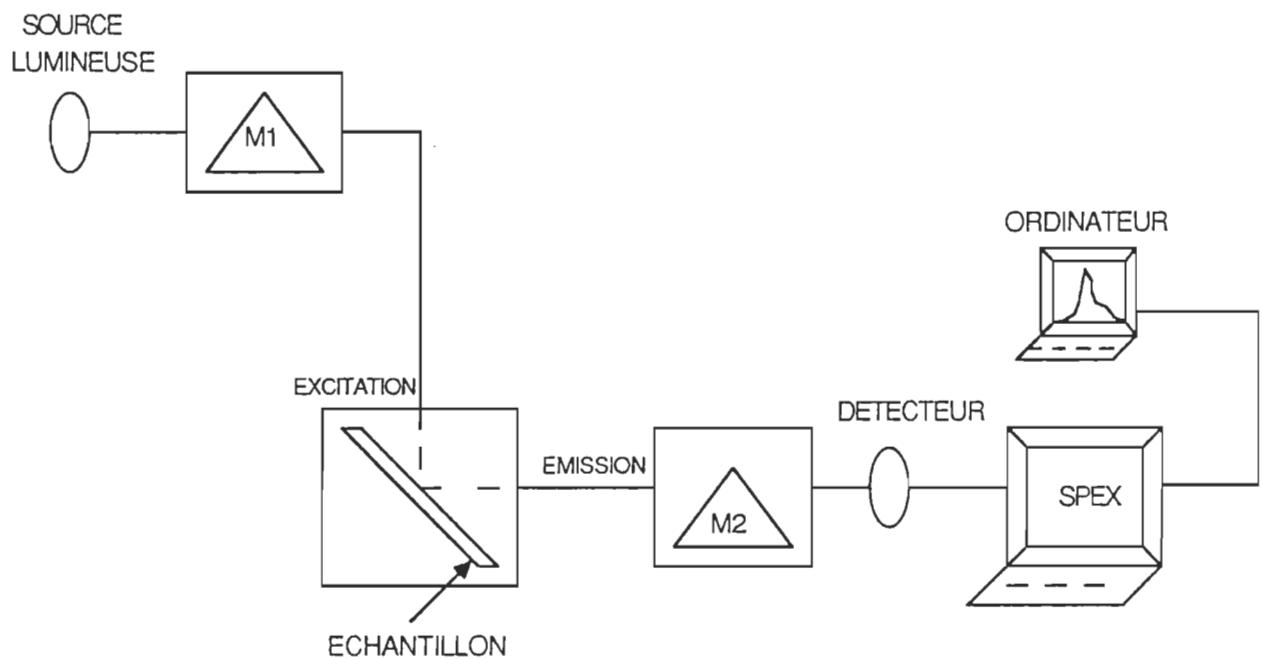
Durant notre travail, chaque mesure est effectuée sur des films de polyvinyle alcool traités (contenant des thylacoïdes) et non traités (sans thylacoïde). Pour chaque degré d'anisotropie, nous prenons le spectre d'absorption du film non traité et préparé dans les mêmes conditions que le film traité (même viscosité, épaisseur). Ensuite nous soustrayons ce spectre de celui contenant les thylacoïdes correspondant à la même polarisation et au même degré

d'anisotropie. Ceci est dans le but d'éliminer les effets de dépolarisation attachés à la structure chimique du film et à son épaisseur.

C.2 Fluorescence polarisée corrigée

Les spectres de fluorescence polarisée sont pris à l'aide d'un spectrofluorimètre fluorolog-2 (Spex Industries Inc). L'appareil (figure 14) est muni d'une lampe au xénon de 450 Watt, d'un monochromateur d'excitation (M1) qui sélectionne la longueur d'onde de la lumière avec laquelle l'échantillon doit être irradié, et d'un monochromateur d'émission (M2) qui sélectionne la longueur d'onde de fluorescence reçue par le système de détection (Photomultiplicateur).

Les échantillons sont excités avec une lumière monochromatique polarisée ($\lambda = 420$ nm) verticalement (V) et horizontalement (H) par rapport à la direction de l'étirement (figure 15). Pour avoir des spectres d'émission polarisés, nous plaçons un polariseur au faisceau d'excitation et un polariseur au faisceau d'émission. Afin d'éliminer toute lumière dispersante et toute lumière ayant une longueur d'onde inférieure à 600 nm, un filtre (passe-haut) est placé sur le trajet de la lumière émise polarisée. La lumière passe ensuite dans le monochromateur (M2) et atteint le photomultiplicateur dans une chambre refroidie par circulation



M1 : Monochromateur d'excitation

M2 : Monochromateur d'émission

Figure 14 Schéma simplifié du spectrofluorimètre.

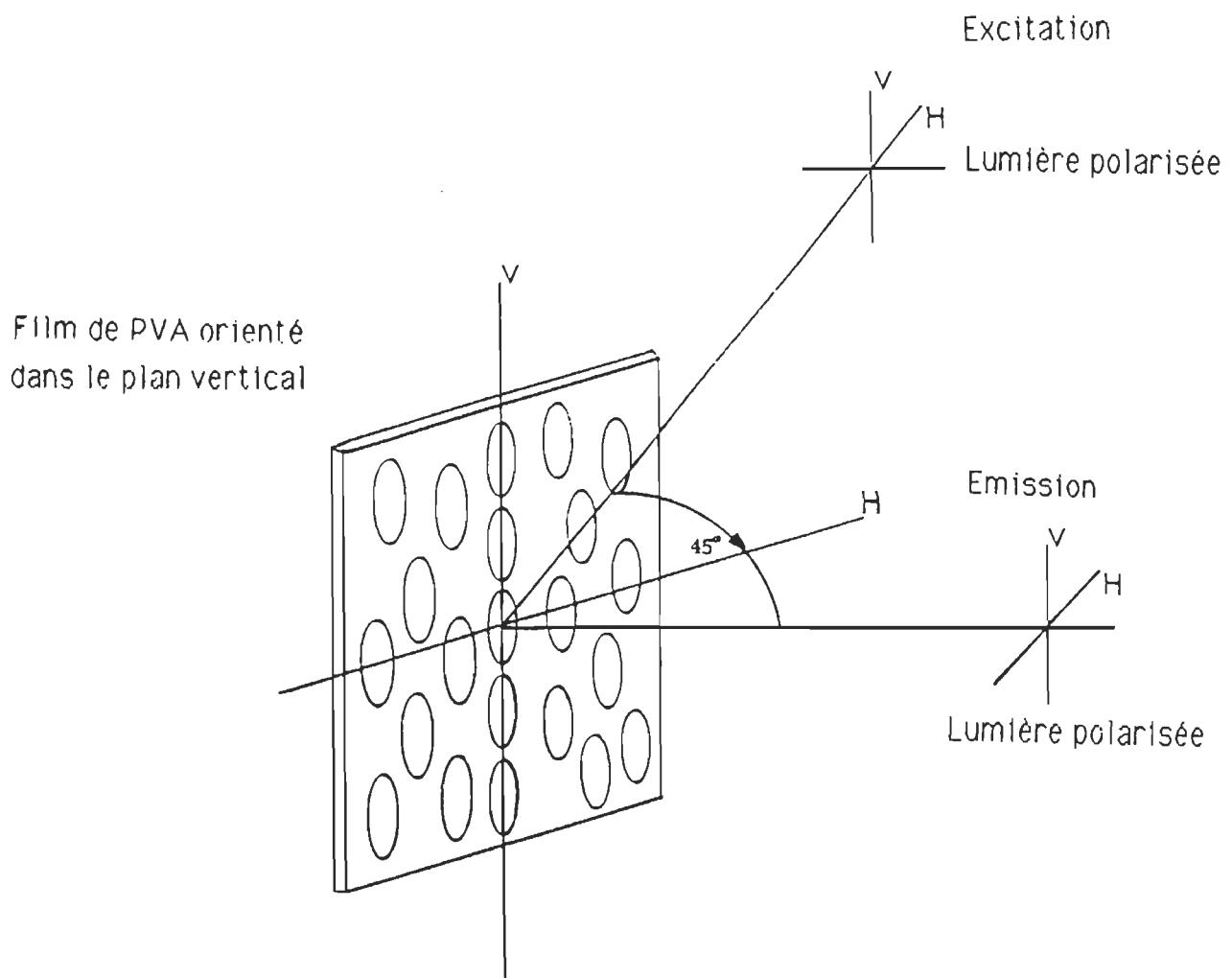


Figure 15 Représentation schématique de la mesure de fluorescence polarisée. H et V représentent la polarisation horizontale et verticale.

continue d'eau froide. Le nombre de photon capté par ce dernier est enregistré sur le spex .

Les spectres de fluorescence polarisée obtenus pour chacune des positions de polarisation à l'excitation et à l'émission(F_{vv} , F_{vh} , F_{hh} et F_{hv}) sont corrigés à l'aide d'une courbe de correction qui compense les variations de la sensibilité du tube photomultiplicateur selon les longueurs d'onde. Cette courbe est obtenue par la méthode de la lampe standard. Cette technique consiste à prendre le spectre d'émission d'une lampe standard ayant un profil d'irradiation connu (spectre d'émission réel), qui est divisé par le spectre d'émission enregistré par l'appareil. Les spectres d'émission des thylacoïdes d'orge incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl enregistrés par la suite sont multipliés par la courbe résultante de correction représentée dans la figure 16 (Robert, 1987; Picard *et al.* 1986). Nous tenons à souligner que chaque spectre d'émission des thylacoïdes pris avec les composantes polarisées (verticale et horizontale) est multiplié par la courbe de correction correspondante.

C.3 Anisotropie de fluorescence corrigée

Durant notre travail, la méthode de correction utilisée pour mesurer l'anisotropie de fluorescence corrigée est appelée: méthode de Formal-L ou méthode du canal unique (Joseph R. Lakowicz, 1983).

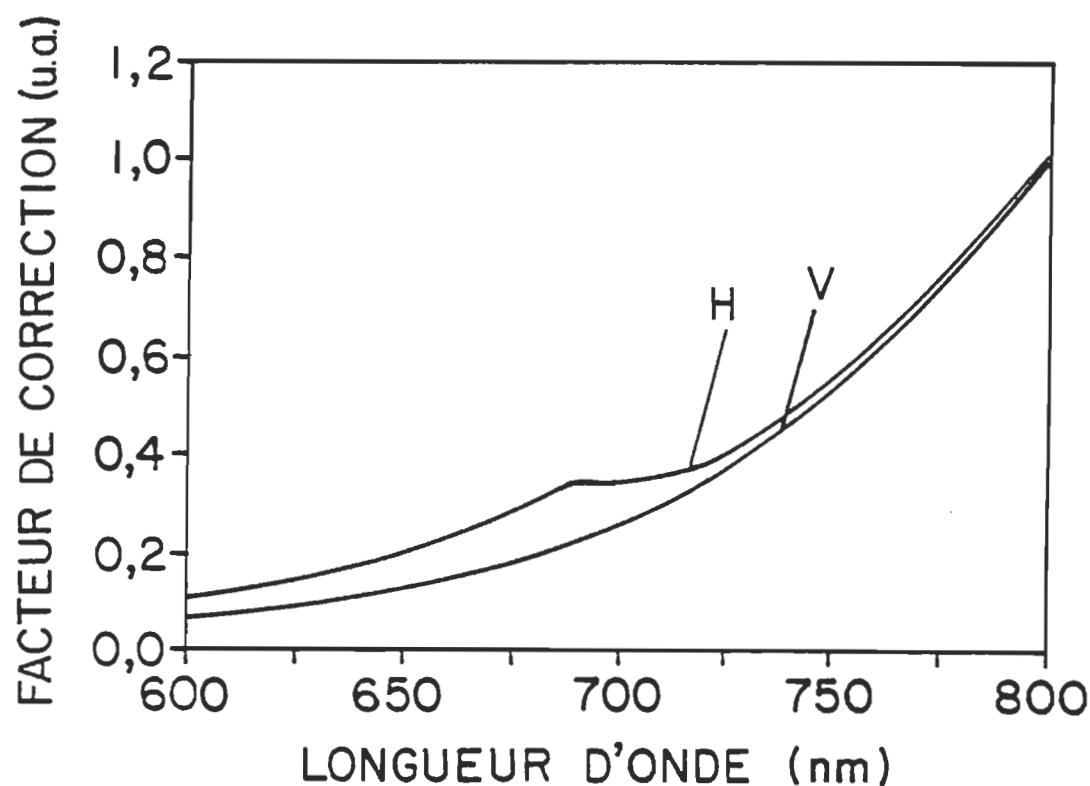


Figure 16 Courbe de correction obtenue avec lumière polarisée verticalement ou horizontalement à l'émission.

L'objectif de cette méthode est de mesurer les intensités de fluorescence des composantes polarisées (verticale et horizontale) non perturbées par le canal optique du système de détection (Clarke et Schneider, 1982).

Le facteur de correction, G, est déterminé à partir du rapport de la composante verticale/horizontale avec le rayon lumineux polarisé horizontalement à l'excitation, i.e., $G = F_{hv} / F_{hh}$. Dans ce cas la polarisation et l'anisotropie corrigée sont données par:

$$P = \frac{F_w - GF_{vh}}{F_w + GF_{vh}}$$

et

$$r = \frac{F_w - GF_{vh}}{F_w + 2GF_{vh}}$$

où F_{vv} et F_{vh} sont les composantes de fluorescence mesurées horizontalement et verticalement, respectivement, avec le faisceau de lumière polarisé verticalement à l'excitation.

Il est important de noter que le facteur G dépend de la longueur d'onde d'émission et de la bande passante du monochromateur.

Les spectres de fluorescence polarisée (800 - 600 nm), des échantillons excités ($\lambda_{ext} = 420$ nm), sont enregistrés avec une largeur de la bande passante de 2 nm à l'excitation et de 1.5 nm à l'émission pour les différentes positions de polarisation à l'excitation et à l'émission.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. Orientation des dipôles d'absorption

A.1 Spectres d'absorption polarisée

Les spectres d'absorption des thylacoïdes d'orge incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl non orientés (milieu isotrope), pris en lumière naturelle (n) et en lumière polarisée sont présentés dans la figure 17. Ces spectres varient légèrement en fonction de la polarisation de la lumière incidente. Cette variation entre les spectres d'absorption polarisée peut être reliée au nombre de thylacoïdes présents dans la zone excitée de l'échantillon (homogénéité du film). Cela est dû au fait que, durant notre travail, il était très difficile d'exciter toujours le même endroit de l'échantillon, et que l'ensemble des spectres d'absorption sont enregistrés lorsqu'une petite partie de l'échantillon est illuminée.

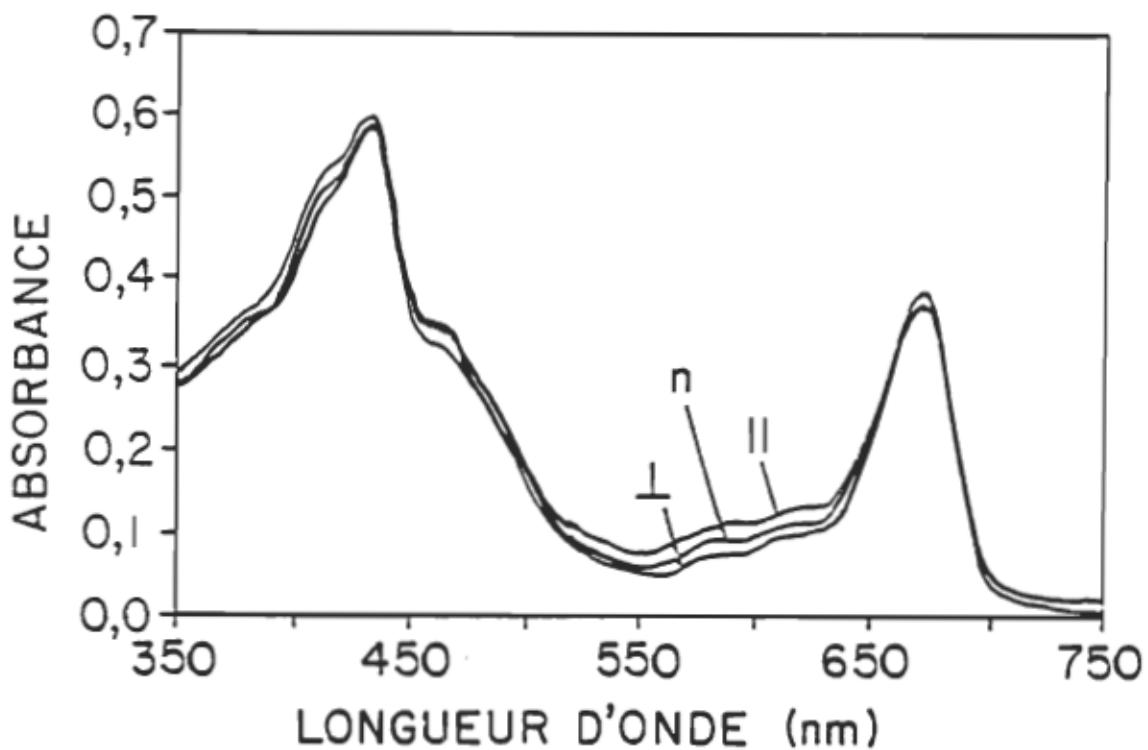


Figure 17 Spectres d'absorption des thylacoïdes d'orge incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl non étirés, pris en lumière naturelle (n), polarisée parallèlement (II) ou perpendiculairement (⊥) à l'échantillon.

Nous tenons à souligner que les spectres d'absorption des thylacoïdes sont très semblables à ceux obtenus avec les chloroplastes et les particules de PSII extraits de feuilles de pois (*Pisum sativum L.*) (Frackowiak et al., 1985), selon la méthode de Burke et al. (1978), Berthold et al. (1981). La différence principale observée est la présence de deux bandes à environ 462 et 408 nm dans le spectre des thylacoïdes d'orge (figure 17). La première bande correspond aux caroténoïdes absorbant à cette longueur d'onde, tandis que la deuxième est la bande Soret de la chl-a.

Il a été démontré antérieurement que les conditions de culture et d'extraction (Frackowiak et al., 1987) des plantes telles que l'intensité lumineuse, la durée d'illumination, la température, la présence d'ion, etc., peuvent modifier la structure morphologique des chloroplastes et des thylacoïdes des plantes. Dans ce travail, les conditions de culture et d'extraction des thylacoïdes d'orge citées dans la section 3.B sont les mêmes pour l'ensemble des échantillons. Les mesures du dégagement d'oxygène de ces derniers, nous donnent une bonne activité photosynthétique située entre 170 et 200 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg chl.h}$ (Carpentier et al., 1987). Cela nous montre que nos thylacoïdes d'orge ont poussé dans des meilleures conditions et qu'ils sont de bonne qualité.

A.2 Spectres d'absorption polarisée des films étirés

Les spectres d'absorption des thylacoïdes d'orge, incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl orientés (milieu anisotrope) à différents pourcentages d'étirement (100, 200 et 300%), sont présentés dans la figure 18. Ces spectres étaient mesurés en utilisant une lumière monochromatique polarisée parallèlement (II) et perpendiculairement (\perp) à la direction de l'étirement.

Les spectres (figure 18) des films anisotropes étirés à 100%, 200% et 300% pris avec la lumière polarisée parallèlement à la direction de l'étirement absorbent plus intensément que ceux obtenus avec la lumière polarisée perpendiculairement. Par contre les spectres présentés dans la figure 18c nous montrent que dans la région 480-590 nm, le film étiré à 300% absorbe plus la lumière polarisée perpendiculairement que celle polarisée parallèlement. Cela nous montre que dans cette région, certains chromophores subissent une réorientation lorsque le film est étiré à 300%. Ainsi nous pouvons remarquer que la valeur du maximum d'absorption varie d'un échantillon à l'autre en fonction de l'étirement (tableau 2), de la nature de la polarisation de la lumière absorbée, du solvant et de l'épaisseur du film. On peut conclure que l'intensité d'absorption des moments de transition des molécules dépend de la nature de la lumière polarisée et de l'orientation des pigments (complexes chlorophylle-protéine) dans le système membranaire thylacoïdal.

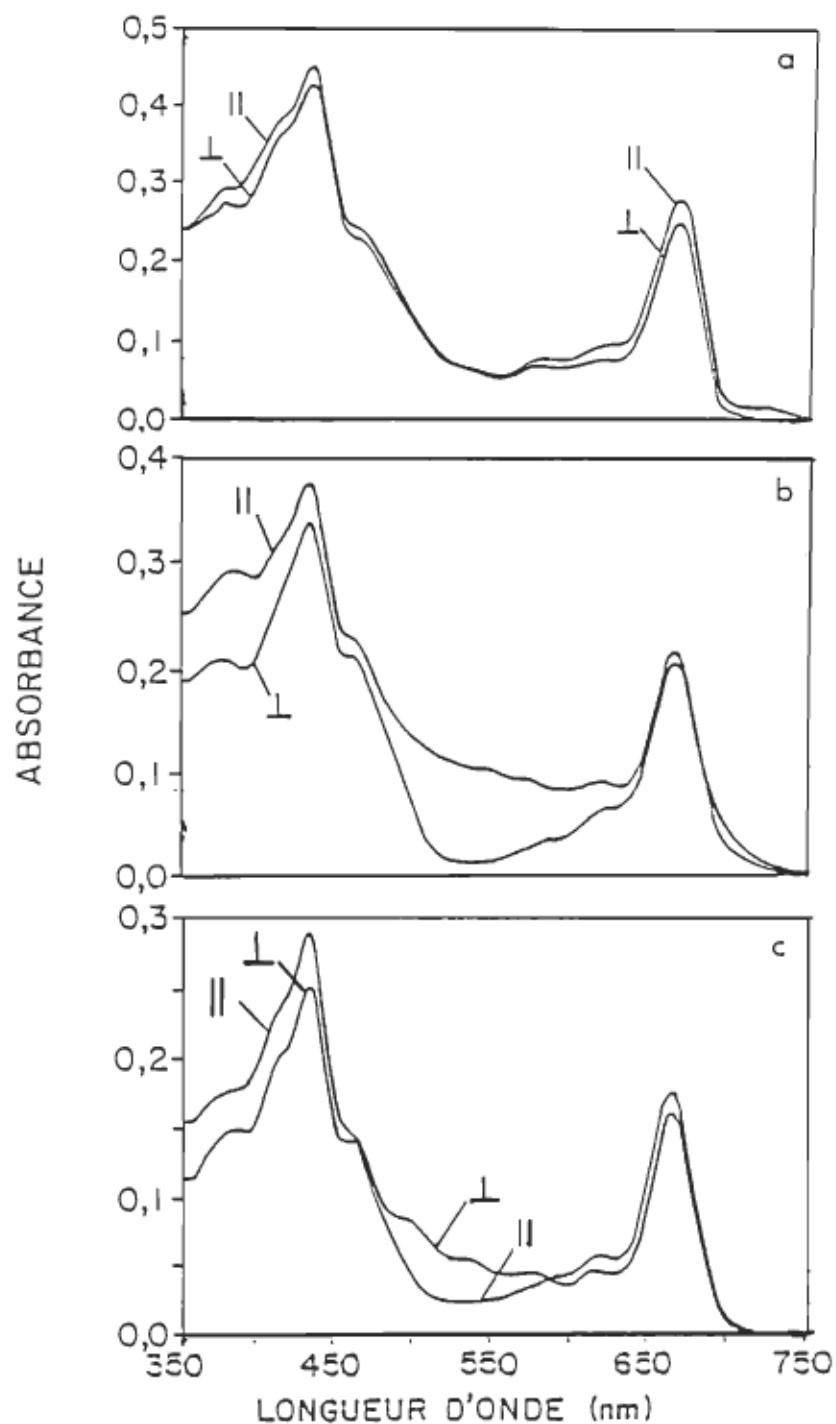


Figure 18 Spectres d'absorption des thylacoïdes d'orge dans des films d'alcool de polyvinyl étirés à 100% (a) 200% (b) et 300% (c), pris en lumière polarisée parallèlement (II) ou perpendiculairement (I) à la direction de l'étirement.

Tableau 2

Effet de l'étirement sur l'intensité d'absorption des dipôles
de transition des thylacoïdes d'orge incorporés dans
des films d'alcool de polyvinyl

Etirement (%) [*]	Polarisation	Intensité d'absorption		
		430	548	670
0%	n	0.597	0.073	0.385
100%		0.447	0.051	0.275
	⊥	0.427	0.052	0.245
200%		0.373	0.100	0.209
	⊥	0.335	0.012	0.199
300%		0.287	0.022	0.167
	⊥	0.250	0.044	0.153

* Voir figure 13.

A.3 Effet de l'étirement sur l'orientation des dipôles d'absorption

Les valeurs du dichroïsme linéaire relatif, calculées pour les trois bandes d'absorption situées à 670, 548 et 430 nm, des thylacoïdes d'orge incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl étirés à 100, 200 et 300% sont données dans le tableau 3.

Nous savons que la bande d'absorption de la chlorophylle-a dans le rouge (670 nm) est reliée à la transition $S_0 \rightarrow S_1$ (état fondamental → premier état excité) du moment de transition $Q_y (0,0)$ (Petke *et al.*, 1979). Nous savons aussi que cette bande est localisée dans l'anneau de porphyrine le long de la ligne connectant les pyrroles I et III, tandis que la bande de Soret est une superposition de plusieurs transitions vibrationnelles.

Le tableau 3 nous montre que pour les étirements correspondant à 100 et à 300%, le dichroïsme linéaire relatif de la chlorophylle-a orientée le long de la direction Q_y dans la bande rouge, est plus élevé que dans la bande de Soret. Ceci a été aussi observé par Frackowiak *et al.*, (1983). Par contre dans le cas des films étirés à 200%, le dichroïsme linéaire relatif est plus élevé dans la bande de Soret que dans la bande rouge. Cette différence peut être liée aux conditions expérimentales de préparation des films qui peuvent modifier l'orientation des pigments lors de l'étirement des films.

Tableau 3

Effet de l'étirement sur l'orientation des dipôles d'absorption des thylacoïdes d'orge incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl

Étirement(%)*	LD			LD'			α (degré)		
	430	548	670	430	548	670	430	548	670
100%	0.020	-0.001	0.030	0.046	-0.019	0.118	54	55	53
200%	0.038	0.088	0.010	0.109	2.129	0.049	53	26	54
300%	0.037	-0.022	0.014	0.141	-0.6	0.894	53	63	43

*Voir figure 13.

Les variations similaires du dichroïsme linéaire relatif et de l'angle d'orientation α des thylacoïdes d'orge, nous montrent que l'orientation principale de la plupart des dipôles de transition X et Y de la chlorophylle-a, est située hors du plan de la membrane. Dans le cas des films étirés à 200% la transition X de la chlorophylle-a, plutôt que celle de Y, est orientée proche du plan de la membrane (Breton and Vermeglio, 1982).

La petite bande d'absorption apparaissant au voisinage de 548 nm, correspond à la transition Q_x (0,0) de la phéophytine (Ganago et al., 1982; Fragata et al., 1988). Nous savons que l'accepteur d'électrons intermédiaire du PSII est une molécule de phéophytine (Klimov and Krasvoski, 1981). Le degré d'orientation des films étirés à 200%, nous montre que cette transition de la phéophytine est orientée proche du plan de la membrane ($\alpha = 26^\circ$). En sachant que la transition Q_y correspondant à cette molécule fait un angle de 74° avec Q_x (Fragata et al., 1988), ce résultat nous montre que la transition Q_y est située approximativement perpendiculairement au plan de la membrane.

En comparant les résultats du dichroïsme linéaire relatif et du degré de l'orientation des films étirés à 200 et 300%, nous remarquons clairement que l'orientation de la molécule de phéophytine par rapport au plan de la membrane varie beaucoup en fonction de

l'étirement. Cela nous montre que cette molécule subit une réorientation lorsque les films sont étirés à 300%. Cette réorientation est probablement due aux conditions expérimentales employées dans la méthode de préparation des films, ou bien aux effets de l'étirement à 300%, qui peuvent modifier la structure protéinique (complexe protéine-chlorophylle) à l'intérieur du système membranaire thylacoïdal.

Nous savons que les thylacoïdes contiennent quatre types d'unités impliquées dans les réactions photosynthétiques: 1) les deux complexes collecteurs de lumière (LHC-I et LHC-II) formés de protéines et de pigments impliqués dans l'absorption de la lumière, 2) les deux complexes photochimiques (photosystème I et II), 3) les transporteurs d'électrons reliant les deux photosystèmes (plastoquinones, cytochrome b-f et la plastocyanine). Ces différentes unités fonctionnelles sont distribuées dans un environnement lipidique complexe. Les lipides membranaires, jouent un rôle très important dans l'organisation structurelle des thylacoïdes puisqu'ils maintiennent une conformation et une orientation transmembranaire appropriées pour les protéines (Siegenthaler et Rawyler, 1986).

L'étendue exacte de l'orientation des systèmes biologiques photosynthétiques n'est pas bien connue présentement. Les membranes thylacoïdales peuvent être pliées et les pigments des

lamelles peuvent ne pas être orientés parfaitement par rapport au plan de la membrane. Cependant l'étude de chacune des particules photosynthétiques bien isolée et hautement purifiée, nous permettra de connaître l'origine et le rôle de chacune des bandes d'absorption avec certitude.

En nous basant sur les résultats rapportés dans cette partie de notre travail: les spectres d'absorption, les valeurs du dichroïsme linéaire relatif et le degré d'orientation, nous pouvons conclure:

- i. La différence entre les spectres d'absorption parallèle et perpendiculaire des thylacoïdes d'orge incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl non étirés, est due aux conditions expérimentales de préparation des films.
- ii. L'intensité d'absorption des moments de transition, dépend de la nature de la lumière polarisée et de l'orientation des pigments dans le système membranaire thylacoïdal.
- iii. Les moments de transition Q_x des chlorophylle-a et des phéophytines sont orientés proche du plan de la membrane.

B. Orientation des dipôles d'émission

B.1 Spectres de fluorescence polarisée corrigés: effet de la calibration du système de détection sur l'intensité de fluorescence

Les spectres de fluorescence polarisée des thylacoïdes d'orge, incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl non étirés, sont mesurés en utilisant une lumière monochromatique polarisée verticalement et horizontalement à la direction de l'étirement.

Les films d'alcool de polyvinyl sont placés sur le porte-échantillon de façon à ce que l'axe d'étirement du film soit verticalement (voir figure 13). A l'aide de polariseurs situés aux faisceaux d'excitation et d'émission, nous pouvons polariser la lumière horizontalement ou verticalement à l'échantillon. Ainsi, lorsque la lumière est polarisée verticalement à l'excitation et horizontalement à l'émission, l'intensité émise observée est F_{vh} et lorsqu'elle est polarisée verticalement à l'excitation et à l'émission, l'intensité émise est F_{vv} .

Tous les spectres d'émission polarisée ont été enregistrés entre 600-800 nm dans les mêmes conditions expérimentales. Lors de la prise des spectres, la lecture se fait par incrément de 0.5 nm, la

largeur de la bande passante à l'émission est fixée à 1.5 nm. Tandis qu'à l'excitation, selon les échantillons examinés, nous devons varier celle-ci entre 1.5 et 2.5 nm.

Les échantillons sont excités au niveau de la bande de Soret ($\lambda = 420$ nm). Nous avons choisi d'exciter à cette longueur d'onde, afin d'observer la variation de la fluorescence des différents pigments photosynthétiques à l'intérieur du système membranaire. Cela nous permettra de décrire l'orientation relative des pigments dans leurs complexes protéiniques (Michel-Villaz, 1976) et de mieux comprendre le transfert d'énergie intermoléculaire (Geacintov *et al.*, 1974) entre le photosystème I et II.

Dans la figure 19, nous présentons les spectres d'émission polarisée corrigés (VV, VH, HH, HV) et non corrigés (VVNC, VHNC, HHNC, HVNC) des thylacoïdes d'orge, incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl. Les spectres corrigés sont obtenus en multipliant les spectres non corrigés par la courbe de correction correspondante présentée dans la figure 16. Chaque spectre est normalisé au point maximum correspondant au pic le plus intense. Nous remarquons que les spectres corrigés et non corrigés ont une bande principale à 683 nm et une autre moins intense située aux environs de 735 nm; cependant, les spectres non corrigés ont une intensité à 735 nm plus

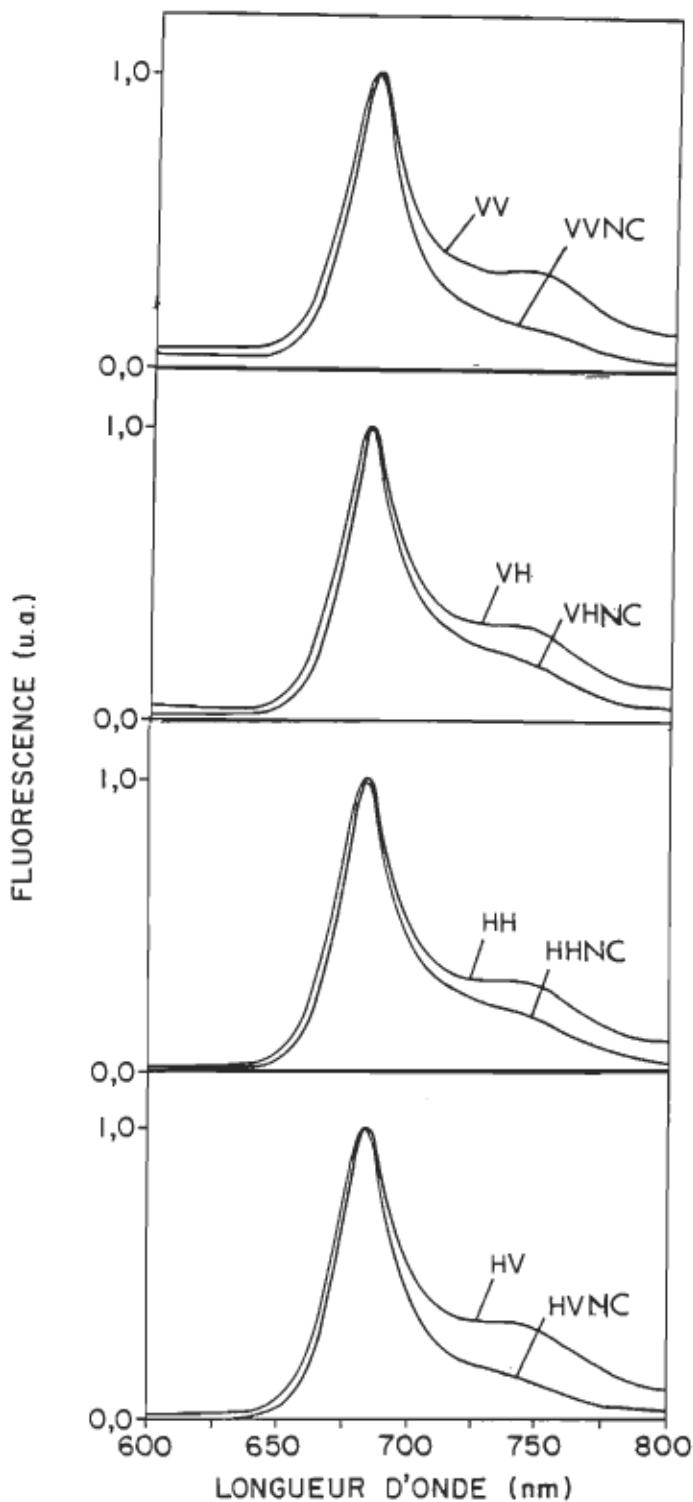


Figure 19 Spectres de fluorescence polarisée des thylacoïdes d'orge dans des films d'alcool de polyvinyl non étirés ($\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$), normalisés à 683 nm. H et V signifient respectivement la polarisation horizontale et verticale aux faisceaux d'excitation et d'émission.
 VVNC, VHNC, HHNC, HVNC : Spectres non corrigés
 VV, VH, HH, HV : Spectres corrigés

faible que celle des spectres corrigés. Ainsi, nous pouvons remarquer que la forme et l'intensité de l'épaulement à 735 nm varient en fonction de la polarisation de la lumière.

La différence observée entre les spectres corrigés et non corrigés, nous montre que la méthode de correction utilisée a un effet considérable sur l'intensité de fluorescence. Cette méthode nous a permis de mesurer les intensités de fluorescence corrigées non affectées par le système de détection.

B.2 Spectres de fluorescence polarisée corrigés des films étirés et non étirés

Les spectres de fluorescence polarisée corrigés des films étirés et non étirés pris dans les mêmes conditions expérimentales sont présentés dans la figure 20. Ces spectres se composent d'une bande localisée à 683 nm (F683) et d'un épaulement situé dans la région 730-750 nm (F730 et F750), dont la longueur d'onde d'émission varie en fonction de la polarisation de la lumière du faisceau d'excitation et d'émission.

La fluorescence à 683 nm est attribuée à la chlorophylle-a

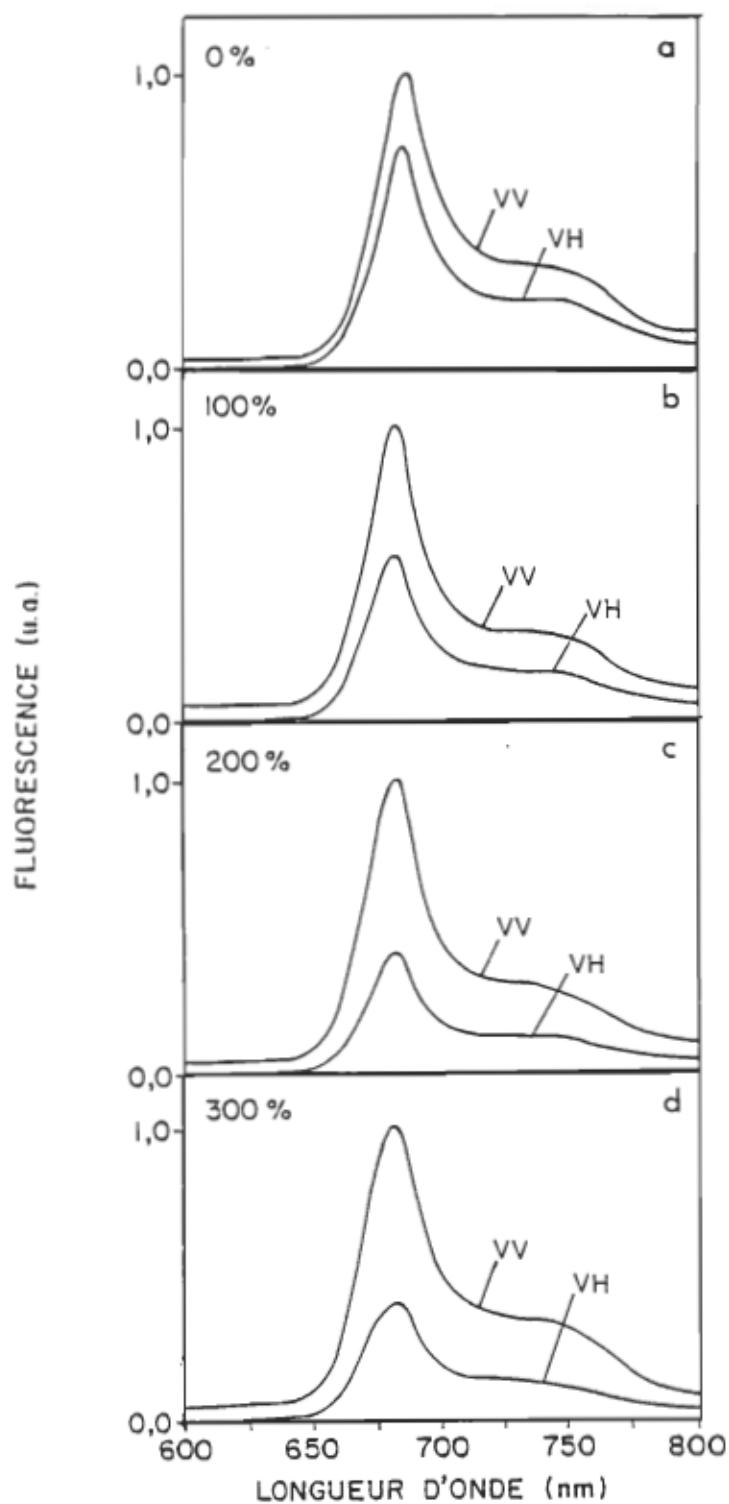


Figure 20 Spectres de fluorescence polarisée corrigés des thylacoïdes d'orge dans des films isotropes (a) et anisotropes étirés à 100% (b), 200% (c) et 300% (d), pris en lumière polarisée verticalement à l'excitation et à l'émission (VV) et verticalement à l'excitation et horizontalement à l'émission (VH).

provenant en grande partie du complexe du cœur du photosystème II (Papageorgiou, 1975). Tandis que les deux bandes F730 et F750 proviennent de la chlorophylle-a du photosystème I (Govindjee and Govindjee, 1975).

Les spectres des films non étirés (figure 20a) nous montrent que l'intensité de fluorescence prise avec la lumière polarisée verticalement à l'excitation et à l'émission F_{vv} est plus élevée que celle prise avec la lumière polarisée verticalement à l'excitation et horizontalement à l'émission F_{vh} . Cette différence observée nous montre que les moments de transition sont orientés différemment dans la membrane thylacoïdale et qu'ils ne devraient pas avoir la même efficacité dans le processus du transfert d'énergie. En outre, nous avons observé que dans le cas de la lumière polarisée horizontalement à l'excitation et à l'émission F_{hh} et horizontalement à l'excitation et verticalement à l'émission F_{hv} (voir figure 21a), la différence entre l'intensité de fluorescence F_{hh} et F_{hv} est beaucoup moins significative que celle observée entre F_{vh} et F_{hv} (voir figure 20a). Cela signifie que même en absence de l'étirement, il existe déjà une légère orientation des particules dans le film. Cette légère orientation peut être liée aux effets physico-chimiques, la nature du solvant, la viscosité du film et la photosélection des composantes polarisées.

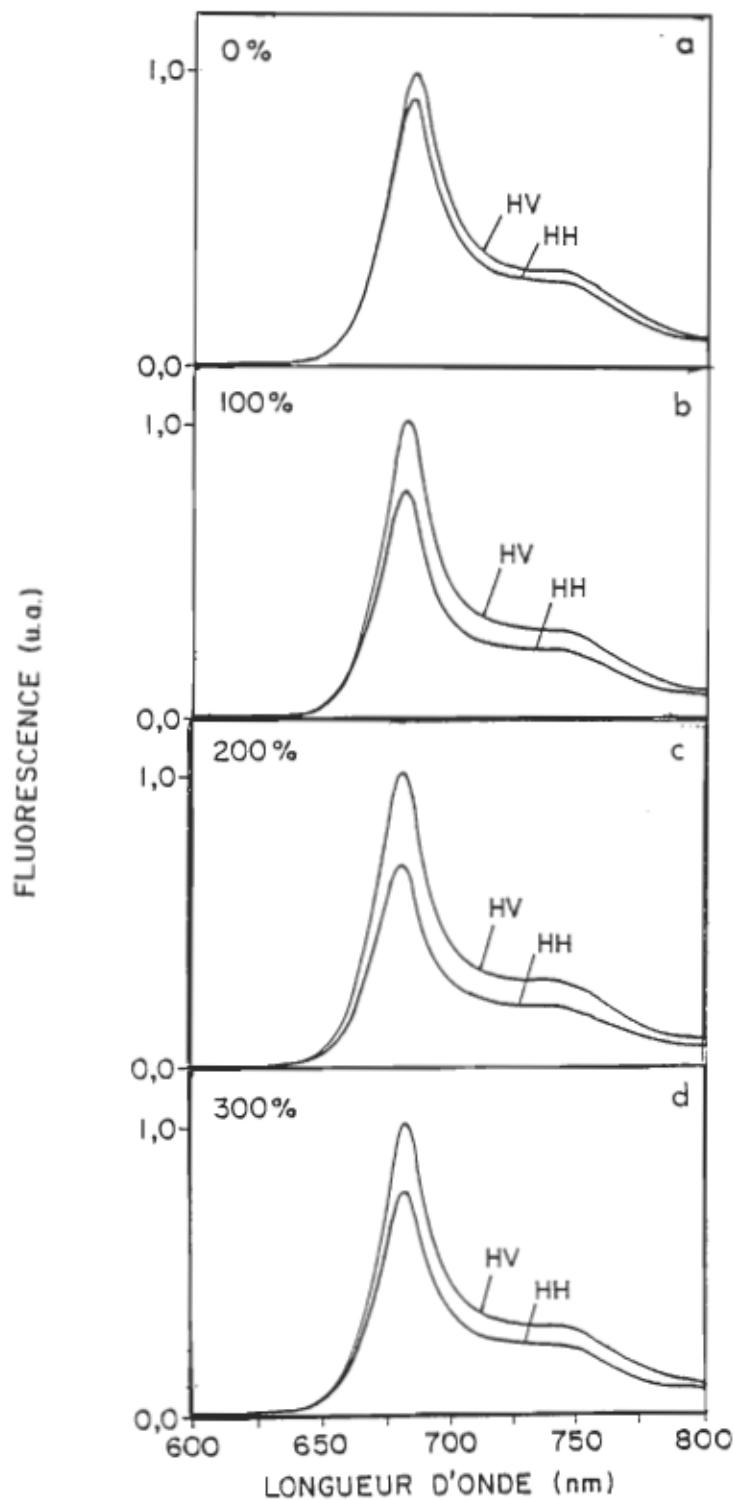


Figure 21 Spectres de fluorescence polarisée corrigés des thylacoïdes d'orge dans des films isotropes (a) et anisotropes étirés à 100% (b), 200% (c) et 300% (d), pris en lumière polarisée horizontalement à l'émission et à l'excitation (HH) et horizontalement à l'excitation et verticalement à l'émission (HV).

Lorsque nous comparons les spectres d'émission polarisée des thylacoïdes en milieu anisotrope à ceux obtenus en milieu isotrope, nous pouvons voir que l'intensité de fluorescence varie de façon plus marquée en fonction de l'étirement et de la polarisation de la lumière.

Le tableau 4 nous montre que lorsque la lumière est polarisée verticalement par rapport à l'axe d'étirement du film au faisceau d'émission, nous favorisons l'observation de l'émission des moments de transition orientés parallèlement à la direction de la lumière polarisée, c'est-à-dire les moments de transition orientés parallèlement à l'axe d'étirement du film ($F_{vv} > F_{vh}$). Nous remarquons aussi que lorsque la lumière est polarisée horizontalement par rapport à l'axe d'étirement, nous observons préférentiellement les moments de transition orientés perpendiculairement à la direction d'étirement du film ($F_{hv} > F_{hh}$). De plus nous constatons que la différence des intensités de fluorescence pour les composantes polarisées F_{vv} et F_{vh} à 683 nm est plus élevée que celle à 735 nm et celle-ci a été le cas pour les différents étirements utilisés. Cette différence est d'autant plus élevée que l'étirement devient important. Ces résultats nous montrent que l'étirement du film d'alcool de polyvinyl joue un rôle important pour l'orientation des molécules dans la membrane des thylacoïdes.

Tableau 4

Intensité de fluorescence polarisée corrigée des thylacoïdes dans des films d'alcool de polyvinyl étirés et non étirés, correspondant à la bande d'émission F683 et F735

Etirement (%) *	Fente (nm)		Polarisation	Intensité de fluorescence ($F \times 10^{-4} \text{ C S}^{-1}$)	
	Excitation	Emission		F683	F735
0 %	2.5	1.5	VV	1.90	0.64
			VH	1.41	0.44
			HH	1.62	0.52
			HV	1.78	0.59
100%	2.5	1.5	VV	3.46	1.07
			VH	1.95	0.60
			HH	1.83	0.57
			HV	2.39	0.72
200%	2.5	1.5	VV	6.70	2.00
			VH	2.80	0.83
			HH	2.82	0.85
			HV	4.11	1.20
300%	2.5	1.5	VV	9.81	3.32
			VH	3.95	1.36
			HH	3.88	1.37
			HV	5.13	1.73

*Voir figure 13.

Les travaux antérieurs (Frackowiak *et al.*, 1985) sur les thylacoïdes de feuilles de petits pois incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl nous montrent que les spectres de fluorescence polarisée des films non étirés pris à la température ambiante sont très différents des spectres des films étirés pris à la même température (Voir figure 22). Ces auteurs ont montrés que l'intensité et la forme de ces spectres varient en fonction de la polarisation de la lumière. En comparant les spectres de fluorescence polarisée horizontalement à l'excitation et à l'émission des films non étirés (Frackowiak *et al.*, 1985) avec les spectres de fluorescence polarisée des thylacoïdes d'épinard orientés par champ magnétique à -196°C (Vasin *et al.*, 1979), nous remarquons que les résultats de Frackowiak et collaborateurs à température ambiante présentent une structure fine très similaire à celle des spectres de fluorescence obtenus à basse température (Vasin *et al.*, 1979; Weis, 1985). Ceci présente un intérêt considérable dans l'étude de l'orientation et du transfert d'énergie intermoléculaire des systèmes photosynthétiques. Cependant, les résultats montrés dans notre travail (voir figures 20 et 21) obtenus avec les thylacoïdes d'orge, ne présentent pas la structure fine rapportée par Frackowiak et collaborateurs à température ambiante .

En nous basant sur nos données expérimentales, nous pouvons conclure:

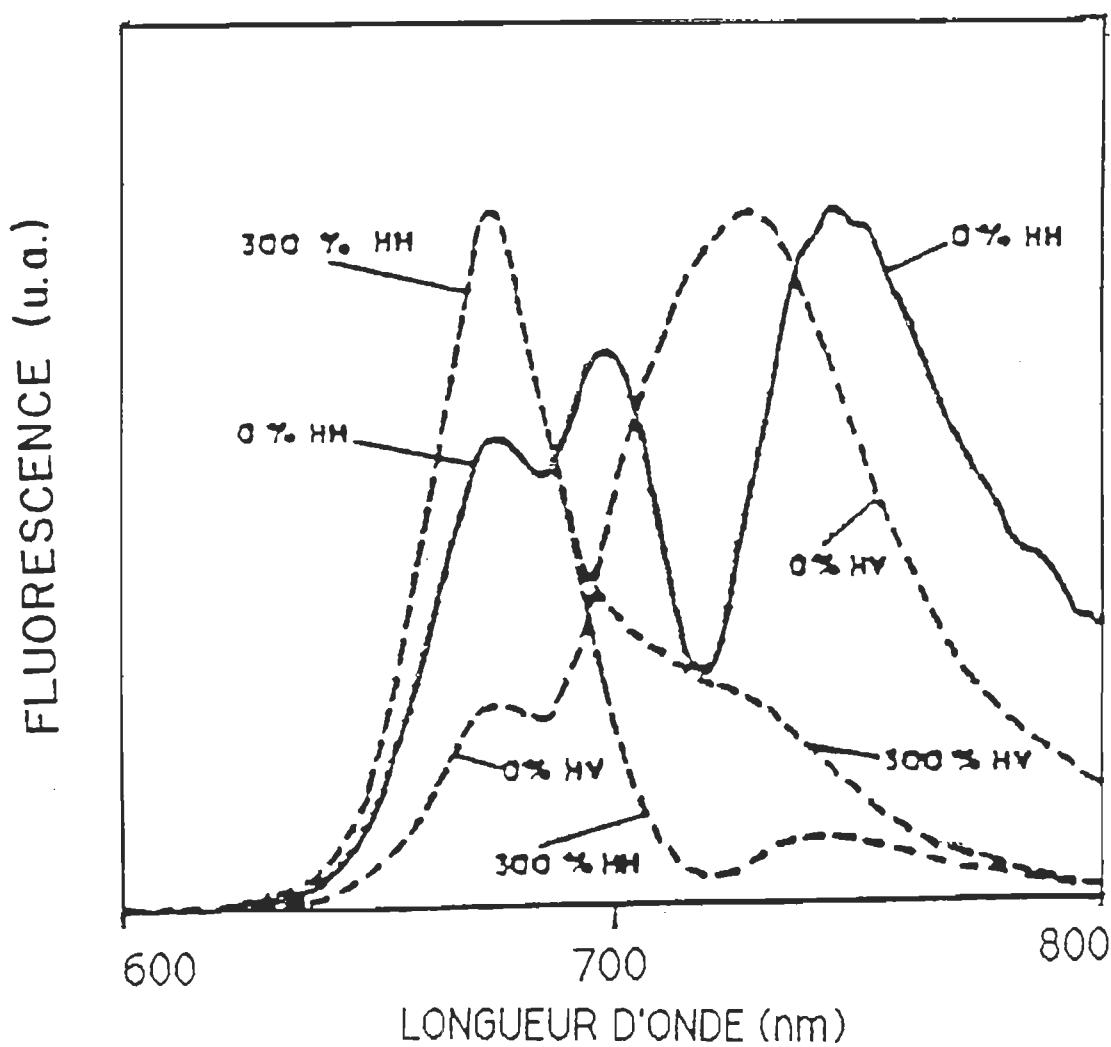


Figure 22 Spectres de fluorescence polarisée des thylacoïdes de pois incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl non étirés (0%) et étirés (300%) (Tiré de Frackowiak, 1985).

- i. Les spectres de fluorescence polarisée corrigés des thylacoïdes d'orge obtenus dans ce travail sont le type courant de spectre que l'on retrouve dans la littérature, caractérisant la fluorescence à la température ambiante.
- ii. Ces spectres ont la même forme en milieu isotrope et anisotrope.
- iii. L'intensité de fluorescence des différentes bandes d'émission varie en fonction de l'étirement et de la polarisation.

Ces résultats nous montrent que la méthode d'étirement des films d'alcool de polyvinyl amène des changements marqués dans l'orientation de certains chromophores, ceci pourrait influencer le transfert d'énergie entre les différents pigments photosynthétiques.

C. Effet de l'étirement sur l'anisotropie de fluorescence

Les spectres de l'anisotropie de fluorescence (r) calculés à partir des composantes polarisées corrigées F_{vv} et F_{vh} sont présentés dans la figure 23. Ces spectres nous montrent que le degré de l'anisotropie de fluorescence des thylacoïdes d'orge augmente en fonction de

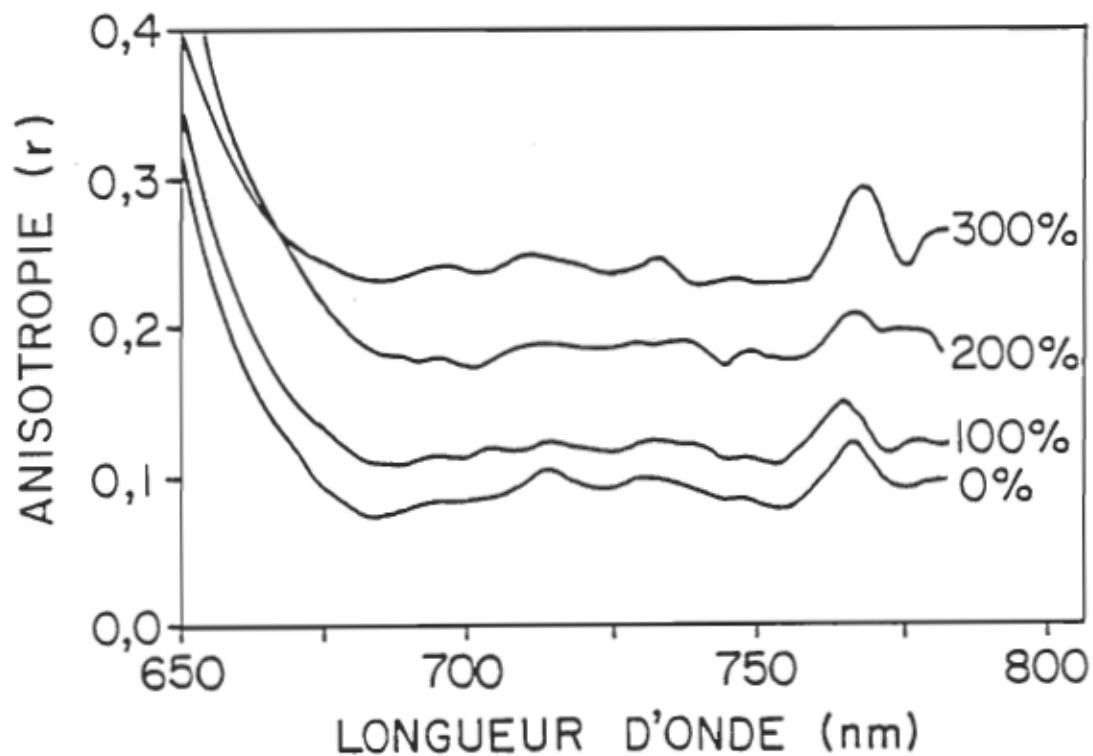


Figure 23 Anisotropie de fluorescence des films non étirés (0%) et des films étirés à 100, 200 et 300%.

l'étirement des films. Nous pouvons constater que ces spectres se composent de plusieurs transitions correspondant respectivement à l'émission de fluorescence du complexe capteur de lumière II (F683) et de la chlorophylle du centre réactionnel du PSI (F735). Nous remarquons que le degré d'anisotropie varie légèrement d'une transition à l'autre, ceci est observé pour l'ensemble des films étirés et non étirés. Notons aussi que la longueur d'onde correspondant à chacune des transitions varie en fonction de l'étirement. Cette variation est remarquable dans le cas des films étirés à 300%. Cela nous laisse croire que l'étirement des films à 300% pourrait affecter la structure des complexes chlorophylle-protéine et modifier l'orientation de certains pigments dans la membrane photosynthétique. A l'appui de cette hypothèse, rappelons que les résultats présentés dans la section 4.1.B (voir figure 18c) montrent effectivement que les chromophores absorbant dans la région 480-590 nm subissent une réorientation lorsque le film est étiré à 300%.

Le tableau 5 donne le degré d'anisotropie de la fluorescence des films étirés et non étirés. On voit que la valeur d'anisotropie à 683 nm est légèrement inférieure à celle correspondant à 735 nm. Cette observation signifie que les moments de transition des molécules émettant à 735 nm possèdent des orientations presque identiques à ceux émettant à 683 nm.

Tableau 5

Effet de l'étirement sur l'anisotropie de fluorescence
correspondant à 683 et 735 nm

Etirement (%) [*]	Anisotropie de fluorescence (r) ^{**}	
	683	735
0%	0.071	0.094
100%	0.107	0.120
200%	0.182	0.190
300%	0.226	0.234

* Voir figure 13.

**Voir chapitre 2.C (equation 11)

L'augmentation du degré d'anisotropie en fonction de l'étirement est due à un changement dans l'orientation des moments de transition correspondant à chacune des molécules. Ce changement pourrait altérer significativement le taux du transfert d'énergie intermoléculaire du PSII au PSI.

D. Effet de l'étirement sur la distribution d'énergie entre PSII et PSI

Les rapports des pics de fluorescence F683/F735 (PSII/PSI) en fonction de l'étirement pour chacune des composantes polarisées VV, VH, HH et HV sont présentés dans la figure 24. Ces rapports nous indiquent la proportion de l'énergie d'excitation présente dans le PSII par rapport au PSI. Cela nous permet de distinguer les changements dans la distribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes. La figure 24 nous montre que le rapport PSII/PSI augmente en fonction de l'étirement jusqu'à 200%. Cette augmentation est due aux interactions des molécules et à leur orientation dans les deux photosystèmes. Remarquons aussi qu'il y a un maximum d'énergie emmagasinée dans le PSII pour un étirement de l'ordre de 200%. Cela signifie que le transfert d'énergie du PSII au PSI doit diminuer en fonction de l'étirement jusqu'à 200%. Dans le cas des films étirés à 300% l'efficacité du transfert d'énergie diminue significativement. Cette diminution nous montre que l'étirement des films au-delà de 200% pourrait:

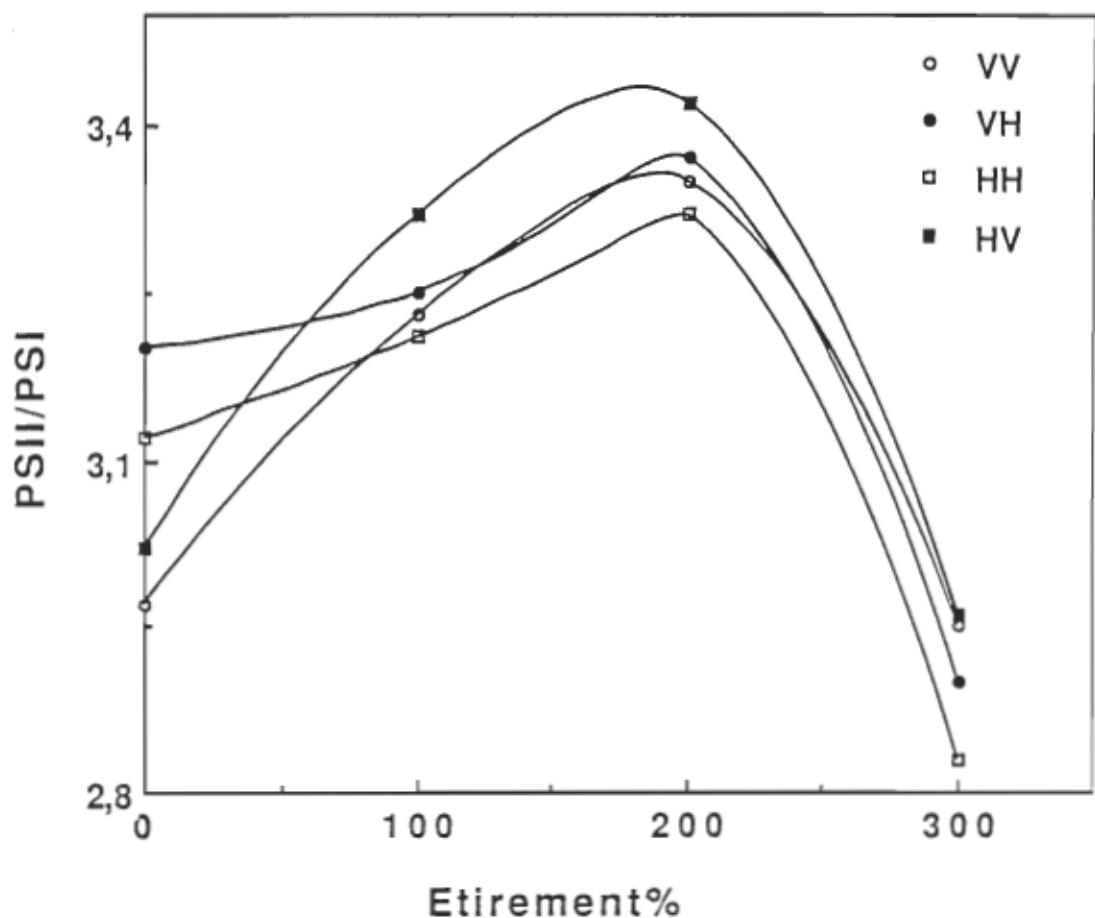


Figure 24 Effet de l'étirement du film de PVA sur la distribution d'énergie entre PSII et PSI.

- 1) modifier la structure protéinique du complexe chlorophyllien.
- 2) modifier l'organisation des molécules à l'intérieur du système membranaire photosynthétique.
- 3) diminuer l'efficacité du transfert d'énergie entre le PSII et le PSI. Ceci nous montre que l'efficacité de "Spillover" entre les systèmes photosynthétiques pourrait être perturbée par les changements structuraux dans les membranes thilacoïdiennes.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

Les spectres d'absorption des thylacoïdes d'orge incorporés dans des films d'alcool de polyvinyl, nous montrent que l'intensité d'absorption des moments de transition dépend de la nature de la lumière polarisée et de l'orientation des pigments dans la membrane photosynthétique.

Les résultats du dichroïsme linéaire relatif et du degré de l'orientation, des films étirés à 200%, nous montrent que le moment de transition Q_x des chlorophylles-a et des phéophytines sont orientés proche du plan de la membrane. Ces résultats nous révèlent aussi que les chromophores absorbant dans la région 480-590 nm, subissent une réorientation lorsque le film est étiré à 300%. Cette réorientation est due aux effets de l'étirement, qui peuvent modifier la structure du complexe protéine-chlorophylle et par conséquent, causent une perturbation dans le processus du transfert d'énergie d'excitation dans le système membranaire thylacoïdal.

Les spectres corrigés de fluorescence polarisée, nous indiquent que l'intensité de fluorescence des différentes bandes d'émission varie en fonction de l'étirement et de la polarisation. Ces spectres ont la même forme dans les milieux isotrope et anisotrope. En comparant nos travaux avec ceux obtenus par d'autres auteurs, nous remarquons que nos spectres de fluorescence polarisée des thylacoïdes d'orge diffèrent beaucoup de leurs résultats. Cependant, nos résultats s'accordent avec ceux de la littérature caractérisant la fluorescence à température ambiante.

L'effet de l'étirement sur le degré d'anisotropie de la fluorescence augmente l'orientation des moments de transition des molécules. Dans le cas des films étirés à 300%, l'efficacité du transfert d'énergie diminue significativement. Cette diminution est associée à une variation de la distance moyenne séparant les molécules (donneurs et accepteurs). Ces résultats nous montrent que l'étirement des films au-delà de 200% pourrait modifier la structure protéïnique et l'organisation des molécules à l'intérieur du système membranaire.

RÉFÉRENCES

- Albrecht, A.G.. Polarizations and assignments of transitions: The method of photoselection. J.Mol. Spectrosc., 1961, 6, 84-108.
- Bethold, D.A., Badcock, G.T., Yocum, C.F.. A highly resolved, oxygen-evolving photosyntem II preparation from spinach thylakoid membranes. EPR and electron-transport properties. FEBS Lett., 1981, 134, 231-234.
- Breton, J., Michel-Villaz, M. et Pailletin, G.. Orientation of pigments and structural proteins in the photosynthetic membrane of spinach chloroplasts: A linear dichroism study. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 314, 42-56.
- Breton, J. et Vermeglio, A.. Orientation of photosynthetic pigments in vivo. In Govindjee (Ed.), Photosynthesis: Energy conversion by plants and bacteria, New York: Academic Press, 1982, 1, 153-194.

Breton, J.. The state of chlorophyll and carotenoid in vivo. II-A linear dichroism study of pigment orientation in photosynthetic bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, 59, 1011-1017.

Burke, J.J., Ditto, C.L. et Arntzen, C.J.. Involvement of the light-harvesting complex in cation regulation of excitation energy distribution in chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys., 1978, 182, 152-163.

Carpentier, R., Leblanc, R.M. et Mimeault, M.. Photoinhibition and chlorophyll photobleaching in immobilized thylacoid membranes. Enzyme Microb. Technol., 1987, 9, 489-493.

Diner, B.A. et Wolhman, F.A.. Isolation of highly active photosystem II particles from a mutant of chlamydomonas reinhardtii. Eur. J. Biochem., 1980, 110, 521-526.

Ford, R.C. et Evans, M.C.W.. Isolation of a photosystem 2 preparation from higher plants with highly enriched oxygen evolution activity. FEBS Lett., 1983, 160, 159-164.

Förster, T.. Delocalized excitation and excitation transfer. In O. Sinanoglu (Ed.). Modern Quantum Chemistry. New York: Academic Press, 1965, 3, 93-137.

Frackowiak, D., Hendrich, W., Romanowski, M., Szczepaniak, A. et Leblanc, R.M.. Polarized spectra of photosystem 2 particles in isotropic and stretched polyvinyl alcohol films. Photosynthetica, 1987, 21, 147-155.

Frackowiak, D., Hotchandani, S. et Leblanc, R.M.. Effect of electric field on polarized absorption spectra of chlorophyll a and b in nematic liquid crystals. Photobiochem. Photobiophys., 1983, 6, 339-350.

Frackowiak, D., Hotchandani, S., Seych, B. et Leblanc, R.M.. Polarized photoacoustic spectroscopy of oriented system. Acta Phys. Polon., 1986, A69, 121-133.

Frackowiak, D., Lorrain, L., Wrobel, D. et Leblanc, R.M.. Polarized photoacoustic, absorption and fluorescence spectra of chloroplasts and thylakoids oriented in polyvinyl alcohol films. Biochem. Biophys. Res. Comun., 1985, 126, 254-161.

Fragata, M., Nordén, B. et Kurucsev, T.. Linear dichroism (250-700 nm) of chlorophyll a and pheophytin a oriented in a lamellar phase of glycerylmonooctanocite / H₂O. Characterization of electronic transitions. Photochem. Photobiol., 1988, 47, 133-143.

Franck, J. et Teller, E.. Migration and photochemical action of excitation energy in crystals. J. Chem. Phys., 1938, 6, 861-872.

Gagliano, A.G., Geacintov, N.E., Breton, J., Acker, S. et Remy, R.. Electric linear dichroism of P700 chlorophyll-a protein complexes. Photochem. Photobiol., 1979, 29, 415-418.

Ganago, I.B., Klimov, V.V., Ganago, A.O., Shuvalov, V.A. et Erokhin, Y.E.. Linear dichroïsm and orientation of pheophytin, the intermediary electron acceptor in photosystem II reactin centers. FEBS Lett., 1982, 140, 127-130.

Geacintov, N.E., Van Nostrand, F. et Becker, J.F.. Polarized light spectroscopy of photosynthetic membranes in magneto-oriented wole-cells and chloroplasts. Fluorescence and dichroism. Biochim. Biophys. Acta, 1974, 347, 443-463.

Ghanotakis, D.F. et Yocum, C.. Polypeptides of photosystem II and their role in oxygen evolution. Photosynth. Res., 1985, 7, 97-114.

Golbeck, J.H.. Structure, Fonction and Organization of the Photosyntem I Reaction Center Complex. Biochim. Biophys. Acta, 1987, 895, 167-204.

Govindjee et Govindjee, R. Introduction to photosynthesis. Bioenergetics of photosynthesis. In Govindjee, Ed. Academic Press, New York, 1975, 1-50.

Govindjee et Govindjee, R. The primary events of photosynthesis. Scientific Am., 1974, 231, 68-82.

Hoover, J.K.. Chloroplasts. New York: Plenum Press, 1984, 20-89.

Ikeuchi, M. et Inoue, Y.. Characterisation of O₂ evolution by a wheat photosystem II reaction center complex isolated by a simplified method: disjunction of secondary acceptor quinone and enhanced Ca²⁺ demand. Arch. Biochem. Biophys., 1986, 247, 97-107.

Klimov, V.V. et Krasnovskii, A.A.. Pheophytin as the primary electron acceptor in photosystem 2 reaction centers. *Photosynthetica*, 1981, 15, 592-609.

Krause, G.H. et Weis, E.. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynth. Res.*, 1984, 5, 139-157.

Lakowicz, J.R.. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Plenum Press, 1983, 111-153.

Lavorel, J., Breton, J. et Lutz, M.. Methodological principles of measurement of light emitted by photosynthetic systems. In J. Barber (Ed.), Light Emission by Plants and Bacteria. New York: Academic Press, 1986, 57-99.

Lehninger, A.L. Biochemistry (2nd ed.). Worth Publisher Inc., New York, 1975, 583-611.

Lorrain, L., Frackowiak, D., Romanowski, M. et Leblanc, R.M.. Effect of stretching of chloroplasts and thylakoids embedded in polymer films. *Photosynthetica*, 1987, 21, 43-50.

Lösche, M., Feher, G. et Okamura, M.Y.. The stark effect in reaction centers from rhodobacter sphaeroides R-26 and rhodopseudomonas viridis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 7537-7541.

Michel-Villaz, M.. Fluorescence polarization: Pigment orientation and energy transfert in photosynthetic membranes. J. Theor. Biol., 1976, 58, 113-127.

Miller, J.N.. Standards in fluorescence spectrmetry. New York: Chapman and Hall., 1981.

Morita, S. et Miyazaki, T.. Dichroism of bacteriochlorophyll in cells of the photosynthetic bacteria Rhodopseudomonas palustris. Biochim. Biophys. Acta, 1971, 245, 151-159.

Murata, N. et Miyao, M. Photosystem II and oxygen evolution. In Photosynthesis (Briggs, W.R., ed.), New york: Alan R. Liss, Inc. 1989, 59-70.

Nobel, P.S.. Biophysical plant physiology and ecology (3d ed.). Freeman and company, San Francisco, 1983.

Norden, B.. Applications of linear dichroism spectroscopy. Applied Spect. Rev., 1978, 14, 157-248.

Pailletin, G., Vermeglio, A. et Breton, J.. Orientation of reaction center and antenna chromophores in the photosynthetic membrane of Rhodopseudomonas viridis. Biochm. Biophys. Acta, 1979, 545, 249-264.

Papageorgious, G.. Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. In Govindjee (Ed.), Bioenergetics of photosynthesis, New York: Academic Press, 1975, 319-375.

Pearlstein, R.M.. Chlorophyll singlet excitons. In Govindjee (Ed.) Photosynthesis I. Energy conversion by plants and bacteria. New York: Academic Press, 1982, 293-330.

Petke, J.D., Maggiora, G.M. Shipmans L. et Christoffersen, R.E.. Photochem. Photobiol., 1979, 30, 203-223.

Picard, G., Munger, G., Leblanc, R.M., Lessag R., Sharma, D., Siemianczuk, A. and Bolton, J.R.. Fluorescence lifetime of chlorophyll a in pure and mixed langmuir - Blodgett films. Chem. Phys. Lett., 1986, 129, 41-47.

Popovic, R., Beauregard, M. et Leblanc, R.M.. Study of energy storage in bundle sheath cells of zea mays. Plant Physiol., 1987, 84, 1437-1441.

Rafferty, C.N. et Clayton, R.K.. Properties of reaction center of Rhodopsendomonas sphaeroides in dried gelatin films. Linear dichroism and low temperature spectra. Biochim. Biophys. Acta, 1978, 502, 51-60.

Robert, S. Transferts d'électrons entre la chlorophylle-a et la plastoquinone-9 incorporées dans des membranes planaires asymétriques. Thèse publiée à l'Université du Québec à Trois-Rivières, 1987.

Schellman, J.A.. Circular dichroism and optical rotation. Chemical Reviews, 1975, 75, 323-331.

Siegenthaler, P.A. et Rawyler, A.. Acyl lipids in thylacoid membranes: distribution and involvement in photosynthetic functions. In Encyclopedia of Plant Physiology. Photosynthesis III: Photosynthetic Membranes and Light Systems. Eds Pirson A. et Zimmer Mann M.H. Springer verlag, Berlin., 1982, 19, 693-705.

Thornber, J.P., Markwell, J.P. et Reinman, S.. Plant chlorophyll-protein complexes: Recent advances Photochem. Photobiol., 1979, 29, 1205-1216.

Thornber, J.P., Peter, G.F., Nechushtai, R.. Biochemical composition and structure of photosynthetic pigment-proteins from higher plants. Physiol. Plantarum, 1987, 71, 236-240.

Vasin, Y.A. et Verkhoturov, V.N.. Investigation of the polarization of fluorescence of chlorella and pea chloroplasts orientated in a magnetic field. Biophysics, 1979, 24, 269-273.

Weis, E.. Chlorophyll fluorescence at 77K in intact leaves: Characterization of a technique to eliminate artifacts related to self-absorption. Photosynth. Res., 1985, 6, 73-86.

Witt, H.T.. Primary acts of energy conservation in the functional membrane of photosynthesis. In Govindjee (Ed.), Bioenergetics of Photosynthesis, New York: Academic Press, 1975, 493-554.