

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR
JUDITH GALLANT

PURIFICATION DES LIPIDES DU CHLOROPLASTE PAR CHROMATOGRAPHIE
LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE ET ÉTUDES SPECTROSCOPIQUES DE
MÉLANGES CHLOROPHYLLE a / LIPIDES À L'ÉTAT MONOMOLÉCULAIRE

FÉVRIER 1990

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 chlorophylle a et les galactolipides sont des constituants membranaires des thylacoïdes, siège de la photosynthèse. La chlorophylle a est le principal pigment capteur de l'énergie lumineuse dans les plantes. Les galactolipides, qui sont des molécules principalement localisées dans les chloroplastes, sont les lipides majoritaires dans ces organites cellulaires. Plusieurs études démontrent que les galactolipides sont plus que de simples composantes membranaires. Il semble que leur présence soit essentielle au bon fonctionnement et à l'agencement optimal des protéines photosynthétiques.

Le but du présent travail est d'étudier les interactions possibles entre la chlorophylle a et ces lipides dans le système modèle des monocouches par la spectroscopie de fluorescence et de durée de vie de fluorescence. Cependant, nous avons tout d'abord mis au point une méthode de purification par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) pour chacun des trois principaux lipides des thylacoïdes. Ceux-ci sont le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), le digalactosyldiacylglycérol (DGDG)

et le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG). Le choix du procédé de purification est basé sur la rapidité et l'efficacité de la CLHP.

La qualité des lipides purifiés est vérifiée par des mesures physico-chimiques très sensibles à la présence d'impuretés, les isothermes de pression de surface. En plus de contrôler le degré de pureté des lipides, cette méthode nous assure de la validité de cette purification au niveau du système biomimétique utilisé lors de nos mesures spectroscopiques.

Dans le cas du MGDG, les spectres d'excitation des systèmes chlorophylle α /lipide (purifié et non purifié) mettent en évidence la nécessité de la séparation du lipide par CLHP. Un déplacement spectral important du maximum du spectre lorsque le MGDG non purifié est employé indique que ce lipide brut conduit à la dégradation du pigment dans la monocouche.

Enfin, les études de durée de vie de fluorescence de ces mêmes systèmes montrent que la décroissance de l'état excité de la chlorophylle α est monoexponentielle. Sa durée de vie est de $5,5 \pm 0,3$ ns, ce qui est caractéristique de l'état monomérique du pigment. La comparaison de nos résultats par rapport à des systèmes où le DGDG et le SQDG purifiés seraient employés permettraient de mieux définir les caractéristiques des interactions existant entre la chlorophylle α et les galactolipides.

REMERCIEMENTS

Ce mémoire est l'aboutissement de deux années de travail. Cependant, il reflète l'assistance de plusieurs personnes qui m'ont aidé à surmonter les difficultés de la recherche. À ce titre, je désire tout d'abord remercier sincèrement mon directeur de recherche, monsieur Roger M. Leblanc, pour ses judicieux conseils et son aide aux moments opportuns. Son enthousiasme face à la recherche est contagieux et stimulant.

J'almerais également souligner la grande patience de mon époux, Denis, tout au cours de ces années d'étude ainsi que sa généreuse contribution à la qualité de l'orthographe de ce travail.

Je voudrais de plus témoigner ma gratitude à ma grande amie, Anne-Marie Joly, dont le talent littéraire m'a permis d'alléger certains passages tortueux dans le texte qui suit.

Finalement, j'offre toute ma reconnaissance à mes collègues de travail qui m'ont encouragé à persévérer et spécialement à Gaétan Munger, Isabelle Dupont et Bogumil Zelent pour toute leur aide professionnelle.

TABLE DES MATIERES

	Page
RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iv
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX	xvi
CHAPITRES	
1- INTRODUCTION	1
1.1 Photosynthèse et organisation membranaire	1
1.2 Chlorophylle a	6
1.3 Lipides	14
1.4 Systèmes modèles	22
1.5 Objectifs de recherche	25
2- MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
2.1 Pureté de l'eau	26
2.2 Port des gants	27
2.2 Procédures de nettoyage de la verrerie	28

	Page
2.3.1 Lames de quartz	28
2.3.2 Matériel de grand volume	29
2.3.3 Autre matériel de verre	29
2.4 Molécules étudiées	31
2.4.1 Lipides commerciaux	31
2.4.2 Croissance des plants d'orge	32
2.4.3 Extraction des lipides	33
2.4.4 Extraction de la chlorophylle <i>a</i>	36
2.5 Chomatographie	38
2.5.1 Théorie générale	38
2.5.2 Chromatographie liquide sur colonne	43
Théorie	43
CL des lipides	45
CL des chlorophylles <i>a</i> et <i>b</i>	52
2.5.3 Chromatographie sur couche mince	57
Théorie	57
Lavage des plaques de CCM	58
CCM des lipides	60
CCM de la chlorophylle <i>a</i>	64

	Page
2.5.4 Chromatographie liquide à haute performance des lipides.	65
Théorie.	65
Solvants.	69
Contrôleur de gradient automatique.	70
Pompes.	71
Échantillons.	71
Injecteur.	72
Colonnes.	72
DéTECTEUR.	76
Enregistreur.	79
Autres précautions.	80
2.5.5 Chromatographie en phase gazeuse.	80
Théorie.	80
Méthylation.	83
Conditions d'analyse.	86
Analyse des résultats.	88
Matériel injecté.	90
2.6 Monocouches.	91

	Page
2.6.1 Théorie.....	91
2.6.2 Purification du phosphate de sodium dibasique.....	96
2.6.3 Bain de Langmuir et isotherme de pression de surface ..	96
2.6.4 Bain de déposition sur substrat solide.....	107
2.7 Spectroscopie de fluorescence.....	110
2.7.1 Théorie.....	110
2.7.2 Spectrofluorimétrie.....	115
2.7.3 Appareillage de la durée de vie de fluorescence.....	117
3- MÉTHODES PUBLIÉES EN CLHP.....	123
4- MONOGALACTOSYLDIACYLGlycérol.....	132
4.1 Chromatographie.....	132
4.1.1 CLHP et CCM.....	132
4.1.2 Mise en garde à propos des standards.....	157
4.1.3 CG.....	163
4.2 Monocouches et spectroscopie.....	173
4.2.1 Isothermes.....	173
4.2.2 Spectroscopie de fluorescence en monocouche	179
5- DIGALACTOSYLDIACYLGlycérol.....	192
5.1 Chromatographie.....	192

	Page
5.1.1 CLHP.....	192
5.1.2 CG.....	200
5.2 Isothermes.....	200
6- SULFOQUINOVOSYLDIACYLGLYCÉROL.....	203
6.1 Chromatographie.....	203
6.1.1 CLHP et CCM.....	203
6.1.2 CG.....	207
6.2 Isothermes.....	208
7- CONCLUSION.....	213
BIBLIOGRAPHIE.....	216
ANNEXE 1.....	227

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1- Schéma d'un chloroplaste	3
2- Schéma du modèle de la mosaïque fluide d'une membrane	3
3- Schéma d'une membrane thylacoïdienne	7
4- Structure moléculaire de la chlorophylle <i>a</i>	8
5- Spectre d'absorption de la chlorophylle <i>a</i> en solution dans l'éther ..	12
6- Diagramme explicatif des bandes d'absorption de la chlorophylle <i>a</i> par rapport aux niveaux d'énergie atteints	12
7- Structures moléculaires des trois principaux lipides du thylacoïde ..	15
8- Distribution des cinq principaux lipides du thylacoïde de part et d'autre de la bicoche membranaire	18
9- Organisation moléculaire de produits amphiphiles à l'interface azote-eau	24
10- Schéma de la séparation de deux produits, allure générale d'un chromatogramme et mesures essentielles aux calculs en chroma- tographie	40

Figure	Page
11- Chromatogrammes illustrant la différence entre la sélectivité et la résolution	44
12- Colonne de chromatographie liquide	46
13- Structure chimique du gel de Sepharose CL-6B	48
14- Structure partielle du gel de DEAE-Sepharose CL-6B	52
15- Schéma de la migration dans une chambre d'élution et mesures des distances parcourues par les produits de même que par le front de solvant	59
16- Schéma général d'un appareil de chromatographie liquide à haute performance	66
17- Diagramme du fonctionnement de l'injecteur Rheodyne, modèle 7126	73
18- Schéma moléculaire du gel de silice à sa surface	73
19- Schéma de la réfraction d'un faisceau lumineux	78
20- Diagramme du système de détection de l'appareil utilisé	78
21- Schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse	81
22- Mécanisme de la réaction de méthylation des acides gras des lipides	84
23- Structure moléculaire des greffons cyanopropyliques SP-2330 sur	

Figure	Page
le gel	89
24- Déposition d'une monocouche sur un solide hydrophile	95
25- Bain de Langmuir	97
26- Schéma général de la balance de Langmuir	100
27- Schéma du fonctionnement électrique d'un transducteur magnétique	102
28- Diagramme de Jablonski	112
29- Schéma général du spectrofluorimètre	116
30- Schéma de l'appareil de durée de vie de fluorescence utilisé	119
31- Chromatogramme de la méthode de CLHP proposée par Demandre et coll. (1985)	127
32- Chromatogramme obtenu par la méthode de Heemskerk et coll. (1986)	130
33- Chromatogrammes de la purification du MGDG	135
34- Chromatogrammes de la purification du MGDG	140
35- Chromatogrammes de la purification du MGDG	142
36- Chromatogrammes de la purification du MGDG	143
37- Chromatogrammes de la purification du MGDG	146
38- Chromatogrammes de la purification du MGDG, mélanges d'hexane,	

Figure	Page
d'isopropanol et d'eau (85/15/0,4)	148
39- Chromatogrammes de la purification du MGDG de Serdary (1986) en vue de calculer le rendement de la purification	150
40- Chromatogrammes de la purification du MGDG, extrait de l'orge, par CLHP	155
41- Chromatogramme de la purification du MGDG, extrait de l'orge, par CLHP utilisant la colonne de 10,0 mm de diamètre interne	158
42- Chromatogrammes de CLHP des échantillons de MGDG de la compta- gnie Serdary	161
43- Chromatogramme en CG de l'échantillon de MGDG de Supelco	165
44- Chromatogramme en CG de l'échantillon de Serdary 1986	166
45- Chromatogramme de l'analyse des acides gras du MGDG de Serdary 1988	168
46- Chromatogramme de CG du premier échantillon de MGDG extrait de l'orge et non purifié	170
47- Chromatogramme de CG du second échantillon de MGDG extrait de l'orge et non purifié	171
48- Chromatogramme de CG de l'échantillon de MGDG extrait de l'orge et purifié par CLHP	172

Figure	Page
49- Isotherme de pression de surface du MGDG de Serdary (1986) purifié par CLHP	175
50- Isothermes de pression de surface de MGDG extraits de l'orge	177
51- Spectre d'excitation de mélanges pigments/lipides en film LB	180
52- CCM de l'échantillon de MGDG brut extrait de l'orge, après la CL mais avant sa purification par CLHP	185
53- Chromatogramme de la purification du DGDG par CLHP selon la méthode de J.-P. Richard	193
54- Chromatogramme de la purification du DGDG, extrait de l'orge, par CLHP selon la méthode de J.-P. Richard	195
55- Chromatogramme de la réinjection du DGDG, extrait de l'orge, et purifié par CLHP selon la méthode de J.-P. Richard	196
56- Chromatogramme de la purification en mode isocratique du DGDG, extrait de l'orge, dans l'éluant constitué d'hexane, d'isopropanol et d'eau dans des proportions de 70/30/3	198
57- Chromatogramme de la purification en mode isocratique du DGDG, extrait de l'orge, dans l'éluant constitué d'hexane, d'isopropanol et d'eau dans des proportions de 70/30/2	199
58- Isothermes de pression de surface du DGDG (#9A _i) et d'un produit	

Figure	Page
contaminant du DGDG (#9A _{ii})	201
59- Chromatogramme de la purification du SQDG de Lipid Product par CLHP selon la méthode de J.-P. Richard	205
60- Isotherme de pression de surface du SQDG de Lipid Product, purifié par CLHP	209

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1- Nom, symbole et structure des principaux acides gras	16
2- Composition lipidique en pourcentage de masse des membranes thylacoïdiennes et de l'enveloppe des chloroplastes d'épinard	17
3- Origine des lipides commerciaux utilisés	32
4- Solvants d'élution et fractions de lipide chloroplastique récoltées en chromatographie liquide sur colonne sur gel de Sepharose CL-6B	50
5- Éluants de régénération du gel de Sepharose CL-6B après la séparation des lipides	51
6- Éluants de régénération du gel de DEAE-Sepharose CL-6B	55
7- Solvants d'élution pour la séparation des chlorophylles <u>a</u> et <u>b</u> sur la colonne de Sepharose CL-6B	56
8- Éluants de régénération du gel de Sepharose CL-6B après la séparation des chlorophylles	57
9- Solvants d'élution de chromatographie sur couche mince, R_f obtenus	

Tableau	Page
et R_f de la littérature	62
10- Limites de pression et débits maximums pour les colonnes utilisées	71
11- Conditions de détection en chromatographie liquide à haute performance	76
12- Conditions chromatographiques de l'analyse des acides gras méthylés des lipides du chloroplaste	86
13- Standards utilisés et leurs principaux acides gras méthylés	90
14- Comparaison des méthodes publiées en CLHP des lipides du chloroplaste	124
15- Conditions initiales de CLHP pour la purification du MGDG	133
16- Résultats des premières expériences de purification du MGDG	134
17- Variation des conditions expérimentales de purification du MGDG en CLHP	137
18- Masses des pics des produits détectés lors de la purification du MGDG de Serdary (1986)	151
19- Paramètres chromatographiques de la purification du MGDG de Serdary (1986) par CLHP	153
20- Composition en acides gras des échantillons de MGDG utilisés	163

Tableau	Page
21- Aires moléculaires à trois pressions de surface et pression au collapse de différents échantillons de MGDG	174
22- Durée de vie de fluorescence de mélanges chlorophylle <u>a</u> /MGDG (1/100) à l'interface azote-eau	182
23- Conditions initiales de CLHP pour la purification du SQDG	203
24- Moyenne des trois résultats des expériences de purification du SQDG par CLHP	204

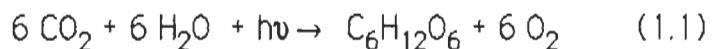
CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Photosynthèse et organisation membranaire

Les végétaux sont les principaux organismes vivants produisant de l'oxygène moléculaire (O_2) tandis que les animaux, incluant l'homme, le consomment. Les plantes maintiennent donc, par cette capacité de dégagement gazeux, toutes les formes de vie animale de notre planète qui ne subsisteraient pas sans elles.

Le processus générateur de l'oxygène est la photosynthèse. La réaction chimique globale de ce mécanisme est indiquée à l'équation 1.1 (Clayton, 1980). Il va sans dire que cette réaction est générale et ne rend pas la complexité des différentes étapes et intermédiaires connus et inconnus de la photosynthèse, car même à ce jour, de nombreux mécanismes de ce processus ne sont toujours pas clairement élucidés.



Les plantes consomment le dioxyde de carbone et l'eau, puis produisent, sous l'influence de l'énergie lumineuse, des sucres, qui sont utilisés ou réservés, et de l'oxygène qui est rejeté dans l'atmosphère. L'organite cellulaire où s'amorcent ces réactions est le chloroplaste, illustré à la Figure 1. Celui-ci est constitué d'une membrane externe qui l'isole du cytoplasme cellulaire. À l'intérieur du chloroplaste, on retrouve le stroma qui est un milieu aqueux où baignent des protéines, des sels, des ions ainsi que d'autres molécules complémentaires aux réactions photosynthétiques. Des structures membranaires essentiellement empilées, les thylacoïdes, sont également présentes à l'intérieur des chloroplastes. Le nombre de chloroplastes et de thylacoïdes, de même que leurs caractéristiques d'empilement (nombre d'amas membranaires ou grana) varient selon l'espèce végétale, le type de cellule et le stade de développement de la plante. Les membranes thylacoïdiennes sont principalement constituées de lipides particuliers, les galactolipides, qui forment la structure en bicouche, de protéines intrinsèques et extrinsèques nécessaires à la photosynthèse et de nombreux types de pigments, qui captent l'énergie lumineuse, ce qui permet d'activer les réactions de synthèse des sucres. La Figure 2 présente un modèle membranaire de la mosaïque fluide proposé par Singer et Nicholson en 1972. Ce modèle présente la membrane

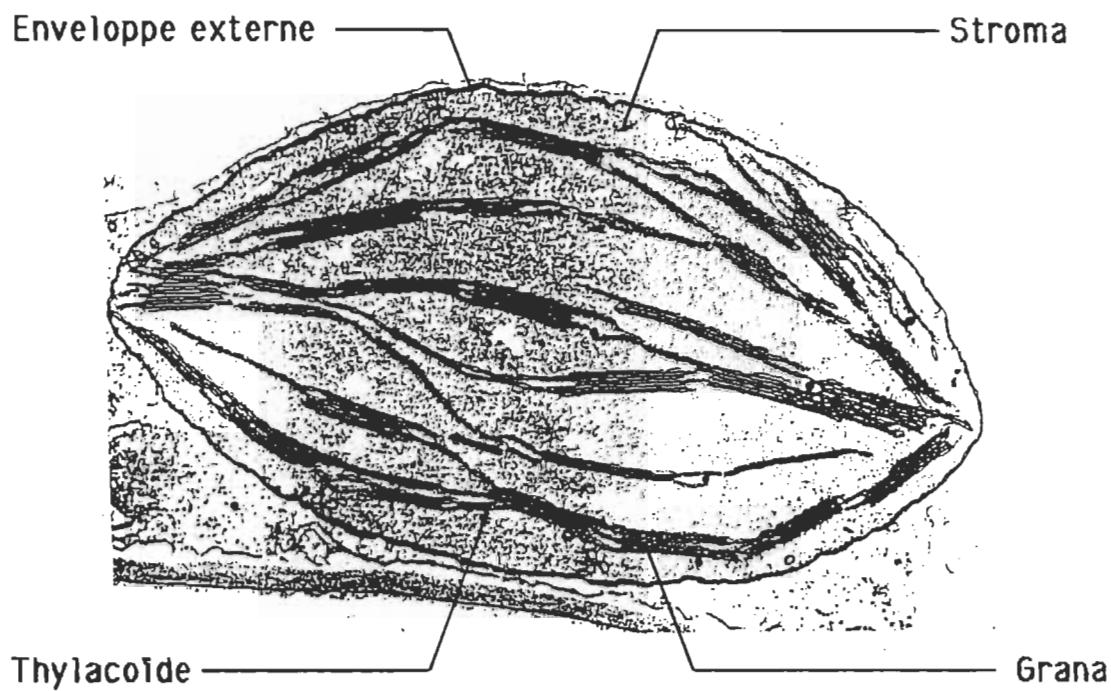


Figure 1. Schéma d'un chloroplaste (Lehninger, 1982).

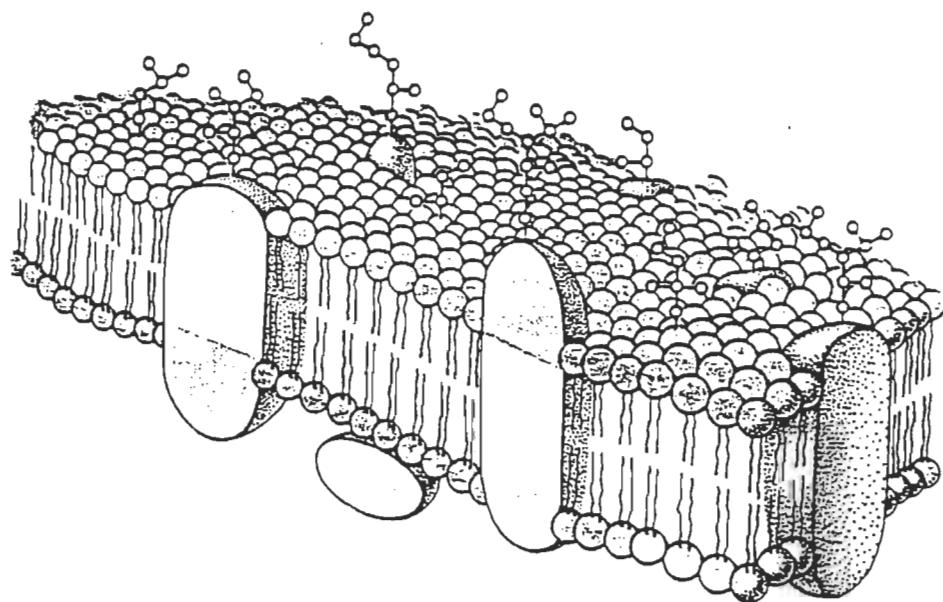


Figure 2. Schéma du modèle de la mosaïque fluide d'une membrane (Lehninger, 1982).

comme une bicouche dont les lipides s'orientent de façon à ce que les têtes polaires, représentées par des petits cercles, soient en contact avec les phases aqueuses, alors que les acides gras forment une barrière hydrophobe au centre de la bicouche. Les protéines se trouvant à la membrane peuvent la traverser entièrement, partiellement ou seulement s'y fixer, selon la nature de la protéine et les interactions qu'elle développe avec la bicouche. Bien que ce schéma général soit applicable à plusieurs types de membranes cellulaires, il représente tout de même l'arrangement propre aux thylacoïdes. Ceci nous amène à mentionner brièvement les éléments distinctifs des membranes photosynthétiques.

Les protéines qui se trouvent au niveau des membranes thylacoïdiennes peuvent être différenciées selon trois activités apparentes. Le *premier* groupe fonctionnel englobe les protéines actives lors de la séparation de charge. Cette dernière est générée par l'excitation d'un pigment particulier, qui est habituellement une chlorophylle *a*, situé au centre réactionnel du photosystème. Il existe deux genres de photosystèmes, se distinguant par leur structure et leur activité respectives dans le processus photosynthétique. Par l'absorption d'énergie lumineuse à son centre réactionnel, le photosystème 2 (PS2) transfert un électron vers le photo-

système 1 (PS1), par l'intermédiaire des protéines de la chaîne de transport des électrons. Son centre réactionnel est ensuite réduit grâce à l'acheminement d'un second électron provenant de l'oxydation de l'eau par l'action du système de dégagement de l'oxygène. Le PS1 peut également, par l'absorption d'énergie lumineuse, exciter un électron d'un pigment de son centre réactionnel et l'expédier vers une protéine productrice de NADPH, qui est un transporteur cellulaire d'hydrogène et d'électron et est utilisé entre autres dans la synthèse des sucres. La réduction de son centre réactionnel se fait par l'arrivée de l'électron du PS2 via la chaîne de transport qui aboutit au PS1. Ainsi, les charges positives créées et localisées sur les pigments, de même que les électrons séparés de ces centres de réaction, sont déplacés sous l'action d'une *deuxième* classe de protéines. Celles-ci constituent la chaîne transporteuse d'électrons, le système d'oxydation de l'eau et les autres appareils protéiques de la photosynthèse qui ne nécessitent pas directement l'absorption d'énergie lumineuse pour s'activer. Le *troisième* groupe de protéines qui se retrouvent aux membranes thylacoïdiennes forment les antennes des photosystèmes. Elles regorgent de pigments qui captent les ondes électromagnétiques et transmettent cette énergie interceptée, l'excitation photonique, d'un pigment à l'autre jusqu'à ce que l'exciton arrive au centre réactionnel du photosys-

tème. La Figure 3 illustre schématiquement l'arrangement membranaire des trois différentes classes de protéines ainsi que le cheminement que peut parcourir l'électron dans la membrane photosynthétique.

Les protéines ne sont pas uniformément distribuées à travers les thylacoïdes. Par exemple, les régions granaires sont particulièrement riches en PS2 alors que les membranes du stroma sont tout spécialement chargées de PS1 et d'ATPase.

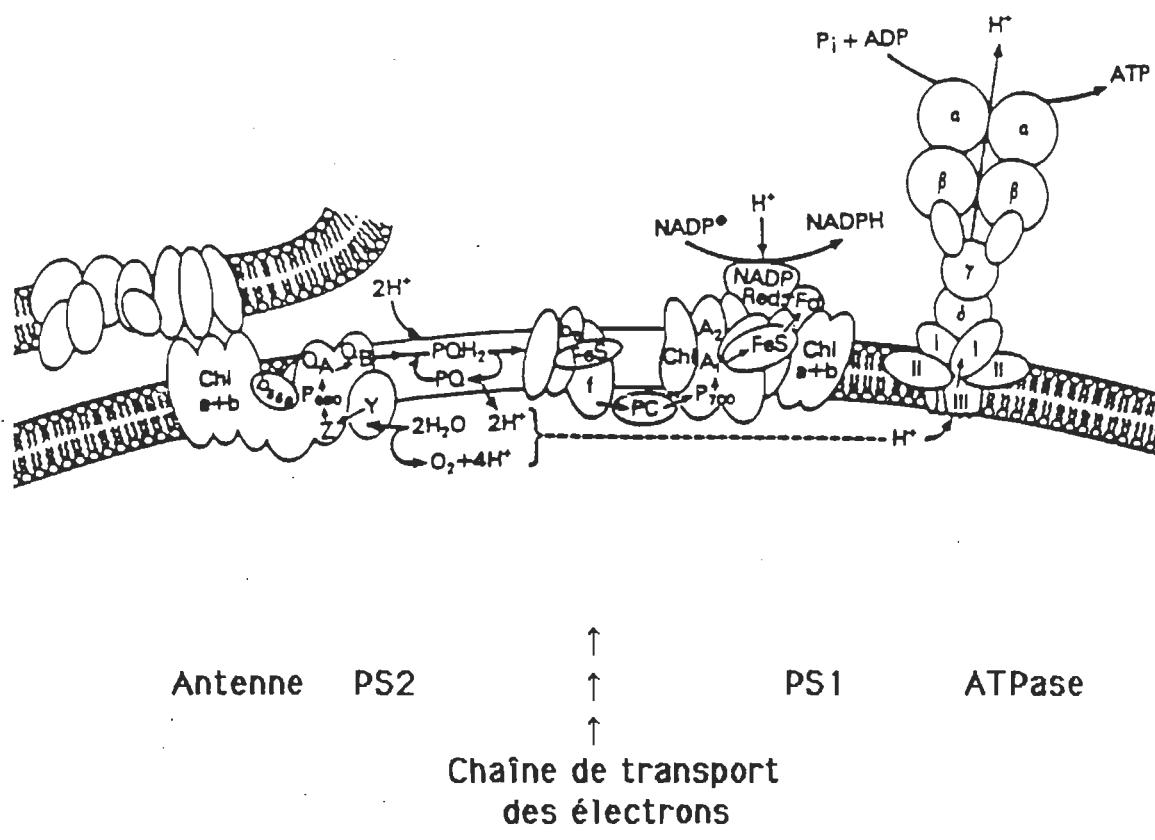
Deux autres caractéristiques particulières aux membranes de thylacoïdes sont les pigments et les lipides qu'elles contiennent. Les sections qui suivent décrivent plus spécifiquement ces deux groupes de molécules propres à ces structures.

1.2 Chlorophylle a

Les chloroplastes contiennent plusieurs types de pigments tels que les caroténoïdes, les xanthophylles et les chlorophylles. La chlorophylle a dont la structure apparaît à la Figure 4, est cependant le pigment principal des algues et des plantes productrices de spores et de graines, en quantité et en fonction dans le mécanisme photosynthétique. Elle est aussi présente dans tous les autres organismes qui dégagent de l'oxygène pendant la

Régin granaire

Région lamellaire



Intérieur du thylacoïde

Figure 3. Schéma d'une membrane thylacoïdienne.

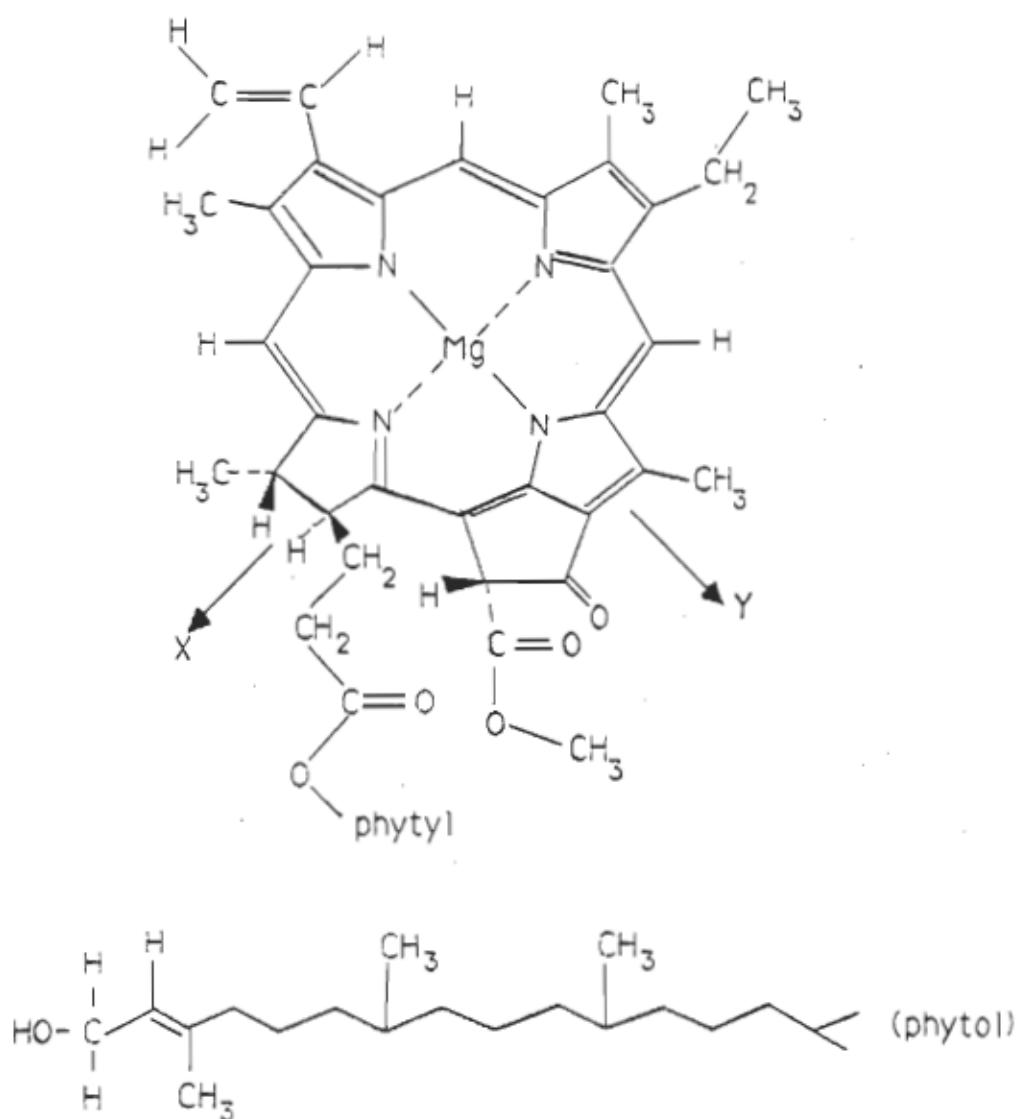


Figure 4. Structure moléculaire de la chlorophylle a.

photosynthèse (Svec, 1978). C'est également cette molécule qui est responsable de la coloration verte des plantes. Il s'agit d'un composé tétrapyrrole cyclique possédant un atome de magnésium à son centre et une queue hydrophobe qui est un résidu phytol. Les propriétés chimiques de cette molécule amphiphile sont les suivantes: la chlorophylle α est insoluble dans l'eau, soluble dans la plupart des solvants organiques et elle est détruite et dégradée par les bases et acides forts. Sa formule chimique est $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ et sa masse moléculaire est de 892,535 g/mol.

Les doubles liaisons du cycle tétrapyrrolique sont toutes conjuguées, ce qui explique la grande capacité d'absorption de cette molécule. L'atome de magnésium est neutre et possède deux liaisons covalentes avec deux atomes d'azote opposés dans le cycle tétrapyrrolique et deux liaisons de coordination avec les deux autres atomes d'azote, qui portent une double liaison. Une cinquième coordination avec de l'eau, un solvant ou avec le groupement carbonyl à la position 9 d'une autre chlorophylle α est couramment sinon toujours observée *in vitro*. Ceci provoque un déplacement de l'atome de magnésium à l'extérieur du plan tétrapyrrolique pour former une structure pyramidale à base carrée autour de cet atome (Cotton et Wilkinson, 1988). Le rôle de l'atome de magnésium est d'aider à main-

tenir la rigidité de la molécule de façon à ce que l'énergie d'excitation ne soit pas trop facilement dégradée en vibrations moléculaires. La présence de cet atome au centre de la molécule augmente également le taux de transformation de l'état singulet excité de courte durée de vie, qui est formé lors de l'absorption d'un photon, à l'état triplet de plus longue durée de vie qui peut alors transférer l'électron vers la chaîne de transport (Cotton et coll., 1987). La dégradation de la chlorophylle α par la perte de cet atome, la phéophytinisation, se produit très facilement par contact avec de l'oxygène, de l'acide ou par une intense radiation lumineuse.

Environ 99 % de ces molécules photoréceptives sont situées dans les complexes collecteurs de lumière alors que la différence est localisée dans les centres réactionnels des photosystèmes (Brown, 1977). Dans les antennes, les chlorophylles α agissent, de concert avec d'autres pigments, comme un entonnoir dirigeant l'excitation photonique vers le centre réactionnel des photosystèmes. Ce mécanisme n'est possible qu'à condition que la vitesse de transfert excitonique soit plus grande que les vitesses de tous les autres mécanismes de désactivation existants. En fait, l'efficacité du transfert d'énergie est très grande et ce, grâce à l'organisation des chlorophylles α qui doivent être bien orientées les unes par rapport

aux autres et espacées d'au moins 10 Å et d'au plus 70 Å (Thornber, 1986).

Dans les centres réactionnels, les chlorophylles a sont intimement engagées dans les mécanismes de séparation de charge brièvement expliqués au préalable, en réduisant la quinone Q_A ou le complexe FeS dans les photosystèmes 2 et 1, respectivement.

L'absorption d'énergie lumineuse par la chlorophylle a, dont le spectre est illustré à la Figure 5, produit une excitation d'un électron π du cycle porphyrrique du pigment. Afin de bien saisir la signification de ces bandes, la symétrie de la chlorophylle a est établie selon deux axes, x et y, tels qu'indiqués à la Figure 4. Les bandes situées autour de 410 à 430 nm forment la bande de Soret. Il s'agit d'un niveau énergétique π^* de plus grande énergie que les bandes Q s'étalant de 530 à 660 nm. La bande de Soret comprend deux niveaux d'énergie différents se différenciant selon la polarisation de la transition électronique. Les bandes Q, qui sont aussi attribuables à une transition $\pi-\pi^*$, mais à un plus faible niveau d'énergie, sont divisées à la fois selon l'orientation de la polarisation mais aussi selon le niveau vibrationnel (0 ou 1) de l'état π_x^* ou π_y^* atteint. La Figure 6 démontre par un diagramme simplifié les niveaux d'énergie atteints cor-

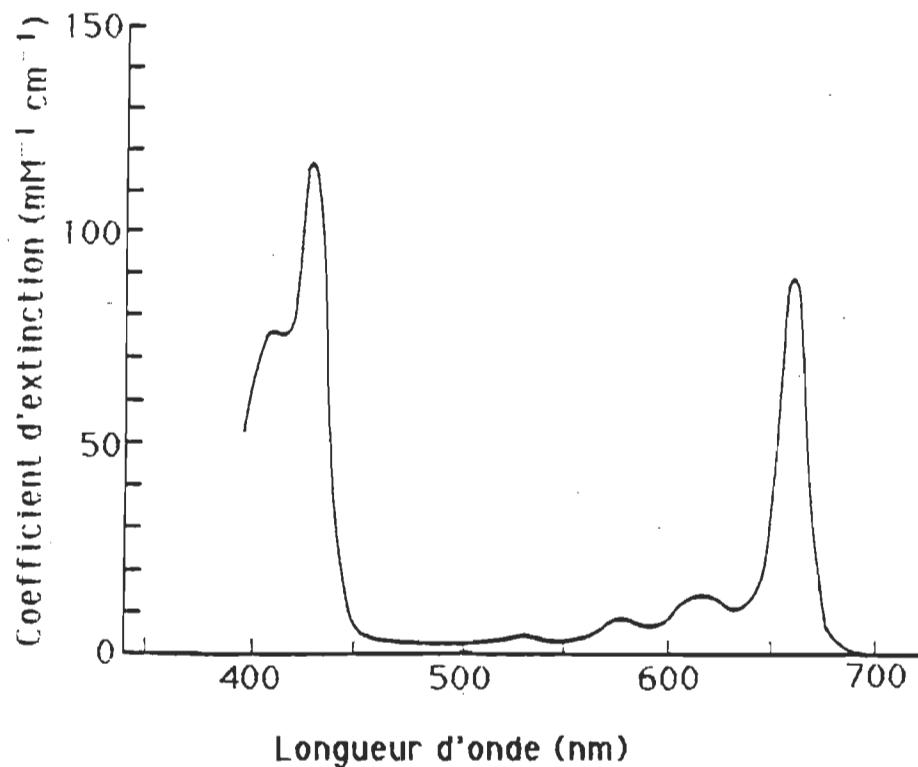


Figure 5. Spectre d'absorption de la chlorophylle α en solution dans l'éther (Clayton, 1980).

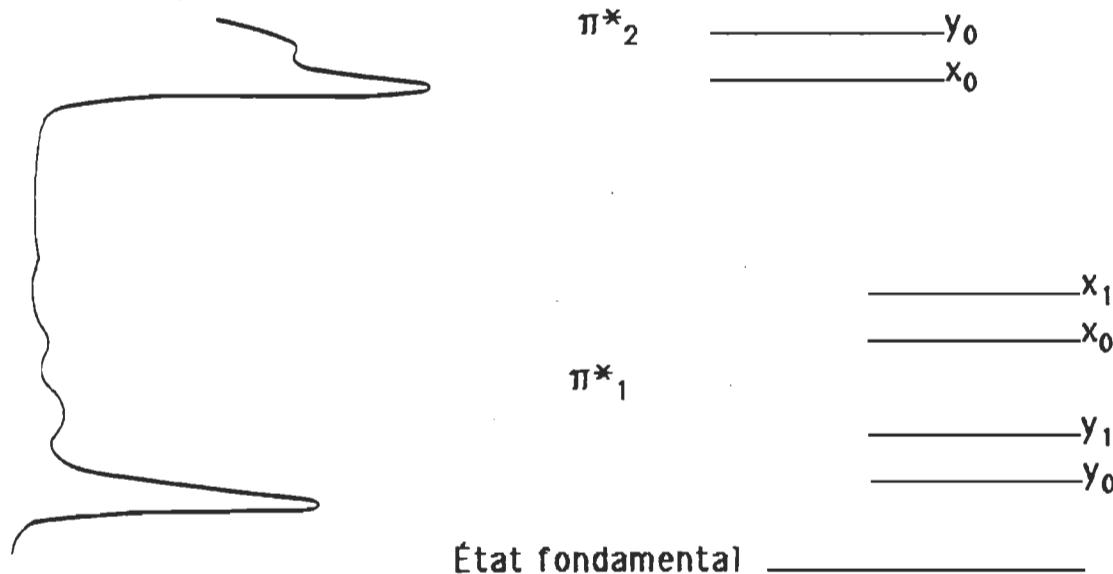


Figure 6. Diagramme explicatif des bandes d'absorption de la chlorophylle α par rapport aux niveaux d'énergie atteints.

respondant à chaque bande du spectre d'absorption de la chlorophylle α .

La fluorescence est l'une des caractéristiques physiques de la chlorophylle α la plus étudiée, car il s'agit d'une mesure directe de l'état d'excitation dû à l'absorption d'un photon. Puisque c'est l'état excité de la chlorophylle α qui est responsable de la propagation de l'exciton dans l'antenne photosynthétique, de même que de la séparation de charge au niveau du centre réactionnel, on comprend l'importance de ces études, que ce soit chez l'organisme entier, dans des fragments de tissus ou dans les systèmes modèles.

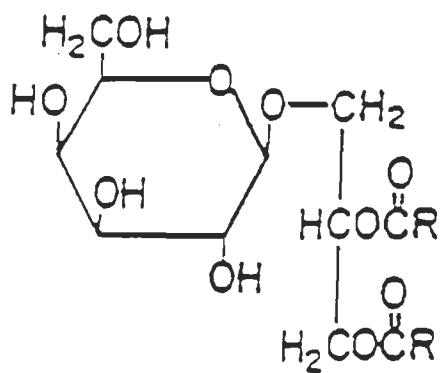
Les spectres d'émission de fluorescence *in vitro* varient selon les conditions expérimentales, mais de façon générale, on observe une bande principale autour de 680 nm. Elle représente l'émission de la radiation produite par le transfert d'un électron du niveau excité inférieur π^* (Q) vers l'état fondamental. On n'observe pas de fluorescence à partir du second niveau excité atteint par une radiation dans la bande de Soret, car la désactivation thermique de ce niveau jusqu'au niveau excité inférieur est plus rapide que la fluorescence.

1.3 Lipides

Dans la plupart des thylacoïdes des plantes supérieures, les galactolipides constituent la majorité des lipides de ces membranes. Les structures de trois de ces principaux lipides sont illustrées à la Figure 7.

Le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) sont des lipides neutres mais polaires. Ils possèdent une tête hydrophile constituée respectivement d'un et de deux groupements galactoses attachés à un groupement glycol. À ce dernier est également lié deux chaînes d'acides gras estérifiés. Ces acides gras sont des hydrocarbures généralement composés de 14 à 22 carbones avec de 0 à 5 insaturations. Le Tableau 1 indique les structures des principaux acides gras présents dans les lipides des thylacoïdes (McMurry, 1984).

Dans les chloroplastes matures, le rapport entre la quantité de MGDG et de DGDG est généralement situé autour de deux (2). L'empilement des thylacoïdes est probablement favorisé par la neutralité de ces lipides car il n'y a pas de répulsion électrostatique possible entre deux membranes adjacentes (Hoober, 1984 et Sprague, 1987).



Monogalactosyldiacylglycerol
(MGDG)

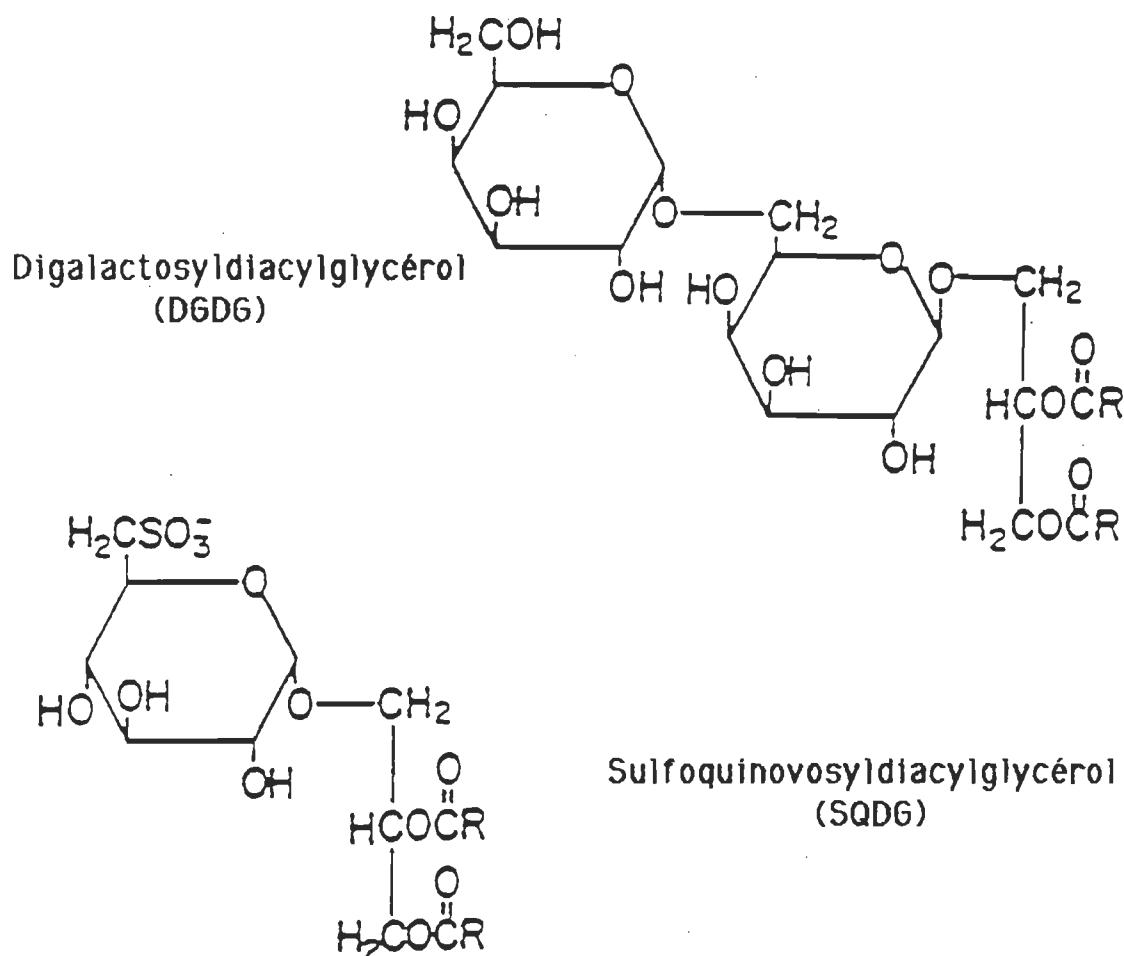


Figure 7. Structures moléculaires des trois principaux lipides du thylacoïde (Hoover, 1984).

Tableau 1

Nom, symbole et structure des principaux acides gras.

Nom	Symbole	Structure
Acide myristique	C14:0	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$
Acide palmitique	C16:0	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$
Acide palmitoléique	C16:1	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
Acide stéarique	C18:0	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$
Acide oléique	C18:1	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
Acide linoléique	C18:2	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-(\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH})_2-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
Acide linolénique	C18:3	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH})_3-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$

Le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) est un lipide chargé négativement dont la tête polaire est constituée d'un glycol et d'un sucre possédant un groupement sulfonique au sixième carbone.

Les lipides sont des molécules amphiphiles car elles sont à la fois hydrophiles, par leur tête polaire, et hydrophobes, par leurs chaînes d'acides gras. Le Tableau 2, tiré d'un article de Douce et Joyard (1980), indique les pourcentages relatifs des différents lipides dans l'enveloppe du chloroplaste ainsi que dans les membranes thylacoïdiennes. Ces proportions sont représentatives de la plupart des plantes supérieures.

Tableau 2

Composition lipidique en pourcentage de masse des membranes thylacoïdiennes et de l'enveloppe des chloroplastes d'épinard.

Lipide	Thylacoïde	Enveloppe
Monogalactosyldiacylglycérol (MGDG)	52	16
Digalactosyldiacylglycérol (DGDG)	26	27
Trigalactosyldiacylglycérol (TGDG)	nd	7
Tétragalactosyldiacylglycérol (TTGDG)	nd	1
Sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG)	6,5	6,5
Phosphatidylcholine (PC)	4,5	20
Phosphatidylglycérol (PG)	9,5	11
Phosphatidylinositol (PI)	1,5	1,5
Diacylglycérol (DG)	nd	10

nd: non détecté

La Figure 8, tirée de l'article de Siegenthaler et coll. (1987), reflète l'organisation des principaux lipides dans les membranes thylacoïdiennes.

Selon les données de Douce et Joyard (1980), chez l'épinard, 98 % du MGDG et 91 % du DGDG des thylacoïdes sont constitués de chaînes polyinsaturées (C16:3 et C18:3). À noter que selon le Tableau 2, ces deux types de molécules totalisent 78 % des lipides présents dans ces structures.

Le rôle de ces galactolipides particuliers aux chloroplastes n'est pas encore bien élucidé, mais les études dans ce sens se font de plus en plus

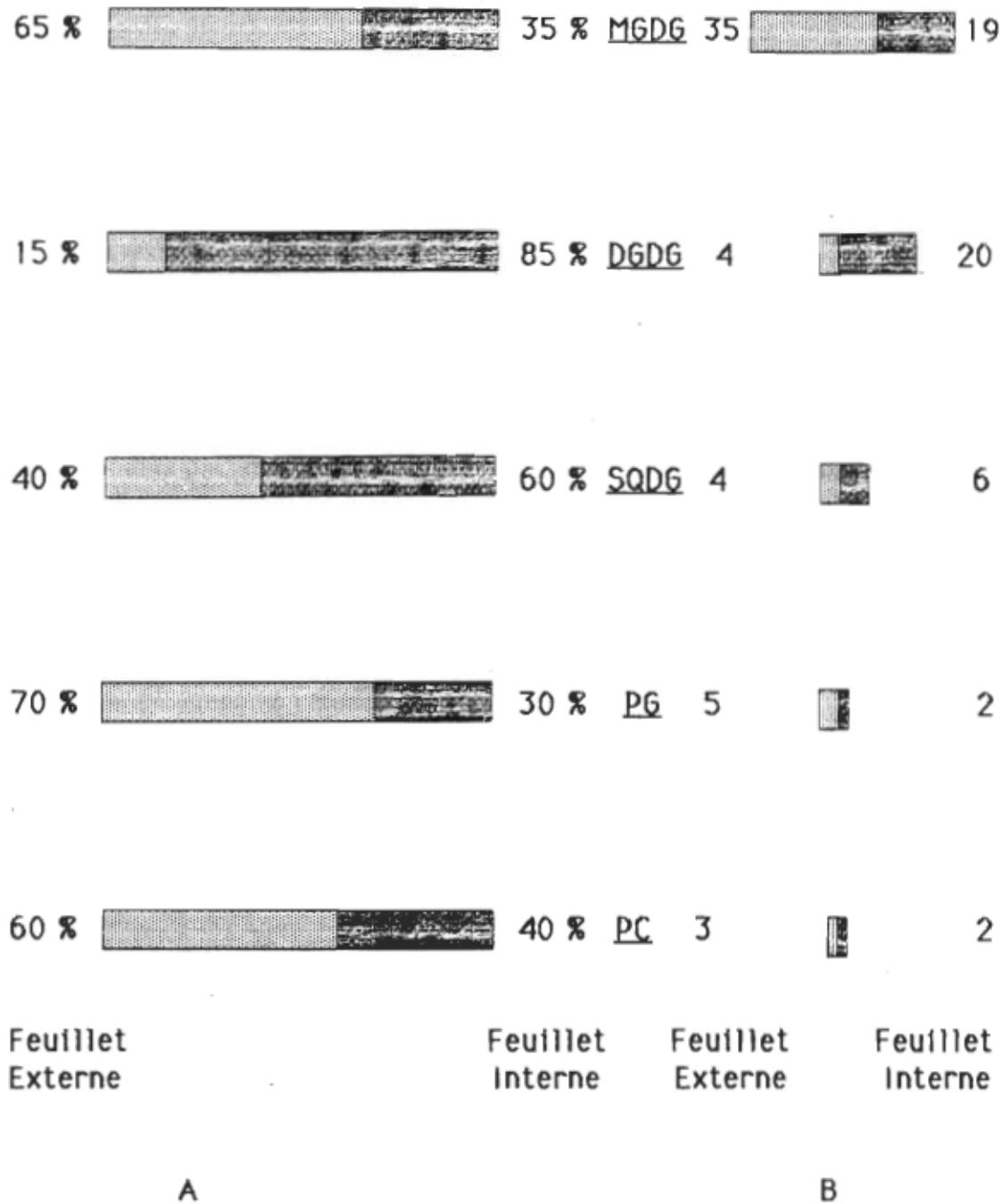


Figure 8. Distribution des cinq principaux lipides du thylacoïde de part et d'autre de la bicouche membranaire; A, en pourcentage de chaque lipide, et B, en fonction des quantités respectives (Siegenthaler et coll., 1987).

actives. L'une des caractéristiques membranaires la plus affectée par le type de lipides présents est la fluidité. Plusieurs auteurs laissent entendre que les galactolipides, principalement insaturés, augmentent la fluidité membranaire, car les doubles liaisons augmentent l'espace occupé par le lipide. Bishop et coll. (1978) rapportent, dans leurs études de temps de relaxation en résonnance magnétique nucléaire, que l'amplitude des mouvements des atomes de carbone des acides gras d'un lipide insaturé s'accroît en se déplaçant de la tête polaire vers le bout de la chaîne de l'acide gras. Ils font également remarquer que les mouvements d'un atome particulier d'un acide gras sont affectés par la nature (l'insaturation) du second acide gras du lipide. Selon les auteurs, ce type d'interaction entre les chaînes d'acides gras est probablement responsable de la conservation d'une fluidité optimale dans les membranes. Plusieurs processus photosynthétiques dépendant de l'action de protéines, tels que le transport des électrons entre le PS2 et le PS1, impliquent la diffusion latérale de certaines composantes membranaires. Or, la diffusion est réglée, entre autres, par la fluidité membranaire. C'est ainsi que Chapman et coll. (1982), en diminuant la fluidité d'une membrane par l'incorporation de stérols ou en diminuant la température de croissance des plants, réussissent à réduire l'activité de la chaîne de transport des électrons. Les galactolipides

pourraient donc avoir un rôle dans le maintien des caractéristiques du milieu membranaire de façon à permettre un bonne mobilité des protéines. D'autres études suggèrent que l'action de ces lipides est plus directe dans la différenciation ou dans la stabilité des complexes photosynthétiques. Par exemple, les études de Bishop et Kenrick (1980) posent pour hypothèse que les galactolipides neutres (MGDG et DGDG) ont des interactions hydrophobes spécifiques avec certaines protéines intrinsèques des membranes photosynthétiques, plus particulièrement avec le complexe collecteur de lumière du PS2 et avec le PS1. Par contre, Anderson (1975) rapporte que les galactolipides sont concentrés dans les zones fluides des membranes alors que les phospholipides et le SQDG, qui sont en général plus saturés et donc plus rigides, limitent ces zones et sont intimement liés aux protéines. Un troisième groupe de chercheurs, Rawyler et coll. (1980), ont remarqué que les lipides associés au complexe antenne du PS2 sont principalement des galactolipides et de la PG (insaturés), tandis que le PS1 est entouré de SQDG et de PI, lipides chargés et plus saturés. Pour sa part, Sprague (1987) rapporte que les lipides dont les chaînes sont principalement insaturées peuvent jouer un rôle important pour l'augmentation de la résistance au froid.

Afin de mieux comprendre les propriétés membranaires des galactolipides, certains auteurs, dont Rawyler et coll. (1987), se sont penchés sur la distribution de ces molécules dans les membranes. Leur hypothèse de départ est basée sur le fait que la plupart des protéines intrinsèques sont distribuées asymétriquement dans les membranes, et ce afin d'effectuer une activité particulière dans un sens spécifique, comme le pompage de protons. Les lipides pourraient donc posséder une asymétrie dans la membrane, comme on l'observe chez les protéines. Les résultats de ces études sont souvent contradictoires à cause de la diversité des méthodes utilisées, certaines étant plus fiables que d'autres. Rawyler et coll. (1987) observent que dans tous les thylacoïdes qu'ils ont étudiés (six espèces de plantes), la demi-membrane externe contenait de 53 à 65 % du MGDG présent dans les structures des thylacoïdes, alors que le feuillet interne contenait de 78 à 90 % du DGDG.

Plusieurs de ces rôles attribués aux galactolipides ne sont, à l'heure actuelle, que des hypothèses et des spéculations. Toutefois, les recherches s'orientent de plus en plus vers ces petites molécules (comparativement aux complexes protéiques) qui composent en moyenne de 35 à 40 % des membranes thylacoïdiennes.

1.4 Systèmes modèles

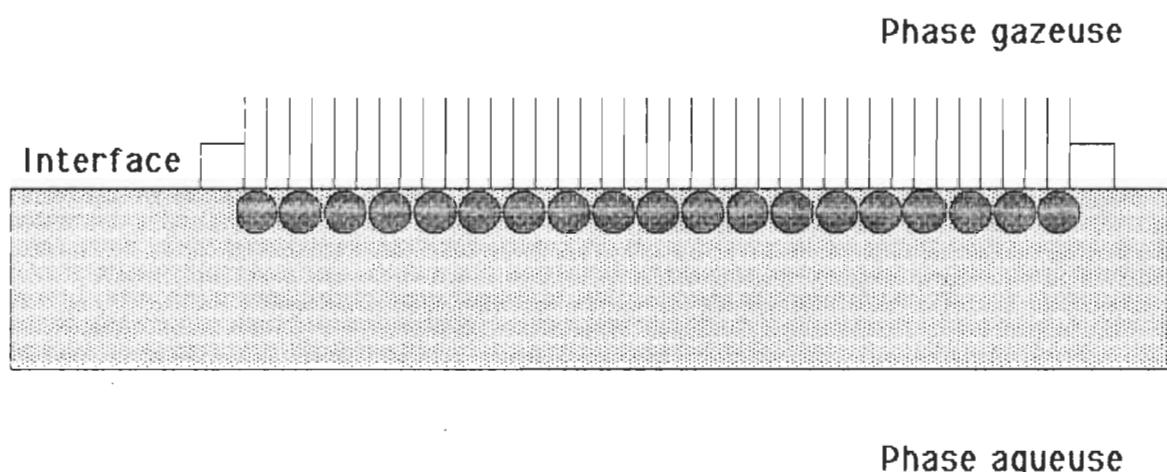
Les résultats des études *in vivo* de molécules aussi importantes que les chlorophylles ou les galactolipides sont souvent difficiles à interpréter étant donné la complexité du système étudié. Les systèmes modèles des membranes tels que les monocouches ou les films Langmuir-Blodgett (LB) offrent l'avantage d'une simplicité relative tout en conservant une certaine organisation des lipides et des pigments.

Benjamin Franklin, dans une lettre qu'il écrivait à un collègue en 1773 a été le premier à décrire une expérience utilisant la capacité des molécules amphiphiles à former une monocouche à la surface de l'eau. Depuis le développement du bain de Langmuir en 1917, les études en monocouches se sont multipliées et aujourd'hui, plusieurs domaines, dont la photosynthèse, bénéficient de ces modèles membranaires. Une monocouche est l'établissement à la surface d'une phase aqueuse (ou autre phase liquide) d'une petite quantité de molécules amphiphiles, de façon à ce que la couche formée ait une molécule d'épaisseur. L'organisation des molécules est alors établie ainsi: la tête polaire (ou un groupement hydrophile) pénètre dans la phase aqueuse alors que les groupements hydrophobes se redressent vers la phase gazeuse au-dessus de celle-ci. Selon le degré de compres-

sion de la monocouche, les molécules à l'interface se réorientent les unes par rapport aux autres. La Figure 9 illustre l'orientation des molécules amphiphiles à l'interface azote-eau. Les films LB sont constitués de monocouches ou de multicoches que l'on a transférées sur un substrat solide.

Les avantages de l'étude des molécules biologiques dans ces systèmes modèles sont nombreux. Les caractéristiques physiques des molécules seules sont établies, puis la complexité du système augmente peu à peu en y ajoutant de nouvelles composantes membranaires, en proportions désirées. Ainsi, le système des monocouches ou des films LB se rapproche de plus en plus d'une demi-membrane biologique. En plus de caractériser l'organisation lipidique, les études en monocouche permettent aussi de déterminer la mobilité des lipides et d'identifier les interactions entre les lipides et les substances dissoutes dans la sous-phase. Ces expériences en monocouche sont aussi compatibles avec des études photophysiques telles que la fluorescence et la durée de vie de fluorescence à condition, bien sûr, d'incorporer à la monocouche des molécules luminescentes. Cependant, la plus grande difficulté de la recherche en monocouche est la propreté du matériel utilisé ainsi que la pureté des molécules étudiées. Généralement, la présence de contaminants tensioactifs affecte les caractéristiques

GROUPEMENTS HYDROPHOBES



GROUPEMENTS HYDROPHILES

Figure 9. Organisation moléculaire de produits amphiphiles à l'interface azote-eau.

physiques de la monocouche à un point tel que les résultats sont souvent inutilisables.

1.5 Objectifs de recherche

Le projet de recherche qui fait l'objet de ce mémoire est dans un premier temps la purification par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) des trois lipides principaux des thylacoïdes, soit le MGDG, le DGDG et le SQDG. Cette technique d'analyse très puissante et également fort utile en purification, ainsi que toutes les autres méthodes utilisées sont décrites dans le chapitre suivant. Les purifications sont suivies de la caractérisation en monocouche par les isothermes de pression de surface. Par des mesures de durée de vie de fluorescence de mélanges de chlorophylle α et de MGDG en monocouche, nous espérons caractériser le type d'interaction qui existe entre la chlorophylle α et ce galactolipide. La comparaison de nos études à celles de la littérature aidera à mettre en valeur les interactions qui existent entre la chlorophylle α et les lipides dans les systèmes constitués de galactolipides ainsi que de lipides étrangers aux thylacoïdes.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le but ultime de la purification des lipides par CLHP est l'étude en monocouche de systèmes modèles tels que les mélanges pigments-lipides et plus tard, photosystèmes-lipides. Ce genre d'étude est tout particulièrement vulnérable à la présence d'impuretés. Nous avons donc porté une attention particulière à la propreté du matériel de laboratoire utilisé. Voici quelques mesures qui ont été prises au cours de nos expériences.

2.1 Pureté de l'eau

Nous utilisons de façon régulière quatre qualités d'eau. L'eau de l'alimentation courante est principalement employée lors des premières étapes de lavage du matériel. L'eau filtrée provient d'un système «NANOpure» à trois cartouches (Sybron-Barnstead, Boston, MA), qui élimine les matières organiques, bactéries, ions et particules dont le diamètre dépasse 0,2 µm. L'eau ainsi filtrée a une résistivité spécifique de l'ordre de 2 à 3 MΩ·cm. L'eau déminéralisée est produite par un système plus performant à quatre cartouches (Sybron-Barnstead, Boston, MA); cette eau possède une résistivité

vité spécifique normalement comprise entre 17,9 et 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$. Les eaux filtrées et les eaux déminéralisées ont été utilisées dans diverses étapes du nettoyage de la verrerie. L'eau déminéralisée peut être introduite dans un système de double distillation en quartz (Heraeus-Quarzschmelze, modèle Bi 18, Hanau, Allemagne) ce qui nous donne l'eau la plus pure que l'on puisse utiliser pour le bain de monocouche, les rinçages finals lors du lavage de la verrerie, les diverses solutions tamponnées et dans les mélanges de solvants pour le système CLHP. L'eau bidistillée est conservée durant un maximum de cinq jours dans un contenant de verre fermé hermétiquement.

2.2 Port des gants

Nous avons toujours porté des gants, que ce soit lors du nettoyage de la verrerie, de la manutention des bouteilles d'eau bidistillée ou lors de la purification d'un produit. Des gants de caoutchouc sont d'usage lorsqu'il y a danger pour l'expérimentateur, lors du lavage du matériel ou durant l'extraction des lipides et des pigments, tandis que des gants de coton sont utilisés dans tout les autres cas. En fait, tout ce qui entre en contact, de près ou de loin, avec les lipides, les pigments ou l'eau utilisée pour le bain de monocouche est manipulé avec des gants. Ceci a pour but d'éviter de contaminer le bain ou les produits par les graisses naturelles présentes

sur la peau et qui ont une grande activité de surface de même qu'une grande affinité pour les lipides.

2.3 Procédures de nettoyage de la verrerie

2.3.1 Lames de quartz. Le nettoyage des lames de quartz servant à la déposition de monocouches en films Langmuir-Blodgett s'inspire de la méthode de Munger et coll., 1987. Le nettoyage commence en frottant les lames avec un papier absorbant imbibé d'éthanol. Les lames sont ensuite placées sur un porte-lames de Téflon et rincées avec un jet d'éthanol, puis à l'eau du robinet. Le tout est introduit dans un bêcher rempli d'eau à laquelle nous ajoutons environ un gramme de détergent en poudre (Sparkleen, Fisher Sci., Nepean, ON). Le bêcher est recouvert de papier d'aluminium et l'eau est portée à ébullition pendant cinq minutes. Les lames sont par la suite rincées à l'eau du robinet, puis à l'eau déminéralisée. L'étape d'ébullition est répétée, puis les lames sont rincées à l'eau bidistillée. Après cette étape, les lames sont trempées dans l'acide sulfochromique (Fisher Sci., Fair Lawn, NJ) durant au moins 72 heures, en scellant le bêcher à l'aide d'une pellicule de plastique résistante à l'acide. Les lames sont ensuite abondamment rincées à l'eau filtrée et à l'eau déminéralisée. Nous neutralisons les lames par un trempage de cinq minutes dans un bain ultrasonique en présence d'hydroxyde de sodium 10^{-2} N (Fisher Sci., Fair Lawn, NJ).

Puis, elles sont copieusement lavées à l'eau déminéralisée et à l'eau bidistillée. Un second trempage de 15 minutes dans le bain ultrasonique et dans l'eau bidistillée termine le nettoyage. Quelques minutes avant la déposition, les lames utilisées le jour même du lavage final sont séchées sous un fort jet d'azote.

2.3.2 Matériel de grand volume. L'Erlenmeyer de quatre litres, utilisé pour faire le tampon lors des études en monocouche, ainsi que les bouteilles dans lesquelles nous conservons l'eau bidistillée, deviennent très lourds lorsque nous les remplissons d'acide sulfurique pour le nettoyage, ce qui représente un danger potentiel. Or, il existe une solution de recharge intéressante qui utilise de l'acide fluorhydrique qui, tout en étant moins dense, nettoie profondément le verre en le rongeant peu à peu. Ces grands contenants sont ainsi lavés en y laissant tremper durant 20 minutes une solution de 50 % d'acide fluorhydrique (Fisher Sci., Fair Lawn, NJ) que nous récupérons. Ensuite, nous les rinçons de nombreuses fois avec de grands volumes d'eau filtrée. La neutralisation par trempage d'une solution d'hydroxyde de sodium 10⁻² N (Fisher Sci., Fair Lawn, NJ) pendant 20 minutes est suivie de nombreux autres rinçages à l'eau filtrée, à l'eau déminéralisée, puis à l'eau bidistillée.

2.3.3 Autre matériel de verre. La veille du nettoyage de la ver-

serie (cellules optiques , bouteilles d'échantillons et autre matériel de laboratoire en verre), environ 50 g d'oxydant inorganique sans ion métallique (Nochromix, Godax Lab. Inc., New York, NY) sont versés dans chacune des bouteilles d'acide sulfurique (Anachemia, Montréal, QC ou Canlab, Mississauga, ON) réservées à cet usage. La solution de nettoyage ainsi préparée n'est utilisable que pendant quatre ou cinq jours. Les bouteilles et autres verreries qui ont contenu de la chlorophylle ou des lipides sont rincées à l'acétone, puis à l'éthanol. Dans le cas où des traces de papier collant paraissent sur les parois externes du matériel à nettoyer, nous enlevons ces résidus organiques en les frottant avec des papiers absorbants imbibés d'hexane. Toute la verrerie, sauf les cellules optiques, est nettoyée au détergent (Sparkleen, Fisher Sci., Nepean, ON) en prenant soin de rincer abondamment à l'eau du robinet. Nous versons alors la solution de nettoyage à base d'acide à l'intérieur de toute la verrerie et la laissons reposer pendant environ 20 minutes. Les pièces qui brunissent au contact de l'acide doivent être débarrassées de l'acide qu'elles contiennent en les rinçant à l'eau avant de les remplir à nouveau. Le brunissement est produit par l'oxydation de composés organiques et risque de contaminer toute verrerie qui sera en contact avec la solution brunie. La solution de nettoyage non brunie est cependant réutilisable. La verrerie est rincée à l'eau du robinet et à l'eau déminéralisée. La neutralisation par trempage dans

une solution d'hydroxyde de sodium 10^{-2} N (Fisher Sci., Fair Lawn, NJ) dure 20 minutes. Le matériel propre est à nouveau rincé à l'eau déminéralisée et à l'eau bidistillée. Toute la verrerie est séchée à l'étuve à 100 °C pendant quelques heures, excepté les cellules optiques qui sont séchées sous jet d'azote. Les septums et couvercles des bouteilles à échantillons doivent être nettoyés par frottage à l'acétone et à l'éthanol. Les couvercles sont ensuite lavés à l'eau déminéralisée et à l'eau bidistillée. La verrerie propre et sèche est protégée de la poussière en recouvrant les ouvertures d'un papier d'aluminium ou d'une pellicule de plastique telle que le chlorure de vinyl (Saran Wrap, Dow Chem., Midland, MI). Les bouteilles à échantillons doivent être remplies d'azote ou d'argon et fermées hermétiquement.

2.4 Molécules étudiées

Les lipides utilisés tout au long de ce travail ont différentes origines. La mise au point de la technique de séparation ainsi que certaines mesures thermodynamiques à l'interface azote-eau ont été effectuées à l'aide d'échantillons lipidiques commerciaux. Cependant, la majeure partie du travail a été exécutée à partir de lipides et de pigments extraits. Les sections qui suivent présentent l'origine des lipides commerciaux ainsi que les méthodes d'extraction des lipides et des pigments.

2.4.1 Lipides commerciaux. Les lipides commerciaux ont été

principalement utilisés au cours des étapes de mise au point des méthodes de CLHP. Ces lipides, facilement disponibles, nous ont permis d'accélérer la réalisation de la séparation en nous évitant les longues étapes de l'extraction. Le Tableau 3 indique l'origine des lipides commerciaux dont nous nous sommes servis.

Tableau 3

Origine des lipides commerciaux utilisés.

Lipide	Fournisseur	Origine	Acides gras principaux
MGDG	Serdary	Blé	C16:0 (21 %) et C18:2 (50 %)
	Serdary	Blé	C16:0 (21 %) et C18:2 (61 %)
	Supelco	Épinard	C16:0 (23 %) et C18:0 (73 %)
SQDG	Lipid Product	Pissenlit	C16:0 (82 %)

2.4.2 Croissance des plants d'orge. La pousse de l'orge s'effectue dans un bac de plastique troué, afin de permettre l'écoulement de l'eau d'arrosage, mesurant 25 cm par 51 cm et ayant 6 cm de haut. Une couche de vermiculite, dont l'épaisseur est d'environ 3,5 cm y est uniformément déposée. Celle-ci est recouverte d'une couche de grains d'orge Hordeum vulgare L. (Kenrick et Bishop, 1986) qui occupe toute la surface disponible, tout en évitant le recouvrement des grains les uns par les autres. Une seconde couche de vermiculite d'environ 1 cm recouvre les grains. Le semis

est abondamment arrosé, jusqu'à ce que la vermiculite ne puisse plus retenir davantage d'eau, qui s'écoulera alors vers le bas. Il est donc préférable de déposer le semis à un endroit permettant de retenir l'excès d'eau. Le rôle de la vermiculite est de fournir un soutien aux plantes durant leur croissance et, par sa grande capacité d'adsorption, permet une bonne redistribution de l'eau et des éléments nutritifs.

Les plants doivent être arrosés quotidiennement pendant six à huit jours. La température, le taux d'humidité et l'intensité lumineuse durant la croissance n'ont pas été contrôlés et varient d'une expérience à l'autre.

2.4.3 Extraction des lipides La méthode d'extraction qui suit doit être exécutée le plus rapidement possible et de préférence à basse température, afin d'éviter la détérioration du matériel extrait par les enzymes cellulaires. La première étape, jusqu'à la centrifugation, s'effectue donc dans une chambre à température contrôlée et réglée à 4 °C. Le reste du processus, jusqu'à la mise à sec de l'échantillon, se réalise à température de la pièce. Cependant, tout le matériel (solutions et verrerie) utilisé au cours de l'extraction est réfrigéré et saturé d'argon ou d'azote. Les solvants organiques employés sont distillés, dégazés par un jet d'argon introduit dans le solvant pendant 10 à 20 minutes, et sont conservés dans des bouteilles de verre brun au réfrigérateur.

On sépare l'orge en quatre aliquots lorsqu'il a atteint six à huit jours, car à cet âge, il contient peu de lignine et de cellulose. Le premier aliquot est coupé à environ 2 cm de la base à l'aide de ciseaux propres. Cette portion est rincée à l'eau bidistillée et introduite dans un broyeur (Osterizer 8, Sunbeam Corp. Ltd, Toronto, ON), avec 65 mL de *tampon 1*. Ce dernier est une solution constituée de 20 mM de tricine (N-tris[hydroxyméthyl]méthyl glycine, Sigma Chem. Co., St- Louis, MO), 10 mM de chlorure de sodium (Fisher Sci., Fair Lawn, NJ), 200 mM de sorbitol ($\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$, Fisher Sci., Fair Lawn, NJ), 1 mM de chlorure de magnésium hydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Fisher Sci., Fair Lawn, NJ) et ajustée à un pH de 7,8 à l'aide d'hydroxyde de sodium 10 N (Fisher Sci., Fair Lawn, NJ). La tricine est un agent tampon qui n'affecte pas le dégagement d'oxygène contrairement au tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane. Le chlorure de magnésium maintient l'agrégation des thylacoïdes et une bonne activité des photosystèmes. Le sorbitol, moins visqueux que le sucre, facilite la filtration et garde la force osmotique. Enfin, le chlorure de sodium maintient la force ionique. L'homogénéisation à vitesse maximum dure 30 secondes. L'homogénat est filtré à travers quatre épaisseurs de coton fromage et un papier filtre de 18,5 cm de diamètre à filtrage rapide (Whatman, numéro 4, Maidstone, Angleterre). Le filtrat, qui contient les produits qui nous intéressent, est recueilli. La méthode décrite ci-haut est répétée pour les trois autres ali-

quots, en changeant de filtre pour chacun. La solution totale obtenue est versée dans huit tubes à centrifugation en matière plastique inerte, d'environ 40 mL. Ces derniers sont ensuite insérés dans la couronne à centrifugation (Sorvall SS-34, Du Pont Instrum., Newtown, CT). La sédimentation des membranes s'effectue à 5 000 rpm (centrifugeuse Sorvall RC-5B, Du Pont Instrum., Newtown, CT), à 10 °C et dure 10 minutes. Le surnageant est jeté et le culot est suspendu dans le tampon 1. Une seconde centrifugation a lieu dans les mêmes conditions que précédemment. Le surnageant est rejeté et le culot est resuspendu dans le *tampon 2*. Ce dernier consiste en une solution de 20 mM de tricine, 10 mM de chlorure de sodium et 5 mM de chlorure de magnésium hydraté, dont le pH est de 7,8 grâce à l'ajout de quelques gouttes d'hydroxyde de sodium 10 N. L'absence de sorbitol provoque l'éclatement des membranes du chloroplaste libérant ainsi les thylacoïdes. La dernière centrifugation, dans les mêmes conditions, est suivie du rejet du surnageant et de l'incorporation d'environ 25 mL d'un mélange de chloroforme et de méthanol (2 / 1, les proportions sont toujours indiquées en rapport de volumes dans le mémoire, sauf indications contraires) à chaque culot. Toutes les solutions sont versées dans le contenant d'un mélangeur (Sorvall, modèle Omni Mixer 17105, Du Pont Instrum., Newtown, CT), qui est gardé dans un bain de glace. L'homogénéisation, à environ 5 000 rpm, reprend durant deux ou trois minutes. L'homogénéisation, à environ 5 000 rpm, reprend durant deux ou trois minutes.

génat est versé dans une ampoule à décantation de deux litres. Environ 50 mL d'une solution de 150 mM de chlorure de sodium et de 4 mM de chlorure de magnésium y sont ajoutés. L'agitation de ces deux phases dans l'ampoule à décantation permet de retirer de la phase organique tout le matériel membranaire soluble à forte concentration en sel. La phase organique est alors principalement composée de pigments et de lipides en solution. Après un repos d'environ cinq minutes, qui permet la séparation des phases, la récupération de la phase organique inférieure est suivie de sa mise à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor R110, Büchi, Schweiz, Suisse). La température du bain ne doit pas dépasser 35 °C, afin d'éviter la détérioration de l'échantillon. Les lipides et les pigments sont ensuite versés dans une fiole de 7 mL à l'aide d'un minimum de solvant. La remise à sec s'effectue par évaporation sous un jet d'azote ou d'argon à l'aide d'un bloc chauffant (Multi-Blok Heater no 2090, Lab-Line Instrum. Inc., Melrose Park, IL) dont la température est inférieure à 35 °C. Quelques microlitres de la solution sont récupérés afin de faire une chromatographie sur couche mince (CCM). L'échantillon peut ensuite être séparé par chromatographie liquide sur colonne (CL) ou conservé dans un congélateur à -135 °C (Queue Cryostat -135 °C, Queue Systems, Parkersburg, WV).

2.4.4 Extraction de la chlorophylle a

L'extraction de la chloro-

phyllé a et autres pigments se fait dans une chambre à température contrôlée et réglée à 4 °C, afin d'éviter la dégradation des pigments. De plus, la chlorophylle doit être protégée de la lumière ambiante. Seul un éclairage vert de faible intensité est employé. L'orge, telle qu'obtenue à la section 2.4.2, est coupée à 2 cm de la base et est homogénéisée (Sorvall, Modèle Omni Mixer 17105, Du Pont Instrum., Newtown, CT) dans un bain de glace pendant 30 minutes à 4 500 rpm avec environ 700 mL d'acétone dégazé et réfrigéré. L'homogénat est filtré sur quatre épaisseurs de coton fromage et centrifugé (Sorvall RC-5B, Du Pont Instrum., Newtown, CT) à 7 000 rpm pendant 10 minutes et à 10 °C. Le surnageant est précipité selon la méthode d'Iriyama et coll. (1974), en ajoutant un septième de son volume en dioxane (Anachemia, Accusolv, Montréal, QC) et environ un tiers de son volume en eau bidistillée, ajoutée goutte à goutte. Le tout est gardé au congélateur une ou deux heures afin d'amorcer la précipitation. Les xanthophylles, qui sont difficilement séparées des chlorophylles par CL, restent en solution. Une seconde centrifugation à 10 000 rpm pendant 15 minutes et à 10 °C permet de récolter le culot contenant des lipides et des pigments. La précipitation au dioxane peut être répétée au besoin en ajoutant au culot environ 50 mL d'acétone puis le dioxane et l'eau dans les mêmes proportions qu'indiquées précédemment. L'échantillon précipité est transféré avec de l'acétone dans un Erlenmeyer, puis évaporé à sec par un

évaporateur rotatif (Rotavapor R110, Büchi, Schweiz, Suisse) dont la température du bain ne dépasse pas 35 °C. Cette précaution a pour but d'éviter des températures trop élevées qui pourraient détruire la chlorophylle. L'échantillon obtenu est évaporé sous vide et gardé au congélateur, sous vide et à la noirceur jusqu'à son utilisation en CL.

2.5 Chromatographie

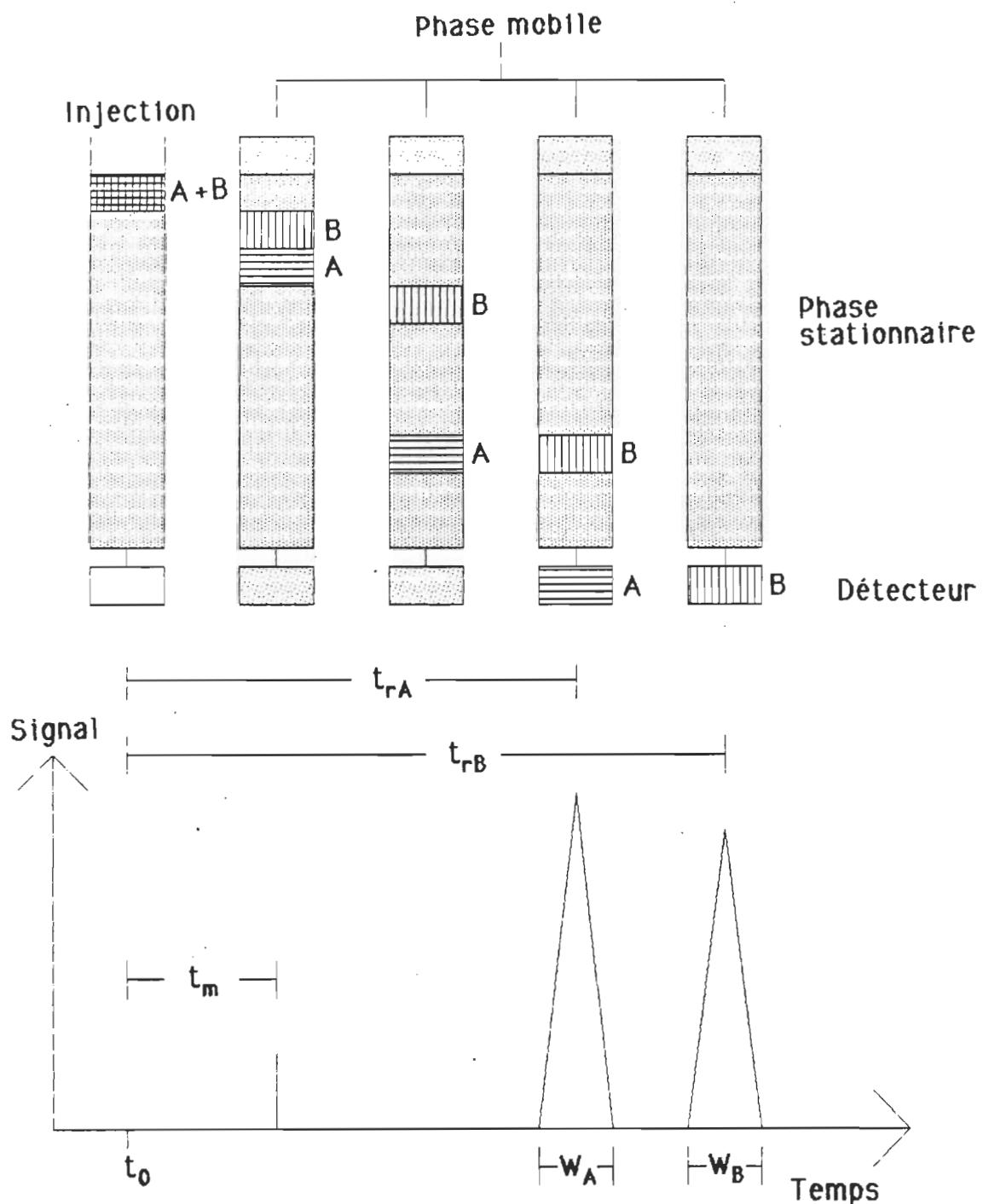
2.5.1 Théorie générale. Les parties théoriques qui suivent ne sont que partielles et ne mettent en évidence que les notions directement impliquées dans nos expériences. Il existe des monographies complètes sur chacun des sujets traités et nous en indiqueront au moins une au début de chaque partie concernée. Le livre de Miller, publié en 1988, discute de la chromatographie de façon générale.

La chromatographie a été découverte par un botaniste russe, Mikhail Tswett, en 1906. Il réussit à séparer différents pigments végétaux sur une colonne de carbonate de calcium. Les différentes bandes de couleur observées lui ont inspiré le nom de cette nouvelle technique.

La chromatographie est un domaine très vaste, car il existe aujourd'hui plusieurs techniques de séparation faisant appel à ses principes. Toutes ont cependant un point en commun. Elles nécessitent une phase

mobile pour le transport des produits et une phase stationnaire qui permet leur séparation de concert avec la phase mobile.

Les séparations chromatographiques sont basées sur les différences d'équilibre des divers composants d'un échantillon entre la phase mobile (aussi appelée éluant, solvant d'élution ou solvant de migration) et la phase stationnaire (gel). La Figure 10 représente le processus de séparation de deux composés lors de l'élution à travers une phase stationnaire. Au moment de l'injection (t_0), l'échantillon est adsorbé sur la phase stationnaire. Le cheminement tout au long de celle-ci se fait par une série d'équilibres des produits entre la phase stationnaire et la phase mobile. Puisque les interactions des produits avec le gel dépendent des groupements fonctionnels présents sur chaque molécule, chacune d'elles a une constante d'équilibre phase stationnaire-phase mobile différente des autres. Elles voyagent donc à des vitesses diverses. Les molécules ayant des interactions plus fortes avec la phase stationnaire étant mieux fixées sur celle-ci, elles sortiront du système chromatographique après les molécules moins retenues. À la sortie du système, un détecteur relié à un enregistreur permet de visualiser par le chromatogramme la séparation des différents produits. Plusieurs mesures importantes sont faites à partir du chromatogramme et sont indiquées à la Figure 10.



Chromatogramme

Figure 10. Schéma de la séparation de deux produits, allure générale d'un chromatogramme et mesures essentielles aux calculs en chromatographie.

Le temps initial (t_0) représente le moment de l'injection et correspond au début du chromatogramme. Le temps mort (t_m) est le temps que prend un produit non retenu par la phase stationnaire pour traverser le système chromatographique de l'injection à la détection.

Le temps de rétention des produits (t_{rA} , t_{rB}) est le temps de parcours respectif. Les largeurs des pics à la base (W_A , W_B) sont mesurés entre les projections des côtés des pics. Les largeurs à mi-hauteur ($W_{1/2A}$, $W_{1/2B}$) sont mesurées à la moitié de la hauteur des pics.

Le nombre de plateaux théoriques N est calculé par la relation 2.1 ou 2.2. Il représente le nombre d'équilibres phase stationnaire-phase mobile qui ont lieu dans le système chromatographique. L'efficacité de la phase stationnaire en tant que séparateur des produits augmente avec le nombre de plateaux théoriques.

$$N = 16 (t_r/W)^2 \quad (2.1)$$

$$N = 5,54 (t_r/W_{1/2})^2 \quad (2.2)$$

Le facteur de capacité k' est une constante reliée aux temps de migration des produits et se calcule selon la formule 2.3.

$$k' = (t_r - t_m) / t_m \quad (2.3)$$

Le facteur de capacité des produits à purifier doit être compris entre 2 et 8. En deça de 2, le produit est élué trop tôt avec tous les contaminants non retenus. Au delà de 8, le produit prend du temps à sortir du système, son pic s'élargissant de plus en plus, sans gain notable de résolution.

Le facteur de sélectivité α représente la capacité de la phase stationnaire à séparer deux solutés. Cette propriété est reliée à la valeur du facteur de capacité de deux produits concernés selon l'expression 2.4 où A et B indiquent l'ordre d'élution.

$$\alpha = k'_B / k'_A \quad (2.4)$$

De façon générale, lorsque le facteur de sélectivité est compris entre 1,5 et 2, la séparation des deux produits est satisfaisante.

La résolution est le paramètre déterminant pour la qualité de la séparation, et est calculée par la relation 2.5.

$$R = 2 (t_{rB} - t_{rA}) / (W_A + W_B) \quad (2.5)$$

Lorsque la résolution est égale ou supérieure à 1,5 le chromatogramme revient à la ligne de base entre les deux pics des produits séparés. La

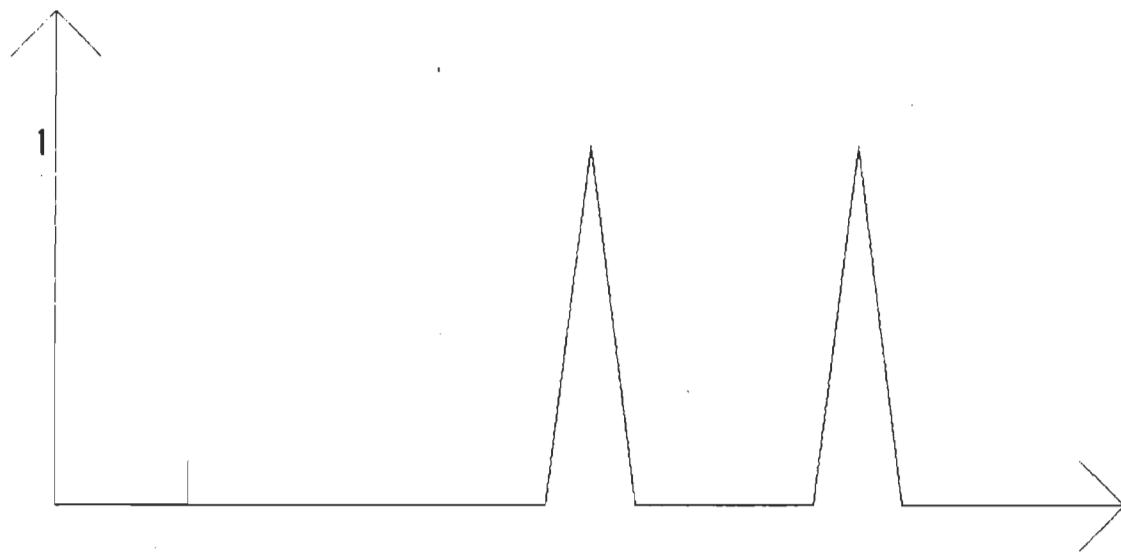
Figure 11 permet de bien saisir la différence entre la résolution et le facteur de sélectivité.

L'optimisation de tous ces paramètres, pour un type de phase stationnaire donné, se fait principalement par des changements de phase mobile mais aussi par la variation de la longueur de gel que les échantillons doivent traverser, de la vitesse d'élution de la phase mobile et du diamètre des particules du gel.

Plusieurs méthodes de chromatographie ont été utilisées au cours de notre recherche. La chromatographie liquide sur colonne (CL) permet un fractionnement partiel des principaux lipides chloroplastiques ainsi que la séparation des chlorophylles *a* et *b*. Les étapes de CL des lipides, bien que fastidieuses, simplifient les étapes de leur purification complète par CLHP. La CCM est principalement utilisée à titre de vérification des étapes d'extraction et de purification. Finalement, la chromatographie en phase gazeuse (CG) est utilisée pour connaître la composition globale des acides gras des lipides.

2.5.2 Chromatographie liquide sur colonne

Théorie. Le volume de Kremmer et Boross, publié en 1979, présente la technique de CL. La chromatographie liquide sur colonne est



$$\alpha_1 = \alpha_2$$
$$R_1 > R_2$$

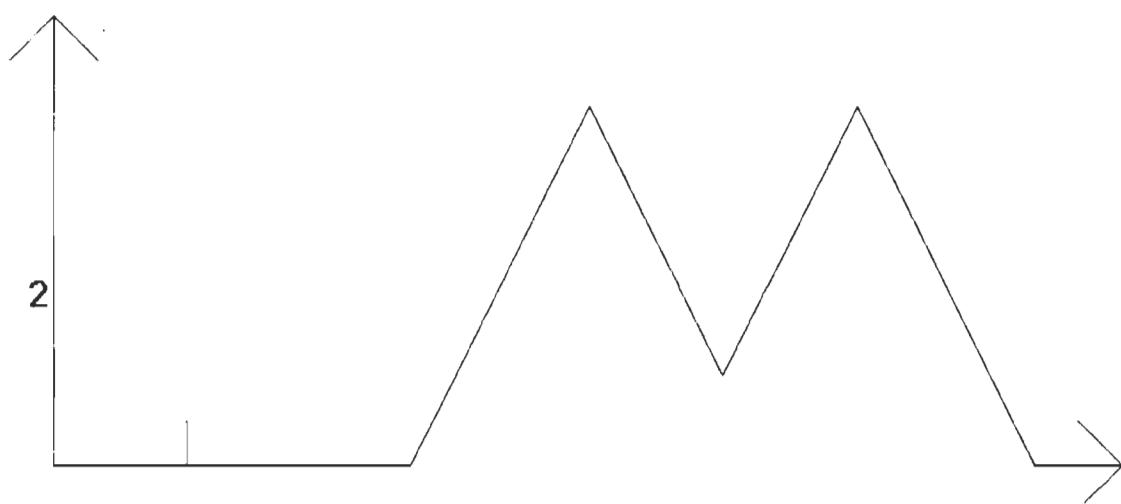


Figure 11. Chromatogrammes illustrant la différence entre la sélectivité et la résolution.

une méthode simple qui utilise très peu de matériel de laboratoire. La phase stationnaire est entassée par l'expérimentateur dans une colonne de verre en évitant que des bulles d'air restent emprisonnées dans le gel. Un système de CL est illustré à la Figure 12. La quantité de gel à déposer dans la colonne dépend de l'efficacité de séparation désirée et de la quantité d'échantillon à séparer.

L'échantillon est délicatement déposé à la surface du gel. Il doit être complètement solubilisé dans un minimum de solvant d'élution et est élué jusqu'à ce qu'apparaisse la surface du gel. À ce moment, l'addition d'éluant frais permet la migration des produits de l'échantillon. L'éluant contenant les produits d'intérêt est récolté à la sortie de la colonne.

CL des lipides. La méthode de séparation des lipides par CL qui suit a été mise au point par François Bellemare et Gaétan Munger, mais n'a jamais été publiée. Elle est cependant basée sur le travail de purification de la chlorophylle α d'Omata et Murata (1980). Tous les solvants utilisés pour la CL sont de qualité chromatographique et à faible teneur en eau (Anachemia Accusolv, Montréal, QC ou Burdick & Jackson Chrompure Multipurpose Solvent, Muskegon, MI).

La phase stationnaire est un gel de Sepharose CL-6B (Pharmacia Fine

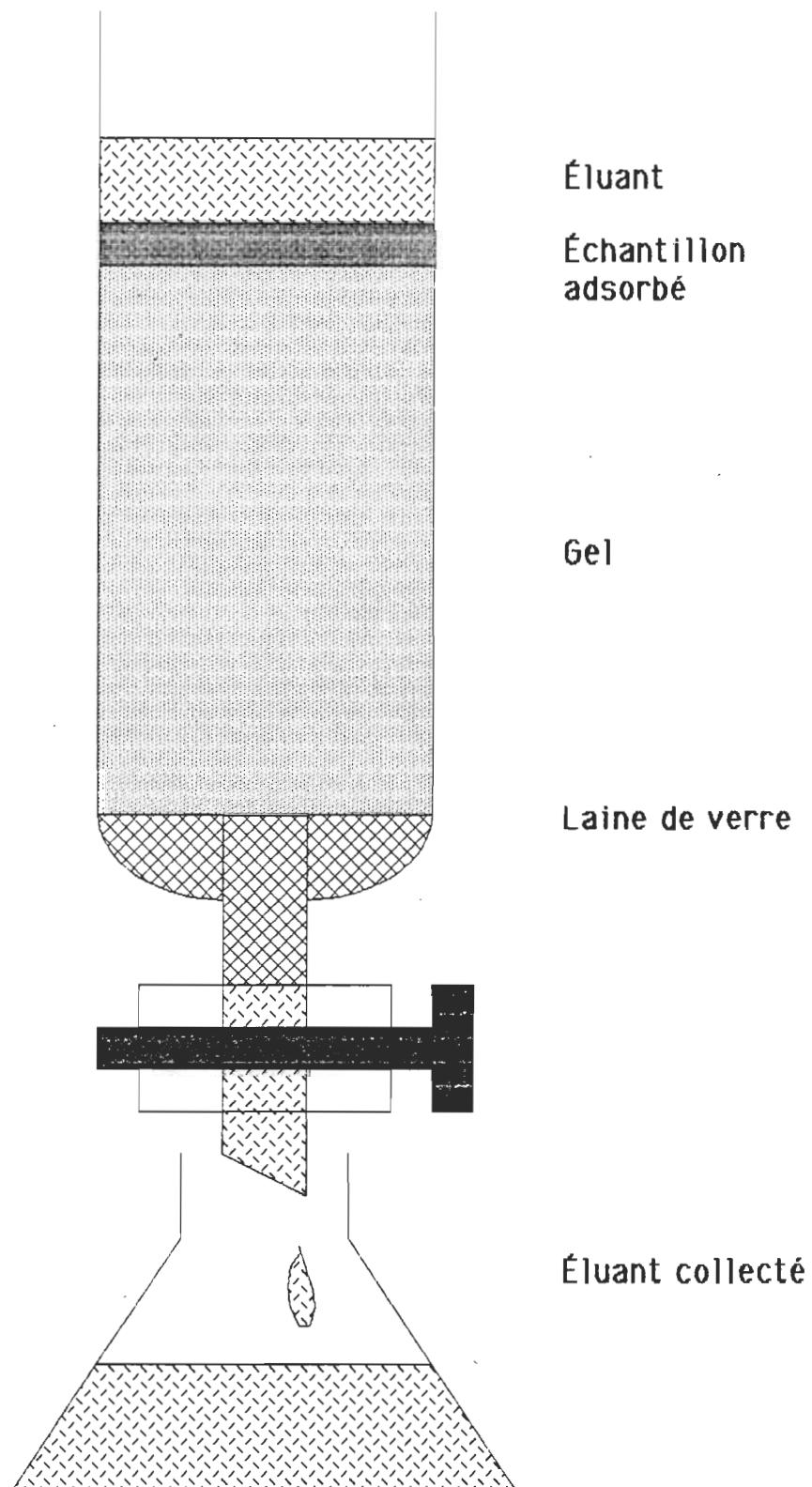


Figure 12. Colonne de chromatographie liquide.

Chem. AB, Uppsala, Suède). Les chaînes de ce gel d'agarose, constituées de D-galactose et de 3,6-anhydro-L-galactose (Kremmer et Boross, 1979), sont chimiquement liées les unes aux autres, ce qui accroît la stabilité thermique et chimique du gel. La Figure 13 présente la structure chimique du gel. La présence de groupements hydroxyl (-OH) permet l'utilisation de ce gel en chromatographie d'affinité (adsorption physique des molécules sur le gel).

Préalablement à son utilisation en CL, le gel doit être traité. Environ 200 mL de la solution contenant le gel est versée dans un entonnoir Büchner en porcelaine contenant un filtre de papier de 9 cm de diamètre à filtrage moyennement rapide (Whatman, numéro 1, Maidstone, Angleterre). Le tout est déposé sur un Erlenmeyer de grand volume relié au vide d'un robinet. Le gel est délicatement agité dans l'entonnoir et l'excès de phase aqueuse est retiré par une légère aspiration, sans toutefois l'assécher. Il est abondamment rincé à l'eau bidistillée, puis, graduellement, de plus en plus d'acétone est ajouté à l'eau. Lorsqu'enfin le gel est complètement saturé d'acétone, il peut être introduit dans la colonne. Nous utilisons une colonne à robinet de 2 cm de diamètre et mesurant de 60 à 65 cm de haut. Il serait cependant avantageux de changer ce type de colonne pour un système de CL à piston et réfrigéré, car un tel système est plus performant et

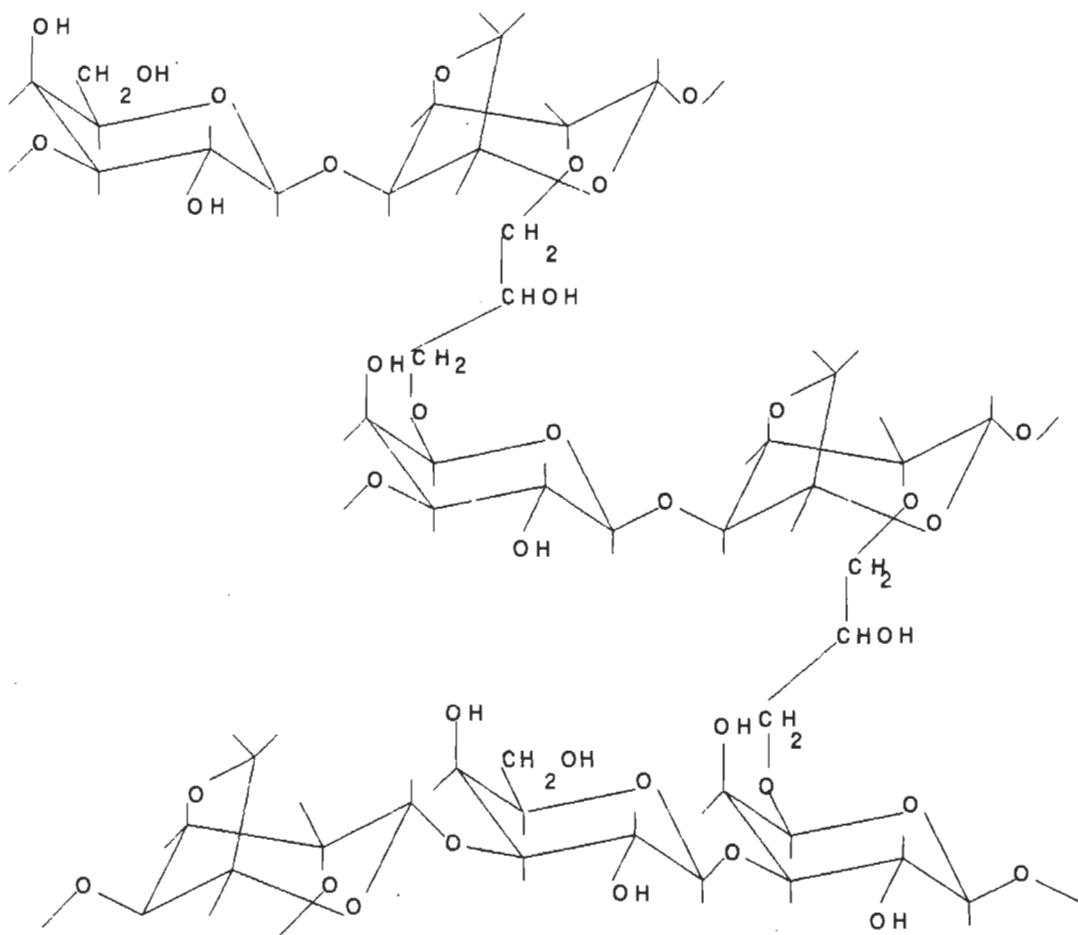


Figure 13. Structure chimique du gel de Sepharose CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals AB, 1979).

plus rapide, ce qui réduit les risques de détérioration des produits à séparer. Au bas de la colonne, près du robinet, nous insérons un morceau de laine de verre afin d'empêcher le gel de sortir de la colonne. Le gel est versé dans la colonne à l'aide d'acétone pour ne pas le laisser sécher sur les parois de la colonne. L'écoulement de l'acétone par le robinet accélère la formation du lit de gel qui doit atteindre de 11 à 14 cm de haut. Le gel restant est gardé au réfrigérateur dans un contenant scellé et peut être utilisé lors du montage d'une autre colonne. L'élution de 150 mL d'un mélange d'acétone et d'hexane (2/1), suivi d'un second mélange (1/2) et finalement de 400 mL d'hexane complète le traitement du gel. Ce dernier doit demeurer 24 heures dans l'hexane avant son utilisation. L'extrait à séparer est solubilisé dans environ 5 mL d'hexane à l'aide d'un bain ultrasonique et est délicatement déposé sur la surface du gel. Les solvants d'élution, leurs volumes ainsi que les fractions récoltées sont indiqués au Tableau 4. Afin d'accélérer la vitesse d'élution, nous utilisons une pression d'argon ou d'azote à la tête de la colonne. Ceci a cependant l'inconvénient d'affaïser le lit de gel de 2 ou 3 cm. En procédant ainsi, la CL dure environ quatre heures; sans pression de gaz, elle peut facilement atteindre huit heures, ce qui peut être dommageable pour les lipides à séparer.

Tableau 4

Solvants d'élution et fractions de lipide chloroplastique récoltées en chromatographie liquide sur colonne sur gel de Sepharose CL-6B.

Éluant	Proportion (v/v)	Volume mL	Fraction #	Produit élué
Hexane		50	1	Pigments
Hexane/IPA	90/10	150	2	Pigments
Hexane/IPA	85/15	100	3	Pigments
Hexane/IPA	80/20	100	4	Pigments
Hexane/IPA	75/25	100	5	MGDG
Hexane/IPA	70/30	100	6	MGDG
Hexane/IPA	60/40	100	6	MGDG
Hexane/IPA	50/50	100	7	Peu de MGDG
Hexane/acétone	50/50	100	7	et de DGDG
Acétone		100	8	DGDG
Acétone/méthanol	50/50	100	9	DGDG, SQDG
				PG
Méthanol		300	10	PC

IPA: Isopropanol

Les fractions recueillies sont évaporées à mesure qu'elles sont collectées à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor R110, Büchi, Schweiz, Suisse) et gardées sous atmosphère inerte. Elles sont ensuite transférées avec un minimum de solvant (méthanol ou chloroforme distillé) dans des bouteilles à échantillons. Quelques microlitres de chaque échantillon sont utilisés pour faire les CCM. Les échantillons sont ensuite évaporés à sec par entraînement sous argon ou azote à l'aide d'un bloc chauffant (Multi-

Blok Heater no 2090, Lab-Line Instrum. Inc., Melrose Park, IL) dont la température ne dépasse pas 35 °C. Les bouteilles sont hermétiquement refermées, identifiées et entreposées à -135 °C (Queue Cryostat -135 °C, Queue Systems, Parkersburg, WV), jusqu'à leur utilisation en CLHP. Les septums utilisés sont recouverts de PTFE qui est placé du côté interne du couvercle (Pierce Chem. Co., Rockford, IL).

Après utilisation, le gel, lorsqu'il ne contient pas d'agrégats de pigments à sa surface, peut être régénéré en faisant éluer dans la colonne ou préférablement dans un entonnoir Büchner les solvants indiqués au Tableau 5.

Tableau 5

Éluants de régénération du gel de Sepharose CL-6B après la séparation des lipides.

Éluant	Proportion (v/v)	Volume mL
Méthanol		150
Méthanol/acétone	50/50	150
Acétone		150
Acétone/hexane	66/33	150
Acétone/hexane	33/66	150
Hexane		> 300

Après ce traitement, le gel est conservé au réfrigérateur pendant au moins 24 heures avant sa ré-utilisation afin de lui permettre de s'équilibrer dans l'hexane.

CL des chlorophylles a et b. La méthode de purification de la chlorophylle a et b provient d'Omata et Murata (1980 et 1983) et utilise deux petites colonnes. La première élimine les caroténoïdes, les phéophytines, les chlorophyllides et le phosphatidylglycérol, alors que la seconde permet la séparation des chlorophylles a et b ainsi que de leurs isomères, c'est-à-dire, les chlorophylles a' et b'.

La première colonne est constituée d'un gel de DEAE-Sepharose CL-6B (diéthylaminoéthylsépharose) dont la structure apparaît à la Figure 14.

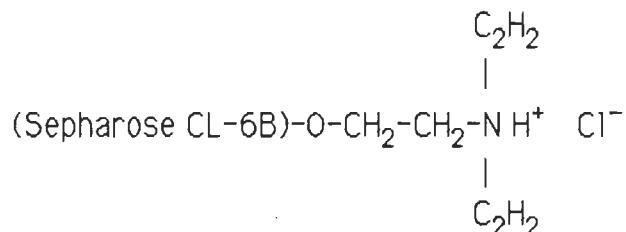


Figure 14. Structure partielle du gel de DEAE-Sepharose CL-6B.

La seconde colonne est faite d'un gel de Sepharose CL-6B (voir Figure 13). Comme au moment de la séparation des lipides par CL, des traitements préliminaires des gels sont nécessaires avant leur utilisation. En

fait, le même montage, composé de l'entonnoir Büchner sous vide, est utilisé. Environ 100 mL de la solution antiseptique dans laquelle baigne le gel de DEAE-Sepharose CL-6B est doucement filtrée. Le gel est abondamment rincé à l'eau bidistillée puis, afin de l'ioniser, trempé durant trois à cinq minutes dans un tampon d'acétate de sodium 1M (CH_3COONa , Fisher Sci., Fair Lawn, NJ) ajusté à un pH de 7 à l'aide d'acide acétique (CH_3COOH , Allied Chem. Canada Ltée, Pointe-Claire, QC). Ensuite, le gel est filtré sous vide sans le laisser s'assécher. Les étapes de trempage et de filtrage sont répétées une seconde fois. De nombreux lavages à l'eau bidistillée, suivis de l'addition graduelle d'acétone permet de rendre le gel complètement saturé de ce solvant organique. Le gel est alors prêt à être introduit dans la colonne de 2,5 cm de diamètre par 10 cm de haut que l'on bouche au préalable avec de la laine de verre. La hauteur du lit de gel doit être de 2 cm. Ce qui reste du gel dans l'acétone est conservé au réfrigérateur dans un contenant hermétique, et peut être utilisé tel quel lors du montage d'une autre colonne.

Le gel de Sepharose CL-6B est traité comme indiqué à la section 2.5.2 (CL des lipides) à l'exception du fait que le gel est introduit dans une colonne de 2,5 cm de diamètre par 15 cm de haut. La hauteur du lit de gel est de 5 cm.

Lorsque tout est prêt pour procéder à la chromatographie sur la première colonne, le quart de l'échantillon de pigments (Section 2.4.4) est solubilisé dans environ 2 mL d'acétone et déposé sur la colonne de DEAE-Sephadex CL-6B. Les chlorophylles *a* et *b* s'adsorbent fortement sur les premiers millimètres de ce gel d'échange ionique. Le caractère zwitterionique des chlorophylles engendre des charges partielles, positive à l'atome de magnésium et négative aux orbitales π du noyau porphyrinique. Selon Omata et Murata (1980), ceci pourrait permettre des interactions entre les groupements diéthylaminoéthyl chargés positivement et les orbitales π des chlorophylles ou permettre une coordination entre les groupements diéthylaminoéthyl non protonés et l'atome de magnésium des chlorophylles. Les caroténoïdes et phéophytines, qui ne possèdent ni charge ni atome de magnésium, ne sont pas adsorbés sur le gel et sont élués très rapidement avec environ 60 mL d'acétone. Lorsque ces produits sont sortis de la colonne, environ 40 mL d'un mélange d'acétone et de méthanol (10/1) permet de récolter les chlorophylles *a* et *b* et les galactolipides. Le gel peut être réutilisé après usage en suivant les étapes de régénération indiquées au Tableau 6. La fraction recueillie, contenant les chlorophylles, est versée dans une ampoule à décantation. Environ 200 mL d'un tampon de phosphate de sodium dibasique 10^{-3} M (Na_2HPO_4 purifié, voir section 2.6.2, ACP Chem. Inc., Montréal, QC) ajusté à un pH de 8 à l'aide de phosphate de sodium mo-

nobasique monohydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Sigma Chem. Co., St-Louis, MO) sont ajoutés à la phase organique.

Tableau 6

Éluants de régénération du gel de DEAE-Sepharose CL-6B.

Éluant	Proportion (v/v)	Volume mL
Acétone/eau/acétate d'ammonium ^a	80/20/1 ^b	150
Acétone/eau	80/20	150
Acétone		> 300

^a (Fisher Sci. Co., Fair Lawn, NJ)

^b En rapport volume/volume/masse

L'ajout d'environ 20 mL de benzène permet de récupérer les chlorophylles a et b dans cette phase. Cette étape, que l'on répète quatre à cinq fois, permet de neutraliser l'acide acétique qui élue avec la phase organique, évitant ainsi les problèmes de phéophytinisation des chlorophylles. La phase benzénique est recueillie et mise à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif puis, séchée sous vide afin d'éliminer complètement l'eau. L'échantillon est solubilisé dans environ 2 mL d'hexane et est déposé sur la deuxième colonne de Sepharose CL-6B. Le Tableau 7 indique les solvants d'éluion, leurs volumes et les fractions recueillies. Les fractions recueillies sont évaporées à sec sur un évaporateur rotatif puis séchées sous vide

pendant une à deux heures.

Tableau 7

Solvants d'élution pour la séparation des chlorophylles a et b sur la colonne de Sepharose CL-6B.

Éluant	Proportion (v/v)	Volume mL	Remarque
Hexane		200	-----
Hexane/IPA	99,9/0,1	200	-----
Hexane/IPA	99,8/0,2	400	-----
Hexane/IPA	99,7/0,3	400	Recirculée 4X, la chl commence à migrer sur le gel
Hexane/IPA	99,6/0,4	300	Recirculée 4X
Hexane/IPA	99,5/0,5	200	Séparation des chls sur le gel
Hexane/IPA	99,25/0,75	200	La chl <u>a</u> commence à sortir de la colonne, début de la récolte
Hexane/IPA	99,0/1,0	400	La chl <u>b</u> avance sur le gel
Hexane/IPA	98,0/2,0	200	La chl <u>a</u> est complètement élue
Hexane/IPA	97,5/2,5	200	La chl <u>b</u> migre sur le gel
Hexane/IPA	97,0/3,0	300	La chl <u>b</u> commence à sortir de la colonne, début de la récolte
Hexane/IPA	96,5/3,5	100	La chl <u>b</u> est complètement élue

Les chlorophylles a et b sont conservées au congélateur, sous vide et à la noirceur, jusqu'à leur utilisation en monocouche. Ces chlorophylles se conservent, dans ces conditions jusqu'à deux ou trois mois. Le gel est ensuite régénéré en faisant circuler dans la colonne les solvants indiqués au Tableau 8.

Tableau 8

Éluants de régénération du gel de Separose CL-6B après la séparation des chlorophylles.

Éluant	Proportion (v/v)	Volume mL
Hexane/IPA	91/9	150
Hexane/IPA	50/50	150
IPA		150
IPA/méthanol	50/50	150
Méthanol		150
Méthanol/acétone	50/50	150
Acétone		150
Acétone/hexane	66/33	150
Acétone/hexane	33/66	150
Hexane		>300

2.5.3 Chromatographie sur couche mince

Théorie. Un des ouvrages de référence importants en CCM est la monographie de Stahl, publiée en 1969. La CCM est une technique de séparation qualitative très rapide utilisée pour des petites quantités de produits. La phase stationnaire est déposée sur un support solide plat (plaqué de verre, de plastique ou d'aluminium) et fixée à l'aide d'un ligand. L'échantillon en solution est déposé goutte à goutte à environ 1 cm du bord inférieur de la plaque. L'éluant est versé dans une chambre d'élution jusqu'à environ 0,5 cm du fond de la chambre. La plaque est placée dans la

chambre d'élution refermée hermétiquement. L'éluant s'élève le long de la plaque de CCM par le principe de capillarité. Les constituants de l'échantillon déposé sur la plaque peuvent alors migrer vers le haut. Les produits ayant plus d'affinité pour la phase mobile migrent plus rapidement que les autres. Lorsque le front de solvant arrive à environ 1 cm du bord supérieur de la plaque, cette dernière est retirée de la chambre d'élution. Après quelques minutes, le solvant d'élution s'étant évaporé, la visualisation des traces de produits s'effectue généralement par l'introduction de la plaque dans une chambre contenant de l'iode solide. Les vapeurs d'iode réagissent avec les produits sur la plaque nous indiquant par des taches noires à quelle distance du point de départ chacun se trouve. Le calcul des distances parcourues par rapport au front de solvant (R_f) selon la relation 2.6 permet d'identifier les produits, soit par une coélution de standards ou en comparant les valeurs de R_f avec celles de la littérature dans les mêmes conditions. La Figure 15 illustre la méthode de migration en CCM de même que la mesure des distances parcourues.

$$R_f = X / F \quad (2.6)$$

Lavage des plaques de CCM. Comme indiqué précédemment, la CCM sert à vérifier chacune des étapes d'extraction et de purification.

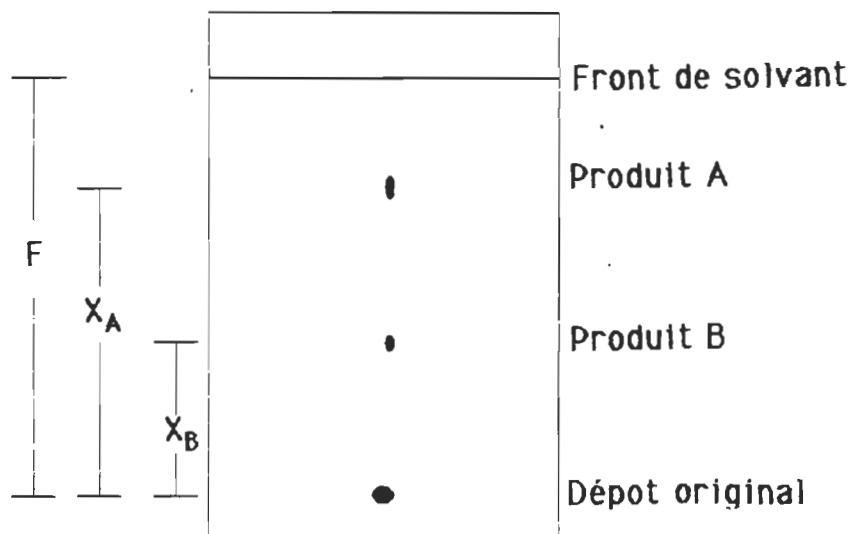
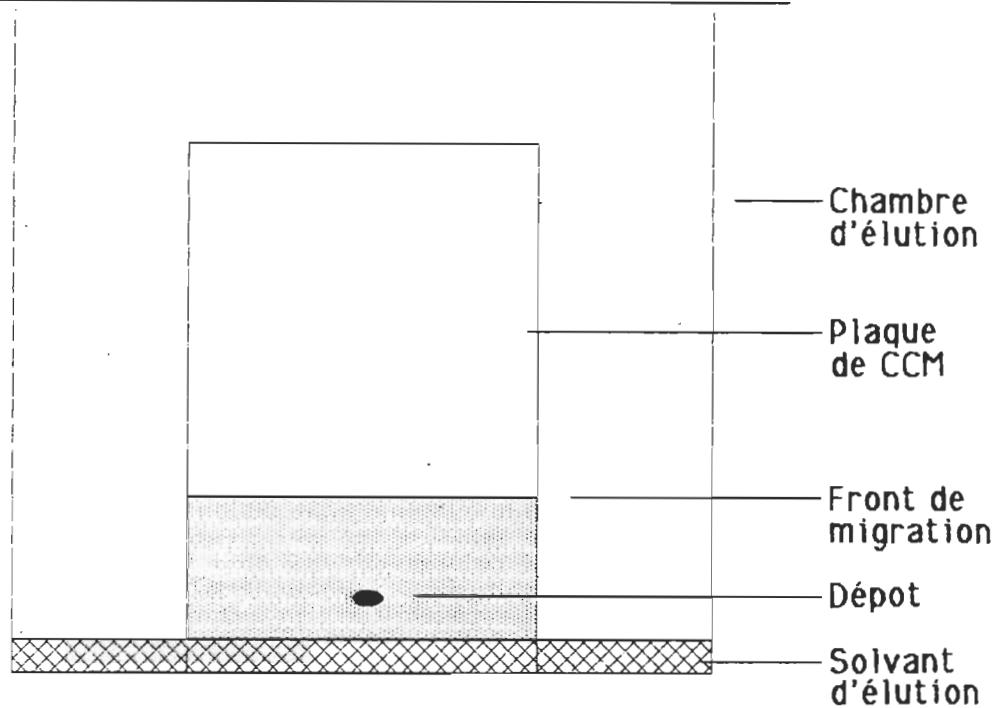


Figure 15. Schéma de la migration dans une chambre d'élution et mesures des distances parcourues par les produits de même que par le front de solvant.

Bien qu'elles ne soient utilisées qu'à ce titre, les plaques de CCM doivent être nettoyées avant l'usage. En effet, des plaques malpropres peuvent induire une interprétation inexacte d'une tache qui pourrait n'être qu'une saleté. La méthode utilisée est basée sur celle indiquée dans le mémoire de maîtrise de D. Guay (1986).

Les plaques de silice de 5 cm par 20 cm sont fixées à un papier absorbant (Kimiwipes, Kimberly-Clark Corp., Toronto, ON) qui est maintenu à l'arrière de la plaque avec du papier collant. Les plaques sont ensuite placées dans une grande chambre de migration fermée, mesurant 20,3 cm de large par 8,5 cm de profond et 20,3 cm de haut et contenant un mélange d'eau et de méthanol (1/1). Le papier absorbant est maintenu à l'extérieur de la chambre, ce qui permet l'écoulement vers l'extérieur des contaminants avec le solvant. Ce nettoyage dure 12 heures. Les plaques propres sont ensuite séchées pendant quatre heures dans une étuve dont la température est fixée à environ 100 °C. Lorsque cette étape est terminée, les plaques sont conservées dans un dessicateur afin d'empêcher leur réhydratation.

CCM des lipides. Les plaques prêtes à l'emploi utilisées pour la CCM des lipides mesurent 5 cm de large par 20 cm de haut. Le gel de silice 60, dont le diamètre des particules est de 10 à 15 µm avec des pores

mesurant 60 Å, est déposé sur un support de verre sur 0,25 mm d'épaisseur (BDH Chem., Toronto, ON et/ou E. Merck, Darmstadt, Allemagne). Les plaques sont activées et gardées au dessicateur.

Lorsque la rapidité de l'analyse a plus d'importance que la qualité de la CCM, des plaques non lavées de gel de silice 60 (E. Merck, Darmstadt, Allemagne), déposé sur aluminium dont l'épaisseur est de 0,20 mm, sont utilisées. Ces plaques mesurent 20 cm par 20 cm, mais nous les découpons de façon à obtenir la largeur voulue.

Les chambres d'élution en verre utilisées mesurent 6 cm de diamètre interne par 20,6 cm de haut et sont laminées d'un papier filtre de 18,5 cm de diamètre (Whatman, numéro 2, Maidstone, Angleterre). Les chambres sont refermées par un couvercle ou une plaque de verre. De plus, l'éluant est laissé une heure à reposer à l'intérieur des chambres afin de bien les saturer. L'élution se fait à température de la pièce. Les solvants d'élution sont fraîchement mélangés. Le Tableau 9 indique les éluants, les R_f moyens que nous avons obtenus ainsi que ceux trouvés dans la littérature.

Selon les données de ce tableau, on remarque que les R_f expérimentaux, calculés à partir d'une vingtaine d'expériences, ne sont pas comparables à ceux obtenus dans la littérature. Plusieurs facteurs peuvent jouer

un rôle dans cette différence.

Tableau 9

Solvants d'élution de chromatographie sur couche mince, R_f obtenus et R_f de la littérature.

Lipide	Acétone/benzène/eau ^a 91/30/8		Chloroforme/méthanol/eau ^a 70/30/4	
	R_f littérature ^b	R_f obtenus	R_f littérature ^c	R_f obtenus
MGDG	0,78	0,56 ± 0,06	0,84	0,7 ± 0,1
DGDG	0,38	0,24 ± 0,05	0,52	0,43 ± 0,06
SQDG	0,24	0,19 ± 0,06	0,38	0,28 ± 0,07

^a Abréviations dans le texte: A/B/E et C/M/E

^b Calculé à partir d'une figure dans l'article de Pohl P. et coll., 1970.

^c Siebertz H.P. et coll., 1979.

En plus d'être affectés par les systèmes d'élution, les R_f sont sensibles au type d'adsorbant, à la grosseur des particules et à l'uniformité de leur diamètre, à l'épaisseur et à l'uniformité de la plaque de CCM, à la quantité de matériel adsorbé sur la plaque, à la distance parcourue par les produits sur la plaque, au taux d'humidité de la phase stationnaire, à la température, au degré de saturation de la chambre d'élution, à la fraîcheur de la solution d'élution et indirectement, au type de ligand qui tient le gel sur la plaque, car il y a variation de la quantité de gel sur la plaque selon le ligand employé (Christian, 1980; Pataki et Keller, 1963; Pavia et coll.,

1982; Skoog, 1985; Stahl, 1969).

Pohl et coll. n'indiquent que les précisions suivantes à propos de leur système de CCM. Les plaques mesurent 12 cm par 20 cm et les auteurs fabriquent eux-mêmes leurs plaques en pesant 3,5 g de gel de silice HF_{254} (E. Merck, Darmstadt, Allemagne), dissous dans 9 mL d'eau. Ils l'agitent pendant 30 minutes et déposent le gel sur un support solide qu'ils activent à 130 °C. Leur éluant est un mélange d'acétone, de benzène et d'eau (91/30/8). L'élution dure 30 minutes, ce qui couvre environ 16 cm de la plaque et la température d'élution est de 23 °C.

Siebertz et coll., pour leur part, indiquent qu'ils utilisent des plaques prêtes à l'emploi faites d'un gel de silice G ayant 0,25 mm d'épaisseur (E. Merck, Darmstadt, Allemagne). Un antioxydant, le butylhydroxytoluène, est ajouté à tous leurs solvants. Le système d'élution est un mélange de chloroforme, de méthanol et d'eau (70/30/4).

Il devient donc très difficile de travailler exactement dans les mêmes conditions que ces auteurs faute de renseignements et nous ne pouvons pas reproduire leurs résultats. Aussi est-il très important de pouvoir comparer les R_f de nos produits extraits et dans nos conditions de CCM à des standards commerciaux de lipides coélués. Malgré son caractère qualitatif, la

CCM est une technique primordiale lorsqu'on établit une méthode de purification en CLHP. Lorsqu'elle est employée avant la première injection d'un échantillon, elle renseigne l'expérimentateur sur l'allure qu'aura le chromatogramme (présence des produits importants, taux de contamination, etc.). Quand elle est utilisée sur les produits recueillis, elle peut souvent assurer leur identité ou rejeter une conclusion inexacte.

CCM de la chlorophylle a. Les plaques utilisées lors de la CCM de la chlorophylle *a* purifiée sont recouvertes de 0,25 mm de gel de silice GF activé dont les particules mesurent en moyenne 15 μm de diamètre (Uniplate, Analtech Inc., Newark, DE). Les plaques mesurent 20 cm de large par 20 cm de haut mais nous découpons, à l'aide d'un ciseau à pointe de carbone, la largeur dont nous avons besoin. Les désignations G et F indiquent que le ligand du gel est le sulfate de calcium et que les plaques sont enduites d'un indicateur fluorescent.

Le solvant de migration est un mélange frais d'hexane et d'acétone (7/3) et le R_f de la chlorophylle *a* dans ces conditions est de 0,4. La chambre d'élution est du même type que décrite à la section précédente (CCM des lipides).

2.5.4 Chromatographie liquide à haute performance des lipides

Théorie Deux publications récentes ont attiré notre attention au sujet de la CLHP, Lindsay (1987) et Meyer (1988). La CLHP a commencé à se développer à partir du moment où des particules de gel de très petit diamètre ($\leq 10 \mu\text{m}$) sont devenus disponibles. Sa particularité est qu'elle utilise une phase mobile sous de grandes pressions et ce, afin qu'elle puisse circuler à travers un gel très fin. La CLHP utilise donc des instruments très particuliers. La Figure 16 représente un appareil de CLHP.

Les solvants d'élution contenus dans les réservoirs sont propulsés à travers le système grâce à une ou plusieurs pompes. Celles-ci sont faites de matériaux résistants à la corrosion. Elles doivent générer des pressions allant jusqu'à $4,2 \times 10^4 \text{ kPa}$ (6 000 psi), sans impulsion avec des volumes délivrés reproductibles. Un contrôleur facilite l'opération des pompes en mode isocratique (phase mobile constante) ou gradient (phase mobile variant au cours de la chromatographie). Un facteur limitant en CLHP est la reproductibilité de l'injection. L'emploi de petits volumes à cette étape est généralement fiable. Les systèmes d'injection les plus utilisés sont les injecteurs à vanne avec des boucles de volumes définis (5 à 500 μL).

La colonne est la partie la plus importante du système de CLHP car

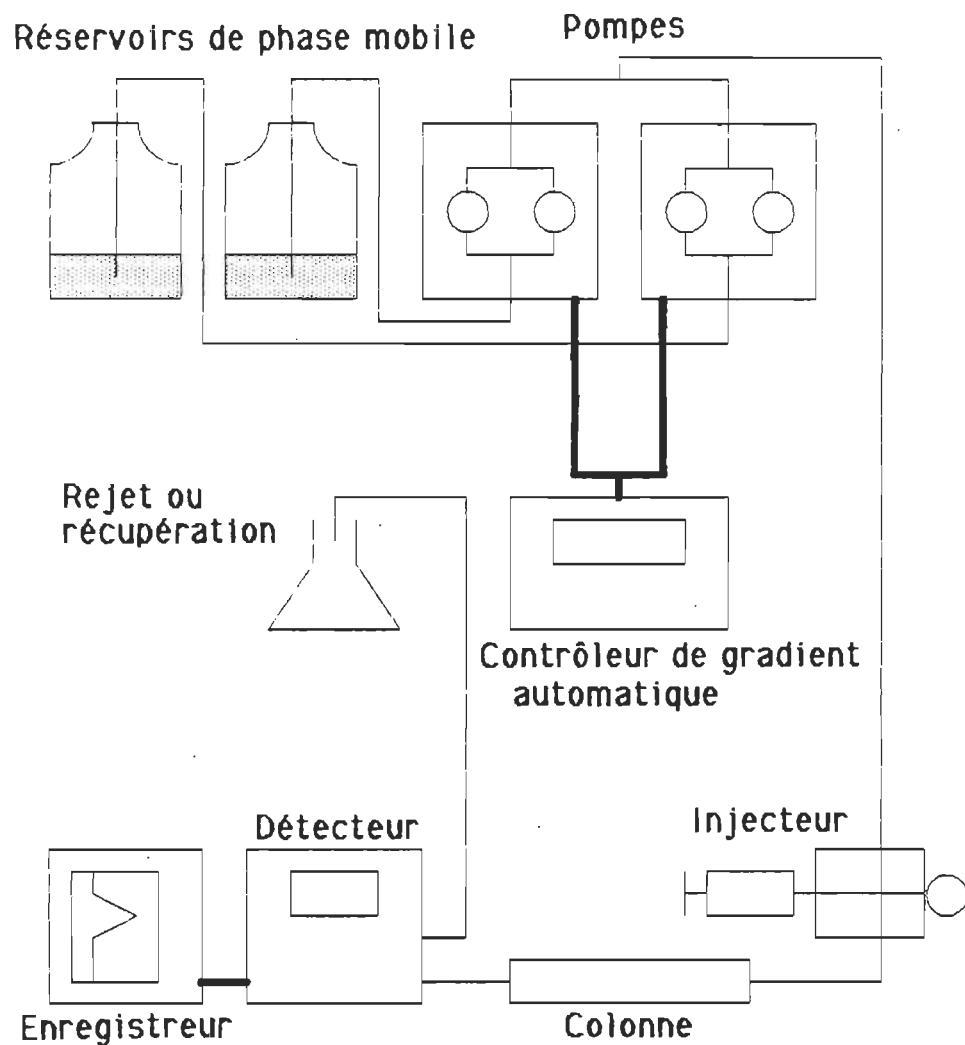


Figure 16. Schéma général d'un appareil de chromatographie liquide à haute performance.

c'est dans la colonne contenant la phase stationnaire que s'effectue la séparation. Les gels utilisés sont soit en phase normale, c'est-à-dire que les particules formant le gel sont polaires, soit en phase inverse, c'est-à-dire que des greffons non polaires sont chimiquement liés à la surface d'un substrat solide. En phase normale (gel de silice, d'alumine), plus un solvant est polaire, plus sa force d'élution, c'est-à-dire sa capacité à désorber les composants de l'échantillon de la phase stationnaire, est grande. En phase inverse, plus un solvant est non polaire, plus sa force éluante est grande. L'annexe 1 présente un tableau des indices de polarité de différents solvants pour le gel de silice. Pour un mélange de solvant, la polarité (P_{ABC}) se calcule selon la relation 2.7.

$$P_{ABC} = \theta_A \cdot P_A + \theta_B \cdot P_B + \theta_C \cdot P_C \quad (2.7)$$

où P_A , P_B et P_C sont les indices de polarité des solvants A, B et C purs, et θ_A , θ_B et θ_C sont les fractions volumiques de chaque solvant. Le choix de la phase mobile est critique pour la réussite de la séparation. Malheureusement, la seule façon de déterminer la phase mobile à utiliser est encore l'essai-erreur, en connaissant les effets de polarité discutés plus haut. Un bon éluant doit posséder les caractéristiques suivantes:

- il doit être constitué de solvants très purs

- il doit être facilement disponible à un coût raisonnable
- sa température d'ébullition doit être au-dessus de 40 °C
- il doit avoir une faible viscosité
- il doit être chimiquement inerte
- il doit être compatible avec le système de détection
- il doit pouvoir solubiliser l'échantillon
- son inflammabilité et sa toxicité doivent être limitées.

La détection en CLHP se fait généralement en absorbance dans l'ultraviolet et dans le visible. La cellule de détection doit pouvoir résister à des pressions de l'ordre de $4,2 \times 10^3$ kPa (600 psi).

Nous avons utilisé la CLHP pour la purification de trois lipides du chloroplaste. Cette technique a l'avantage d'être plus rapide que les méthodes conventionnelles de purification par CCM ou CL. Elle implique cependant l'utilisation de matériel et de méthodes spécifiques telles que décrites ici. Au cours de nos expériences, nous avons utilisé deux systèmes de CLHP. La description qui suit s'applique aux deux systèmes sauf en ce qui a trait aux modèles impliqués. Les premiers modèles indiqués proviennent de l'appareil le plus récent, sur lequel nous avons fait la major partie de nos expériences. Les deuxièmes modèles indiqués représentent le second système utilisé au début de nos études.

Solvants. Deux qualités de solvants ont été utilisées. Les solvants de Anachemia, Accusolv (Mississauga, ON) et de Burdick & Jackson, Chropure Multipurpose Solvant (Muskegon, MI) sont distillés avant leur usage pour la CLHP. Par contre, les solvants de Burdick & Jackson de qualité CLHP ne le sont pas. Les mélange de solvants sont faits à l'aide de cylindres gradués identifiés pour chaque solvant et utilisés exclusivement pour eux. L'eau est mesurée à l'aide d'une micropipette (Gilson, modèle Pipetman, France). Tous les mélanges sont filtrés et dégazés sous le vide d'un robinet par un système comprenant un Erlenmeyer de 1 L, un réservoir de 300 mL, une base de verre fritté pour le réservoir, de 47 mm de diamètre, ainsi qu'un filtre de même diamètre, en PTFE non laminé dont les pores sont de 0,5 µm (Millipore Corp., Bedford, MA). Les bouteilles contenant les éluants pour la CLHP sont en verre brun afin de réduire les risques d'oxydation. Elles sont recouvertes, à l'ouverture, d'un papier d'aluminium et scellées par de la paraffine (Parafilm M, American CAN Corp., Greenwich, CT). Des filtres d'acier inoxydable sont installés au bout des tuyaux en PTFE et trempent dans les éluants. Ils servent à éviter que des particules, accidentellement présentes dans les éluants, soient amenées dans le système de CLHP. Ces filtres peuvent être nettoyés par un trempage dans l'acide nitrique diluée, à l'aide d'un bain ultrasonique.

Contrôleur de gradient automatique. Le contrôleur de pompes utilisé de Waters Assoc., modèle 680, Milford, MA (Modèle 420, Beckman Instrum. Inc, San Ramon, CA) opère et surveille le fonctionnement de nos deux pompes. Il permet d'effectuer des analyses en mode isocratique, de programmer des expériences en mode de gradient de solvant, d'ajuster le débit des pompes et de commander l'arrêt automatique de celles-ci en cas de hausses ou de baisses subites de pression. Les hausses peuvent indiquer un blocage dans le système. Une pression trop élevée peut endommager la colonne, l'appareil et peut même devenir dangereuse pour l'expérimentateur si un bris se produit. Une baisse de pression indique généralement une fuite de solvant. Les limites de pression sont programmables sur le modèle de Waters et dépendent de la colonne qui est sur le système de CLHP. La vitesse maximale du débit des pompes, lorsqu'elle est programmée sur le contrôleur, est de 10 mL/min. Cependant, cette vitesse peut occasionner, avec les colonnes de petit diamètre, des pressions supérieures à leurs limites respectives. La vitesse maximale dépend donc aussi de la colonne utilisée. Le Tableau 10 indique les limites de pression ainsi que les vitesses maximales des colonnes utilisées.

Tableau 10

Limites de pression et débits maximums pour les colonnes utilisées.

Colonne	Limite supérieure de pression 10^{-4} kPa	Limite inférieure de pression 10^{-2} kPa	Débit maximum mL/min
Altex Ultrasphere-Si 4,6 mm d.i. X 250 mm	2,1 (3 000 psi)	3,5 (50 psi)	5,0
Altex Ultrashere-Si 10,0 mm d.i. X 250 mm	1,4 (2 000 psi)	3,5 (50 psi)	10,0

Pompes. Les deux pompes utilisées de Waters Assoc., modèle 510, Milford, MA (Modèle 100A, Beckman Instrum. Inc., San Ramon, CA) servent à propulser la phase mobile à travers la colonne. Chacune d'elles a la possibilité d'atteindre un débit de 0,1 à 9,9 mL/min. Le débit des pompes doit être calibré en ajustant le volume délivré par intervalle de temps. Les pompes de Waters possèdent également un contrôle compensatoire pour la compressibilité des solvants utilisés.

Échantillons. Les échantillons lipidiques doivent être dissous dans la phase mobile à l'aide d'un bain ultrasonique pendant cinq minutes. Des concentrations d'approximativement 0,2 mg/mL et 1,0 mg/mL ont été injectées dans les colonnes de 4,6 mm et 10,0 mm de diamètre interne, respectivement. La CLHP des lipides est répétée deux fois afin de bien les

séparer de tout contaminant. À titre de vérification, une troisième chromatographie est effectuée, de même que la CCM des lipides purifiés dans les deux systèmes d'éluant. Ceci a pour but de s'assurer de la bonne qualité de la purification.

Injecteur. La Figure 17 présente le schéma fonctionnel de l'injecteur utilisé de Rheodyne Inc., modèle 7126, Cotati, CA. Dans la position «LOAD», l'échantillon est introduit par le port d'injection dans une boucle de 200µL. L'excès est rejeté par la sortie 6 indiquée à la Figure 17. Lorsque l'injecteur est tourné de 60° à la position «INJECT», l'éluant, qui circule de la pompe à la colonne, entraîne l'échantillon. Une marque doit être faite sur le chromatogramme permettant de reconnaître le moment de l'injection. C'est aussi dans cette position que se fait le nettoyage du port d'injection. À l'aide d'une seringue remplie de l'éluant et d'un nettoyeur de port d'injection adapté à la seringue (numéro 7125-054, Rheodyne Inc., Cotati, CA), l'éluant est envoyé dans le port et est rejeté par la sortie 5 de la Figure 17, nettoyant ainsi l'intérieur de l'injecteur. Ce nettoyage se fait au début de chaque séance de travail sur l'appareil, de même qu'avant l'injection d'un nouvel échantillon différent du précédent.

Colonnes. Nous avons utilisé deux colonnes de diamètres différents (Altex Ultrasphere-Si, Beckman Instrum. Inc., San Ramon, CA). La

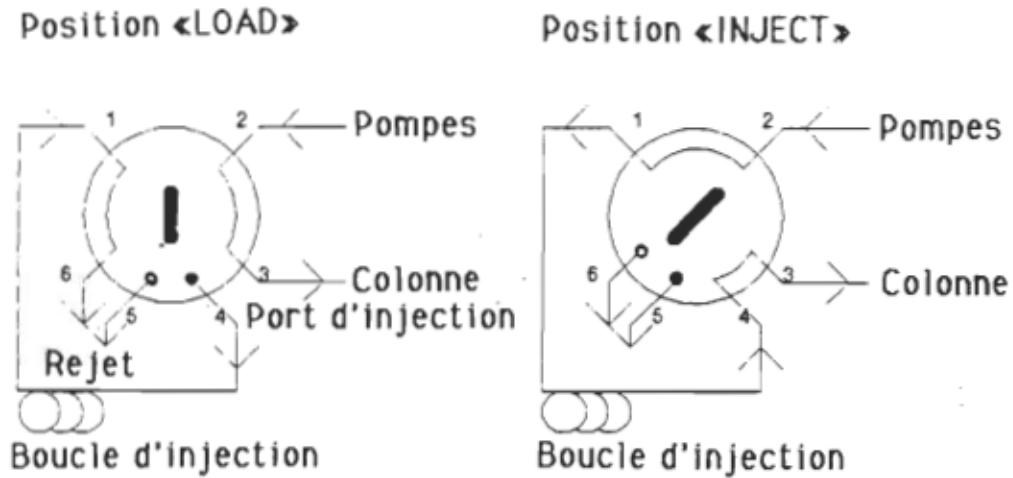


Figure 17. Diagramme du fonctionnement de l'injecteur Rheodyne, modèle 7126 (Rheodyne Inc., 1984).

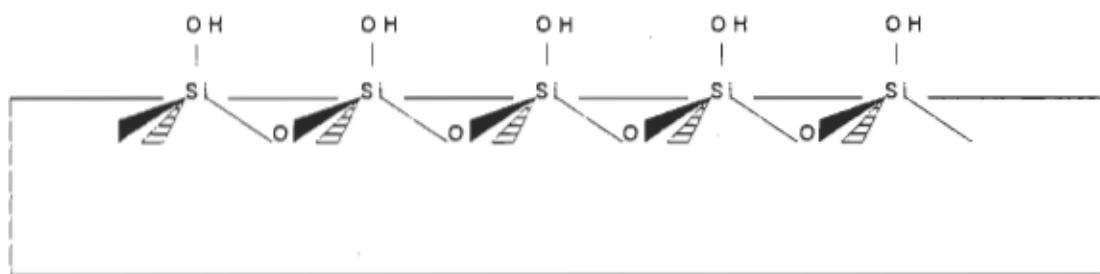


Figure 18. Schéma moléculaire du gel de silice à sa surface.

plus petite colonne (4,6 mm de diamètre interne par 25 cm de long) a été utilisée afin de mettre au point la méthode de purification des différents lipides. La méthode a ensuite été facilement adaptée à la seconde colonne de plus grand volume (10,0 mm de diamètre interne par 25 cm de long) qui a servi à maximiser la quantité de lipides purifiés. Le recouvrement métallique de ces colonnes est en acier inoxydable. Les colonnes sont remplies de gel de silice dont les particules poreuses mesurent en moyenne 5 μm de diamètre avec des pores de 80 Å. Le gel de silice résiste difficilement aux pH plus petits que 2 ou plus grands que 7,5. Les acides ou bases fortes sont donc nuisibles à ces colonnes. Ce type de gel est aussi soluble dans l'eau. Il n'est donc pas recommandé d'en introduire par grands volumes ou d'en laisser dans la colonne durant un long laps de temps. Le méthanol a le même effet sur le gel. Comme on peut le voir à la Figure 18, la surface du gel est recouverte de groupements hydroxyl, ce qui permet l'adsorption différentielle des produits contenus dans l'échantillon par l'action de ponts hydrogène. Lorsque la phase mobile contient un faible pourcentage d'eau, elle forme une gaine aqueuse autour du gel qui diminue l'intensité des liens hydrogène et permet aux produits de sortir plus rapidement du système, avec généralement une meilleure résolution. Cependant, après quelques semaines d'usage de la colonne dans ces conditions, la qualité de la séparation diminue de même que le nombre de plateaux théoriques.

ques à cause d'un excès d'eau adsorbé sur le gel. La régénération permet alors de débarrasser complètement la colonne de toute trace d'eau. Elle consiste à faire circuler, dans l'ordre, de l'hexane, de l'isopropanol, du chlorure de méthylène et du méthanol, en débutant avec le solvant à polarité légèrement supérieure et miscible à celui qui est dans la colonne au début de la régénération. Ensuite, la série est répétée en sens inverse jusqu'à l'hexane. À chaque étape, la colonne doit pouvoir s'équilibrer avec l'éluant ce qui représente le passage dans le gel d'un volume de solvant d'environ 20 fois celui de la colonne. L'équilibration de la colonne est une étape très importante. Après une régénération, la colonne est équilibrée dans l'éluant de purification en procédant par étapes. La première consiste à retirer l'hexane de la colonne si l'éluant de purification n'en contient pas et de le remplacer par le constituant principal de l'éluant. Dans le cas de la purification du MGDG et du DGDG, le solvant principal de l'éluant étant l'hexane, cette étape ne s'applique pas. Par contre, dans le cas du SQDG, le solvant principal étant le chloroforme, l'hexane est remplacé par ce solvant. L'équilibration de la colonne dans le solvant principal a lieu en faisant circuler 100 fois le volume de la colonne dans le système. Les autres constituants de la phase mobile sont ajoutés un à un en équilibrant la colonne à chaque étape. À la fin du travail sur l'appareil, l'eau est retirée du système en équilibrant la colonne dans l'éluant sans eau. Lorsque le

travail reprend, il ne reste qu'à ajouter l'eau et à rééquilibrer la colonne avant d'injecter l'échantillon à purifier.

Détecteur. Nous décelons la présence des lipides grâce à un détecteur programmable uv-visible à plusieurs longueurs d'onde, Modèle 490, version E.0, Waters Assoc., Milford, MA. Les conditions d'opération du détecteur sont indiquées au Tableau 11.

Tableau 11

Conditions de détection en chromatographie liquide à haute performance.

Condition	Valeur
Numéro du canal	1
Mode de détection	Absorption
Maximum d'absorbance en unités d'absorbance	1,500 UA
Longueur d'onde de détection	205 nm
Constante de temps	1 seconde
Autozéro	Oui
Marque sur le chromatogramme	Oui
Atténuation automatique	Non
Polarité des pics	Positive
Zéro à l'enregistreur	Placé à zéro
Voltage de la lampe	1 000 V
Energie de la lampe à la cellule de l'échantillon	Environ 71
à la cellule de référence	Environ 272

La programmation d'un autozéro et d'une marque sur le chromatogramme au moment de l'injection (temps = 0,00 min) facilite l'analyse des ré-

sultats. La longueur d'onde d'analyse régiee par un monochromateur a été déterminée par un balayage des absorbances en fonction de la longueur d'onde de 190 nm à 300 nm. De façon générale, plus la longueur d'onde est petite, plus les lipides absorbent. Cependant, aux environ de 190 à 200 nm, plusieurs solvants organiques absorbent aussi. À 205 nm, leur contribution est minime et l'absorption des lipides est encore suffisamment grande pour être efficace. Aucune vérification quant à la linéarité de l'absorption n'a été faite puisque la purification n'est pas quantitative.

La majeure partie du travail fait sur la purification du SQDG utilise un détecteur à indice de réfraction d'Altex, Modèle 156, Beckman, San Ramon, CA. Cet appareil a été utilisé à cause de la présence de chloroforme dans la phase mobile. Ce dernier absorbe beaucoup dans l'ultraviolet, ce qui réduit grandement la détection en absorption des produits élués.

Le principe de fonctionnement de l'appareil est basé sur la loi de Snell qui s'énonce ainsi: lors d'une réfraction, le sinus de l'angle incident θ_1 est proportionnel au sinus de l'angle émergeant θ_2 . La Figure 19 illustre le principe de cette loi de la réfraction. Cette loi s'exprime également en termes mathématiques selon la relation 2.8.

$$(\sin \theta_1 / \sin \theta_2) = (n_2 / n_1) \quad (2.8)$$

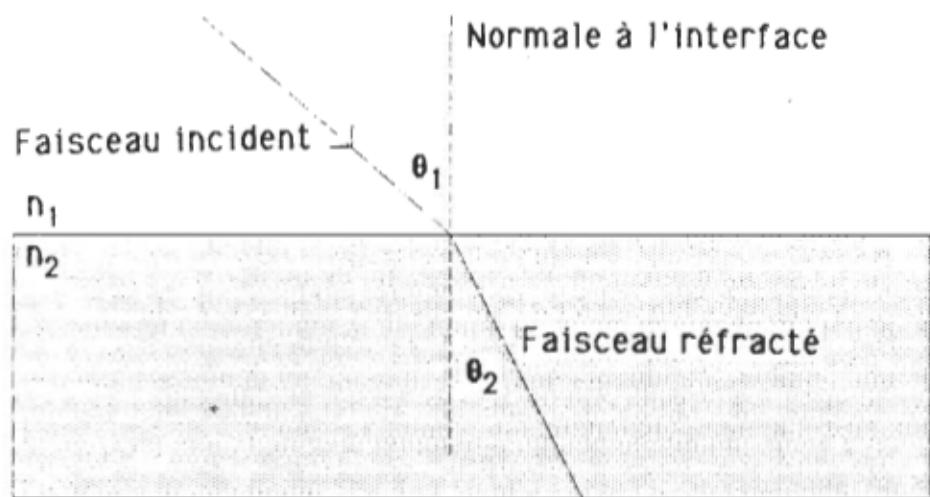


Figure 19. Schéma de la réfraction d'un faisceau lumineux.

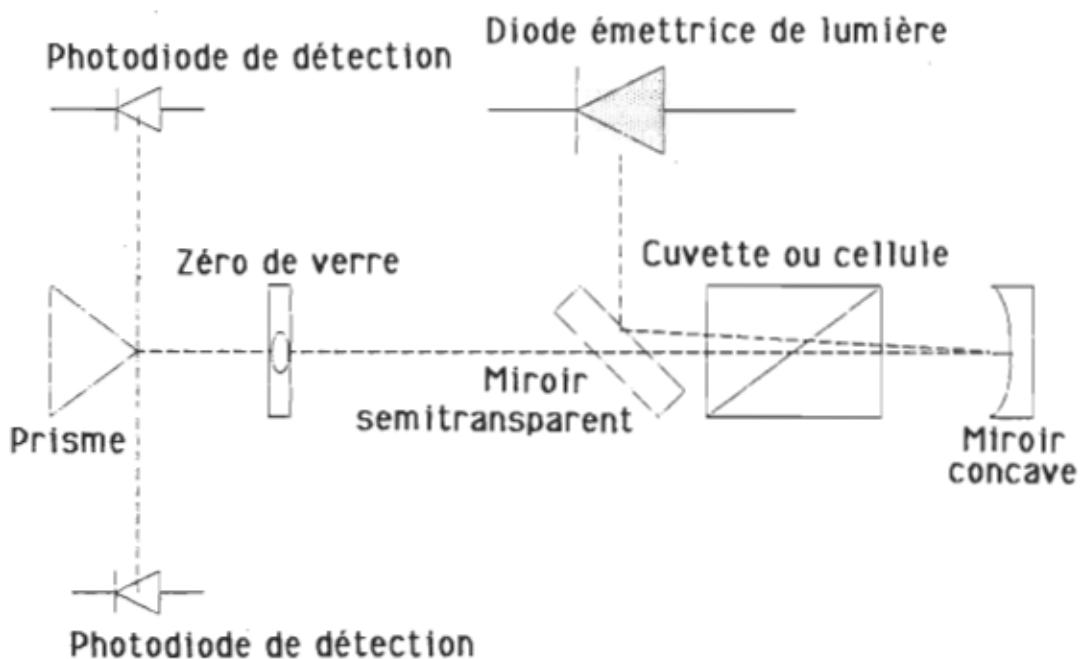


Figure 20. Diagramme du système de détection de l'appareil utilisé.

où n_1 et n_2 sont les indices de réfraction des milieux 1 et 2.

La Figure 20 représente le système optique du détecteur à indice de réfraction. Lorsque les deux compartiments de la cellule de détection (échantillon et référence) sont remplis de phase mobile, on ajuste le zéro de l'appareil, ce qui permet un partage égal du faisceau aux deux photodiodes de détection. Lorsque l'échantillon atteint la portion de la cuvette dans laquelle circule l'éluant, le faisceau réfracté est dévié et les deux photodiodes ne reçoivent plus la même quantité de lumière. Le détecteur envoie ainsi un signal non nul à l'enregistreur. Ce signal peut être positif ou négatif selon l'augmentation ou la diminution de l'indice de réfraction dans la cellule à échantillon. Ce type de détecteur est très sensible aux pulsations des pompes. Les gradients de solvant ne peuvent être utilisés à cause de l'immobilité de la phase contenue dans le compartiment de référence de la cellule de détection. De plus, cet appareil est excessivement sensible aux variations de température et doit donc être protégé des rayons du soleil et des courants d'air.

Enregistreur. Les chromatogrammes sont imprimés à l'aide de l'enregistreur de BBC-Goerz Metrawatt, modèle SE 120, Nürnberg, Autriché (Modèle BD-40), dont le voltage est réglé à 10 mV à pleine échelle. À cette valeur, les pics sont normalement complets, ce qui est nécessaire

pour certains calculs. La vitesse de déroulement du papier dépend de l'échantillon, mais se situe généralement à 0,5 ou 0,25 cm/min.

Bien que l'enregistreur soit utile, son remplacement dans les nouveaux systèmes de CLHP par un intégrateur qui donne plus de renseignements, ou mieux, par un ordinateur qui permet de garder en mémoire les résultats, est un grand avantage pour l'expérimentateur.

Autres précautions. Avant d'injecter un échantillon avec un nouvel équipement sur le système (changements de colonne, de boucle d'injection, etc), la vérification du temps mort est nécessaire aux calculs. Elle se fait par l'injection de 5 % d'acétone dans la phase mobile. L'acétone, non retenu par la colonne, arrive au détecteur au temps mort.

2.5.5 Chromatographie en phase gazeuse.

Théorie. Le livre de McNair et Bonelli (1968) traite de la CG. Son principe est que l'échantillon est vaporisé à l'injection et parcourt la colonne chromatographique à l'aide d'un éluant gazeux inerte. Les composantes de base d'un appareil de CG sont illustrées à la Figure 21.

Le gaz vecteur est généralement de l'hélium, de l'argon, de l'azote ou de l'hydrogène. Il doit servir de phase mobile dans le système. Sa pression et son débit doivent donc pouvoir être réglés et mesurés. Le rôle de l'in-

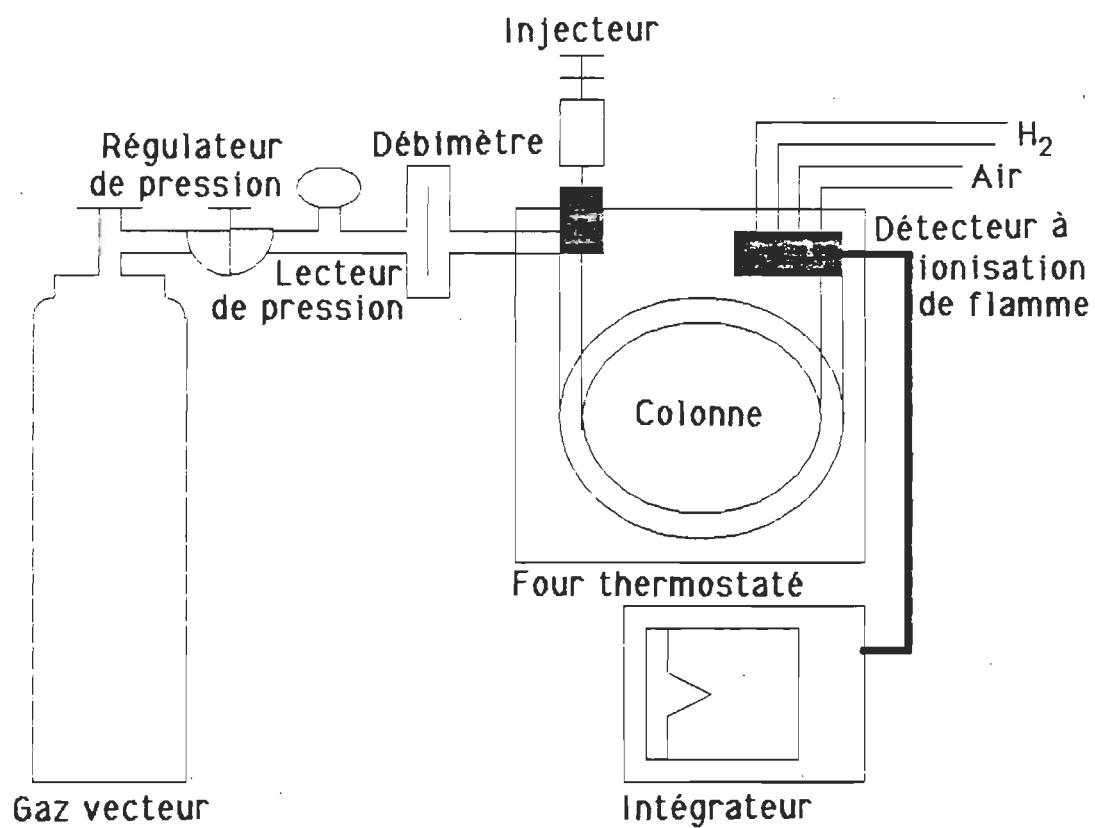


Figure 21. Schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse.

jecteur est de volatiliser l'échantillon avant qu'il n'atteigne la colonne. Sa température est habituellement réglée à 50 °C au-dessus du point d'ébullition du produit injecté le moins volatile. Le volume d'échantillon injecté varie de quelques dixièmes de μL à 2,0 μL .

Il existe plusieurs types de colonnes en CG: les colonnes remplies et les colonnes capillaires. Notre discussion ne s'attardera qu'aux colonnes remplies. Elles sont généralement faites de tubes enroulés de métal ou de verre de 2 ou 3 m, avec des diamètres internes de 2 à 4 mm. Le support solide de la phase stationnaire, qui est souvent de la terre de diatomée, doit être inerte aux températures d'analyse. En CG, c'est l'optimisation de la programmation des températures plutôt que la variation de la phase mobile qui procure une bonne séparation des pics des produits. Un des détecteurs couramment utilisé est le détecteur à ionisation de flamme. La combustion est générée par une étincelle dans un mélange d'air et d'hydrogène. Les produits qui sortent de la colonne sont ionisés et sont détectés par un collecteur chargé.

La CG est utilisée dans nos expériences pour mesurer la composition totale des lipides en acides gras. À cette fin, les lipides doivent être cli- vés en trois parties, soit la tête polaire et les deux acides gras. Cette opération est décrite dans les prochains paragraphes.

Méthylation. Toutes les étapes de la réaction se font sous atmosphère inerte d'argon ou d'azote. Une quantité d'environ 0,1 mg de lipides est transférée dans une fiole de réaction de 5 mL (Pierce Chem. Co., Rockford, IL) avec un solvant qui est ensuite évaporé à sec par entraînement sous azote ou argon à l'aide d'un bloc chauffant (Multi-Block Heater, Lab-Line Instrum. Inc., Melrose Park, IL). Puis, 1 mL d'une solution de trifluorure de bore dans du méthanol ($\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 14 % m/v, Pierce Chem. Co., Rockford, IL) est ajouté aux lipides à l'aide d'une seringue. La fiole est hermétiquement refermée et chauffée à 100 °C pendant 15 minutes à l'aide du bloc chauffant. Le chauffage augmente la pression à l'intérieur de la fiole et le septum recouvert de PTFE devient alors concave. Il est tout particulièrement important à ce stade de vérifier l'étanchéité du bouchon car les produits contenus dans la fiole peuvent s'échapper dans l'air ambiant. La réaction de méthylation est indiquée à la Figure 22. Le BF_3 qui est un acide de Lewis initie la réaction et la méthylation se produit grâce à la présence de méthanol. À la fin des 15 minutes, la fiole est retirée du bloc chauffant et est refroidie durant 10 minutes. Le contenu est alors transféré, à l'aide d'une pipette Pasteur propre, dans une éprouvette munie d'un bouchon dont l'intérieur est recouvert de PTFE. La fiole de réaction est rincée deux fois avec de l'hexane (distillé ou de qualité CLHP) et une fois avec de l'eau bidistillée. L'hexane et l'eau de rinçage sont ajoutés au

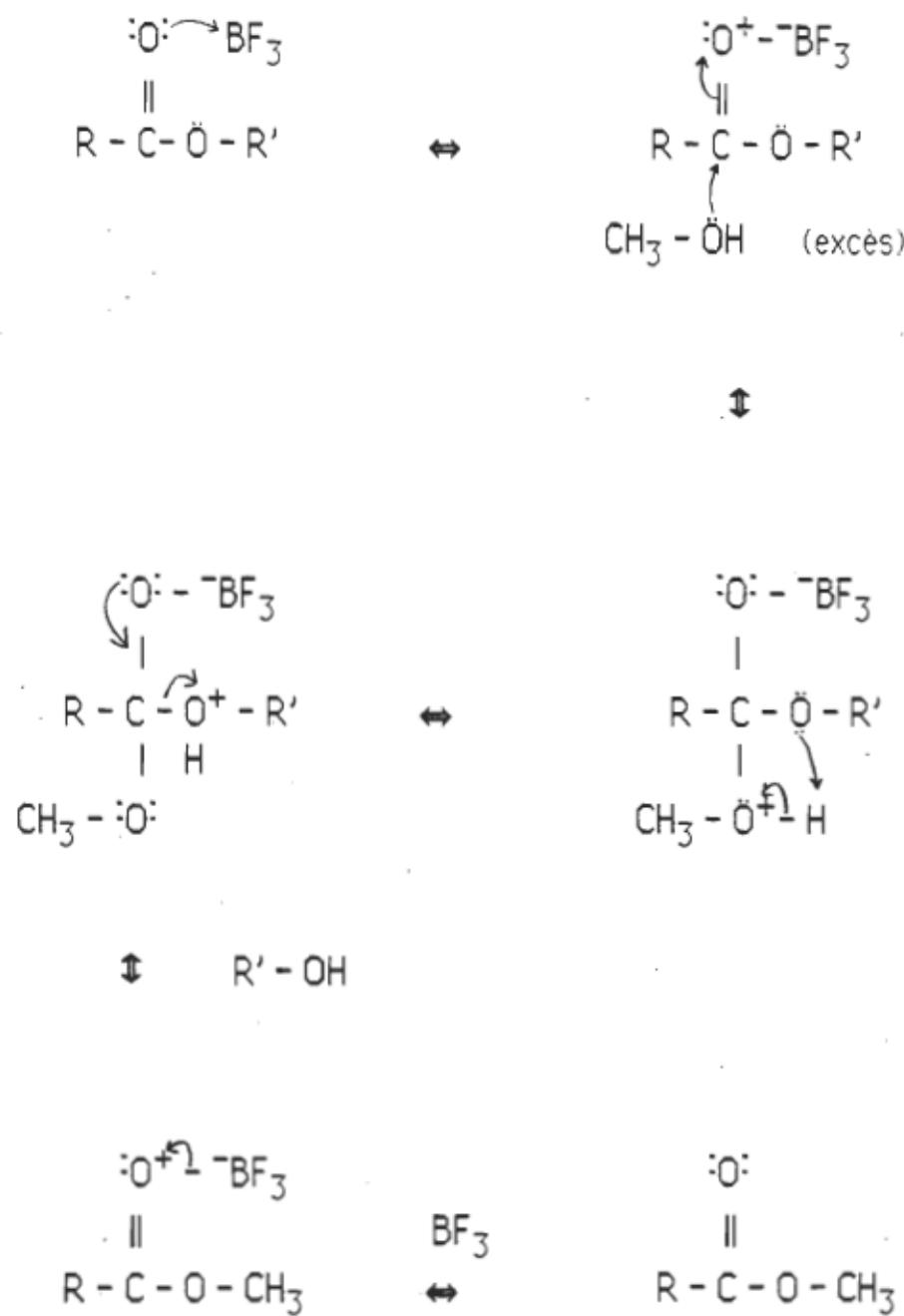


Figure 22. Mécanisme de la réaction de méthylation des acides gras des lipides (basé sur Allinger et coll., 1975).

contenu de l'éprouvette. L'extraction, qui se fait par une douzaine d'inversions de l'éprouvette fermée, a pour but de séparer la tête polaire et autres contaminants solubles (comme les excès de réactifs) dans la phase aqueuse des acides gras méthylés qui restent dans la phase organique. La phase organique (supérieure) est transférée à l'aide d'une pipette dans une seconde éprouvette de même type. L'interface de la première éprouvette est rincée deux fois avec un peu d'hexane qui est aussi transféré dans la seconde éprouvette. On procède ensuite à un séchage par l'ajout de 0,2 à 0,3 g de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4 , Fisher Sci., Fair Lawn, NJ) qui a préalablement été séché une heure à l'étuve à 100 °C. Le contact entre la phase organique et le sulfate de sodium est aussi bref que possible, c'est-à-dire quelques secondes. La phase organique est transférée dans une fiole de 3,5 mL (Pierce Chem. Co., Rockford, IL) et est évaporée à sec par entraînement sous azote ou argon à l'aide du bloc chauffant. Les lipides méthylés sont ensuite solubilisés dans 40 μL d'hexane distillé dans un bain ultrasonique.

Il est préférable de faire deux ou même trois méthylations de chaque échantillon à analyser par CG afin de vérifier la reproductibilité, de même qu'un blanc, c'est-à-dire une méthylation au cours de laquelle toutes les conditions expérimentales et tous les réactifs sont appliqués à une fiole

ne contenant pas de lipides. Ceci permet de déceler la présence d'impuretés dans les réactifs. Un autre blanc constitué exclusivement d'hexane est aussi recommandé afin de vérifier les solutions de standards d'acides gras méthylés faites à partir de ce solvant.

Conditions d'analyse. Le chromatographe en phase gazeuse utilisé est le modèle 3700 de Varian (Sunnydale, CA). Nous n'utilisons que son détecteur à ionisation de flamme. Le Tableau 12 présente les conditions expérimentales de l'analyse des acides gras méthylés.

Tableau 12

Conditions chromatographiques de l'analyse des acides gras méthylés des lipides du chloroplaste.

Condition	Valeur
<u>Pressions</u>	
N_2 à la bombone	$4,2 \times 10^2$ kPa ou 60 psi
N_2 au CG à la T° de la pièce à la T° initiale	$1,4 \times 10^2$ kPa ou 20 psi
H_2 à la bombone	$1,9 \times 10^2$ kPa ou 28 psi
Air à la bombone	$2,8 \times 10^2$ kPa ou 40 psi
<u>Débits</u>	
N_2 à la sortie du CG à T° de la pièce	20 mL/min
H_2 à la sortie du CG à T° de la pièce	30 mL/min
Air à la sortie du CG à T° de la pièce	300 mL/min
<u>Températures</u>	
Injecteur	260 °C

Tableau 12 (Suite)

Condition	Valeur
Détecteur IF	300 °C
<u>Colonne</u>	
Initiale	170 °C
Durée	2 minutes
Augmentation	3 °C/min
Finale	235 °C
Durée	10 minutes
<u>Colonne</u>	
Type	GP 10 % SP 2330 sur 100/120 Chromosorb WAW, Supelco Inc., Bellefonte, PA
Longueur	2,4 m
Diamètre externe	6 mm
Diamètre interne	2 mm
T° critique	275 °C
Tube	Verre
<u>Intégrateur</u>	
Type	Shimadzu C-R3A, Chromatopac, Kyoto, Japon
Atténuation	4 (16 mV pleine échelle)
Vitesse de déroulement du papier	5 mm/min
Largeur de pic minimum	
pour la détection	30 secondes
Sensibilité de la détection des pics	70 µV/min
Dérivation de la ligne de base	0 µV/min
Aire minimum des pics	
pour la détection	10 unités
Temps d'altération des paramètres	
(Sensibilité, largeur de détection	
pour la prévention de l'élargissement des pics)	34 minutes
Temps d'arrêt de l'analyse	33,5 minutes
Méthode	621
Format	2

Tableau 12 (Suite)

Condition	Valeur
<u>Programmation</u>	
Élimination des pics inutiles	de 0 à 2,5 minutes

Le principal constituant du gel dans la colonne, le Chromosorb WAW, est une silice poreuse blanche lavée à l'acide, provenant de la terre de diatomée et dont les particules mesurent de 125 à 140 µm. En plus de ce constituant, il y a 10 % de gel traité contenant 68 % de greffons cyano-propyléniques. La Figure 23 représente la structure moléculaire de ce gel.

Le CG est mis en marche la veille de l'expérimentation en respectant les conditions expérimentales. Cependant, la colonne est chauffée à 250 °C toute la nuit ou durant environ 12 heures. Ceci a pour but de nettoyer la colonne en désorbant tout contaminant.

Analyse des résultats. Les standards servent à identifier les temps de rétention des différents acides gras méthylés. Les acides gras contenus dans les échantillons peuvent alors être déterminés par comparaison. L'intégrateur fournit aussi l'aire sous les pics (en unités fixes) ainsi que les pourcentages respectifs par rapport à l'aire totale de tous les pics du chromatogramme. Les temps de rétention des acides gras, pour un

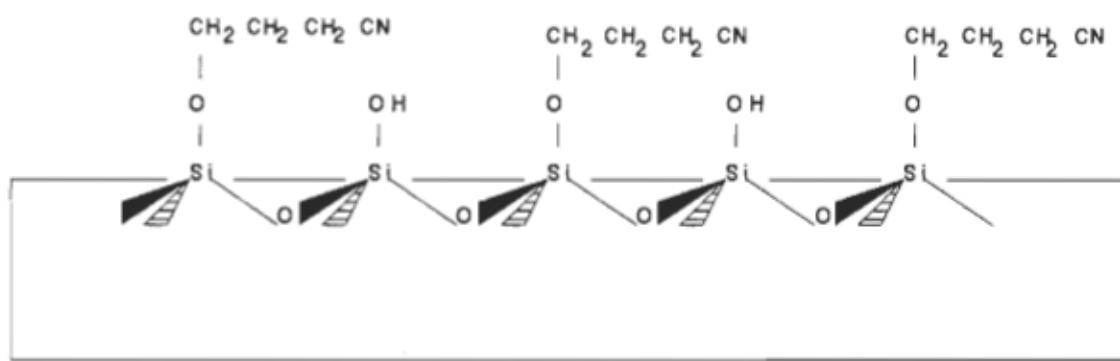


Figure 23. Structure moléculaire des greffons cyanopropyliques SP-2330 sur le gel.

même nombre d'insaturations, sont proportionnels au nombre de carbones.

De même, pour des acides gras ayant le même nombre de carbone, les temps de rétention sont proportionnels au nombre d'insaturations. Les analyses de CG permettent de calculer les masses molaires des lipides ainsi que leur indice d'insaturation. Ceux-ci représentent le nombre moyen d'insaturations par acide gras et se calculent selon la relation 2.9.

$$I_i = \sum (N_i \cdot \%_i) \quad (2.9)$$

où I_i est l'indice d'insaturation, N_i est le nombre d'insaturations sur l'acide gras «i» et $\%_i$ est son pourcentage de présence dans le lipide.

Matériel injecté. Le volume d'injection des échantillons et des standards varie de 0,4 à 1,0 μL . Le Tableau 13 indique les standards utilisés. Ils proviennent tous de la compagnie Supelco Canada Ltée (Oakville, ON).

Tableau 13

Standards utilisés et leurs principaux acides gras méthylés.

Standard	Acide gras méthylé
PUFA #1	C14:0; C16:0; C16:1 ω 7; C18:1 ω 9; C18:1 ω 7; C18:2 ω 6; C20:1 ω 9; C18:4 ω 3; C22:1 ω 11; C22:1 ω 9; C20:5 ω 3; C22:5 ω 3; C22:6 ω 3.
PUFA #2	C14:0; C16:0; C16:1 ω 7; C18:0; C18:1 ω 9; C18:1 ω 7; C18:2 ω 6;

Tableau 13 (Suite)

Standard	Acide gras méthylé
	C18:3 ω 6; C18:3 ω 3; C20:3 ω 6; C20:4 ω 6; C20:5 ω 3; C22:4 ω 6; C22:5 ω 3; C22:6 ω 3.
Méthyl	
Linolénate	C18:3 ω 3.
GLC-10	C16:0; C18:0; C18:1; C18:2; C18:3.
GLC-60	C20:0; C20:1; C20:2; C20:3.

2.6 Monocouches

Les quelques pages qui suivent présentent une brève théorie de même que les conditions expérimentales de nos mesures en monocouche. À titre de référence, le livre de Gaines, publié en 1966, et le mémoire de maîtrise de G. Munger (1979), décrivent en détail les phénomènes aux interfaces et l'appareillage nécessaire aux mesures.

2.6.1 Théorie. Les phénomènes d'expansion des huiles à la surface de l'eau sont connus depuis l'antiquité. Cependant, leur compréhension est récente. C'est Langmuir, en 1917, qui a jeté les bases théoriques et a mis au point les moyens techniques afin d'étudier ces phénomènes de surface. Par ses calculs d'aire moléculaire, il a proposé que des molécules amphiphiles, comme les huiles, qui possèdent à la fois une portion hydrophile et une portion hydrophobe, s'organisent à l'interface d'une phase aqueuse

(aussi appelée sous-phase) et d'une phase gazeuse. Elles peuvent former, si elles ont l'espace nécessaire, une monocouche insoluble, c'est-à-dire qu'elles recouvrent la phase aqueuse en une couche d'une molécule d'épaisseur, la portion hydrophile pénétrant dans la phase aqueuse alors que la portion hydrophobe s'élève dans la phase gazeuse, dans un arrangement moléculaire ordonné, comme illustré à la Figure 9 (page 24).

L'aire moléculaire a_m , c'est-à-dire la surface disponible pour chaque molécule, est calculée selon l'expression 2.10.

$$a_m = S / n^s \quad (2.10)$$

où S est la surface totale de la monocouche et n^s est le nombre de molécules déposées sur cette surface. L'aire moléculaire est exprimée en $\text{\AA}^2/\text{molécule}$.

L'arrangement particulier présenté à la Figure 9 n'est pas sans rappeler l'organisation membranaire des cellules. En fait, les monocouches faites de composants membranaires sont souvent employées comme systèmes modèles pour les études biomimétiques, car elles se comportent d'une façon analogue à des demi-membranes (Lamarche et coll., 1988).

Les lipides se prêtent particulièrement bien aux études en monocou-

che car ils possèdent deux caractères fonctionnels distinctifs, les têtes polaires qui sont hydrophiles et les chaînes d'acides gras, qui sont hydrophobes. L'une des caractéristiques physiques qui est mesurée en monocouche est la pression de surface. Tout liquide possède une tension superficielle à l'état pur, γ . Cette propriété peut être représentée comme la force qui tient ensemble les molécules de la phase liquide ou qui tend à attirer vers l'intérieur du liquide les molécules se trouvant à sa surface. Elle peut aussi être exprimée comme le travail à fournir pour expandre la surface d'un liquide par rapport au changement de surface. La présence de molécules amphiphiles formant une monocouche à l'interface gaz-liquide modifie les forces de cohésion de la phase aqueuse changeant ainsi la tension de surface.

La balance de Langmuir développée au début du siècle permet de mesurer ces différences de tension superficielle. Elle utilise une barrière flottante qui sépare deux compartiments d'un bain rempli de phase aqueuse. Dans un de ces compartiments, une monocouche est déposée alors que l'autre interface est gardée propre. Le déplacement de la barrière flottante est proportionnel à la pression de surface π engendrée par la présence de la monocouche selon la relation 2.11.

$$\pi = \gamma^* - \gamma \quad (2.11)$$

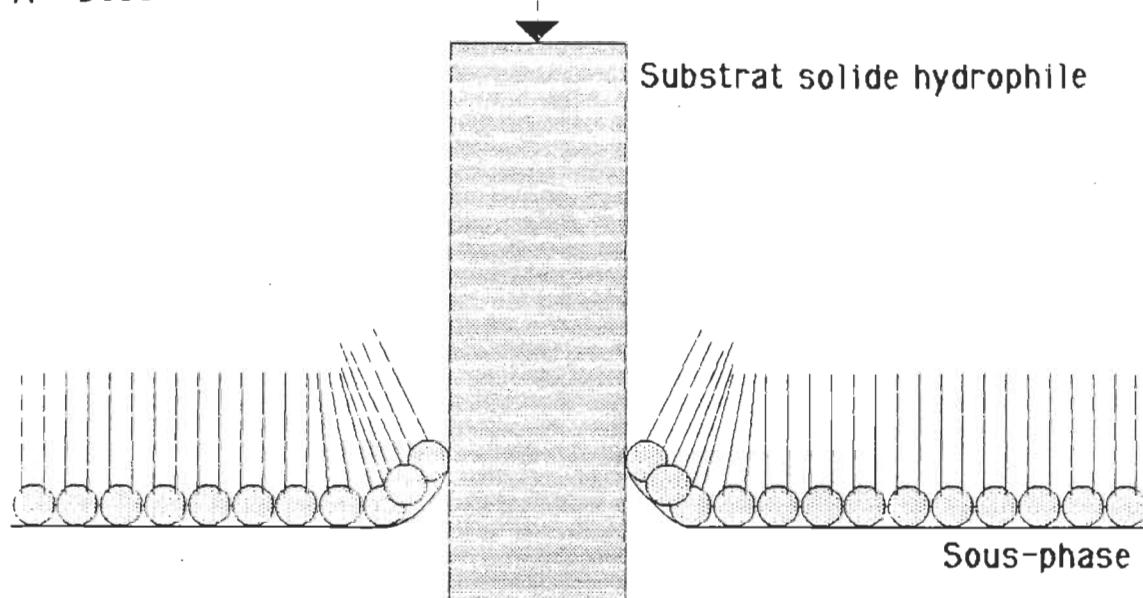
où γ est la tension de surface de l'interface propre et γ' est la tension superficielle de l'interface en présence de la monocouche.

En faisant varier l'aire occupée par la monocouche par une compression qui diminue l'espace moléculaire moyen, à une température donnée, une isotherme de pression de surface, c'est-à-dire une représentation graphique de la pression de surface par rapport à l'aire moléculaire disponible, permet de déterminer d'autres caractéristiques physiques de la monocouche telles que les changements de phase, les aires moléculaires limites, etc.

Les monocouches étalées à la surface de la sous-phase peuvent être transférées sur un substrat solide. Cette technique de déposition de films est nommée «Langmuir-Blodgett» (LB) qui sont les deux principaux auteurs de cette méthode. Si le substrat est hydrophile comme une lame de quartz, aucune déposition ne se produit lors de la descente du substrat dans la sous-phase, les parties hydrophobes des molécules en monocouche n'ayant aucune interaction avec ce substrat. Par contre, lors de la remontée, les parties hydrophiles peuvent s'y fixer grâce aux interactions de ponts hydrogènes ou dipolaires comme indiqué à la Figure 24.

Avant de décrire le montage du bain de Langmuir utilisé au cours de

A - Descente



B - Remontée

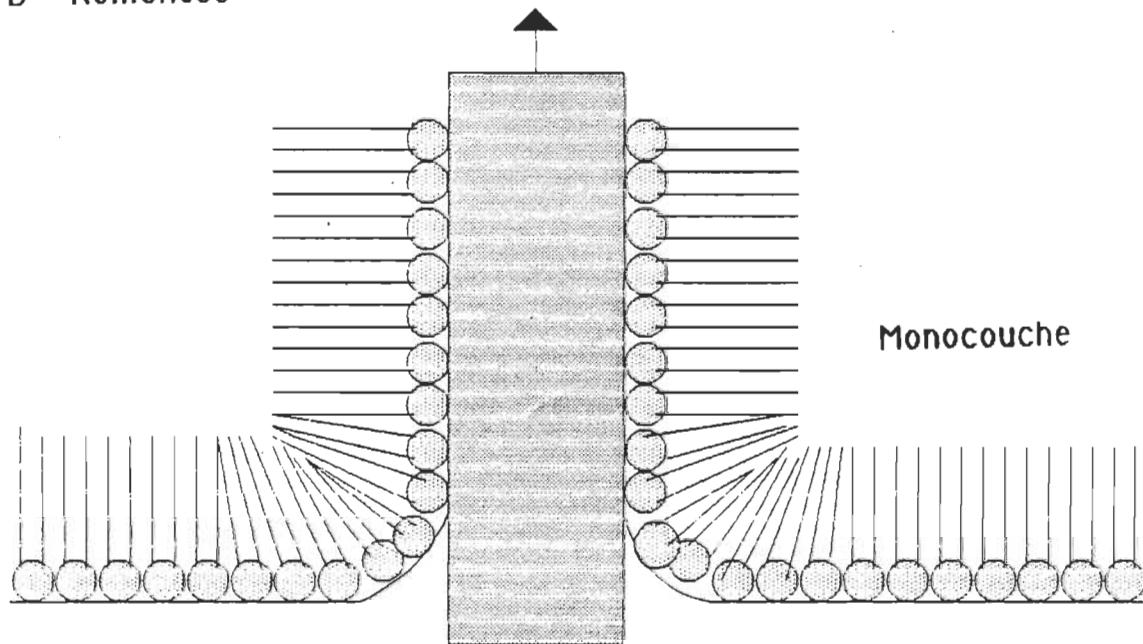


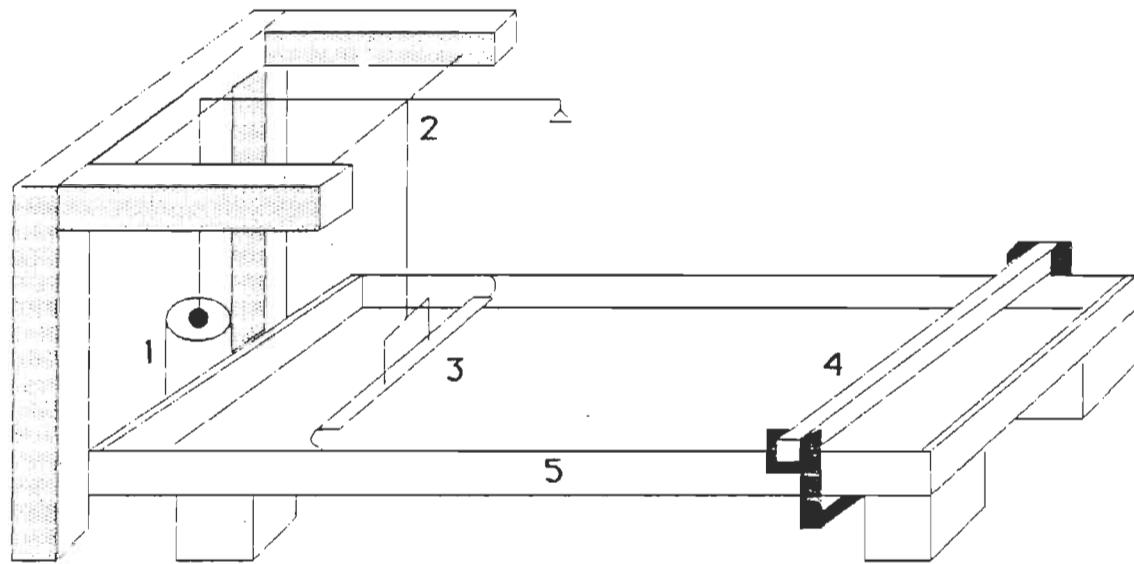
Figure 24. Déposition d'une monocouche sur un solide hydrophile.

nos expériences, nous présentons la méthode de purification du sel utilisé dans le tampon sur lequel les monocouches sont déposées.

2.6.2 Purification du phosphate de sodium dibasique. Les sels utilisés dans les tampons servant de sous-phase lors des études en monocouche sont souvent contaminés par des agents tensioactifs qui interfèrent avec les mesures de pression de surface à l'interface air-eau. Une méthode de purification du phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4) mise au point par S. Picard (1988) a permis l'utilisation de ce sel pour nos études. Cette purification consiste à agiter 50 g de phosphate Na_2HPO_4 anhydre (ACP Chem. Inc., Montréal, QC) dans 100 mL de chloroforme (Anachemia Accusolv, Montréal, QC) durant 10 à 15 minutes. Un repos de cinq minutes suivi de la décantation du solvant achève la première étape de la méthode. Cette étape est répétée cinq fois et un séchage sous vide pendant une à deux heures termine la purification.

2.6.3 Bain de Langmuir et isotherme de pression de surface

Le bain utilisé afin d'obtenir les isothermes de pression de surface sert également à mesurer les durées de vie de fluorescence de mélanges de chlorophylle *a* et de lipides à l'interface air-eau. Les principales composantes du bain sont illustrées à la Figure 25.



1 - Transducteur magnétique

2 - Balance de Langmuir

3 - Flotteur

4 - Barrière mobile

5 - Bassin

Figure 25. Bain de Langmuir.

Le bain utilisé est fait d'aluminium dont l'intérieur est recouvert de PTFE adhésif (Fluorocarbon Dielectric Division, Lockport, NY). Ce matériel hydrophobe produit un ménisque de phase aqueuse qui dépasse les bords du bain facilitant les étapes de nettoyage de sa surface et assurant aussi un bon contact entre la sous-phase, la barrière mobile et le flotteur. Le PTFE se nettoie par le frottement d'un papier absorbant (Kimwipes, Kimberly Clark Corp., Toronto, ON) imbibé d'éthanol. Le bain mesure 14,0 cm de large par 52 cm de long, a une profondeur de 4,4 cm et son rebord mesure 4 mm. De plus, ses parois sont constituées de canaux permettant la circulation continue d'eau venant d'un bain thermostaté (Lauda, Modèle k-21R, Brinkmann Instrum. Ltd., Rexdale, ON) réglé à 20 °C, de même que le passage de gaz tels que l'azote. Ce gaz ressort par les côtés supérieurs des parois en se dirigeant au-dessus de la monocouche, ce qui évite l'oxydation des molécules étalées à l'interface.

La barrière mobile qui comprime la monocouche est faite de laiton et a une largeur de 1,3 cm, une épaisseur de 6 mm et une longueur de 25,9 cm. Son poids garantit une bonne adhérence avec les rebords du bain, ce qui évite la fuite de matériel déposé à l'interface vers la surface disponible à l'arrière de la barrière mobile. Elle est aussi recouverte du PTFE et reliée pour son déplacement vers le flotteur à une vis sans fin placée sous le

bain. Cette dernière est activée par un moteur électrique, lui-même mis en marche par une boîte de contrôle. Les positions de départ et d'arrêt de la barrière mobile sont déterminées par celles de deux interrupteurs amovibles. La position de départ de la barrière mobile ne doit produire aucune pression de surface en présence de la monocouche. À la position d'arrêt, le collapse de la monocouche, c'est-à-dire la destruction irréversible de l'arrangement monomoléculaire à l'interface, doit être atteint.

La balance de Langmuir, représentée à la Figure 26 et qui mesure les pressions de surface est constituée d'un flotteur de Mylar (Du Pont Ltd., Montréal, QC) mesurant 12,5 cm de long par 0,8 cm de large et 0,125 mm d'épais, relié aux parois du bain par deux minces bandes de PTFE mesurant 5,0 cm de long par 1 cm de large et dont l'épaisseur est de 0,125 mm (Carborundum Co., Farmingdale, NY). Ces bandes sont fixées à l'aide de cire et sont placées en demi-cercle, l'un convexe l'autre concave, aux extrémités du flotteur de façon à empêcher le matériel déposé à l'interface d'atteindre le compartiment propre mesurant environ 6 cm de long à l'arrière du flotteur. Elles doivent cependant être suffisemment flexibles pour permettre au flotteur de se déplacer librement de quelques millimètres. Les bandes sont donc installées avec les longs côtés tranchants perpendiculaires à l'interface. Le flotteur est troué à deux endroits afin de le relier

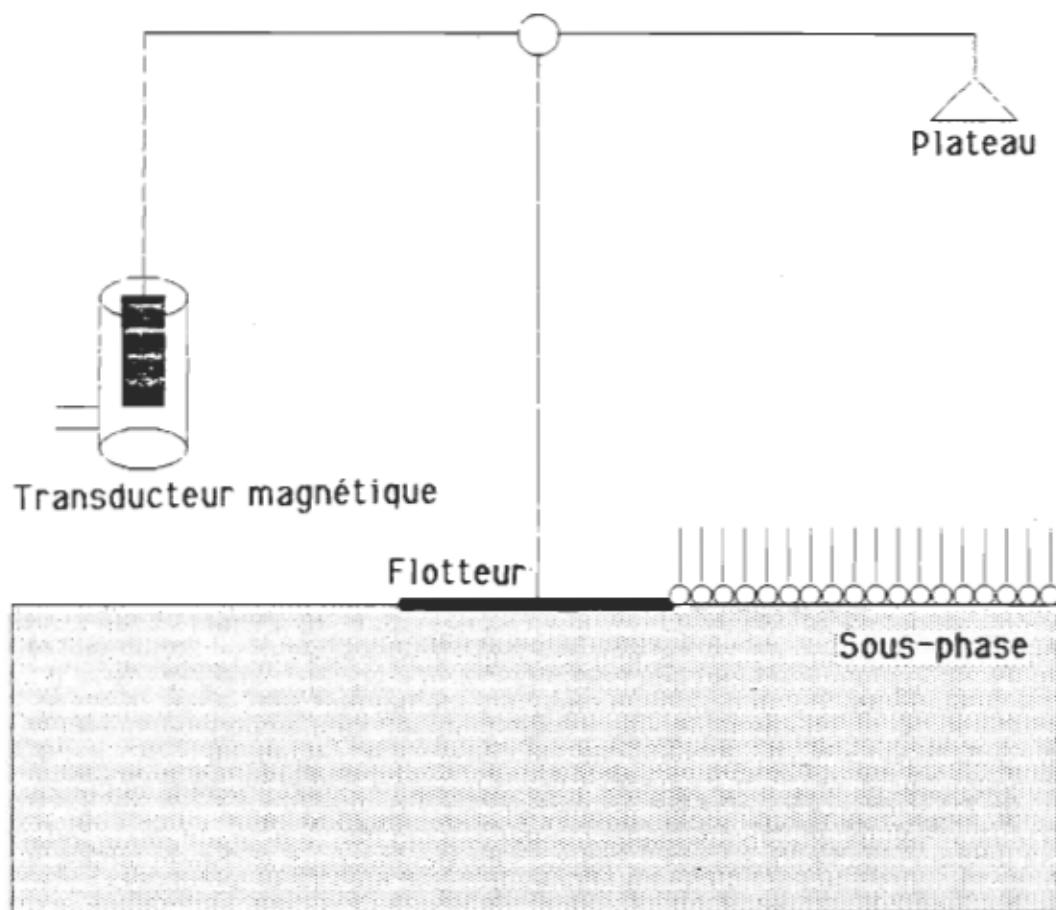


Figure 26. Schéma général de la balance de Langmuir.

aux fourchettes d'une barre verticale elle-même fixée à un fil de torsion horizontal placé dans le sens de la largeur du bain. Le mouvement du flotteur vers l'arrière lors de la compression de la monocouche par la barrière mobile est donc transmis à ce fil de torsion. Ce dernier est un fil de guitare (Fullerton, Fender Musical Instrum., CA) de 0,05 cm de diamètre dont la force de rappel doit être telle que les pressions de surface au col-lapse soit plus petites que la limite maximale de la linéarité du balancier. À l'endroit où sont joints la barre verticale et le fil de torsion, deux bras horizontaux, perpendiculaires au fil de torsion, dans le sens de la longueur du bain, sont également reliés au système du balancier. Le premier bras qui s'allonge vers l'avant du flotteur, et qui mesure 7,5 cm, sert à porter les poids étalonnés pour la calibration du déplacement du flotteur. Le se- cond bras qui s'étend vers l'arrière du flotteur est relié à un fil de nylon duquel pend une barre de métal qui est introduite dans un transducteur magnétique (Modèle 7 DCDT-050, Hewlett-Parckard, Boeblengen, Allema- gne). Lors des mouvements du flotteur, ces déplacements sont transmis à la barre de métal qui se déplace verticalement à l'intérieur du transduc- teur. Le schéma fonctionnel du transducteur apparaît à la Figure 27. Le mouvement de la barre métallique à l'intérieur du transducteur produit une différence de potentiel (tension) proportionnelle au déplacement de la barre. Cette tension aux bornes du transducteur est lue par un multimètre

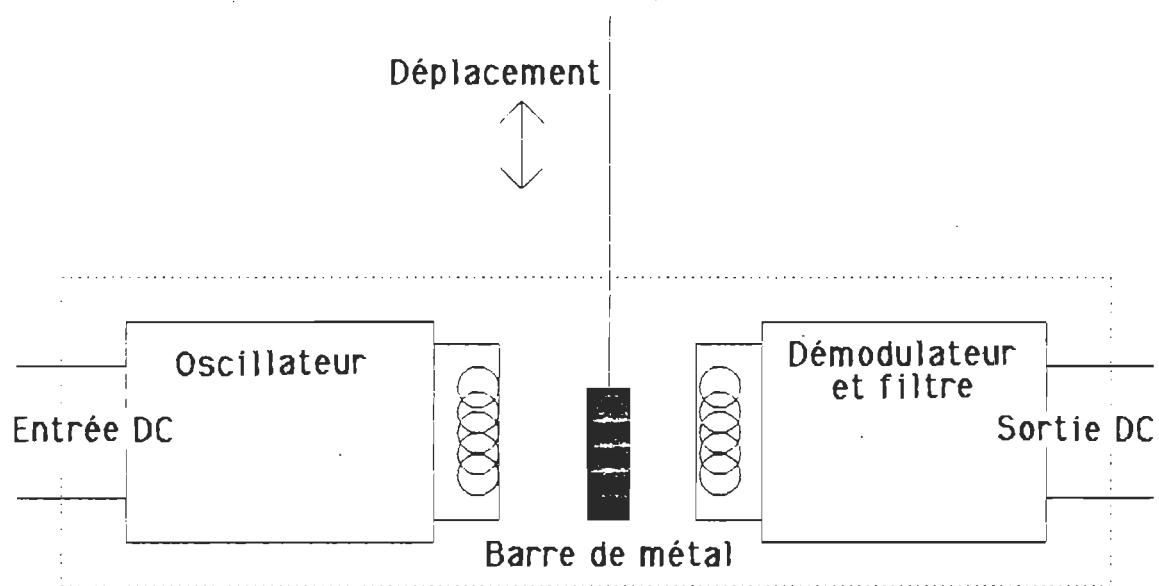


Figure 27. Schéma du fonctionnement électrique d'un transducteur magnétique.

(Brunelle Instrum. Inc., modèle 4060, St-Élie d'Orford, QC) et enregistré par un ordinateur (Apple IIc, Cupertino, CA). Ce signal électrique est aussi relié à l'amplitude du mouvement du flotteur sous l'action de la compression de la monocouche.

Comme indiqué précédemment, la mesure de la pression de surface se fait par la différence des tensions superficielles des interfaces de chaque côté du flotteur. Le transducteur émet un signal électrique dû au déplacement du flotteur, ce déplacement est proportionnel à la force appliquée sur la monocouche. La force de rappel est fournie par le fil de torsion. La sensibilité s de la balance est déterminée par la relation 2.12.

$$s = p \cdot g^* \cdot L_h / L_v \cdot L_e \quad (2.12)$$

où p est la pente de la calibration de la balance (masses déposées dans un plateau à l'extrémité du bras horizontal de la balance de Langmuir en fonction de la tension générée) en g/V; g^* est l'accélération gravitationnelle qui vaut $9,8 \text{ m/s}^2$; L_h est la longueur du bras horizontal du balancier où on dépose les masses de calibration; dans notre cas cette longueur est de 7,5 cm; L_v est la distance entre le film déposé à l'interface et le fil de torsion qui vaut 10,0 cm; et L_e est la longueur effective du flotteur, soit dans notre cas 13,25 cm, et calculée selon l'expression 2.13.

$$L_e = L_f + 0,5 (l_b - L_f) \quad (2.13)$$

où L_f est la longueur du flotteur (12,5 cm) et l_b est la largeur du bain (14,0 cm). Lorsque les valeurs L_h , L_v et L_e sont exprimées en mètre, la sensibilité est en $\text{mN} / \text{m} \cdot \text{V}$. La calibration, le calcul de la sensibilité et l'enregistrement des isothermes se font par ordinateur grâce à un programme mis au point par P. Boivin, auxiliaire de recherche.

Un autre facteur important à considérer lors des mesures de pression de surface est le déplacement du flotteur vers l'arrière qui augmente l'aire occupée par la monocouche. Il faut donc corriger l'aire en fonction du déplacement du flotteur. Ce facteur de déplacement (d) est le rapport du déplacement et de la tension développée aux bornes du transducteur en mm / V . Pour notre bain de monocouche, ce facteur d équivaut à 1,5 mm / V. Le calcul de l'aire réellement occupée par la monocouche a_m se fait selon la formule 2.14.

$$a_m = l_b (L + d \cdot \Delta V) / n^s \quad (2.14)$$

où L est la longueur du film entre la position zéro du flotteur et la barrière mobile, l_b est la largeur du bain, d est le facteur de correction dû au déplacement du flotteur, ΔV est la tension au transducteur, et n^s est le nombre

de molécules déposées à l'interface.

La sous-phase utilisée pour les isothermes et les mesures de durée de vie de fluorescence est un tampon de phosphate de sodium dibasique 10^{-3} M (Na_2HPO_4 , purifié comme à la section 2.6.2, ACP Chem. Inc., Montréal, QC) ajusté à un pH de 8,00 à l'aide de phosphate de sodium monobasique monohydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Sigma Chem. Co., St-Louis, MO), fraîchement préparé à l'aide d'eau bidistillée et saturé d'azote par un barbottement de quelques minutes. Le tampon est délicatement versé dans le bain et est laissé à reposer durant une période d'attente de 60 minutes ou plus, afin de permettre aux molécules tensioactives possiblement présentes dans la sous-phase d'atteindre la surface. Toute la surface du bain, derrière le flotteur, entre le flotteur et la barrière mobile et derrière la barrière est nettoyée à l'aide d'une pipette propre reliée au vide d'un robinet. La compression manuelle de la surface jusqu'à quelques centimètres du flotteur ne doit produire aucune augmentation de la pression de surface.

Les solutions de lipides ou les mélanges de chlorophylle *a* et de lipides (rapport 1:100) sont faites à partir de benzène fraîchement distillé, dans des flacons de 3,5 mL (Pierce Chem. Co., Rockford, IL) sous azote. Le benzène est un solvant idéal pour la déposition car il solubilise bien les

échantillons, s'étale et s'évapore rapidement et est très peu miscible avec l'eau. La concentration en lipides se situe généralement aux environs de 3×10^{-4} M, ce qui permet de déposer de 1,8 à $2,2 \times 10^{16}$ molécules à l'interface par 80 à 100 μL de solution. La chlorophylle a et les lipides sont pesés à l'aide d'une balance électronique (Cahn, modèle 2000, Ventron Instrum. Corp., Cerritos, CA). La déposition se fait à l'aide d'une micro-seringue de 100 μL (Unimetrics Corp., Modèle #TP5100, Analytical Instrum. Sc. Ltd., Milton, ON) en déposant doucement et à différents endroits de l'interface entre le flotteur et la barrière mobile, chaque goutte de la solution. Une seconde période d'attente de 15 minutes permet au benzène de s'évaporer complètement. La compression dirigée par l'ordinateur se fait à une vitesse de $5 \text{ \AA}^2 / \text{molécule} \cdot \text{minute}$. Puisque le bain de monocouche est inclus dans une chambre noire pour les mesures de durée de vie de fluorescence, les isothermes se font à la noirceur. Cependant, l'éclairage vert ambiant est d'une faible intensité afin de protéger la chlorophylle lorsque cette chambre n'est pas refermée. Lorsque les mesures sont terminées, la monocouche est enlevée de l'interface grâce à l'aspiration au moyen d'une pipette propre reliée au vide d'un robinet. D'autres isothermes peuvent être effectuées sur la même sous-phase lorsqu'elle est bien nettoyée.

2.6.4 Bain de déposition sur substrat solide. Le bain utilisé pour la déposition de monocouches sur substrat solide est relativement semblable à celui illustré à la Figure 25. Ce bain est fait de verre dont l'intérieur est recouvert du même PTFE adhésif et mesure 14,7 cm de large par environ 32,5 cm de longueur, 4,4 cm de profondeur et les rebords ont 6 mm d'épaisseur. Le bain est placé dans une chambre à humidité et température contrôlées fixées à 40 % et 20 °C. Le bain est recouvert d'une cage de verre synthétique sous laquelle l'atmosphère est inerte et il est déposé sur une table antivibration sous laquelle on retrouve quatre pneumatiques. La barrière mobile de PTFE mesure 25 cm de long par 1,2 cm de large et 0,67 cm d'épais. Le flotteur de Mylar a une longueur de 12,7 cm, une largeur de 0,8 cm et une épaisseur de 0,125 mm, et est fixé au parois du bain par deux bandes de PTFE comme dans le montage du bain des isothermes. La balance de Langmuir opère selon les mêmes principes qu'indiqués précédemment ($L_h = 6,0$ cm; $L_v = 8,8$ cm; $L_e = 13,7$ cm). Le fil de torsion mesure 0,033 cm de diamètre et les mouvements du flotteur sont lus sur un cadran indiquant l'angle de torsion du fil. La sensibilité de la balance est de $0,737 \theta \cdot m / mN$. Ainsi, pour que la déposition se fasse à 20 mN / m, le flotteur doit se déplacer d'un angle de 14,7 °. Avant de compacter la monocouche, le flotteur est manuellement déplacé vers l'avant

d'un angle équivalent à la pression de surface désirée. Lorsque le film est comprimé et a atteint cette valeur, le flotteur est donc revenu à sa position initiale de 0°. Ce bain possède deux systèmes d'ajustement de la pression de surface. Le premier utilise un laser (Metrologic Neon Laser, Merlan Sc. Ltd., Georgetown, ON) dont le faisceau est dirigé sur un miroir collé à la tige de métal verticale reliant le flotteur au fil de torsion. La réflexion est dirigée vers une cible au mur. Le second système d'ajustement de la pression de surface est un indicateur inclus dans la boîte de contrôle de la compression dont l'aiguille est centrée lorsque la pression de surface atteint 20 mN / m. Ceci est possible grâce à un minitransducteur qui n'est sensible qu'aux faibles déplacements du flotteur autour de cette pression de surface.

Les solutions des mélanges de lipides et de chlorophylle a sont préparées comme l'indique la section précédente. La déposition se fait avec environ 2×10^{16} molécules incluses dans un volume d'approximativement 100 μL . Les temps d'attente sont les mêmes que pour les isothermes. Les lames utilisées pour soutenir les films Langmuir-Blodgett sont nettoyées comme l'indique la section 2.3.1. Elles mesurent en moyenne 7,6 cm de long par 2,5 cm de large et 0,2 mm d'épais. Deux lames sont accrochées à un support double qui est relié à un système hydraulique de déposition,

dont on retrouve les caractéristiques dans l'article de Munger et coll. (1987). Les lames sont descendues manuellement de façon délicate jusqu'à environ 2 mm de la surface de la monocouche comprimée à 20 mN / m. Le mécanisme hydraulique est alors actionné afin de tremper les lames dans la sous-phase et permettre ainsi la déposition. Lorsque les lames de quartz touchent à la monocouche, la sous-phase doit mouiller les lames et la descente se fait sans sauts du ménisque sur la lame. La remontée des lames est accompagnée de la déposition de la monocouche sur le substrat solide et est couplée au mouvement de la barrière mobile activée par le contrôleur qui garde la pression de surface stable. La distance parcourue par la barrière mobile est notée car la diminution de l'aire de la monocouche doit être équivalente à l'aire déposée sur les deux lames. Ceci est vérifié par le calcul du rapport de déposition R_d selon la formule 2.15, qui idéalement doit être égal à 1,00.

$$R_d = [2(L_{dA} \cdot l_A) + 2(L_{dB} \cdot l_B)] / (L_d \cdot l_b) \quad (2.15)$$

où L_{dA} et L_{dB} sont les longueurs de déposition sur les lames A et B, l_A et l_B sont les largeurs des lames, L_d est la longueur parcourue par la barrière mobile au cours de la déposition et l_b est la largeur du bain. Les mesures de déposition sur les lames se font après les expériences de spectroscopie

en embuant les lames pour faire apparaître les monocouches.

Après la déposition, les lames sont transportées dans une boîte close et sous azote jusqu'aux instruments de spectroscopie. Une lame est utilisée afin de mesurer les spectres d'excitation de la chlorophylle a de la monocouche. C'est d'ailleurs notre seul moyen de vérification de la qualité de la chlorophylle a en monocouche.

2.7 Spectroscopie de fluorescence.

Cette dernière section du chapitre «Matériel et Méthodes» présente une brève théorie des spectroscopies de fluorescence et de durée de vie de fluorescence qui ont été employées au cours de nos expériences. Les appareils y sont sommairement décrits. Pour les lecteurs intéressés par ces spectroscopies, nous vous référons aux ouvrages de Lakowicz (1983) et de Demas (1983).

2.7.1 Théorie. Toutes les molécules possèdent différents niveaux d'énergie électronique, vibrationnelle et rotationnelle. À la température de la pièce, la plupart des molécules sont au niveau électronique et vibrationnel le plus bas, l'état fondamental. Les niveaux supérieurs des molécules, les états excités, peuvent être peuplés grâce à l'absorption de radiation dont l'énergie est égale à la différence énergétique entre l'état

fondamental et le niveau excité atteint, selon la loi de Planck-Einstein indiquée par la relation 2.16.

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu \quad (2.16)$$

où ΔE est la différence d'énergie entre les niveaux 2 et 1, E_2 est l'énergie de l'état supérieur, E_1 est l'énergie de l'état inférieur, h est la constante de Planck et ν est la fréquence de la lumière absorbée, inversement proportionnelle à la longueur d'onde λ . La Figure 28 représente les niveaux d'énergie d'une molécule fictive ainsi que les transitions électroniques possibles. D'après ce diagramme, la fluorescence est l'émission de radiation produite par la désactivation d'un électron de la molécule occupant les niveaux vibrationnel et rotationnel les plus bas d'un niveau électronique excité pour atteindre un niveau vibrationnel et rotationnel quelconque du niveau électronique fondamental. La loi de Planck-Einstein est aussi applicable, indiquant la fréquence et par conséquent, la longueur d'onde de la radiation émise. La multiplicité des états impliqués dans la transition doit être la même (pas de changement de spin de l'électron durant la transition). Lorsque cette multiplicité est différente, le phénomène décrit est la phosphorescence. Il existe d'autres processus de désactivation possibles non indiqués dans le diagramme de la Figure 28, qui

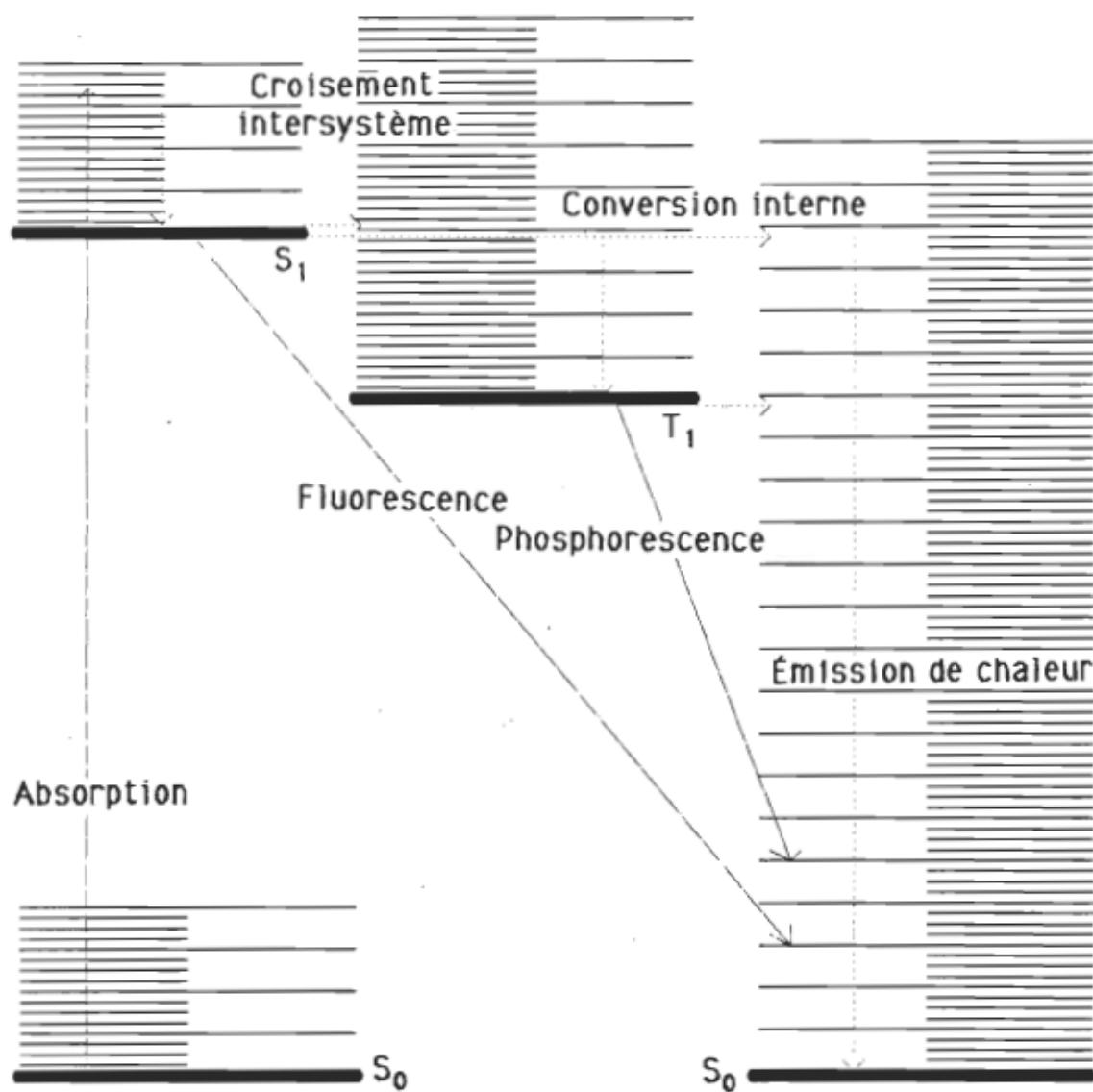
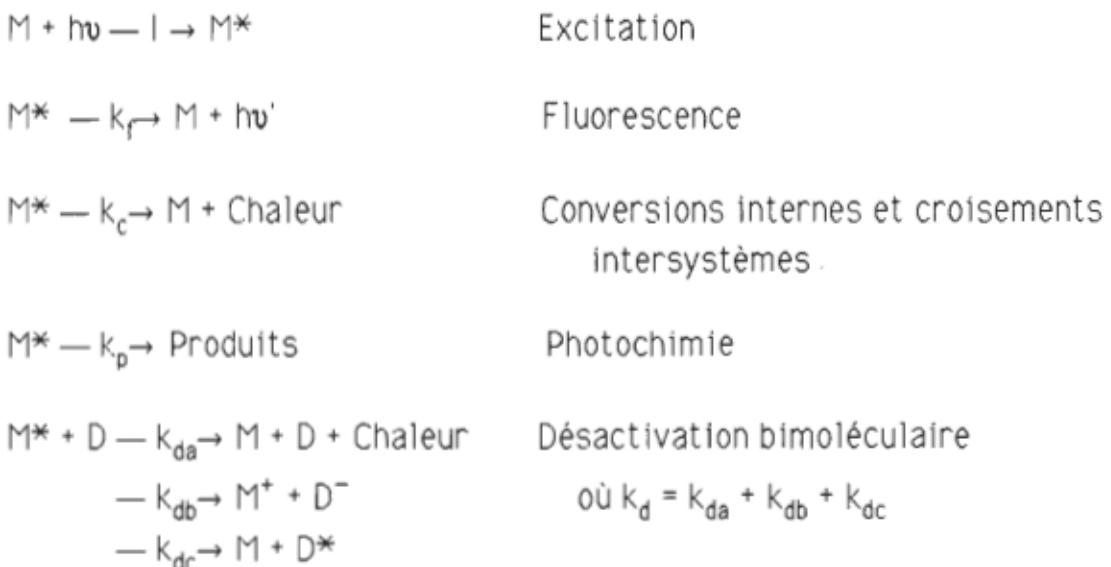


Figure 28. Diagramme de Jablonski.

impliquent les molécules voisines, de même espèce ou d'espèces différentes, qui peuvent agir comme désactivateur par collision ou par association avec l'état excité de la molécule étudiée.

Deux types de spectres peuvent être enregistrés en fluorescence. En illuminant un échantillon à une longueur d'onde donnée où il吸orbe, on peut observer l'intensité de la fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'émission. En fixant la détection (fluorescence) à sa fréquence maximale, on peut aussi balayer les longueurs d'onde absorbées par l'échantillon pour obtenir le spectre d'excitation.

Lorsqu'une radiation excite une molécule (M), il existe plusieurs processus de désactivation possibles, résumés par les mécanismes suivants:



où I est l'intensité de la radiation excitatrice, les « k » représentent les

constantes de vitesse des différents processus de désactivation et D (quencher) est une molécule qui s'approprie ou dégrade l'énergie de l'état excité de la molécule M.

Le taux de désactivation de l'état excité M^* est donné par la relation suivante, à condition que la production de molécules excitées M^* soit arrêtée ($I = 0$).

$$-\frac{d[M^*]}{dt} = (k_f + k_c + k_p + k_d [D]) [M^*]$$

On définit la durée de vie de fluorescence, τ , comme le temps nécessaire pour que la population de l'état excité $[M^*]$ passe à $[M^*]/e$. D'où,

$$\tau = 1 / (k_f + k_c + k_p + k_d [D]).$$

On constate ici que les autres mécanismes de désactivation influencent la population de M^* , c'est pourquoi les termes de ces mécanismes apparaissent dans l'expression de τ . La définition rigoureuse de τ est le temps de vie statistique moyen des molécules excitées M^* dans l'analyse de la population. L'expression mathématique de base de τ est donc

$$\tau = \int_0^\infty (-d[M^*]/dt) t dt / \int_0^\infty (-d[M^*]/dt) dt.$$

2.7.2 Spectrofluorimétrie. Nous avons effectué les spectres d'excitation des films Langmuir-Blodgett des mélanges de chlorophylle α et des lipides en proportion 1/100. Ces spectres permettent de vérifier la qualité de la chlorophylle α dans la monocouche par la présence d'une bande principale à 438 nm dans le spectre d'excitation, la détection de la fluorescence étant fixée à 678 nm. L'observation d'une bande autour de 416 nm indique que la chlorophylle α s'est dégradée en phéophytine α par la perte de l'atome de magnésium central (Picard, thèse de doctorat, 1990).

L'appareil utilisé est le spectrofluorimètre Spex Fluorolog II (Modèle 1870, Spex Industries Inc., Metuchen, NJ). La thèse de G. Picard (1990) décrit en détail cet appareil de même que les méthodes de correction des spectres. La Figure 29 présente le schéma de l'instrument utilisé.

La lampe à arc au xénon alimentée par une source (ELXE-500) émet la lumière pour exciter l'échantillon. Une fente ajustable fixe l'intensité de cette lumière incidente. La radiation est ensuite dirigée vers un monochromateur (Modèle 1681, Minimate-2) qui sélectionne les longueurs d'onde d'excitation. Le monochromateur est contrôlé par un ordinateur (Spex Datamate). Une seconde fente à la sortie du monochromateur permet la résolution du faisceau incident sur l'échantillon. Ce dernier est fixé à un porte-échantillon conçu spécialement pour les films minces qui possède deux

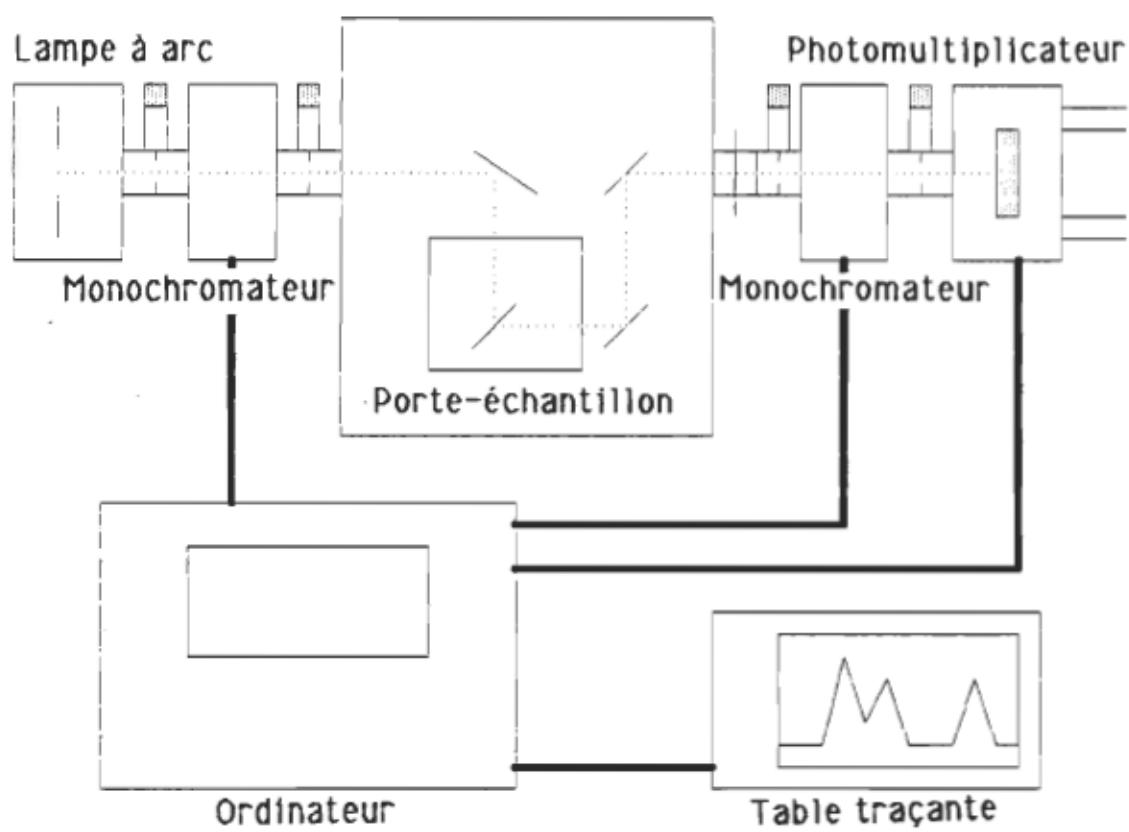


Figure 29. Schéma général du spectrofluorimètre.

positions de détection, frontale et latérale. Lors de nos mesures, la détection latérale est utilisée car l'intensité de la fluorescence est plus grande à cette position. Un polariseur vertical ainsi qu'un filtre à 550 nm sont insérés à la sortie de la boîte à échantillons. Une troisième fente ajuste l'intensité de la fluorescence. Un second monochromateur du même modèle, détermine les longueurs d'onde de détection. Il est également contrôlé par ordinateur. Une dernière fente à la sortie du monochromateur permet la résolution du faisceau fluorescent sur le photomultiplicateur de détection de la fluorescence (Products for Research Inc., Modèle R 928/115, Danvers, MA) refroidi par un courant d'eau froide. L'ordinateur enregistre les signaux du photomultiplicateur. De plus, il est relié à une table traçante pour l'impression des spectres. Lors des spectres d'excitation, la fluorescence est fixée à 678 nm et l'excitation s'étend sur les longueurs d'onde de 350 à 500 nm. Les mesures sont prises à tous les deux nanomètres pendant deux secondes. Les deux fentes à l'excitation sont fixées à 4 mm alors que les deux autres sont ajustées à 1,5 mm. Les spectres sont corrigés en fonction de l'émission de la lampe et de la sensibilité du tube photomultiplicateur par rapport à la longueur d'onde.

2.7.3 Appareillage de la durée de vie de fluorescence. L'appareil de durée de vie de fluorescence (PRA System 3000, Photochemical

Research Associates Inc., London, ON) illustré à la Figure 30, est conçu de façon à représenter le phénomène de la fluorescence en terme de probabilité qu'un photon de longueur d'onde λ_{em} soit émis au temps t après l'excitation. On attend généralement une réponse exponentielle décroissante en fonction du temps. Pour obtenir ce genre de résultat, l'appareil fonctionne ainsi:

- un court éclair de longueur d'onde appropriée est utilisé pour créer l'état excité de la molécule étudiée;
- cet éclair produit un signal de référence temporel qui démarre un «chronomètre électronique» qui est un convertisseur temps-amplitude de voltage;
- lorsque le détecteur (sensible à un seul photon) observe la fluorescence, un signal temporel arrête le chronomètre;
- le temps compris entre les deux signaux est enregistré et le chronomètre est remis à zéro;
- les quatre étapes précédentes sont répétées 30 000 fois par seconde durant tout le temps de la mesure.

Le temps enregistré est indiqué comme un compte (un photon) dans le canal approprié d'un analyseur qui englobe tous les temps semblables sur un court laps de temps. On obtient ainsi, après quelques heures de mesure,

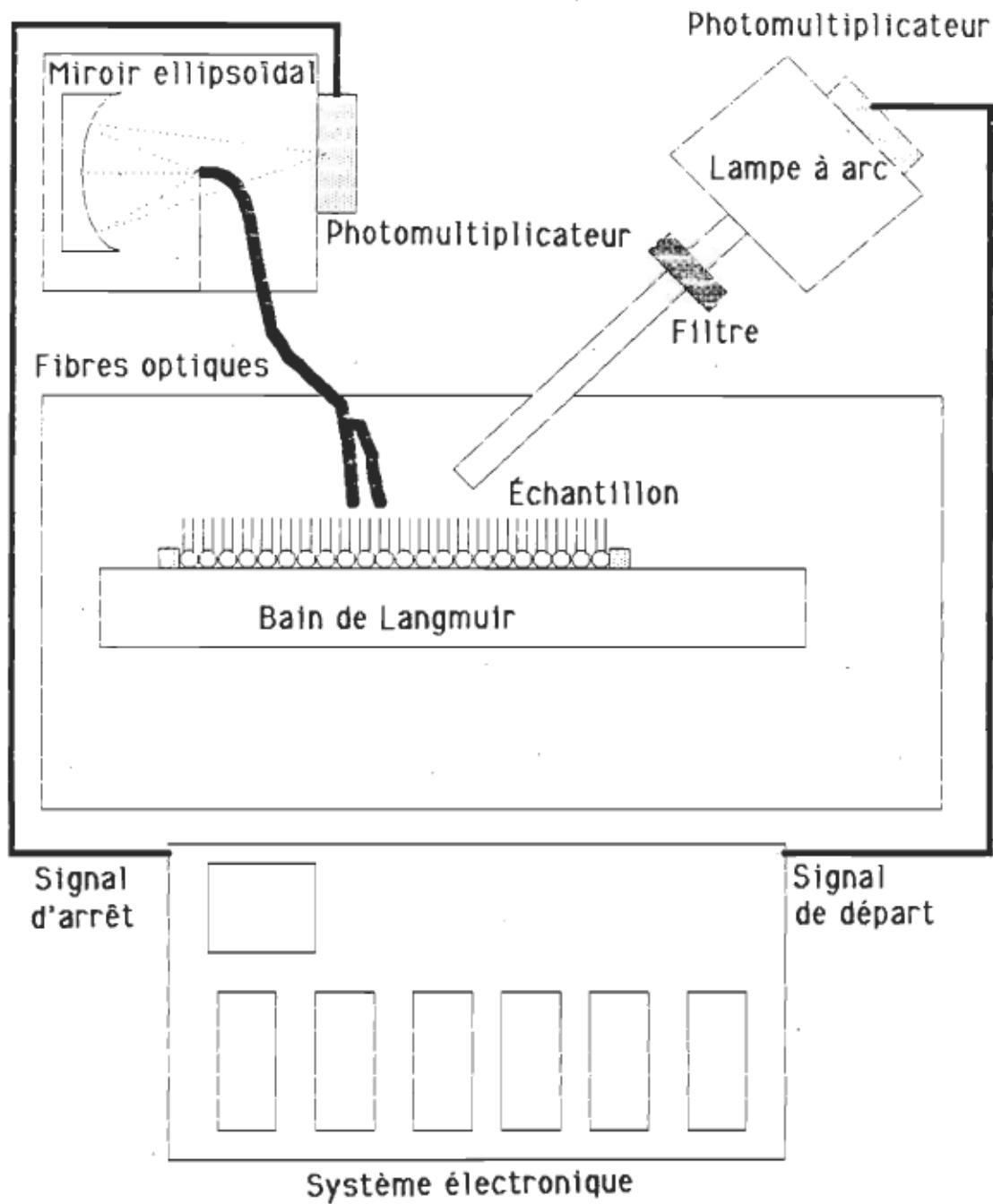


Figure 30. Schéma de l'appareil de durée de vie de fluorescence utilisé.

un graphique du nombre de comptes (de photons) par canal, représentatif de l'intensité de la fluorescence en fonction du temps. Les paramètres de décroissance de la population de l'état excité sont obtenus par la déconvolution du signal de l'échantillon et du profil de l'éclair par un ordinateur intégré au système.

Deux types d'échantillons peuvent être analysés par les mesures de durée de vie de fluorescence. Ce sont des mélanges de chlorophylle a et de lipides dans des proportions 1/100, soit à l'interface air-eau, soit en film Langmuir-Blodgett. Pour les mesures à l'interface, le faisceau excitateur de la chlorophylle a est dirigé à la surface d'un bain de monocouche inclus dans une petite chambre close mesurant 65 cm de long par 32 cm de large et 25 cm de haut, faite d'aluminium anodisé à laquelle sont reliés les appareils nécessaires à la mesure. Les mesures en film Langmuir-Blodgett peuvent être effectuées en plaçant la lame sur laquelle est déposée la monocouche sur un support de verre qui s'appuie sur les parois du bain de façon à ce que la monocouche soit suspendue dans le vide à l'endroit où convergent le faisceau d'excitation et les fibres optiques. De cette façon, la configuration de l'appareil pour les deux types de mesures demeure la même.

La lumière excitatrice est générée par une lampe à arc, sous azote à

50,7 kPa. L'espacement entre les électrodes est de 2 mm et la différence de tension générée par une source d'alimentation est de 5 kV. La fréquence des éclairs est fixée à 30 kHz, chaque éclair durant environ 4 ns. La lumière produite est principalement riche en rayons ultra-violets. Un filtre Oriel dont la bande passante est de 100 nm centrée à 440 nm réduit l'intensité du faisceau incident en ne laissant passer que les rayons susceptibles d'exciter la chlorophylle a sans la dégrader. Un photomultiplicateur R955P (Hamamatsu TV Co. Ltd., Hamamatsu, Japon), situé près de la lampe, capte des photons et produit le signal de départ de la rampe de voltage qui sert de chronomètre dans les nanosecondes. La lumière arrive à l'échantillon à un angle de 45°. Deux faisceaux de fibres optiques placés dans le plan normal à l'échantillon et aux rayons incidents et réfléchis, capte la fluorescence. La détection utilise un miroir ellipsoïdal qui a la particularité de posséder deux foyers. Au premier foyer, l'extrémité des fibres optiques dirige les photons captés vers le miroir qui les renvoit à un filtre interférentiel à 680 nm (Ditric Optics Inc., Hudson, MA) dont la bande passante est de 10 nm, pour atteindre le second foyer situé à l'entrée d'un second tube photomultiplicateur. Ce dernier est refroidi par un courant d'eau froide afin d'éviter les comptes thermiques, et une pompe à air dont le jet est dirigé à l'entrée du tube empêche la condensation de la vapeur d'eau au contact du photomultiplicateur froid. À l'arrivée d'un photon de

fluorescence, le tube produit un signal d'arrêt de la rampe de voltage. Le montage électronique qui analyse les signaux est principalement composé d'un analyseur multicanal (Tracor Northern, Modèle TN-1/50, Midleton, WI), de délais électroniques, de discriminateurs, de calibrateurs, de compteurs, etc. Un ordinateur VT103-AA, un lecteur de disquettes souples de 20 cm RX02, une imprimante Decwriter III de Digital Equipements Corp. (Marlboro, MA) ainsi qu'une table traçante (Hewlett-Packard, Modèle 7225B, San Diego CA) complètent l'appareillage de la durée de vie de fluorescence.

CHAPITRE 3

MÉTHODES PUBLIÉES EN CLHP

La première étape de l'expérimentation de ce projet de recherche est la purification du MGDG, du DGDG et du SQDG par CLHP. Nous avons donc, dans un premier temps, effectué une recherche bibliographique afin de connaître les méthodes de CLHP de nos lipides, publiées à ce jour dans la littérature scientifique. Le texte qui suit présente un résumé de cette recherche ainsi que les raisons qui nous ont poussé à établir nos propres méthodes de purification.

Le Tableau 14 indique les méthodes d'analyse en CLHP des lipides du chloroplaste publiées dans la littérature. Il faut noter ici que ces techniques n'ont pour but que l'analyse lipidique plutôt que la purification. Ce point est tout particulièrement important dans la discussion qui suit.

Il existe deux types de séparation possibles en CLHP des lipides du chloroplaste, basés sur la dualité fonctionnelle de ces molécules, c'est-à-dire la tête polaire et les acides gras.

Tableau 14

Comparaison des méthodes publiées en CLHP des lipides du chloroplaste.

Colonne	Phase mobile	Détection	Référence
Spherisorb C-6 4,6 X 125 mm	H ₂ O/MeCN* gradient	200 nm	Kesselmeier et Heinz, 1985 et 1987.
Biophase-ODS 4,6 X 250 mm	MeOH/tampon 95/5	205 nm	Lynch et coll., 1983.
Resolv C-18 3,9 X 150 mm	MeCN/IPA 65/35	205 nm	Bishop, 1987.
μBondapak C-18 3,9 X 300 mm	MeOH/H ₂ O/MeCN 90,5/7/2,5	205 nm	Demandre et coll., 1985.
Porasil 3,9 X 300 mm	IPA/Hex/H ₂ O gradient	205 nm	Demandre et coll., 1985.
Lichrospher Si 4,6 X 250 mm	MeCN/MeOH/H ₂ SO ₄ 135/5/0,2	214 nm	Marion et coll., 1988.
LiChrosorb NH ₂ 4,0 X 250 mm	IPA/Hex/H ₂ O/MeOH gradient	202 nm	Heemskerk et coll., 1986.

*MeCN: acétonitrile.

Jusqu'à maintenant, la plupart des publications se concentrent sur la séparation des lipides selon le type d'acides gras liés aux galactolipides et ce, dans le but de cerner leurs cheminements de synthèse dans le chloroplaste. Ainsi, les quatre premières méthodes indiquées au Tableau 14 utilisent des colonnes en phase inverse, non polaire, qui ont une grande affinité avec les longues chaînes hydrocarbonées des lipides. Les phases mobiles sont généralement polaires et constituées d'eau, d'acétonitrile, de

méthanol ou d'isopropanol. La détection, basée sur la capacité d'absorption des acides gras insaturés, se situe en moyenne de 200 à 205 nm. À noter que dans ce cas, les lipides contenant deux acides gras saturés ne sont pas détectés. C'est pourquoi les auteurs procèdent généralement à une seconde analyse des lipides, substitués d'un chromophore. Ces techniques, qui sont applicables à tous les lipides chloroplastiques, bien qu'intéressantes en soit, ne satisfont pas nos objectifs de purification. Le but de nos expériences est d'isoler des pigments et des autres contaminants, un lipide particulier, indépendamment de ses chaînes d'acide gras. Notre séparation doit donc se baser sur la différentiation de la tête polaire. Bien que la littérature n'abonde pas à ce sujet, quelques auteurs se sont tout de même penchés sur la question. Dans toutes les publications, incluant notre travail, ce type de séparation nécessite une colonne polaire, qui interagit avec les têtes hydrophiles, et un éluant de polarité faible à moyenne. La cinquième méthode de séparation des galactolipides, proposée par Demandre et coll. (1985), utilise une colonne de gel de silice (Porasil). Un gradient de solvant relativement simple, débutant par un mélange d'isopropanol et d'hexane (4/3), est graduellement enrichi en eau par une solution d'isopropanol, d'hexane et d'eau (8/6/1,5), par une programmation linéaire s'étalant sur 20 minutes. La séquence d'élution se termine en mode iso-

cratique dans 100 % du dernier mélange de solvants durant une autre période de 20 minutes. Un exemple des chromatogrammes obtenus par cette méthode est exposé à la Figure 31, où le MGDG et le DGDG sont identifiés. Les désavantages de cette méthode d'analyse sont nombreux. Un premier point défavorable est le manque de résolution entre le pic des pigments et celui du MGDG. Lorsque cette méthode est utilisée pour analyser le contenu lipidique d'un échantillon, cette pauvre résolution n'est pas limitative, mais lorsqu'il s'agit d'isoler le lipide, ce rapprochement est inopportun. En fait, le MGDG est élué parmi les contaminants formant la traînée du pic des pigments. Ainsi, cette méthode est inadéquate pour la purification du MGDG. Le second point au détriment de cette méthode est la coélution du DGDG et du SQDG. En effet, la méthode proposée ne sépare pas ces deux lipides. La purification du DGDG et de SQDG est donc impossible. Enfin, le troisième inconvénient à cette méthode est la variation de la ligne de base. L'amplitude de cette déviation est plus grande que certains pics importants sur le chromatogramme. Encore ici, lorsque le but de l'expérimentation est l'analyse des lipides, la variation d'une ligne de base n'entrave pas l'identification ni même les calculs tirés du chromatogramme. Par contre, lorsqu'on doit recueillir le produit à la sortie du système chromatographique, cette modification de la ligne de base peut induire des erreurs

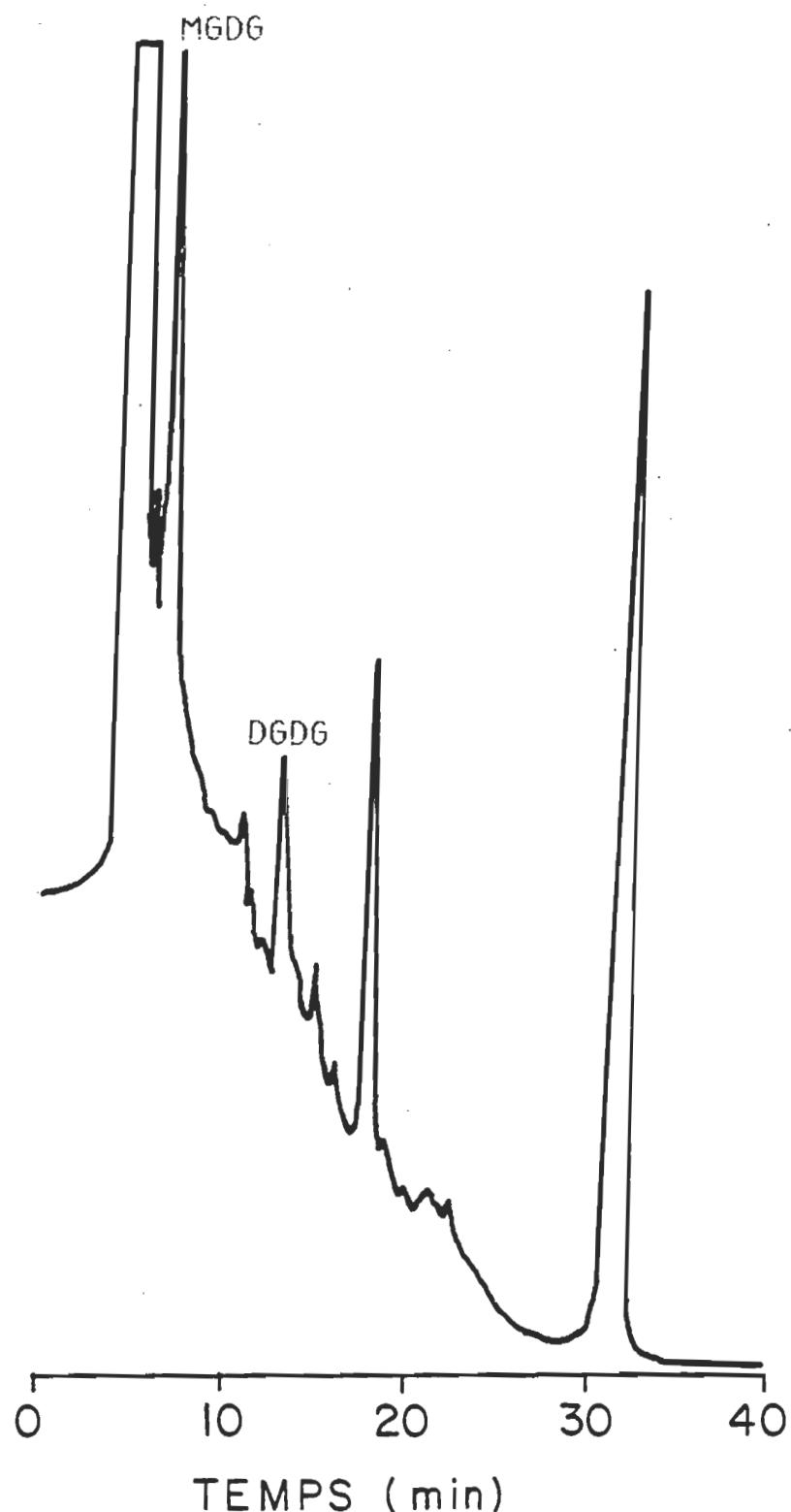


Figure 31. Chromatogramme de la méthode de CLHP proposée par Demandre et coll. (1985).

quant à la fin du pic et au début du suivant. Ce phénomène peut donc être préjudiciable à une bonne purification.

Dans la sixième méthode publiée, indiquée au Tableau 14, les auteurs utilisent également une colonne de silice comme phase stationnaire. Cependant, leur phase mobile est constituée d'acétonitrile, de méthanol et d'acide sulfurique (135/5/0,2). Cette composition n'est pas sans rappeler les réactifs nécessaires à la méthylation des acides gras des lipides, qui utilise le BF_3 , un acide de Lewis fort employé comme catalyseur, et le méthanol, source de méthanoate. Cette phase mobile, utilisant aussi un acide fort et du méthanol, pourrait donc entamer une réaction de méthylation des lipides séparés. Puisque le but des auteurs n'est que d'analyser les acides gras contenus dans leurs lipides, l'amorce de cette réaction, pendant que les lipides sont en solution dans la phase mobile, ne les gène pas. De fait, suite à la séparation des lipides, ils ajoutent 5 mL d'une solution de 2 % d'acide sulfurique dans le méthanol et complètent la réaction par un chauffage et une extraction des acides gras méthylés. Par contre, nous croyons que cette méthode est inappropriée pour la purification de nos lipides qui doivent rester intacts. De plus, la présence d'acide dans nos mélanges de lipides et de chlorophylle à lors des mesures spectroscopiques

piques en monocouche serait désastreuse pour ce pigment, facilement phéophytinisé en milieu acide.

La dernière méthode de séparation des galactolipides indiquée au Tableau 14 utilise une colonne polaire mais substituée d'un groupement amine ($\text{Si}-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$). La phase mobile est constituée de deux mélanges d'isopropanol, d'hexane, d'eau et de méthanol (A: IPA/Hex (80/55); B: IPA/Hex/ $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (80/55/15/10)) utilisés dans une programmation de gradient complexe. Cette méthode semble adéquate pour purifier le MGDG qui sort du système chromatographique après sept minutes, bien séparé des pigments et des autres lipides. Un chromatogramme obtenu par cette méthode est illustré à la Figure 32. Cependant, le DGDG prend plus de 20 minutes avant d'être élué. Cette technique pourrait donc être employée pour purifier le MGDG, mais ne serait pas efficace pour obtenir le DGDG pur puisque son temps de rétention est beaucoup trop grand. Quoi qu'il en soit, si nous avions décidé d'employer cette méthode pour purifier le MGDG, nous aurions eu à la modifier afin de pouvoir réinjecter une nouvelle fraction d'échantillon toutes les dizaines de minutes.

À la lumière de cette recherche bibliographique, nous avons décidé d'établir nos propres méthodes de purification, pour chacun de nos lipi-

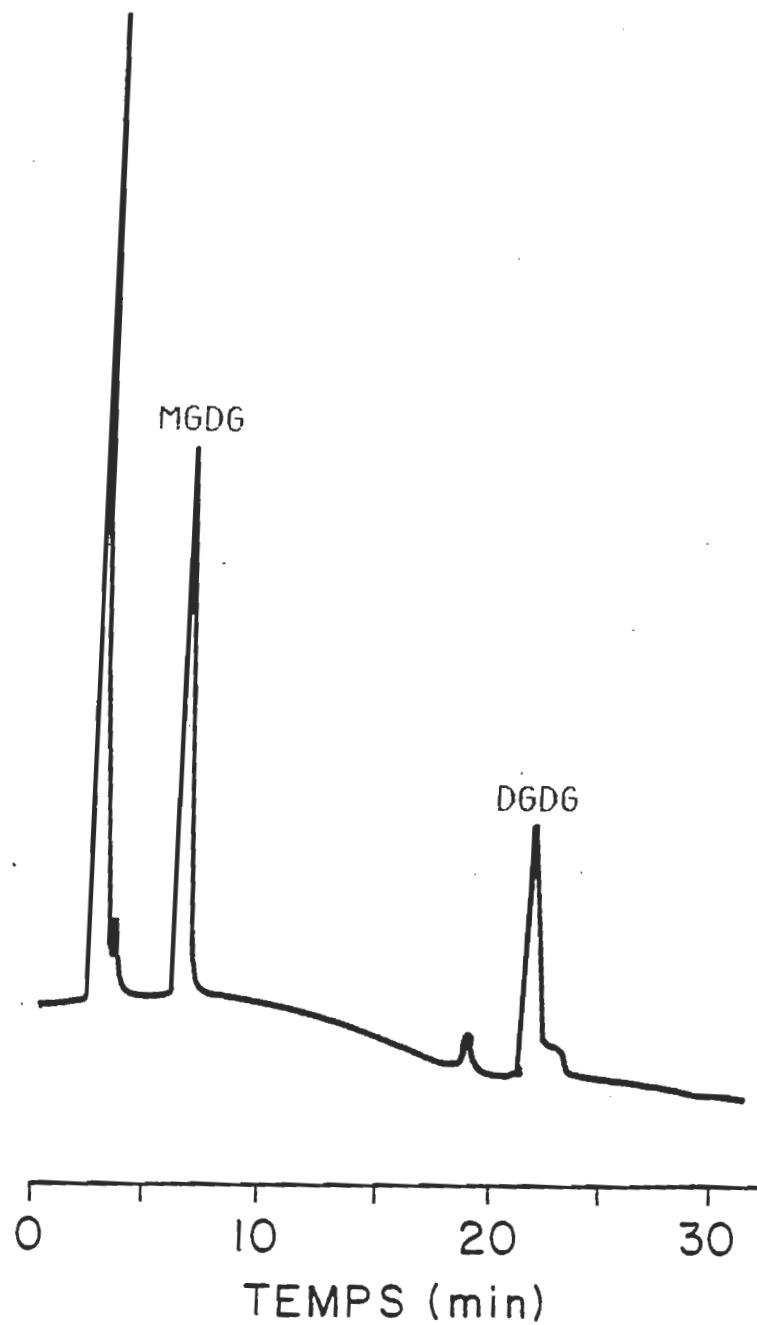


Figure 32. Chromatogramme obtenu par la méthode de Heemskerk et coll. (1986).

des, qui sont au préalable grossièrement séparés par CL. Ainsi, nous pouvons optimiser le temps que nécessite chaque purification sans avoir le désavantage de devoir éluer plusieurs autres lipides dans un temps raisonnable, ni en surchargeant la colonne de produits non élués.

CHAPITRE 4

MONOGALACTOSYLDIACYLGlycérol

4.1 Chromatographie

4.1.1 CLHP et CCM. Lors de nos premiers essais de purification du MGDG, nous utilisions le système de CLHP de Beckman. Les conditions expérimentales de départ sont indiquées au Tableau 15.

Ces conditions expérimentales proviennent d'un travail fait antérieurement par J.-P. Richard, qui utilisait cette méthode pour purifier le MGDG et le DGDG. Les résultats obtenus pour trois injections dans ces conditions sont indiquées au Tableau 16 et un chromatogramme, celui de la troisième injection, apparaît à la Figure 33 A. L'utilisation du chloroforme, comme solvant de dilution de l'échantillon, est due à la solubilité réduite de l'échantillon dans l'éluant ou dans l'un des solvants qui constituent la phase mobile. Le débit de la phase mobile n'a pas été vérifié au cours de ces expériences préliminaires. Une différence entre la valeur demandée et la valeur obtenue affecterait les temps de rétention des produits élués, mais

l'allure générale du chromatogramme ainsi que les paramètres de séparation, qui sont des valeurs relatives, ne seraient pas considérablement altérés.

Tableau 15

Conditions initiales de CLHP pour la purification du MGDG.

Condition	Valeur
Débit de la phase mobile	1,5 mL/min
Vitesse de déroulement du papier	0,2 cm/min
Échelle de voltage de l'enregistreur	10 mV et 50 mV
Solvants d'élution	A: Hex/IPA/H ₂ O (70/30/1) B: Hex/IPA/H ₂ O (70/30/3)
Programmation de l'élution	De 0 à 21 min: A 100 % et B 0 % isocratique De 21 à 26 min: A 100 % à 0 % et B 0 % à 100 % gradient linéaire De 26 à 50 min: A 0 % et B 100 % isocratique De 50 à 52 min: A 0 % à 100 % et B 100 % à 0 % gradient linéaire De 52 à 100 min: A 100 % et B 0 % isocratique
Longueur d'onde de détection	205 nm
Colonne	Altex Ultrasphere-Si 4,6 X 250 mm dp: 5 µm
Échantillon	MGDG Serdary (1986) dans CHCl ₃ concentration inconnue
Volume d'injection	250 µL

Tableau 16

Résultats des premières expériences de purification du MGDG.

Injection #	t _r des fractions recueillies (min)	Résolution	R _f *	
			A/B/E	C/M/E
1	#1 1,5 ± 0,3	1,00	—	—
	#2 3,5 ± 0,3		0,59	0,75
2	#3 1,5 ± 0,3	1,33	—	—
	#4 3,0 ± 0,3		0,59	0,68
3	#5 1,8 ± 0,3	1,55	—	—
	#6 3,5 ± 0,3		0,59	0,68

* Dans les conditions expérimentales habituelles (section 2.5.3), p.62.

Les CCM des fractions recueillies coéluaien avec l'échantillon de départ. Selon les R_f obtenus, le MGDG se retrouve dans les fractions paires, c'est-à-dire les fractions #2, #4 et #6, qui correspondent au deuxième pic de chaque chromatogramme. Cependant, ces fractions ne sont pas suffisamment résolues par rapport au premier pic, c'est-à-dire les fractions #1, #3 et #5 (voir Figure 33 A), qui contiennent les pigments et le chloroforme. En fait, lors de la troisième injection, celle qui nous a donné la meilleure séparation (déterminée par la plus grande résolution), le MGDG élué du système de CLHP en même temps que la traînée du pic des solvants et des pigments. De plus, le pic du MGDG comporte deux épaulements de

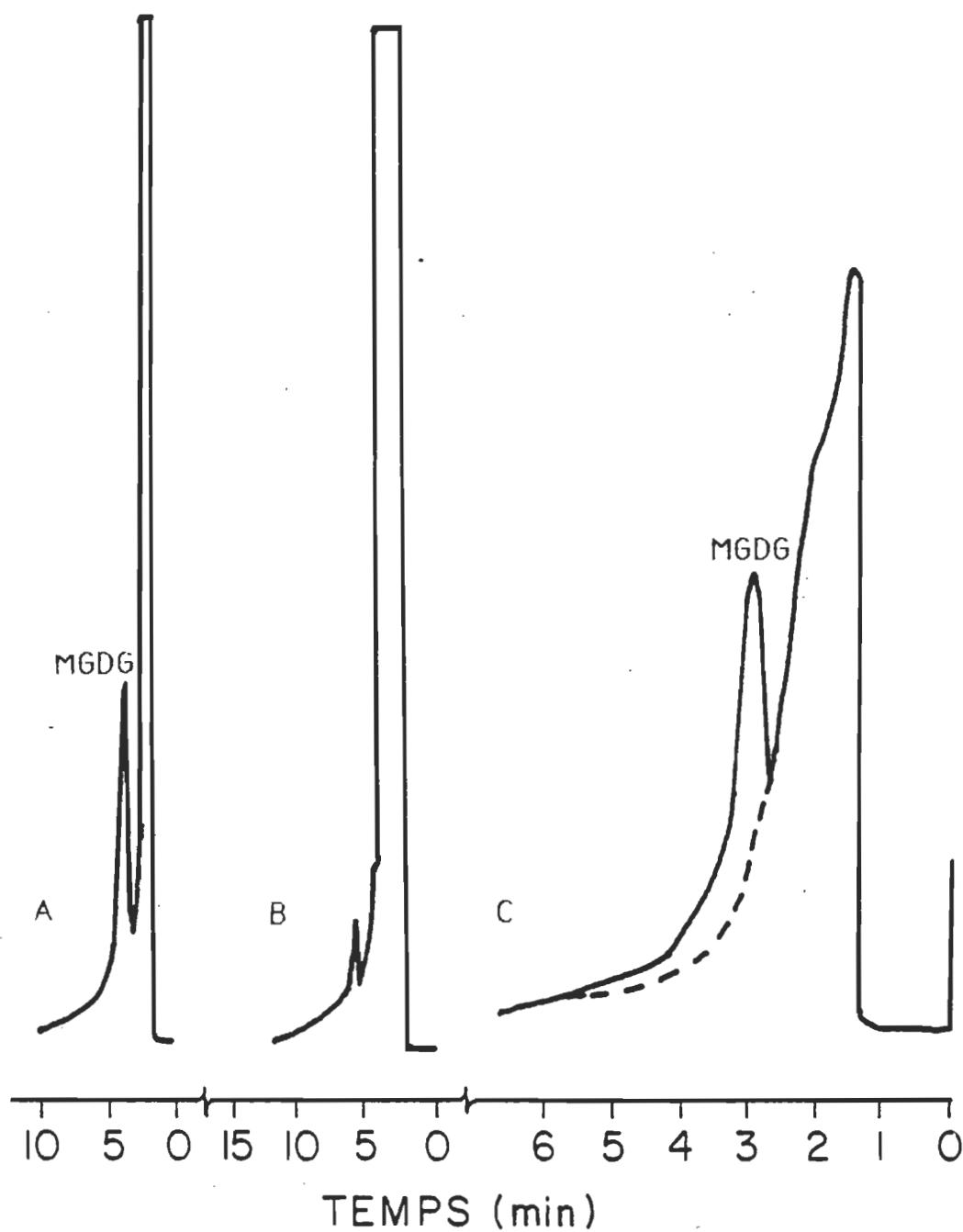


Figure 33. Chromatogrammes de la purification du MGDG; A: dans les conditions indiquées au Tableau 15; B: en mode isocratique dans le mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (70/30/3); C: en mode isocratique dans le mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (70/30/1), échantillon saturé de Supelco en pointillé.

part et d'autre, ce qui indique qu'au moins deux autres contaminants sont présents dans cette fraction, même si on ne peut les détecter par CCM. Les conditions expérimentales utilisées ne sont donc pas adéquates pour purifier le MGDG.

En vue d'isoler le pic du MGDG des produits qui éluent tôt et des contaminants qui l'épaulent, nous devions modifier la composition de la phase mobile. Malheureusement, il n'existe aucune méthode absolue pouvant régler tous les problèmes de séparation. Seule la méthode par tâtonnement, doublée de la connaissance des effets de la polarité des solvants et de l'eau sur la séparation des produits, permet d'arriver aux résultats attendus. Le Tableau 17 présente les différentes conditions expérimentales utilisées afin d'améliorer la séparation et l'isolation du MGDG.

Ces mesures ont été effectuées sur le système de CLHP de Waters, à l'exception de la première mesure qui a été prise avec celui de Beckman. Les valeurs de débit du système de Waters ont été régulièrement vérifiées et les pompes calibrées pour délivrer le volume voulu. Les conditions expérimentales sont indiquées à la section 2.5.4 du chapitre «Matériel et Méthodes». Les éluants sont tous utilisés en mode isocratique et contiennent différentes proportions de mélanges d'hexane, d'isopropanol et d'eau.

Tableau 17

Variation des conditions expérimentales de purification du MGDG en CLHP.

Proportion	t_r du MGDG	Remarque
70/30/3	—	MGDG pas séparé du pic des solvants (voir Figure 33 B)
70/30/1	3,0 \pm 0,1	Injection du MGDG Serdary (1986), non résolu, présence de benzène dans phase mobile pour détermination du t_m , 2,0 mL/min (voir Figure 33 C)
	—	Injection du MGDG Supelco non détecté (voir Figure 33 C)
70/30/0,8	3,1 \pm 0,1	Serdary (1986), meilleure séparation (voir Figure 34 A)
75/25/0,8	3,8 \pm 0,1	Meilleure séparation (voir Figure 34 B)
80/20/0,8	4,9 \pm 0,1	Déboublement du pic du MGDG (voir Figure 34 C)
70/30/0,6	3,5 \pm 0,1	Amélioration (voir Figure 35 A)
70/30/0,4	—	Échantillon dégradé non détecté (voir Fig. 35 B)
70/30/0,6	3,2 \pm 0,1	Nouvel échantillon, sans benzène, pics des pigments bien visibles (voir Figure 35 C)
70/30/0,4	3,4 \pm 0,1	(voir Figure 36 A)
70/30/0,4	3,4 \pm 0,1	Nouvel échantillon, dédoublement du pic du MGDG (voir Figure 36 B)
70/30	11,5 \pm 0,1	Pour vérification de l'effet de l'eau, pic «pata-toïde» (voir Figure 36 C)
80/20/0,4	6,2 \pm 0,1	MGDG bien séparé des pigments, mais pas du produit qui le succède, $R = 1,31$ (voir Fig. 37 A)
80/20/0,2	7,7 \pm 0,1	Détérioration par rapport à la condition précédente, $R = 0,68$ (voir Figure 37 B)
80/20/0,6	5,4 \pm 0,1	Détérioration par rapport à 80/20/0,4, $R = 1,17$ (voir Figure 37 C)
85/15/0,4	9,4 \pm 0,1	Bonne séparation, t_r élevé, $R = 1,85$ (voir Figure 38 A)
	4,7 \pm 0,1	4,00 mL/min, $R = 1,84$ (voir Figure 38 B)

La première chromatographie qui apparaît au Tableau 17 a été effectuée dans un mélange contenant environ 3 % d'eau (70/30/3). Dans ce chromatogramme, le MGDG est littéralement collé au pic des pigments. En théorie, une augmentation de la quantité d'eau augmente la gaine aqueuse recouvrant le gel, ce qui diminue les interactions possibles entre les groupements hydroxyles de la tête polaire du lipide et du gel. Cet essai qui a confirmé cette hypothèse, est un pas dans la mauvaise direction. Nous avons donc diminué la quantité d'eau dans la phase mobile.

Les solutions de MGDG injectées dans le système, lorsque le solvant d'élution consiste en un mélange de proportion 70/30/1, contiennent environ 5 % de benzène et ce, dans le but de bien déterminer le temps mort du système. La pratique de cette procédure, utile en théorie, s'avère être nuisible. En fait, le benzène élargit le pic du temps mort au point de camoufler complètement les pics des pigments, et sa traînée, qui est très étendue, couvre la base du pic du lipide. De plus, la résolution entre le pic du lipide et celui des pigments n'est pas assez grande dans ces conditions, comme on peut le constater à la Figure 33 C. Apparaît également à cette Figure le chromatogramme, en pointillé, du MGDG de Supelco. Comme nous l'avons décrit précédemment, la saturation de ce lipide empêche bel et bien

sa détection dans l'ultraviolet.

On observe, d'après les résultats inscrits au Tableau 17, que lorsqu'on diminue la polarité de l'éluant (pour un même pourcentage d'eau), on augmente le temps de rétention du MGDG. Ceci se manifeste clairement à la série de mesures contenant 0,8 mL d'eau et des proportions d'hexane et d'isopropanol variant de 70/30 à 80/20. Comme nous l'avons décrit précédemment, le MGDG est adsorbé à la surface du gel de silice grâce aux groupements hydrophiles de sa tête polaire. La diminution de la polarité de la phase mobile diminue sa force éluante. L'équilibre de transfert des molécules de lipides se déplace alors vers la phase stationnaire. Le temps de résidence du MGDG dans la phase mobile diminue, augmentant ainsi le temps que prend le lipide à traverser la colonne, d'où l'augmentation du temps de rétention par la diminution de la polarité de l'éluant. En plus de retarder la migration du MGDG dans la colonne, la diminution de la polarité provoque une dissociation du pic de ce lipide (voir Figure 34). Au moment de l'analyse initiale de ces résultats, nous croyions que ce dédoublement du pic du MGDG était dû soit à une séparation du lipide selon ses acides gras, soit à une séparation du lipide de ses produits de dégradation. La première hypothèse est pour le moins douteuse puisque notre colonne

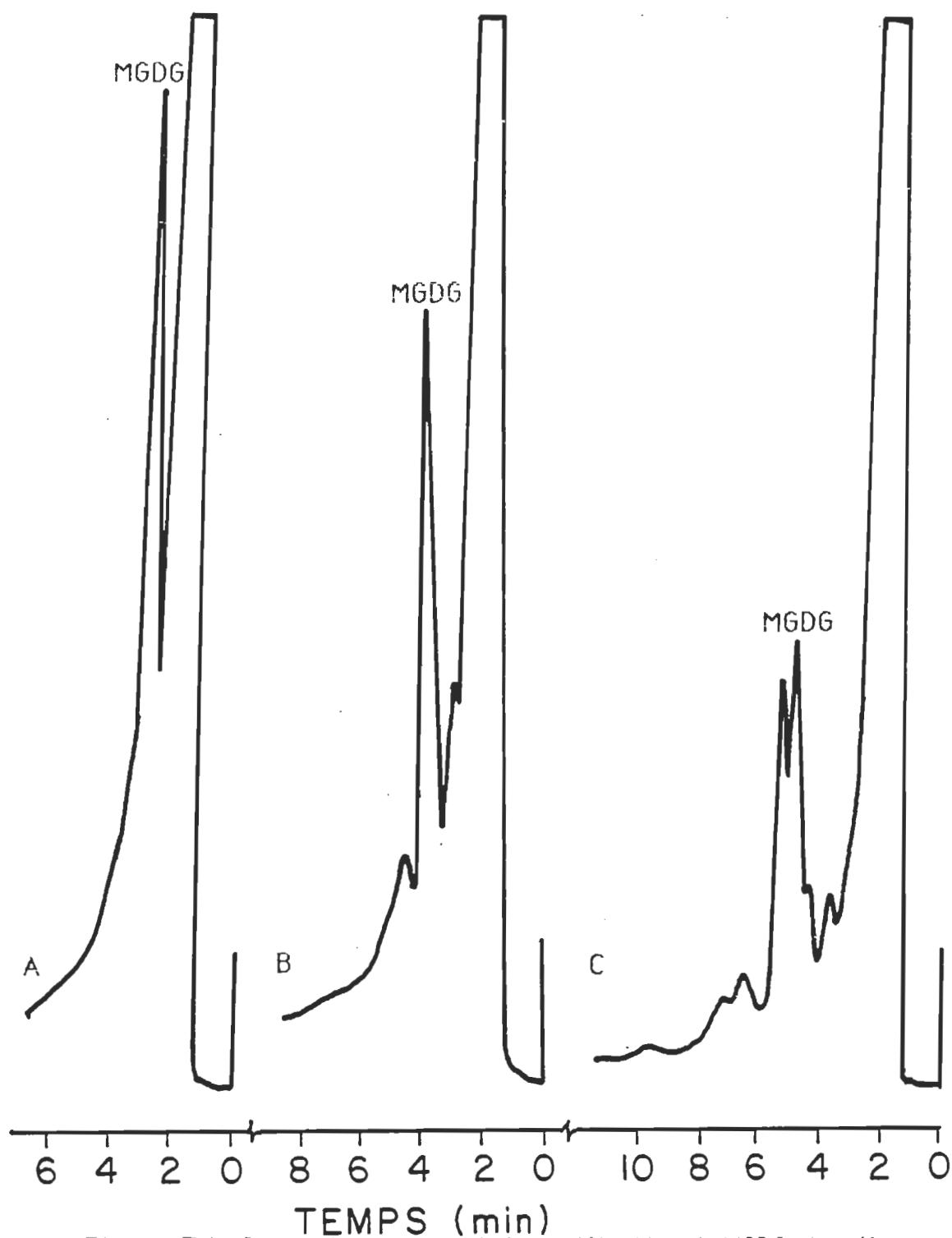


Figure 34. Chromatogrammes de la purification du MGDG; A: mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (70/30/0,8); B: mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (75/25/0,8); C: mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (80/20/0,8).

polaire, qui est le facteur principal dans le processus de la séparation, ne peut interagir avec les différents acides gras des lipides, de façon que la vitesse d'élution de chaque espèce moléculaire soit différente. La seconde hypothèse est plus logique puisque nous travaillions, jour après jour, avec la même solution de MGDG. Or, les lipides sont des molécules sensibles à la présence d'oxygène, de chaleur et de lumière. Des produits de dégradation peuvent donc être apparus dans la solution et se seraient séparés du MGDG lors de la dernière mesure chromatographique.

En analysant le comportement chromatographique du MGDG dans la série de mesures des mélanges 70/30/0,6 et 70/30/0,4, on constate que les temps de rétention du lipide ainsi que les comportements chromatographiques ne sont pas reproductibles (voir le Tableau 17 et les Figures 35 et 36). En effet, on note que lorsque l'éluant est le mélange de proportion 70/30/0,6, les deux mesures de temps de rétention diffèrent de 9 % alors que l'erreur expérimentale sur chaque mesure est de 3 %. Un comportement curieux apparaît également dans le cas du second éluant, c'est-à-dire le mélange en proportion 70/30/0,4. Lors de la première mesure dans ce mélange, le MGDG est élué dans un seul pic alors que dans la seconde, il est subdivisé en trois pics non résolus. Néanmoins, le temps de rétention du

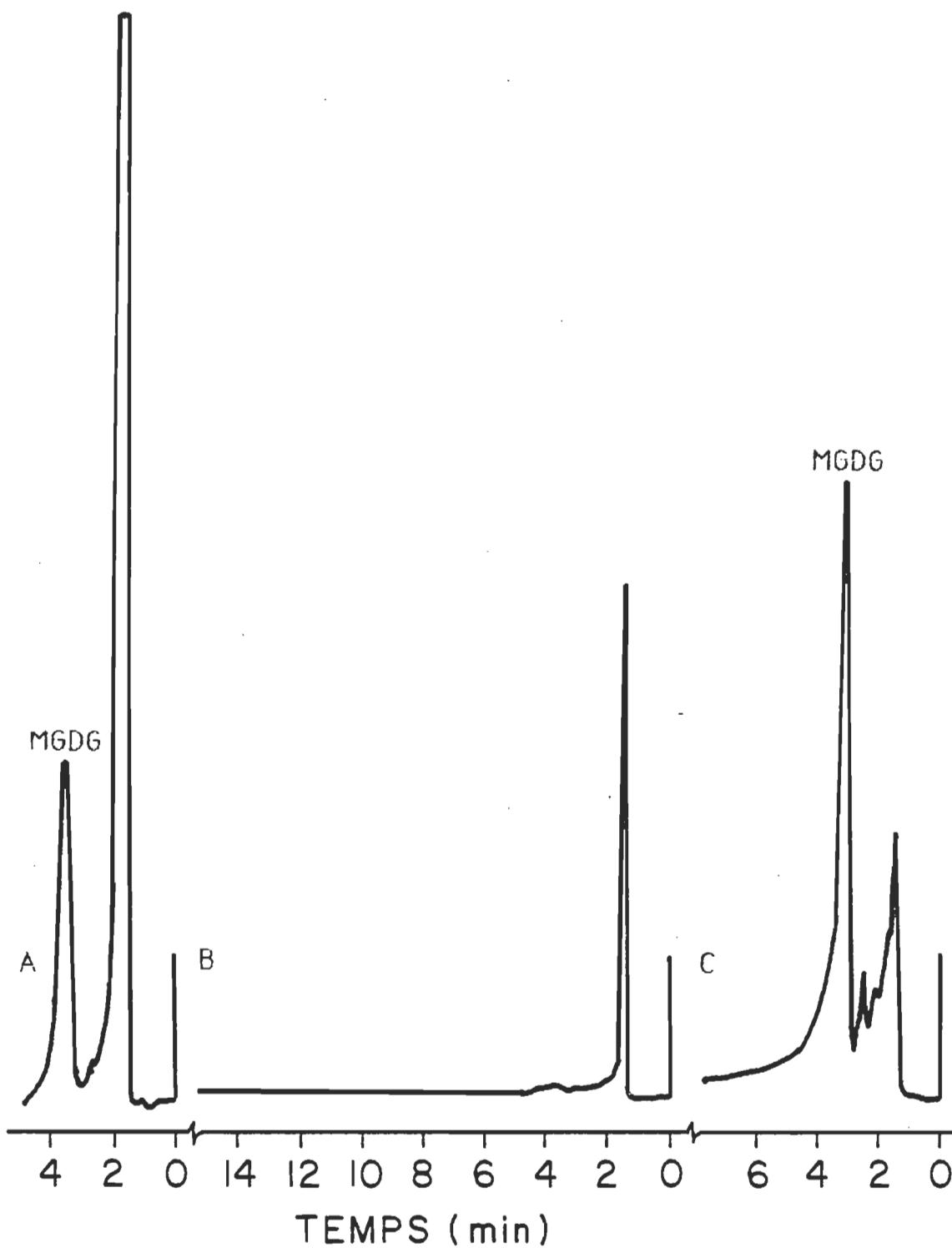


Figure 35. Chromatogrammes de la purification du MGDG; A: mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (70/30/0,6); B: mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (70/30/0,4); C: mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (70/30/0,6), nouvel échantillon.

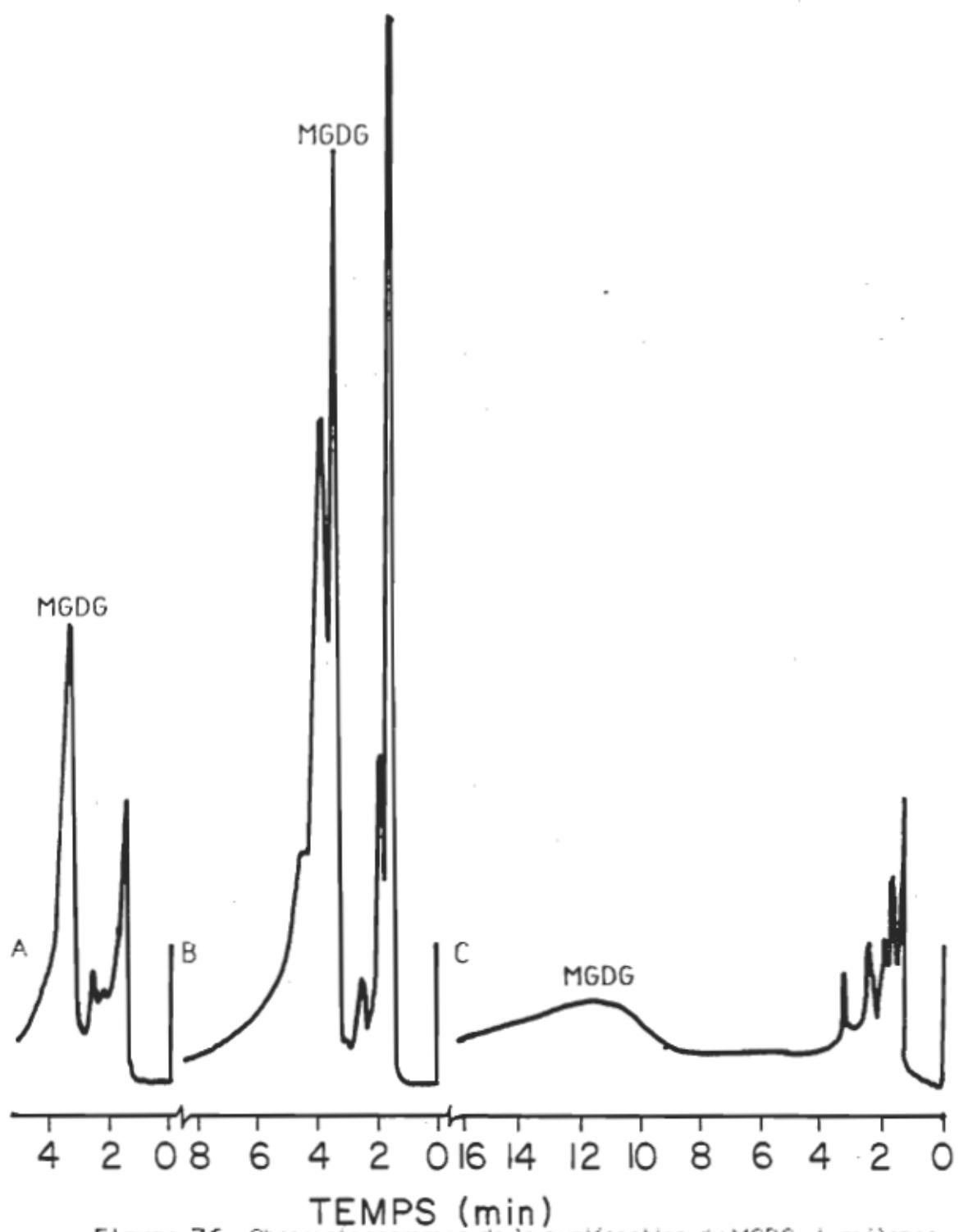


Figure 36. Chromatogrammes de la purification du MGDG; A: mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (70/30/0,4); B: mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (70/30/0,4), nouvel échantillon; C: mélange d'hexane et d'isopropanol (70/30).

pic unique de la première mesure correspond à celui du premier des trois pics apparaissant au chromatogramme de la seconde mesure, qui provient d'une solution différente. Il est probable que ces dernières différences chromatographiques, pour le même éluant, soient dues à la variation de la composition des échantillons dans les deux solutions. Toutefois, les temps de rétention du MGDG dans l'éluant pauvre en eau (70/30/0,4) est comparable à 3 % près à l'une des valeurs obtenues dans l'éluant riche en eau (70/30/0,6). À ce point, on peut se demander pour quelle raison il y a une différence plus grande entre les temps de rétention d'éluants de même composition que lorsque les proportions sont différentes. Pour résoudre ce dilemme, il faut considérer l'effet de l'eau sur la colonne. L'eau recouvre en effet les particules de silice pour former une couche hydratée. Elle diminue donc le nombre de sites actifs (Si-OH) disponibles pour interagir avec les têtes polaires des lipides. Cette couche est très stable et il est difficile de la déloger. Mais lorsque nous avons pris ces mesures, nos changements de phase mobile se faisaient très rapidement. Nous faisions circuler quelques millilitres du nouveau mélange de solvants dans la colonne et nous injections presque immédiatement le MGDG. Nous ne nous préoccupions alors pas de désorber toute l'eau contenue dans la colonne avant de l'équilibrer dans le nouvel éluant. Ainsi, les quantités d'eau en-

tourant le gel au moment de ces injections sont inconnues et varient d'une expérience à l'autre. Il est donc possible que les différences notées aux temps de rétention du MGDG dans des éluants de même nature soient dues aux variations du pourcentage d'eau adsorbé sur le gel. D'ailleurs, à partir de l'instant où nous avons noté cet effet de l'eau sur la séparation de notre lipide, tous nos changements subséquents de phase mobile se sont faits en désorbant l'eau et en rééquilibrant la colonne dans le nouvel éluant par la méthode indiquée à la section 2.5.4. L'effet de l'eau est mis en évidence par le chromatogramme enregistré lorsque l'éluant ne contient pas d'eau (70/30). Dans ces conditions, les pigments sont très bien séparés du lipide, qui n'apparaît qu'après 11,5 minutes, mais sous une forme «patatoïde». L'absence de l'eau autour du gel provoque une suradsorption du lipide sur le gel, ce qui retarde considérablement son élution. De plus, la disparition de l'eau dans la colonne élargit énormément le pic du lipide. En effet, plus un produit séjourne longtemps dans une colonne, plus les différents processus d'élargissement des bandes (diffusion latérale, etc.) affectent le pic.

La dernière série de mesures reprend le travail de diminution du pourcentage d'eau à partir de la mesure prise dans l'éluant de proportion 80/20/0,8. L'étape suivante a donc été d'injecter l'échantillon dans le mélange 80/20/0,4 dont le chromatogramme apparaît à la Figure 37 A. Cet

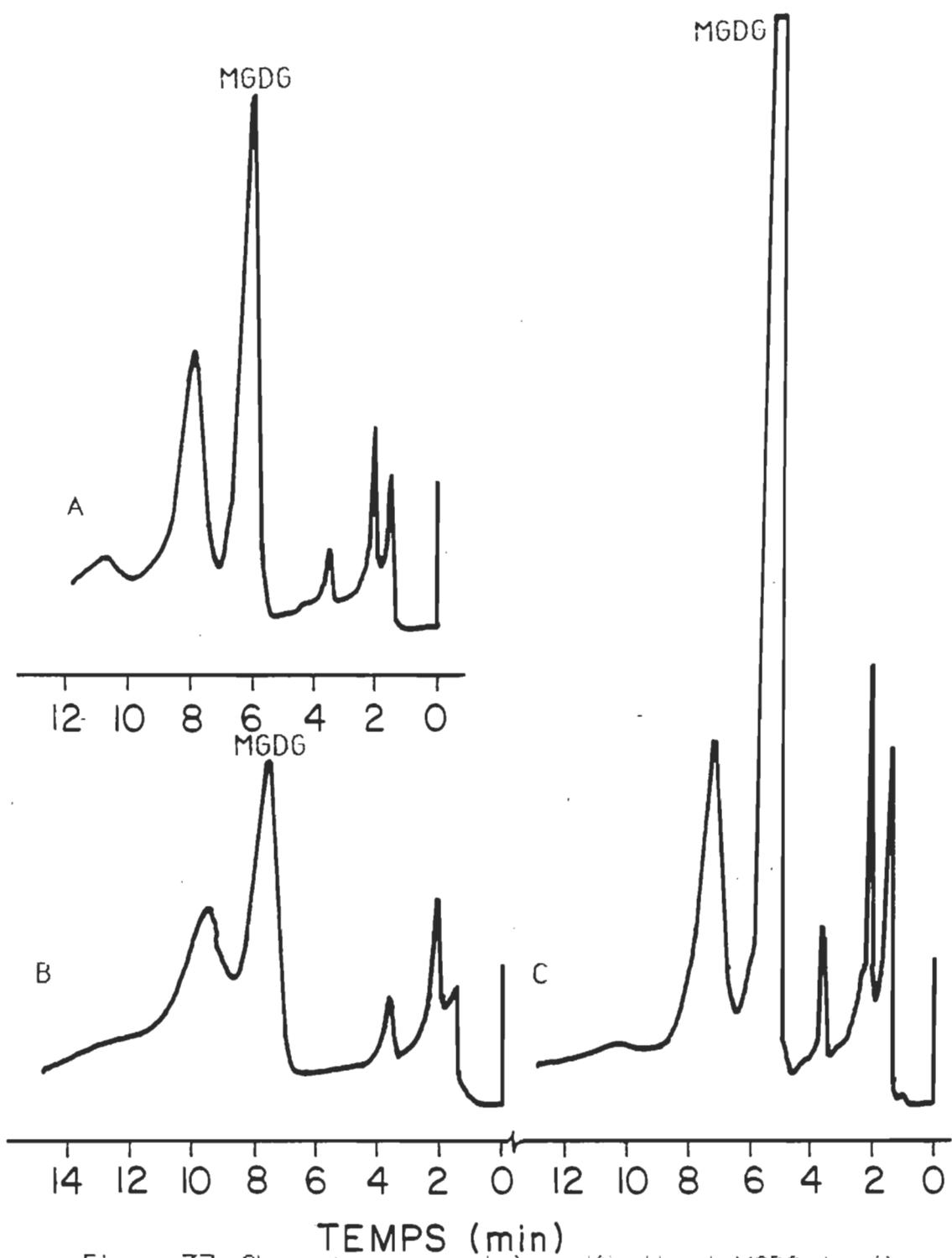


Figure 37. Chromatogrammes de la purification du MGDG; A: mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (80/20/0,4); B: mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (80/20/0,2); C: mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (80/20/0,6).

éluant améliore la séparation du pic de MGDG des pigments mais n'est pas idéal quant à la résolution du pic de MGDG et du produit qui le succède. Les deux éluants suivants, les mélanges de proportions 80/20/0,2 et 80/20/0,6 n'ont pas amélioré ce paramètre (voir Figures 37 B et C). En gardant le pourcentage d'eau constant, nous avons diminué une fois de plus la polarité en augmentant la proportion d'hexane dans le mélange jusqu'à 85/15/0,4. Ce mélange de solvant résoud le pic du MGDG ($R = 1,85$) et le contaminant subséquent, tout en l'isolant des pigments (voir Figure 38 A). Cependant, le temps de rétention du MGDG doit être optimisé de façon à ce que la purification soit la plus rapide possible, tout en conservant des paramètres chromatographiques satisfaisants. Le débit de la phase mobile a donc été accéléré à 4,0 mL/min (voir Figure 38 B). À cette valeur, la pression de la phase mobile s'approchait de la limite maximale à laquelle peut être soumise la colonne. Aucune autre accélération de la méthode avec ce système n'est donc possible.

La phase mobile n'étant constituée que de 15 % d'isopropanol, l'ordre dans laquelle on ajoute les différents solvants de l'éluant est crucial puisque l'hexane et l'eau sont immiscibles. Lorsqu'on ajoute dans l'ordre l'hexane, l'isopropanol et l'eau, la solution est trouble et l'eau forme une phase différente au fond du récipient. Après une longue agitation

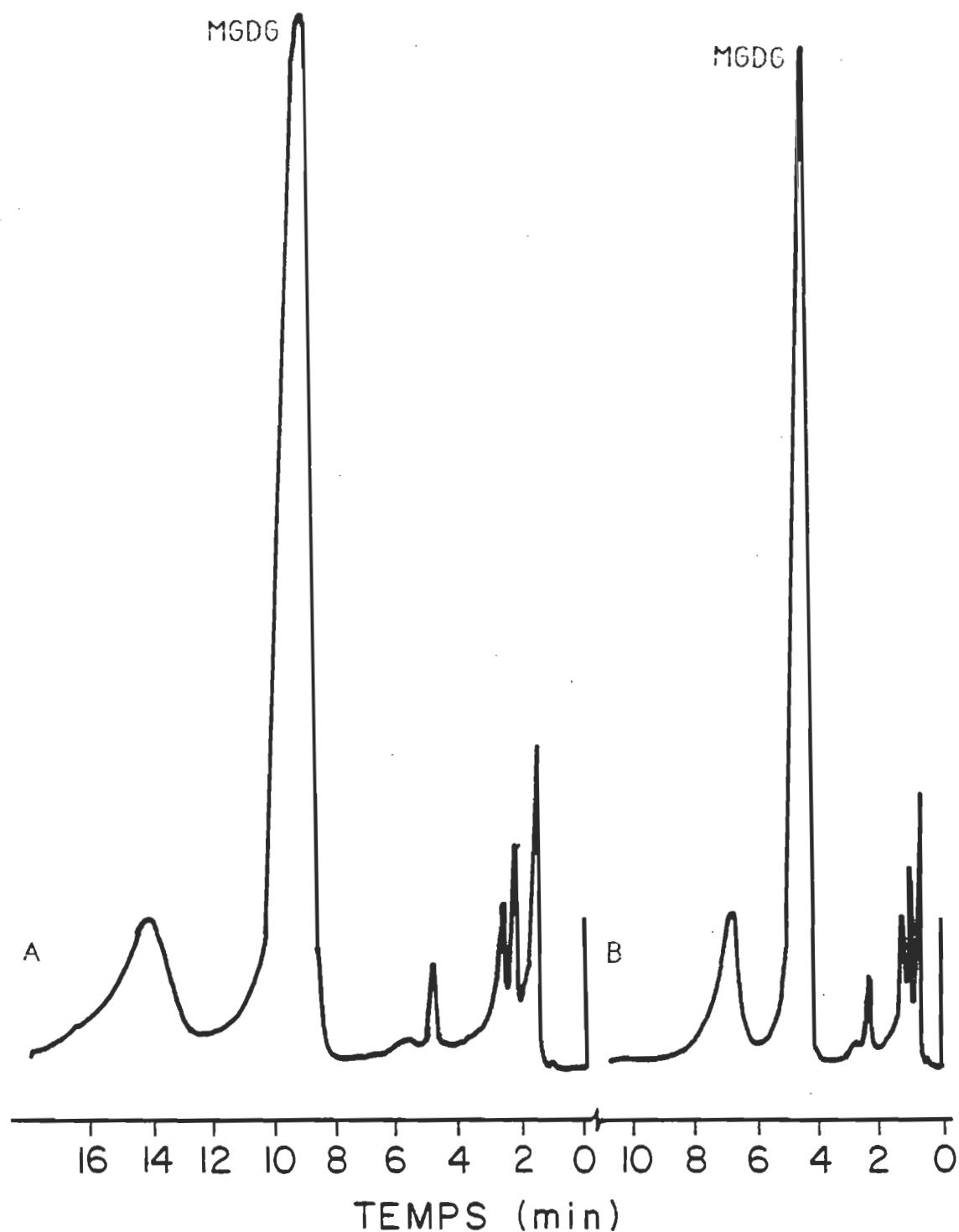


Figure 38. Chromatogrammes de la purification du MGDG, mélanges d'hexane, d'isopropanol et d'eau (85/15/0,4); A: à 2,0 mL/min; B: à 4,0 mL/min.

vigoureuse, la solution redevient finalement homogène et translucide. Afin d'éviter cette perte de temps que représente l'agitation, l'ordre d'addition des solvants doit être la suivante: l'eau est ajoutée à l'isopropanol, puis lorsque ces deux composants sont bien mélangés, on ajoute l'hexane et on agite durant quelques secondes. L'addition de l'eau à l'isopropanol dans lequel elle est miscible facilite l'homogénéisation de l'éluant riche en hexane.

Afin de connaître le rendement approximatif de la purification, nous avons pesé précisément 2,535 mg de MGDG de Serdary (1986) non purifié que nous avons dissous dans 2,00 mL de phase mobile. Connaissant la concentration (1,2675 mg/mL), nous avons injecté 6 fois 200 μ L, ce qui représente 1,90125 mg de produit. Un exemple de chromatogramme apparaît à la Figure 39 A. Nous avons récolté ensemble les six fractions de MGDG que nous avons ensuite évaporées et pesées. Nous avons obtenu 0,572 mg de MGDG, ce qui équivaut à un rendement de 38 %. L'échantillon récolté possédait une légère coloration verte indiquant la présence de pigments, ce qui a été confirmé par une réinjection du matériel récolté. Le faible rendement obtenu est difficilement explicable par l'analyse habituelle des chromatogrammes des six injections. En effet, en considérant que chacun des produits élusés ont le même coefficient d'absorption à 205 nm (ce qui

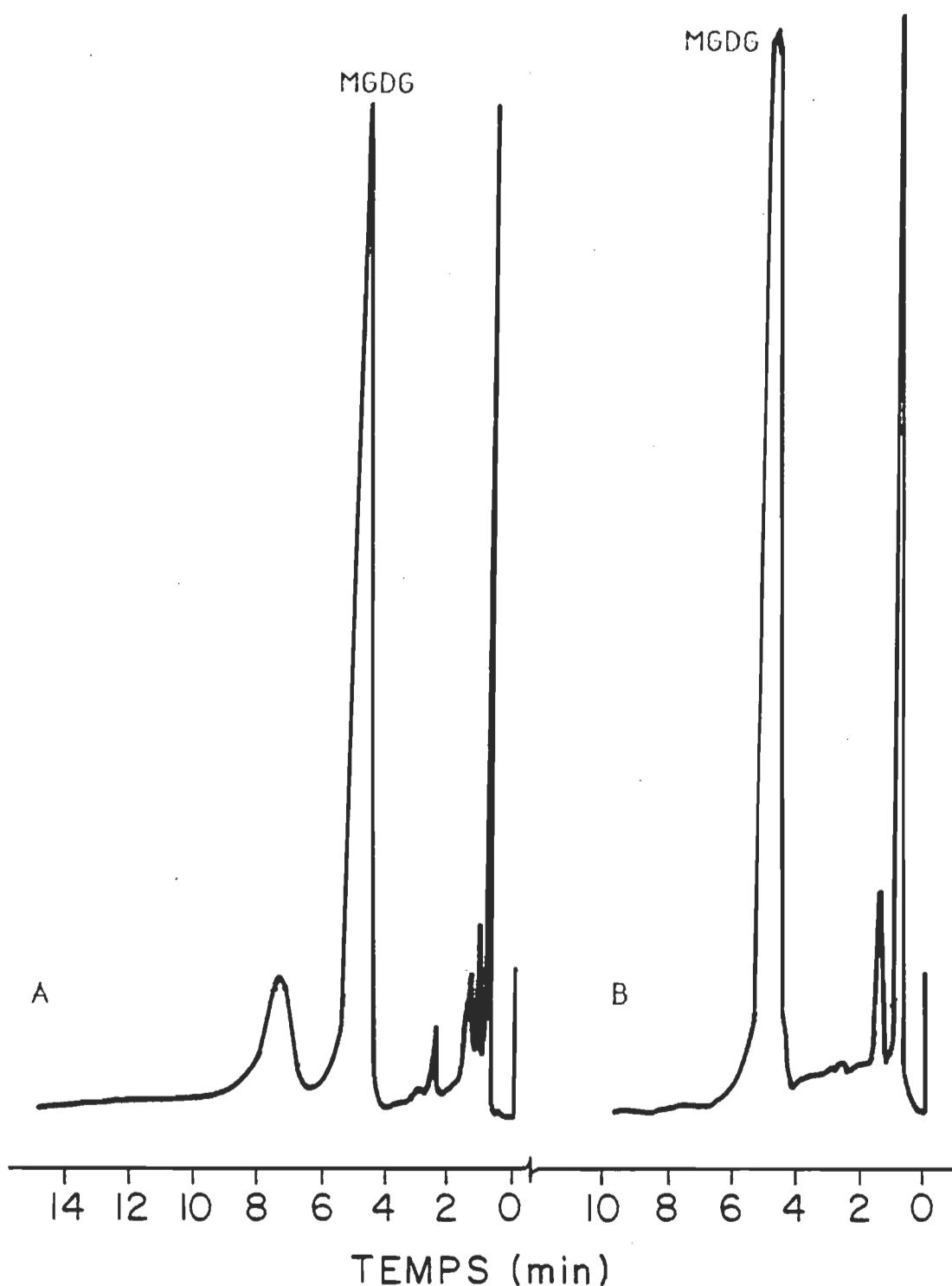


Figure 39. Chromatogrammes de la purification du MGDG de Serdary (1986) en vue de calculer le rendement de la purification; A: injection #1; B: réinjection.

est foncièrement faux), nous estimons, en établissant les quantités relatives de produit dans les pics par pesée, que le pic de MGDG représente environ 60 % de tout le matériel détecté. Le Tableau 18 indique les valeurs obtenues lors de cette mesure pour l'injection #1.

Tableau 18

Masses des pics des produits détectés lors de la purification du MGDG de Serdary (1986).

Produit	Masses des pics g	Pourcentage respectif
Pigments (ensembles)	0,0178	25 %
MGDG recueilli	0,0413	59 %
Produits éluant après le MGDG	<u>0,0109</u>	<u>16 %</u>
Total	0,0700	100 %

La différence entre le rendement attendu (59 %) et obtenu (38 %) pourrait être expliquée par l'hypothèse suivante: un des produits élué possède un faible coefficient d'absorption, ce qui implique qu'une grande quantité de produit serait éluée alors qu'un tout petit pic apparaîtrait. Les pigments possèdent de façon générale beaucoup d'insaturations, leur coefficient d'absorption est grand et ils ont une masse molaire du même ordre de grandeur que les lipides. Ainsi, nous croyons que la grandeur des pics

des pigments détectés sur nos chromatogrammes sont représentatifs de la quantité présente dans l'échantillon. Mais il n'en va pas de même pour les lipides car leur nombre d'insaturations est variable et dépend du type de lipides de même que de leur origine. Si, par exemple, le produit qui élue en dernier sur le chromatogramme est un lipide principalement saturé, son absorption serait faible. Une grande quantité de produit ne peut donc pas être détecté, ce qui provoquerait une surestimation du rendement de la purification du MGDG par le calcul de l'aire sous la courbe. Cette hypothèse serait vérifiable par l'analyse des acides gras de ce produit contaminant s'il s'agissait bien d'un lipide. Ainsi, la plus grande cause d'erreur dans la détermination du rendement de purification du MGDG est probablement due aux absorptions variables des lipides. La purification doit donc se faire avec une grande quantité au départ, car, selon l'origine de l'échantillon, sa contamination en pigments ou en autres lipides peut occasionner un faible rendement de l'ordre de celui que nous avons obtenu pour l'échantillon commercial de Serdary (1986). De plus, la purification doit être répétée une seconde fois car une certaine quantité de pigments peut contaminer l'échantillon récolté.

Le Tableau 19 montre les temps de rétention ainsi que les paramètres chromatographiques importants de six injections du MGDG de Serdary

(1986) non purifié, et de la réinjection de la fraction récoltée.

Tableau 19

Paramètres chromatographiques de la purification du MGDG de Serdary
(1986) par CLHP.

Injection #	t_{rA} min	t_{rB} min	k'_A	k'_B	α	R
1	$4,9 \pm 0,1$	$7,3 \pm 0,1$	4,4	7,1	1,6	1,6
2	$4,9 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,1$	4,3	7,2	1,7	1,8
3	$5,0 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,1$	4,4	7,2	1,6	1,7
4	$4,9 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,1$	5,0	8,3	1,7	1,8
5	$4,9 \pm 0,1$	$7,3 \pm 0,1$	5,4	8,7	1,6	1,7
6	$4,8 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,1$	5,4	8,9	1,6	1,9
réinjection	$4,9 \pm 0,1$	—	4,3	—	—	—

On constate que les temps de rétention sont très reproductibles. L'allure de tous les chromatogrammes est identique excepté le chromatogramme de la réinjection qui ne contient que des traces de produits contaminants, principalement des pigments (voir Figure 39 A et B). L'échantillon de MGDG de Serdary (1986) a été utilisé lors de nos mesures d'isothermes de pression de surface.

L'étape suivante de nos expériences de purification du MGDG utilisait un échantillon extrait de l'orge, riche en acides gras insaturés, dans le but

de le purifier, puis de l'employer aux études de monocouche et de fluorescence.

Nous avons donc utilisé une fraction d'extraction obtenue par la chromatographie liquide sur colonne, riche en MGDG (#5) et l'avons dissoute dans 3,5 mL de phase mobile. Nous avons ensuite purifié cette solution de MGDG en effectuant 15 injections successives et avons récolté ensemble toutes les fractions de MGDG. Un exemple des chromatogrammes obtenus à cette étape de la purification du MGDG apparaît à la Figure 40 A. Les paramètres chromatographiques moyens sont les suivants: le temps de rétention du MGDG est de $4,6 \pm 0,2$ minutes (erreur calculée avec un intervalle de confiance de 95 %), le facteur de capacité du MGDG est de $4,8 \pm 0,3$, celui du produit le succédant est de $8,0 \pm 0,5$ et le facteur de sélectivité est de $1,69 \pm 0,09$. La résolution n'a pas été calculée à cause de la petitesse du pic du produit contaminant.

Le MGDG recueilli a été évaporé à sec, dissous dans environ 2,5 mL de phase mobile et réinjecté en neuf étapes consécutives. Une copie de l'un des chromatogrammes obtenus est représentée à la Figure 40 B. Tout le MGDG élué à chaque chromatographie est récupéré ensemble dans le même vial. Les données chromatographiques moyennes sont les suivantes: le

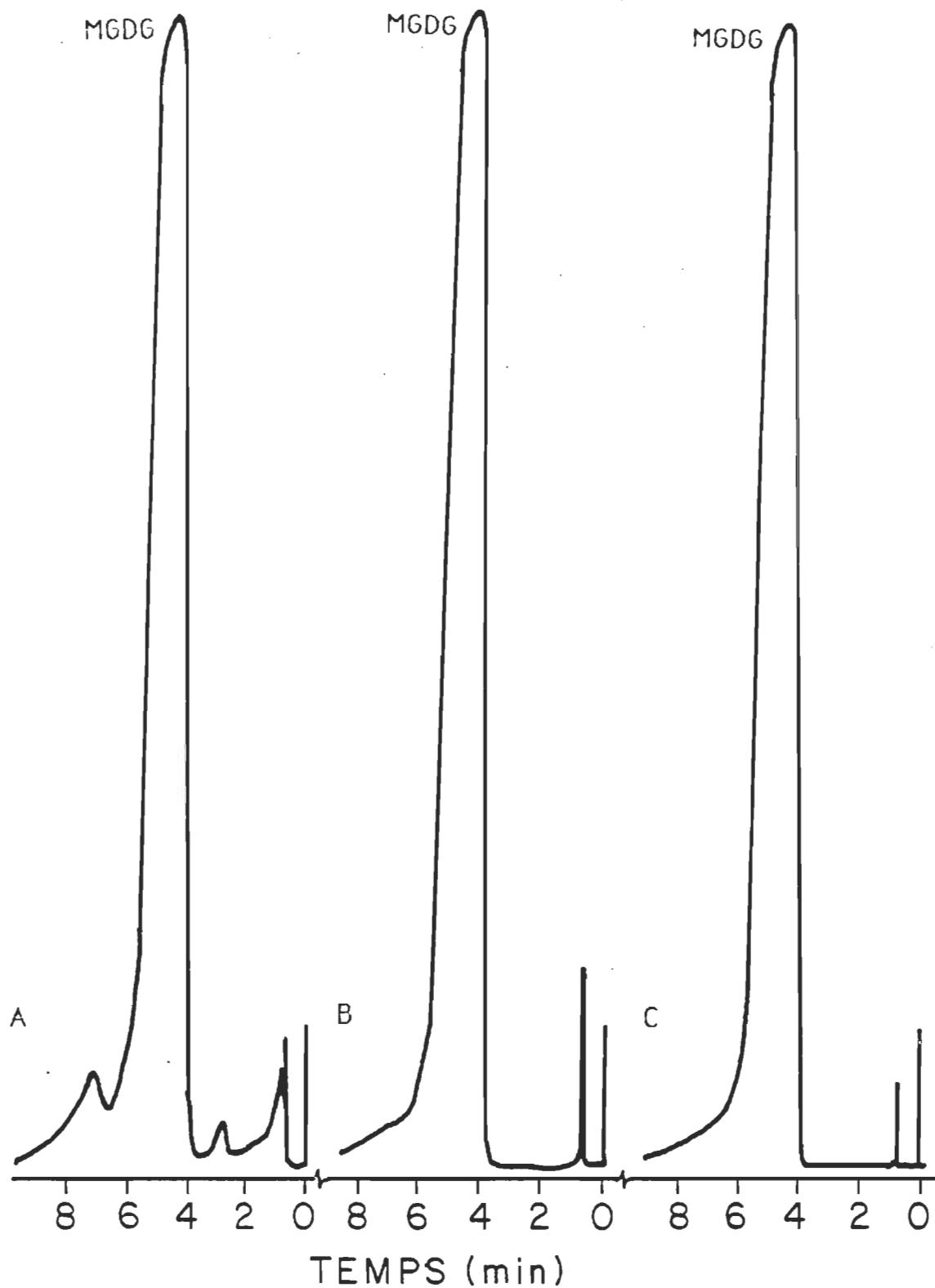


Figure 40. Chromatogrammes de la purification du MGDG, extrait de l'orge, par CLHP; A: première étape de la purification; B: seconde étape de la purification; C: vérification par la réinjection du matériel purifié.

temps de rétention moyen du MGDG lors de cette deuxième étape de la purification est de $4,4 \pm 0,4$ min et son facteur de capacité moyen est de 5 ± 1 . Afin de vérifier la pureté du lipide, le MGDG recueilli à cette seconde étape a été réinjecté une seule fois. Le chromatogramme obtenu est indiqué à la Figure 40 C. On remarque qu'il n'y a plus aucune trace de lipide contaminant et le petit pic apparaissant au temps mort du système laisse croire qu'il s'agit de la détection d'un léger front de solvant plutôt que de la présence de pigments. En effet, ce petit pic a une forme tout à fait particulière, positive au début, puis négative par la suite, mais arrêtée par la limite de mouvement de la plume traçante. Quoiqu'il en soit, même s'il s'agit d'une trace de pigments, la quantité détectée est négligeable par rapport au pic du lipide purifié. A la fin de cette purification, nous avons obtenu environ 8 mg de MGDG.

Une dernière série d'expériences en CLHP a été entreprise afin d'augmenter la rapidité de la méthode ainsi que la quantité de lipide purifié. Pour ce faire, nous avons installé la colonne de 10,0 mm de diamètre interne dont la section efficace, c'est-à-dire l'aire de contact disponible au produit pour s'adsorber en tête de colonne, est 4,7 fois plus grande que la colonne précédemment utilisée. Nous pouvons donc injecter une solution

4,7 fois plus concentrée et ainsi, pour un même volume injecté, nous purifions plus de produit à la fois, ce qui augmente d'autant la rapidité de la méthode. De plus, l'installation de cette colonne nous a permis de travailler à la limite du débit des pompes, c'est-à-dire à 10,0 mL/minute, ce qui représente une nouvelle accélération d'un facteur de 2,5. Cependant, à cause de l'augmentation de la quantité de gel que le lipide doit traverser dans cette nouvelle colonne, le temps de rétention du lipide est de 4,1 fois supérieur à celui obtenu avec la colonne de plus petit diamètre. Donc, au total, cette nouvelle colonne réduit d'environ trois fois le temps nécessaire pour purifier une certaine quantité de lipide. La Figure 41 montre l'allure d'un chromatogramme obtenu à l'aide de cette colonne pour la purification d'un échantillon de MGDG extrait de l'orge.

4.1.2 Mise en garde à propos des standards. Une bonne partie de nos expériences ont constitué en la mise au point de la méthode de CLHP dans le but de purifier nos lipides dont le MGDG. À cette fin, nous utilisons principalement des standards, c'est-à-dire des lipides commerciaux purs et d'identité certifiée, et ce, dans le but d'accélérer l'élaboration de la méthode en évitant les longues étapes d'extraction et de séparation préparative par CL. Cependant, nous nous devons de mettre en garde les utilisateurs inconditionnels des lipides commerciaux, car ces derniers sont

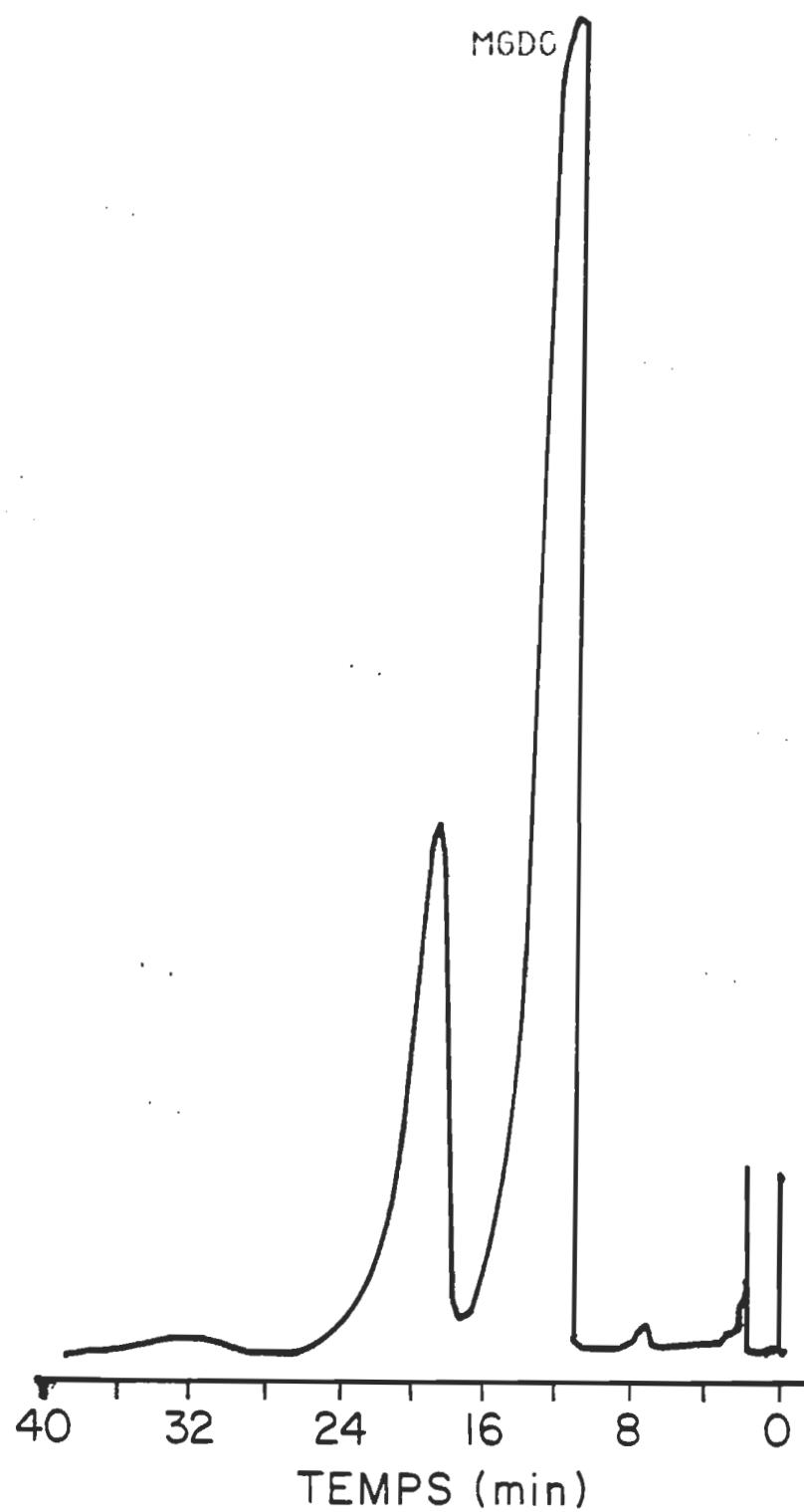


Figure 41. Chromatogramme de la purification du MGDG, extrait de l'orge, par CLHP en utilisant la colonne de 10,0 mm de diamètre interne.

rarement purs et leur identité est régulièrement inexacte. Ainsi, le MGDG de la compagnie Supelco est identifié de la façon suivante dans le catalogue ainsi que sur la bouteille du produit: Monogalactosyl diglyceride (plant). Par l'indication «plant», nous admettons habituellement que ces lipides sont extraits de plantes supérieures, donc qu'ils sont principalement constitués d'acides gras insaturés, ce qui n'est pas le cas. En fait, ils sont effectivement extraits de plantes, mais ils sont aussi chimiquement saturés. En examinant le catalogue de cette compagnie, on remarque que cette précision n'apparaît que dans un tableau séparé de l'endroit où est décrit le produit d'intérêt. Il est donc facile de ne pas voir ce renseignement pourtant si important. Des lipides saturés sont inutilisables en CLHP lorsqu'on se sert d'un détecteur aux ultraviolets car ces produits hydrogénés n'absorbent pas à la longueur d'onde d'analyse.

Une série de problèmes similaires se sont produit avec le MGDG de la compagnie Serdary. Nous utilisions un produit acheté en 1986, contenant quelques contaminants, mais tout de même utilisable en CLHP. Selon l'inscription de l'étiquette du produit, ce lipide est extrait de l'épinard. Nous nous attendions donc à ce que ce lipide soit essentiellement composé de l'acide gras linolénique (C18:3) (Heemskerk et coll., 1988; Kates, 1970). L'analyse des acides gras, dont les résultats apparaissent à la section sui-

vante nous indiquent que ce MGDG de Serdary est principalement constitué d'acide linoléique (C18:2). Inquiets de nos résultats, nous avons communiqué avec la compagnie afin de vérifier leur exactitude. Nos analyses se sont avérées correctes car leur lipide provenait de farine de blé et non pas de l'épinard. Cette différence d'acide gras n'affecte pas la CLHP et maintient donc l'utilité de ce lipide pour la mise au point de la méthode. Par contre, ce changement modifie les propriétés tensioactives des molécules lipidiques, et les isothermes de pression de surface sont altérées.

Après avoir utilisé tout le MGDG acheté en 1986, nous avons entamé un nouvel échantillon, de la même compagnie, reçu en 1988, et extrait du blé (quoique l'inscription indiquait que la source était l'épinard). Lors de l'injection de ce produit dans notre système chromatographique, nous avons obtenu le chromatogramme indiqué à la Figure 42 A. On constate que cet échantillon contient très peu de MGDG. D'ailleurs, une CCM de cet échantillon effectuée dans le mélange de solvant acétone/benzène/eau (91/30/8) et coélueée avec notre MGDG extrait de l'orge confirme ce résultat. Après avoir retourné cet échantillon à la compagnie, ils nous ont envoyé un troisième échantillon extrait de l'orge et obtenu en 1989, dont la CCM nous confirme l'identité. Cependant, le chromatogramme de ce

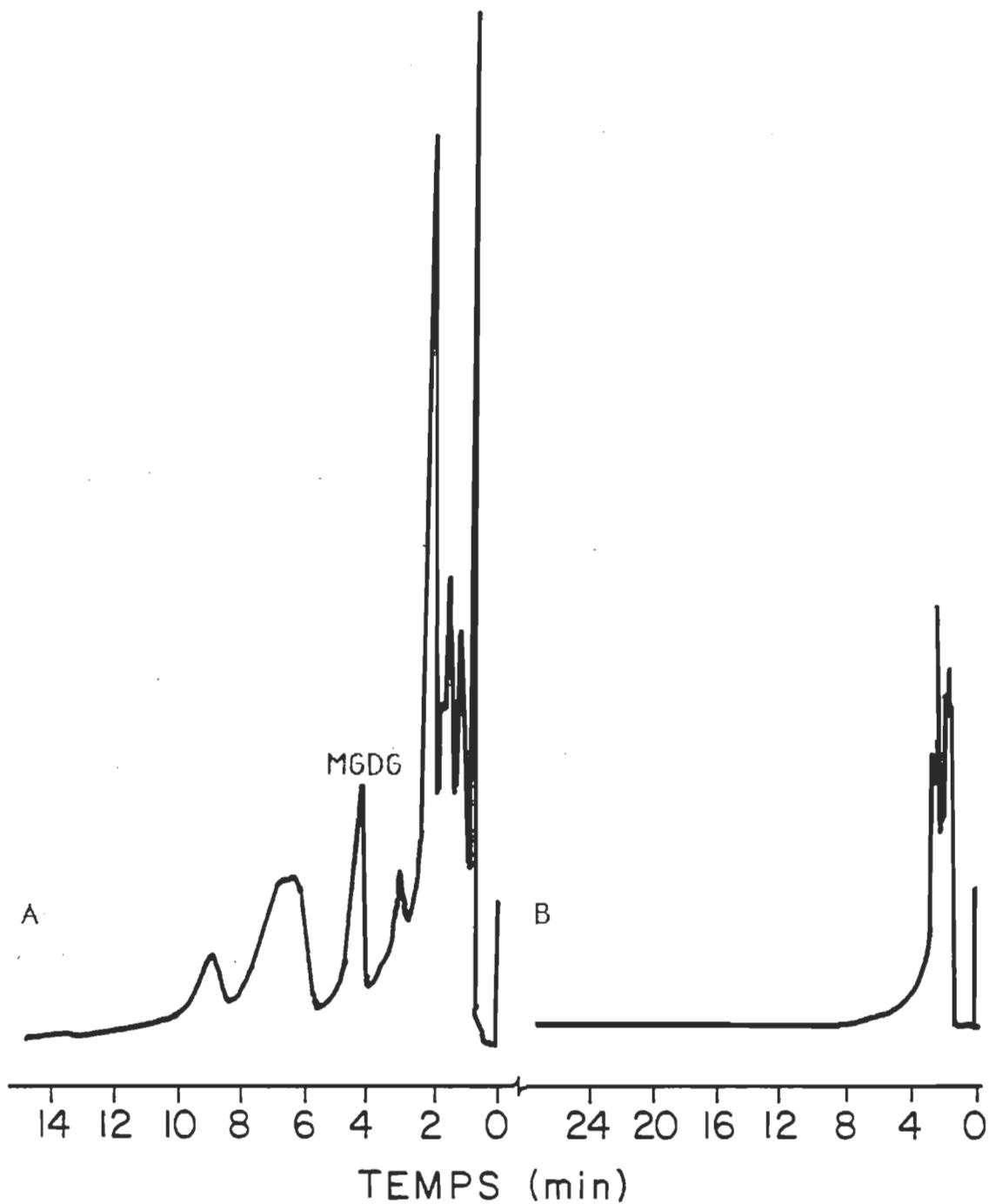


Figure 42. Chromatogrammes de CLHP des échantillons de MGDG de la compagnie Serdary; A: MGDG Serdary 1988; B: MGDG Serdary 1989.

lipide est désastreux. Comme on peut le constater à la Figure 42 B, on ne détecte absolument pas le lipide. Nous avons alors cru que l'échantillon a été hydrogéné comme c'est le cas des produits de la compagnie Supelco. Cependant, les responsables du laboratoire qui ont produit ce lipide nient l'avoir chimiquement réduit. L'analyse en CG, qui n'est malheureusement pas incluse dans ce travail, nous donnera de plus amples renseignements sur ce qui est advenu à ce lipide pour qu'il soit indétectable en CLHP. Toutefois, nous avons observé que lorsque nous développons la CCM de ce lipide, la tache du MGDG avait la forme d'un anneau, comme si ce n'était que la bordure de la tache qui se colorait à l'iode. Après avoir laissé la CCM à l'air durant 12 heures, nous avons constaté qu'un nouvelle exposition à l'iode colorait cette fois toute la tache. Une hypothèse pouvant expliquer cette observation est que, lors de la migration des lipides sur la plaque, un arrangement particulier de ces molécules s'est produit. En effet, si les lipides sont disposés avec les acides gras vers le centre et les têtes polaires formant une couronne autour de ceux-ci, comme une micelle à deux dimensions, un lipide saturé ne se complexera avec l'iode que par la tête polaire, ne colorant ainsi que le contour de la tache. Après quelques heures de contact avec l'oxygène de l'air, le lipide dont les acides gras sont oxydés peut alors former de nouveaux complexes avec l'iode, ce qui colorerait

le centre de la tache. Cependant, le diamètre de celle-ci, c'est-à-dire environ 0,5 cm correspond difficilement avec les dimensions des lipides. De plus, un lipide saturé est plus difficilement oxydable par l'oxygène puisque ce sont normalement les doubles liaisons qui sont attaquées.

4.1.3 CG. Le Tableau 20 présente les résultats des analyses de CG qui déterminent les acides gras principaux des différents MGDG que nous avons utilisés.

Tableau 20

Composition en acides gras des échantillons de MGDG utilisés.

Échantillon	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:3	mm	I_i g/mol
Supelco	—	22,8 %	77,2 %	—	—	—	—	774	0
Serdary 1986	—	21 %	tr	16 %	50 %	10 %	tr	770	1,5
Serdary 1988	tr	21 %	tr	10 %	61 %	4 %	tr	770	1,5
Orge	—	tr	—	—	7 %	88 %	—	773	2,8
Orge	—	2,7 %	—	1,4 %	5,9 %	88 %	—	773	2,8
Orge purifié	—	tr	—	—	4,4 %	95 %	—	775	2,9

mm: masse moléculaire; I_i : indice d'insaturation; tr: trace.

Nos résultats d'analyse lipidique du MGDG de Supelco indiquent que ses acides gras sont tous saturés. L'indice d'insaturation est donc nul.

Environ 25 % de ses acides gras contiennent 16 carbones et les 75 % qui restent se composent de chaînes ayant 18 carbones. On remarque que les valeurs indiquées sont plus précises que la plupart des résultats des autres échantillons de MGDG. En effet, les chromatogrammes du lipide de Supelco, qui est chimiquement altéré, ont la ligne de base la plus nette. La Figure 43 montre un des chromatogrammes de cet échantillon. Il y a peu de traces de produits contaminants, autres que les acides gras réellement présents dans l'échantillon, qui sont la plus importante cause d'erreur sur nos chromatogrammes. Ces traces sont souvent dues à la présence résiduelle des pics importants de l'échantillon précédemment injecté. Cependant, la cause de leur apparition n'est pas clairement établie. Étant donné que la seringue est bien rincée dans deux solutions différentes d'hexane, la contamination par l'échantillon précédent est minimisée. Toutefois, le septum situé dans le port d'injection, ou la colonne elle-même, peuvent accumuler des produits qui sont remis en circulation par l'effet d'entraînement qui provoque l'injection d'un nouvel échantillon.

L'échantillon de Serdary acheté en 1986 a été gardé à sec à -135 °C sous argon. L'analyse de CG (voir Figure 44) de ce lipide montre que son acide gras principal est le C18:2. Comme il est indiqué à la section pré-

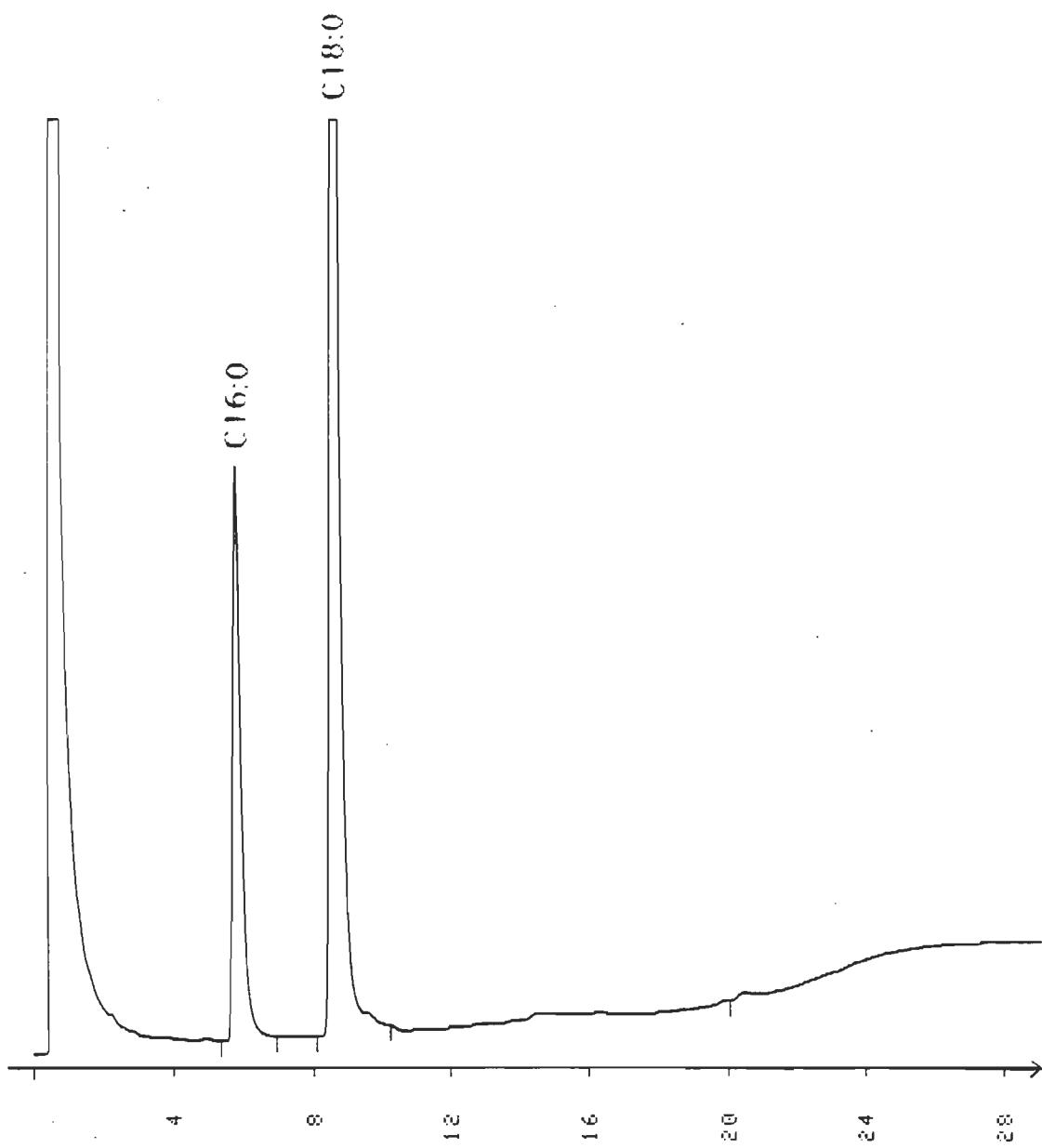


Figure 43. Chromatogramme en CG de l'échantillon de MGDG de Supelco (sans soustraction de la ligne de base).

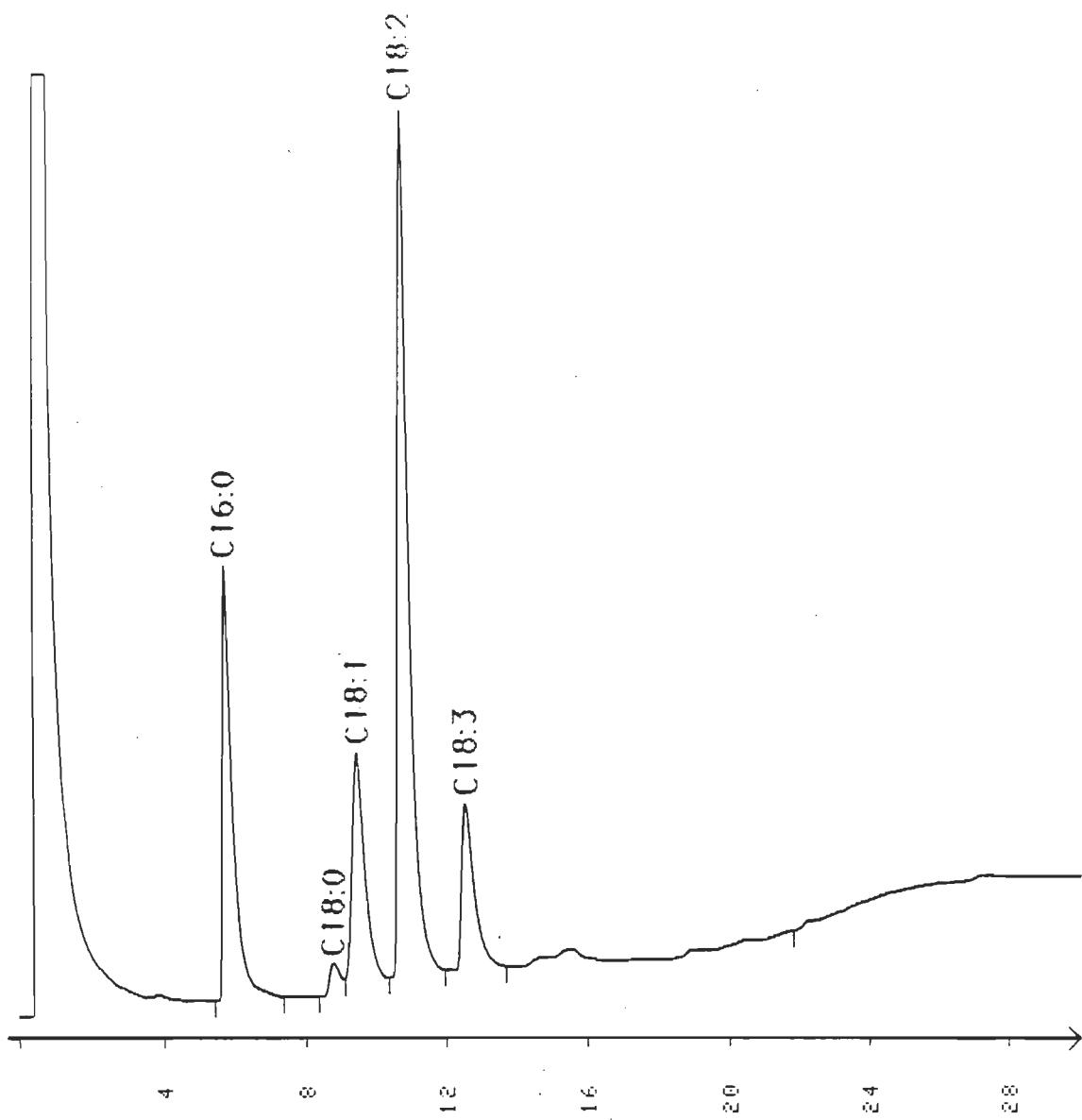


Figure 44. Chromatogramme en CG de l'échantillon de Serdary 1986 (sans soustraction de la ligne de base).

cérente, ce résultat nous a surpris puisque nous nous attendions à obtenir presque exclusivement du C18:3. Nous avons donc cru que cet échantillon s'était dégradé et que son acide gras principal, le C18:3 s'était réduit en C18:1 et en C18:2 par vieillissement. Pourtant, lorsqu'un échantillon lipique se dégrade, il est généralement oxydé et ses chaînes sont clivées aux endroits les plus susceptibles d'être attaqués, c'est-à-dire aux doubles liaisons. Nous avons alors analysé un échantillon plus récent, soit le MGDG de Serdary 1988. À notre grand étonnement, l'analyse des acides gras de ce lipide est semblable à celle de l'échantillon précédent (voir Figure 45). Il comporte un peu plus de C18:2 et des traces de C14:0 mais dans l'ensemble, ces deux échantillons possèdent les mêmes acides gras. Leurs masses molaires ainsi que leurs indices d'insaturation sont donc identiques. Puisque notre échantillon le plus vieux (MGDG Serdary 1986) est relativement semblable à notre MGDG plus récent (1988), nos conditions de conservation des lipides permettent donc l'emploi de nos produits sur une relativement grande période de temps. Cependant, les analyses de CLHP indiquent que ce dernier échantillon contient très peu de MGDG (voir section 4.1.2 et la Figure 42). Les CCM confirment cette analyse en séparant huit taches distinctes; dont la principale est le DGDG, les autres taches sont des lipides, dont le SQDG et un peu de MGDG, et des pigments.

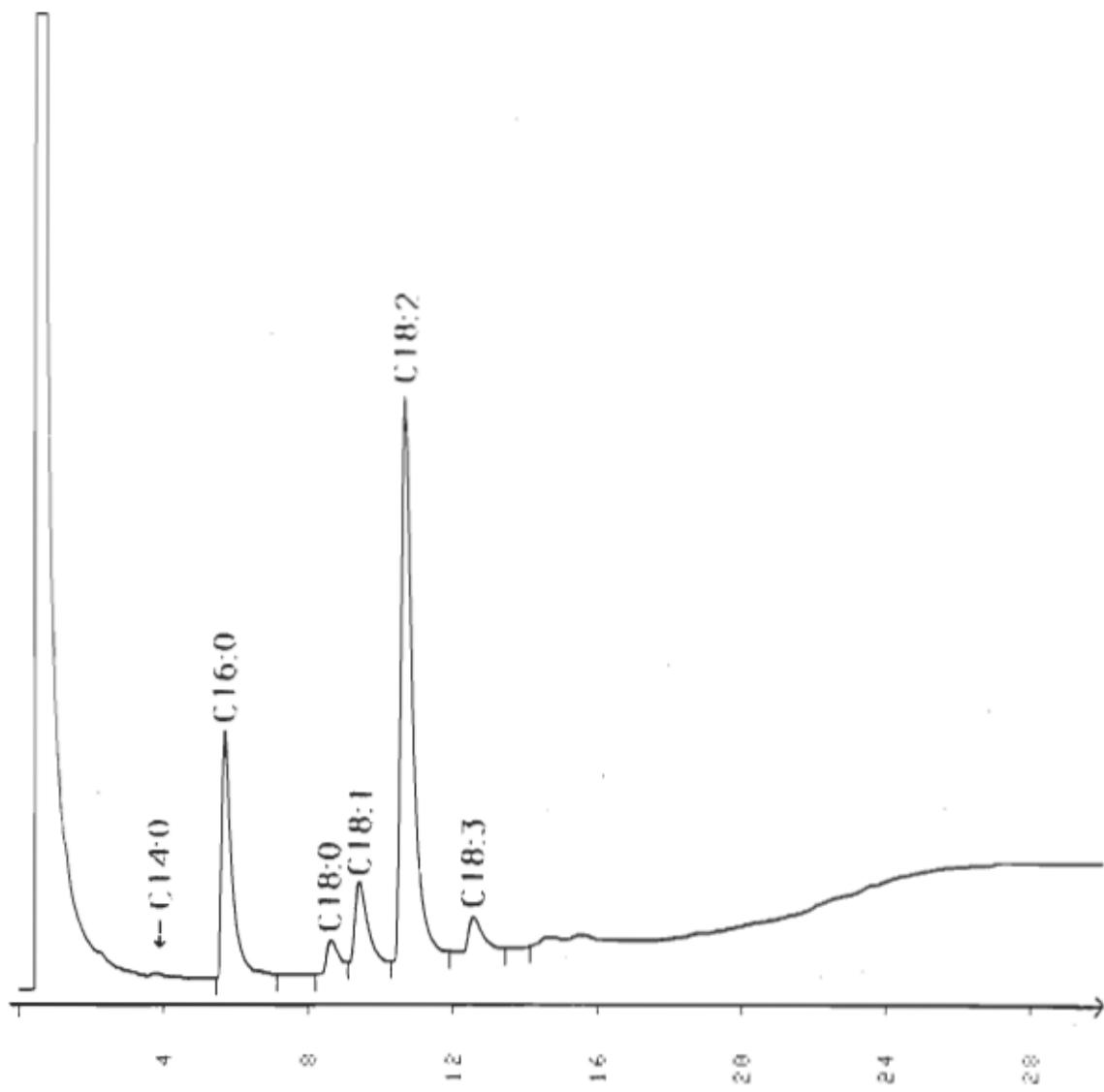


Figure 45. Chromatogramme de l'analyse des acides gras du MGDG de Serdary 1988 (sans soustraction de la ligne de base).

Nous croyons que la similitude notée entre les résultats des MGDG de 1986 et de 1988 est due au fait que ces lipides ont la même origine. En effet, on remarque souvent, dans les plantes supérieures, que les différents lipides de même source ont des distributions d'acides gras similaires.

Nos échantillons de MGDG extraits de l'orge ont également été étudiés par CG. Il est à remarquer que les temps de rétention apparaissant sur les deux chromatogrammes sont différents l'un de l'autre de même que des résultats exposés précédemment. Ceci est dû à une légère différence du débit du gaz vecteur dans l'appareil de CG. On observe, d'après les données indiquées au Tableau 20, que les échantillons non purifiés contiennent un peu moins d'acide linolénique que l'échantillon purifié. Les chromatogrammes apparaissant aux Figures 46, 47 et 48 facilitent l'interprétation de cette différence. Les chromatogrammes des échantillons non purifiés possèdent un pic, qui équivaut de 4 à 7 % de l'aire totale sous les pics, qui est absent sur le chromatogramme de l'échantillon purifié. Ce pic apparaît après celui de l'acide linolénique. Nous avons remarqué que ce pic, qui possède une forme particulière, est présent chaque fois que l'échantillon injecté contenait des pigments au moment de la méthylation. Nous croyons donc qu'il s'agit d'un pic correspondant à la méthylation de la queue phytyl

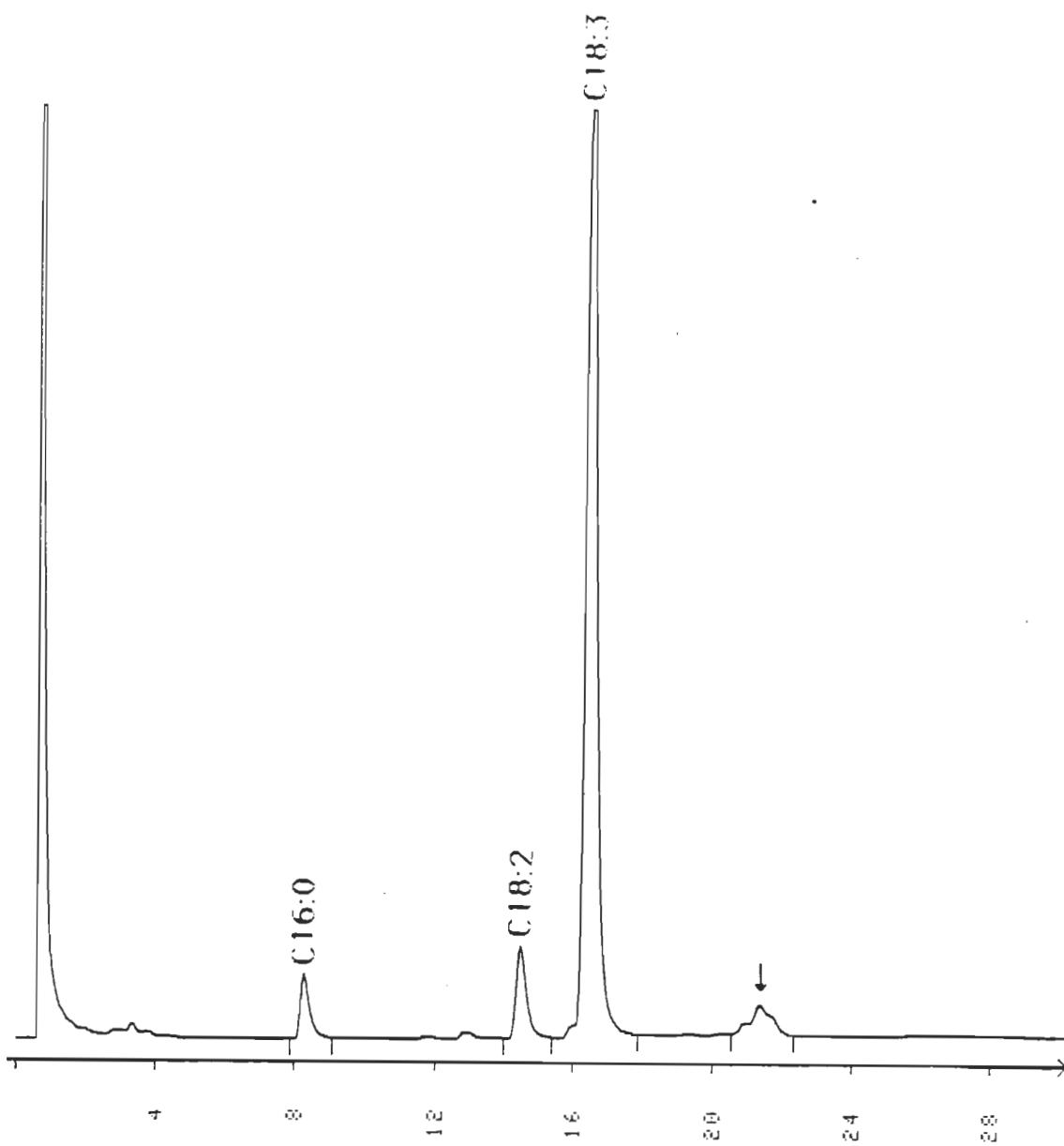


Figure 46. Chromatogramme de CG du premier échantillon de MGDG extrait de l'orge et non purifié (avec soustraction de la ligne de base).

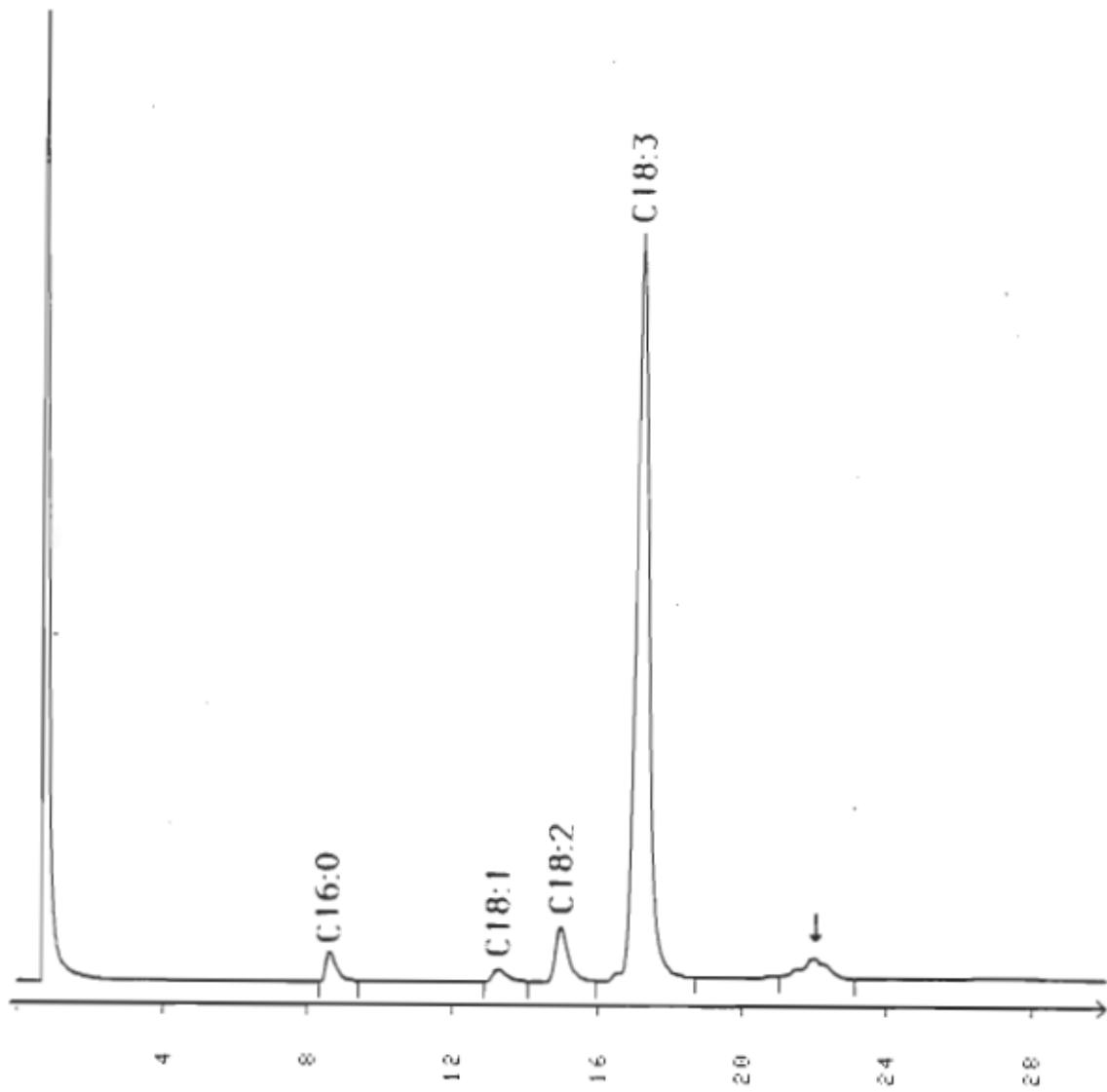


Figure 47. Chromatogramme de CG du second échantillon de MGDG extrait de l'orge et non purifié (avec soustraction de la ligne de base).

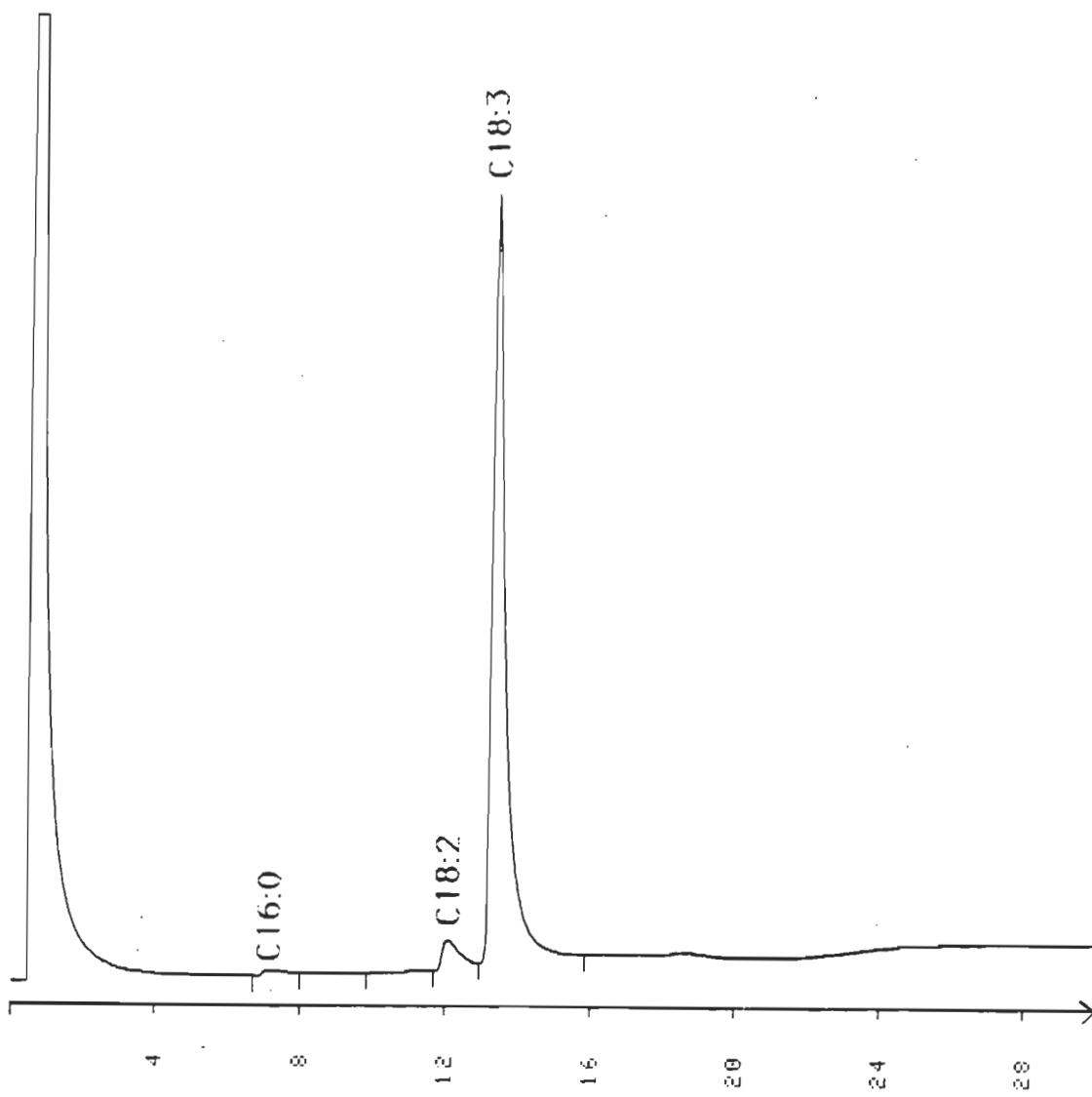


Figure 48. Chromatogramme de CG de l'échantillon de MGDG extrait de l'orge et purifié par CLHP (sans soustraction de la ligne de base).

des chlorophylles ou à tout autre longue chaîne hydrocarbonée fixée par une liaison ester dans les pigments. Cette hypothèse est logique puisque le groupement phytol, qui contient 20 carbones, élue de la colonne après les acides gras contenant 18 carbones. L'ordre d'élution est donc respecté. On remarque également que le pic correspondant à l'acide palmitique (C16:0) est plus important dans le cas des échantillons non purifiés. Nous croyons qu'il est possible que cet acide gras provienne d'un lipide autre que le MGDG, qui serait présent en faible quantité dans l'échantillon, puisqu'il est presque absent dans l'échantillon de MGDG purifié.

4.2 Monocouches et spectroscopie

4.2.1 Isothermes. Le Tableau 21 indique les caractéristiques physiques des échantillons de MGDG que nous avons étudiés par les isothermes de pression de surface.

Le premier échantillon que nous avons caractérisé par les isothermes est le MGDG de Serdary (1986) purifié par CLHP. La Figure 49 montre un de ces isothermes. L'isotherme de cet échantillon est, à peu de chose près, identique à celui publié dans l'article de Tancrède et coll. (1982). Les conditions expérimentales des mesures de ces chercheurs sont les mêmes que les nôtres. Cependant, les auteurs indiquent que leur échantillon pro-

vient de l'épinard (Serdary).

Tableau 21

Aires moléculaires à trois pressions de surface et pression au collage de différents échantillons de MGDG.

Échantillon	Aire moléculaire à 10 mN/m Å ² /mol.	Aire moléculaire à 20 mN/m Å ² /mol.	Aire moléculaire à 30mN/m Å ² /mol.	Pression de surface au collage mN/m
Serdary (1986) purifié par CLHP	94	78	70	42
Extrait de l'orge purifié par CLHP (#0-5)	87	73	66	42
Extrait de l'orge non purifié (#0-5)	100	83	74	40
Extrait de l'orge non purifié (#1-5)	94	78	68	40

L'indice d'insaturation du MGDG ayant une telle origine se situe généralement autour de 2,8 car l'acide gras principal de ce lipide est l'acide linolénique. Notre lipide, dont l'origine est la farine de blé, a un indice de 1,5. Bishop et coll. (1980), dans leurs études en monocouche des lipides du chloroplaste, rapportent que les MGDG, dont les indices d'insaturation diffèrent, ont des isothermes non identiques. Ces études, malgré leurs conditions expérimentales radicalement différentes, montrent une isotherme d'un MGDG dont l'indice d'insaturation est de 2,9, semblable à notre

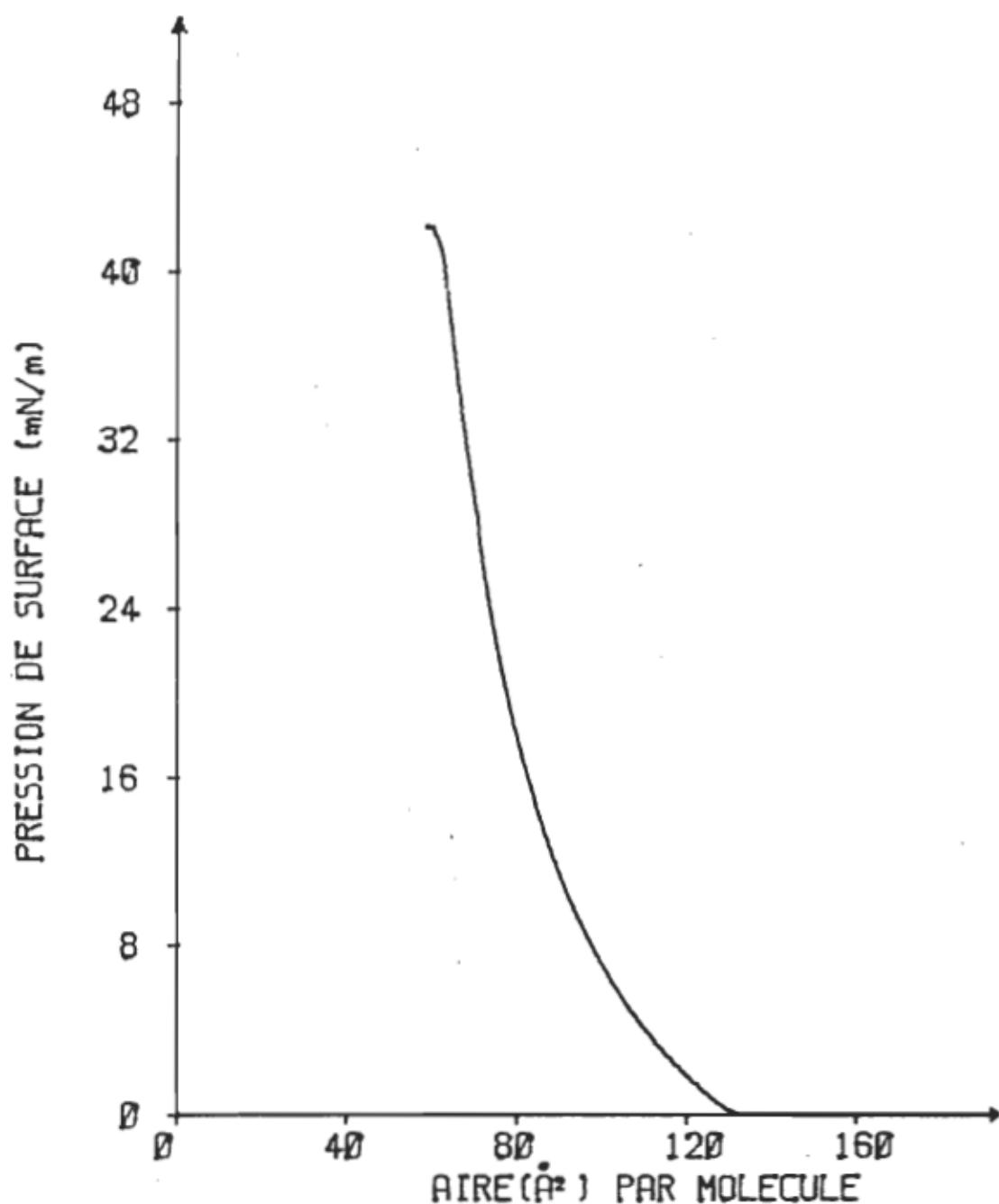


Figure 49. Isotherme de pression de surface du MGDG de Serdary (1986) purifié par CLHP.

isotherme de même qu'à celui de Tancrède et coll. (1982), à part la pression au collapse qui n'est pas indiquée. Nous croyons qu'il est possible que notre MGDG de Serdary et celui de l'étude de Tancrède et coll. (1982) soient le même. En effet, les mises en garde de la section 4.1.2 s'appliquent à tous les travaux dans lesquels ont été utilisés des lipides commerciaux sans vérification des acides gras.

La ressemblance notée entre notre isotherme (de même que celle de Tancrède et coll., 1982) et l'isotherme de Bishop et coll. (1980), dont l'indice d'insaturation est de 2,9, n'est probablement qu'un hasard dû à la différence des conditions expérimentales. Dans ce dernier article, l'isotherme du MGDG dont l'indice est comparable à notre échantillon est très différente de celui que nous avons obtenue. Cette isotherme quitte l'abscisse à $120 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$, et la courbe, qui est dans l'ensemble déplacée de $7 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ vers la gauche, possède une inflexion apparente à environ 35 mN/m .

Le second échantillon dont les caractéristiques sont indiquées au Tableau 21 est l'échantillon extrait de l'orge et purifié par CLHP. Une isotherme représentative de cet échantillon apparaît à la Figure 50. Les propriétés tensioactives de cet échantillon sont comparables à plus ou moins

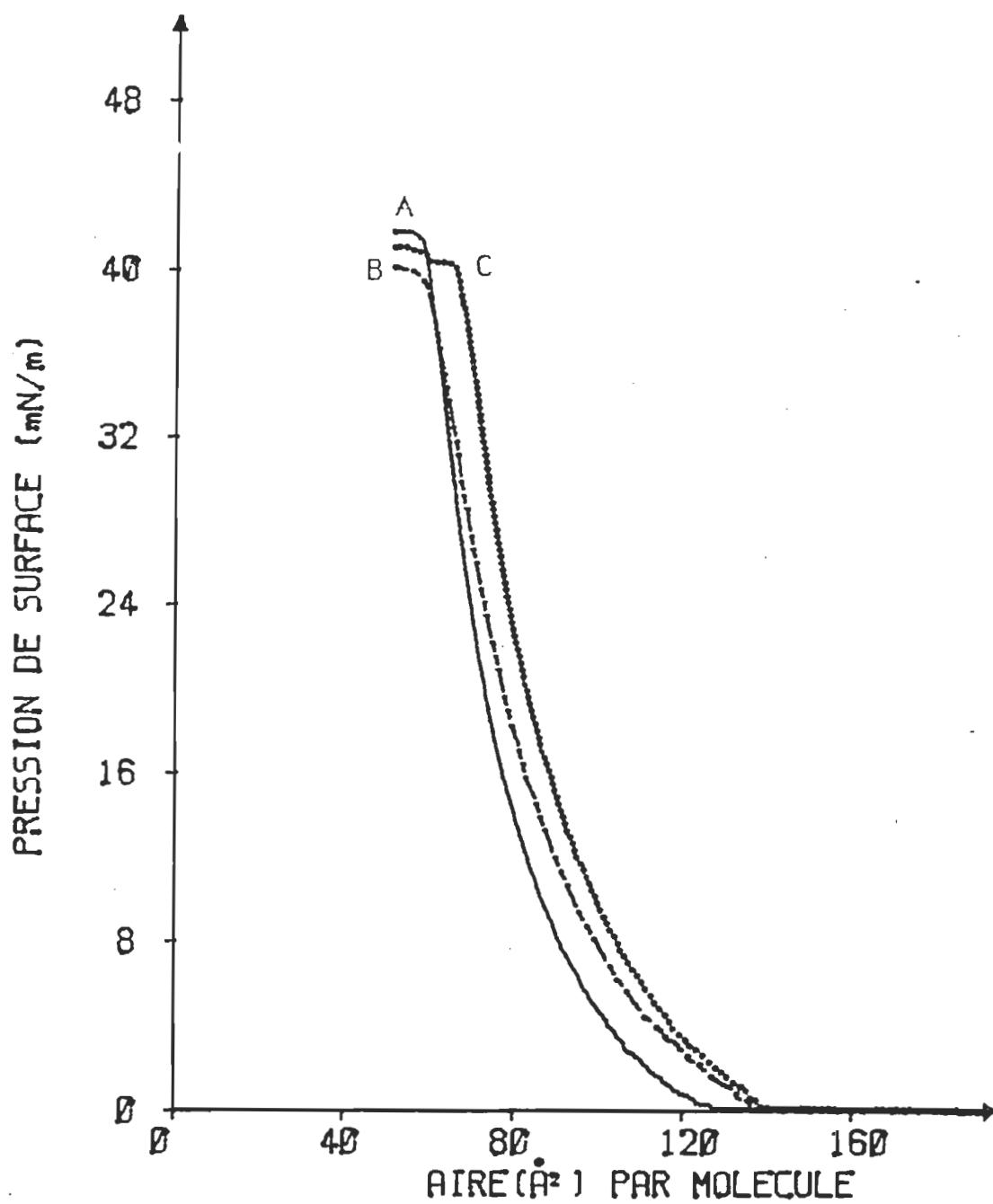


Figure 50. Isothermes de pression de surface de MGDG extraits de l'orge; A: purifié par CLHP; B: avant la purification de l'échantillon A; C: non purifié et provenant d'une autre extraction.

2 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ près à celles du MGDG de Serdary purifié par CCM, selon les données de Tancrède et coll. (1981). Si la source de ce lipide commercial est bien l'épinard (riche en acide linolénique), cette similitude entre nos isothermes et les résultats publiés témoigne de la validité de notre méthode de purification du MGDG par CLHP. De plus, comme dans le cas de la séparation par CCM de Tancrède et coll. (1981), notre méthode n'emploie aucun acide dont l'utilisation en purification des lipides est à éviter, selon les études de ces chercheurs. L'isotherme présentée à la Figure 50 provient d'un échantillon purifié deux mois auparavant et gardé à sec, sous atmosphère inerte, à -135°C et à l'obscurité. Notre méthode permet donc l'élimination de tout contaminant pouvant induire une dégradation du lipide dans ces conditions. La Figure 50 présente une seconde isotherme provenant de l'échantillon de MGDG extrait de l'orge tel qu'il est avant sa purification par CLHP. Dans l'ensemble, cette courbe est déplacée vers la droite de 13 à 8 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ en passant de 10 à 30 mN/m. Le collapse de cette isotherme se situe autour de 40 mN/m. Ces déplacements sont probablement dus à la présence de produits de dégradation et de pigments, principalement la chlorophylle, qui occupe un espace plus grand que le MGDG à l'interface. Une troisième isotherme provenant d'un échantillon de MGDG extrait de l'orge, non purifié résultant d'une seconde extraction, apparaît

aussi à la Figure 50. La première observation notée est la différence qui existe entre nos deux échantillons de MGDG extrait mais non purifié. Cette dissimilitude est vraisemblablement due à une variation du taux et du type de contamination d'un extrait à l'autre, selon les paramètres expérimentaux des étapes de préparation des échantillons tels que la hauteur du lit du gel dans la colonne de CL. L'évasement de cette courbe aux grandes aires moléculaires témoigne de l'impureté de l'échantillon, de même que la faible pression au collapse située autour de 40 mN/m.

4.2.2 Spectroscopie de fluorescence en monocouche. L'importance de la purification du MGDG est mise en évidence par l'étude des spectres d'excitation des mélanges de chlorophylle *a* et de MGDG, purifié et non purifié en film LB. On observe, à la Figure 51, que lorsque le MGDG non purifié est utilisé, le maximum du spectre d'excitation de la monocouche est à 414 nm. Or, cette longueur d'onde est caractéristique de la phéophytine *a*, qui est un dérivé de dégradation de la chlorophylle *a*. Aussi, on remarque que le spectre d'excitation du mélange constitué de phéophytine *a* et de DOPC est presque identique à celui du mélange de la chlorophylle *a* et du MGDG non purifié. Mais lorsque le MGDG purifié par CLHP est utilisé, le spectre est considérablement différent, le maximum de l'excitation

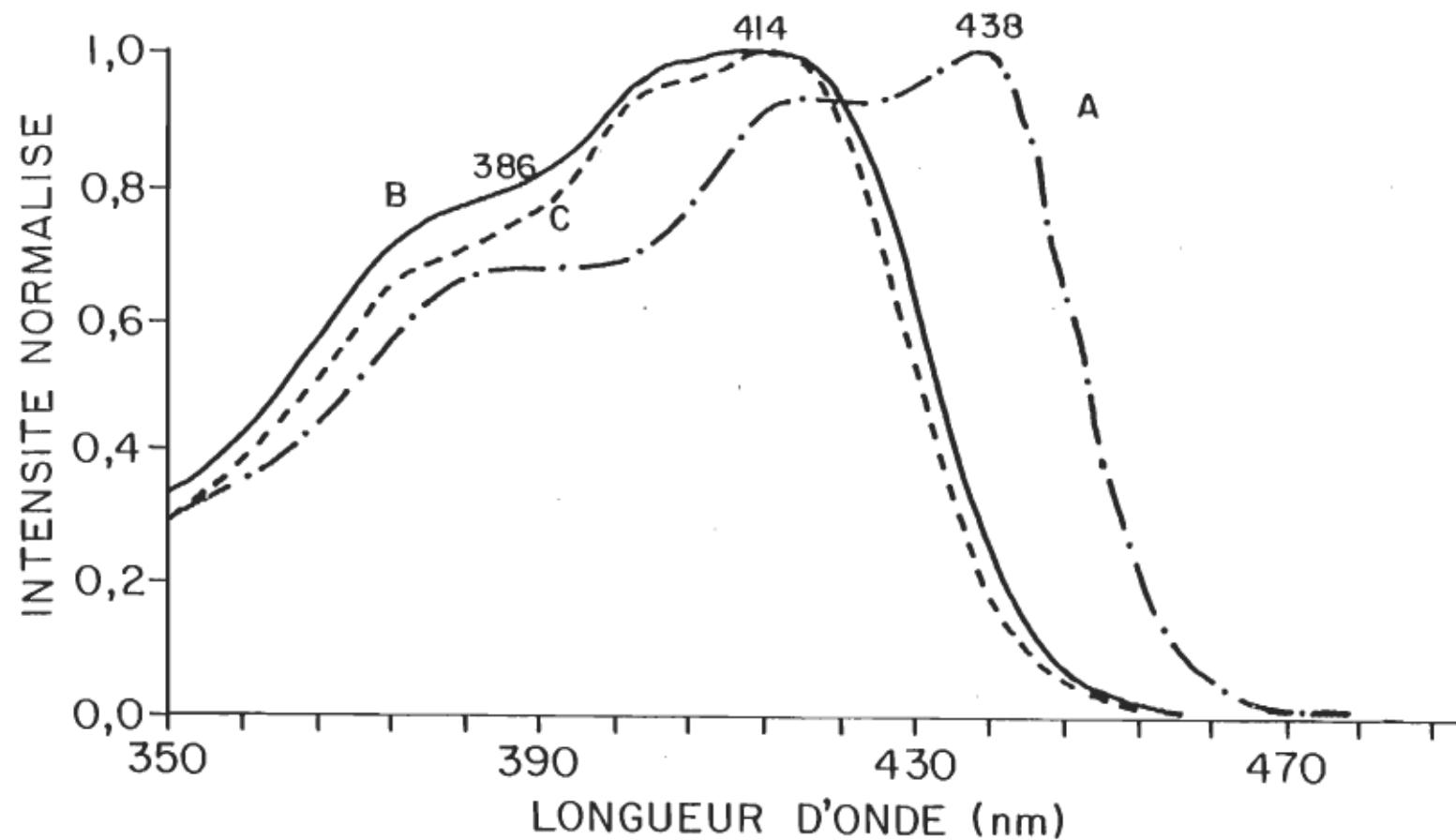


Figure 51. Spectre d'excitation de mélanges pigments/lipides en film LB; A: chlorophylle a /MGDG purifié par CLHP; B: chlorophylle a /MGDG non purifié; C: phéophytine a /DOPC.

tation se situant maintenant à 438 nm, avec deux épaulements à 414 et 386 nm. Or, le spectre d'excitation de la chlorophylle α en solution dans le benzène (Picard, 1990) possède un maximum à 432 nm et deux épaulements à 414 et 380 nm. La correspondance des bandes principales entre le spectre d'excitation de la chlorophylle α dans le benzène et celui du mélange de chlorophylle α et de MGDG, purifié par CLHP, en film LB indique que cette purification du lipide est bel et bien nécessaire afin d'éliminer tout contaminant susceptible de dégrader la chlorophylle α dans la monocouche.

Le Tableau 22 présente les résultats de nos études de durée de vie de fluorescence des mélanges (1/100) de chlorophylle α et de MGDG extrait de l'orge et purifié par CLHP en monocouche à l'interface azote-eau.

L'un des premiers paramètres à établir sur le système étudié est la détermination du type de décroissance de l'état excité de la chlorophylle α par la fluorescence. Le Tableau 22 présente, pour chacune des expériences, les calculs de durée de vie de fluorescence mono- et biexponentielle. Dans les quatre premiers groupes de résultats, on constate que les erreurs sur les durées de vie biexponentielles sont gigantesques.

Tableau 22

Durée de vie de fluorescence de mélanges chlorophylle a/MGDG (1/100) à l'interface azote-eau.

Expérience #	τ_1 ns	$\%$ ₁	τ_2 ns	$\%$ ₂	Remarque
35	5,54 ± 0,03	100	—	—	—
	5,7 ± 0,1	93,6	2 ± 2	6,4	—
28	5,32 ± 0,04	100	—	—	—
	5 ± 1	66,5	7 ± 5	33,5	—
29	5,16 ± 0,05	100	—	—	1 mN/m
	5,3 ± 0,2	91,4	1 ± 7	8,6	1mN/m
24	5,50 ± 0,03	100	—	—	—
	5,51 ± 0,09	99,3	1 ± 18	0,7	—
23	5,68 ± 0,06	100	—	—	—
	8,3 ± 0,3	32,8	4,6 ± 0,2	67,2	—
45	5,61 ± 0,04	100	—	—	—
	6,36 ± 0,09	69,2	4,0 ± 0,2	30,8	—
42	5,47 ± 0,05	100	—	—	—
	6,2 ± 0,1	64,7	4,1 ± 0,4	35,3	—
39	5,56 ± 0,04	100	—	—	MGDG non purifié
	5,9 ± 0,2	89,4	2 ± 1	10,6	MGDG non purifié

Dans les cas des trois expériences suivantes, l'erreur sur ces durées de vie est généralement plus petite, mais les résultats présentés de τ_1 et τ_2 semblent avoir été partagés de part et d'autre de la valeur donnée par les calculs en décroissance monoexponentielle, de façon que leurs moyen-

nes, en respectant leurs proportions, soient égales à cette valeur.

Les valeurs biexponentielles sont donc le produit forcé d'une déconvolution n'ayant aucun sens physique. On peut donc conclure que la chlorophylle α diluée 100 fois dans le MGDG possède une durée de vie monoexponentielle à l'interface azote-eau.

Toutes nos expériences ont été faites à une pression de surface de 20 mN/m à l'exception de l'expérience #29 qui a été mesurée à 1 mN/m. On remarque que cette valeur monoexponentielle de durée de vie de fluorescence est légèrement inférieure aux autres résultats. À cette pression de surface, la chlorophylle α et les lipides sont orientés plus ou moins parallèlement à l'interface. De plus, étant moins entassés les uns contre les autres, tous les pigments étalés à l'interface peuvent dégrader l'énergie d'excitation plus facilement en mouvements vibrationnels, rotationnels ou translationnels. La probabilité de formation de dimères pourrait aussi être sensiblement augmentée aux faibles pressions de surface, car les chlorophylles α peuvent migrer plus facilement dans la monocouche. L'augmentation de la fluidité de la monocouche par une diminution de la pression de surface peut donc expliquer la légère baisse de durée de vie de fluorescence observée à 1 mN/m.

On ne remarque aucune différence de durée de vie de fluorescence de la chlorophylle α lorsque le MGDG non purifié (extrait de l'orge) est utilisé. En étudiant le chromatogramme de cet échantillon lors de la purification (voir Figure 40) de même que ses CCM reproduites à la Figure 52, on observe que, malgré son état de produit non purifié, sa pureté est relativement grande. Comme on le constate précédemment, cet état affecte beaucoup les spectres d'excitation et les isothermes de pression de surface. Mais puisque les mesures de durée de vie de fluorescence se font tout de même à 20 mN/m, la chlorophylle α se retrouve approximativement dans les mêmes conditions d'orientation, d'interaction et de liberté de mouvement que ce soit dans l'échantillon purifié ou brut. Dans ce cas, sa durée de vie de fluorescence pourrait être inchangée, comme on l'observe à la mesure #39. Une seconde hypothèse peut expliquer cette stabilité de la durée de vie de la chlorophylle α dans le MGDG non purifié. Ce lipide possède une tête polaire suffisamment grande pour protéger la chlorophylle par des interactions spécifiques avec celle-ci, ce qui empêcherait les contaminants présents dans l'échantillon de MGDG d'affecter les propriétés de durée de vie de fluorescence de ce pigment. Une molécule comme le phytol, qui ne possède qu'un petit groupement hydrophile ne pourrait pas offrir les mêmes caractéristiques de protection de la chlorophylle à l'interface, et, dans ce

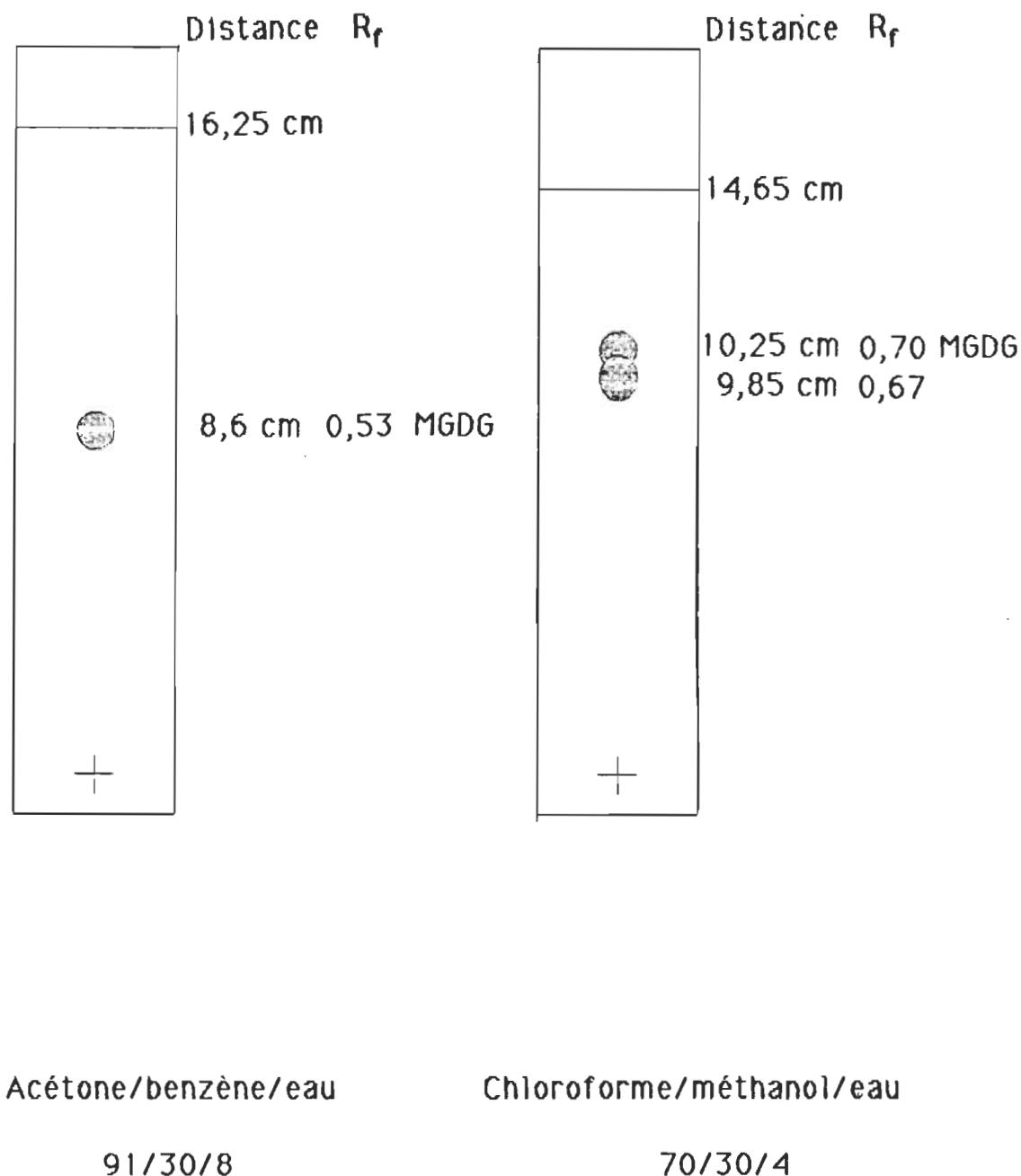


Figure 52. CCM de l'échantillon de MGDG brut extrait de l'orge, après la CL mais avant sa purification par CLHP.

cas, nous croyons qu'un tel système serait beaucoup plus affecté par la présence de contaminants. Enfin, une troisième hypothèse est qu'en utilisant le MGDG non purifié, la chlorophylle a est dégradée en phéophytine a, qui, si elle possède les mêmes caractéristiques de durée de vie de fluorescence que la chlorophylle a, peut induire la même valeur de décroissance monoexponentielle.

Notre valeur moyenne de la durée de vie de fluorescence de la chlorophylle a dans un mélange (1/100) contenant du MGDG purifié à l'interface azote-eau et à 20 mN/m est de $5,5 \pm 0,3$ ns. L'erreur de cette moyenne est calculée avec le facteur de Student pour un intervalle de confiance de 95 %.

Dans le but de comparer notre valeur à la moyenne des durées de vie de fluorescence de la chlorophylle a en solution publiées dans la littérature, nous avons compilé les résultats indiqués au Tableau 7 de la thèse de doctorat de G. Picard (1990). Cette moyenne des publications scientifiques se situe à environ 5,2 ns et est généralement interprétée comme correspondant à l'état monomère du pigment. Nous sommes donc en droit de conclure que notre valeur est également indicatrice de l'état monomérique de la chlorophylle dans notre système.

La plupart des mesures de Picard (1990 et 1988) ont été faites en films Langmuir-Blodgett (LB). Ainsi, pour des systèmes comprenant une molécule de chlorophylle pour 100 molécules de PC, il observe une décroissance biexponentielle, quels que soient les acides gras du lipide. La décroissance lente à 4,5 ns, responsable de 75 % de la fluorescence, est due au monomère de la chlorophylle. La seconde durée de vie, évaluée à 2,0 ns correspond à la différence, soit 25 % de la fluorescence. Cette composante est interprétée par l'auteur comme étant due à la présence de microdomaines à haute concentration de pigments où le nombre de pièges d'énergie est plus important. En gardant le type d'acide gras constant, cet auteur a également étudié l'effet de la tête polaire de différents phospholipides sur la décroissance de fluorescence de la chlorophylle en film LB. Dans le cas de la PC et de la PS, il note deux durées de vie, l'une se situant à 5,4 ns avec un pourcentage de 75 % de la fluorescence. La seconde est de 2,5 ns qui représente 25 % de l'émission lumineuse. Pour la PI et la PG, les durées de vie sont les mêmes mais les pourcentages sont inversés, la plus lente représentant 40 % et la plus rapide, les 60 % complémentaires. En utilisant des lipides du thylacoïde, il remarque encore une décroissance biexponentielle. Lorsqu'il utilise un MGDG purifié, il obtient 4,8 ns pour 80 % de la fluorescence et 1,5 ns pour les 20 % restants. Le MGDG non pu-

rifié donne des résultats similaires, c'est-à-dire 5,9 ns (90 %) et 1,5 ns (10 %). Le DGDG offre des résultats quasi-identiques au MGDG purifié.

Nous avons tenté d'identifier les causes principales de la différence entre les résultats de cet auteur et les nôtres. Picard propose une hypothèse que nous appuyons. Le fait que ces études aient été effectuées en films LB peut affecter l'homogénéité de la distribution de la chlorophylle dans les lipides par rapport à ce qui existe à l'interface azote-eau. La création de microdomaines, ou encore la cristallisation de la monocouche lorsqu'elle repose sur une imperfection de la surface sur laquelle elle est déposée, pourrait également induire la composante rapide de la fluorescence. L'étude en film LB de nos mélanges de chlorophylle et de MGDG purifié par CLHP pourrait également donner une décroissance biexponentielle qui, sans toutefois prouver l'hypothèse suggérée, démontrerait la différence d'état entre les systèmes déposés aux interfaces azote-eau par rapport aux dépositions sur substrat solide.

Picard ne présente que deux résultats de durée de vie de fluorescence à l'interface azote-eau. Le système est constitué d'un mélange 1/100 de chlorophylle *a* et de PC (composée d'acide linolénique). Dans un cas, il indique que la décroissance est biexponentielle, à 5,5 ns pour 80 % de la

fluorescence et 2,5 ns pour les 20 % qui restent. Dans le second cas, et pour le même système, la décroissance est monoexponentielle à 5,5 ns. Malheureusement, l'auteur ne distingue et ne discute pas ces deux résultats. On peut alors supposer que l'une de ces valeurs est une erreur expérimentale. En supposant que la décroissance monoexponentielle représente la vraie nature du système à l'interface azote-eau, nos propres résultats sont en accord avec cette valeur.

Un second groupe de chercheurs a également étudié la durée de vie de fluorescence de la chlorophylle α diluée dans des lipides à l'interface azote-eau. Ces auteurs (Agrawal et coll., 1985) indiquent que lorsque la chlorophylle α est diluée à un rapport de 1 pour 120 avec la dioléoylphosphatidylcholine (PC à C18:1), à une pression de surface de 2 mN/m, la durée de vie de fluorescence du pigment est monoexponentielle à $5,5 \pm 0,3$ ns. Ceci est en parfait accord avec nos résultats. Cependant, nous ne nous trouvons pas dans les mêmes conditions de pression de surface et de dilution de la chlorophylle. Avec les graphiques que présentent ces auteurs, nous avons évalué, en effectuant une moyenne de leurs résultats à 10 et à 30 mN/m, qu'à 100 lipides pour 1 pigment, la durée de vie de fluorescence se situe à environ 4,9 ns, ce qui est tout de même comparable à nos résultats. Nous ne croyons pas que la compression, jusqu'à 20 mN/m, de leur

système qui a été étudié à 2 mN/m n'induise de nouvelles composantes de fluorescence. Les auteurs indiquent aussi qu'une augmentation de pression de surface, pour une fraction molaire de chlorophylle donnée, ne crée pas de trappes de fluorescence.

Dans un second article (Chauvet et coll., 1988), ce groupe de chercheurs a présenté ses résultats de durée de vie de fluorescence de la chlorophylle α diluée (1/120) dans la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), qui est un lipide dont les acides gras, complètement saturés, comportent 16 carbones. À 20 mN/m et à la température de la pièce, ce lipide, qui présente deux transitions de phase, se trouve dans la transition de la phase liquide condensée (LC) à la phase solide condensée (SC). Il n'est donc pas surprenant qu'ils observent une décroissance biexponentielle de l'état excité. La composante rapide vaut 2,1 ns alors que la lente se situe à 5,3 ns. La composante rapide est très sensible aux faibles variations de pression de surface. Afin d'expliquer leurs résultats, ils affirment, par l'étude de l'intensité de la fluorescence au cours des transitions de phase, que la chlorophylle qui se trouve dans les domaines LC est non fluorescente, alors que dans les domaines SC, elle est monomérique, fluorescente, mais elle possède tout de même deux types de population. Les

chlorophylles qui sont à proximité de trappes d'énergie possèdent une courte durée de vie. L'augmentation de la pression de surface provoque donc un rapprochement entre ces chlorophylles et les trappes, diminuant du même coup la durée de vie de ces pigments. La durée de vie de fluorescence lente est due aux chlorophylles dites «libres», qui sont suffisamment éloignées des trappes d'énergie, ce qui les rend pratiquement insensibles à l'augmentation de la pression de surface. Leurs caractéristiques spectroscopiques ne varient donc pas en fonction de la pression de surface.

CHAPITRE 5

DIGALACTOSYLDIACYLGLYCÉROL

5.1 Chromatographie

5.1.1 CLHP. La première méthode de purification du DGDG que nous avons employé provient d'un travail fait par J.-P. Richard, qui utilisait cette méthode pour la purification du MGDG et du DGDG. Les conditions expérimentales sont indiquées au Tableau 15 du chapitre précédent. Le système utilisé est celui de Beckman. Nous avons injecté un échantillon de DGDG d'origine inconnue, dont la CCM démontre neuf taches de produits incluant le DGDG. Le chromatogramme obtenu est reproduit à la Figure 53. Le pic du DGDG est identifié parmi la série de produits élués par la CCM des fractions recueillies. Le DGDG élué hors du CLHP en 40 minutes, ce qui est passablement long. De plus, un produit contaminant non identifié, élué après le DGDG, n'est pas résolu de ce dernier.

Puisque nous ne connaissons pas l'origine de ce lipide, nous avons répété l'expérience avec un échantillon extrait de l'orge, en espérant qu'il

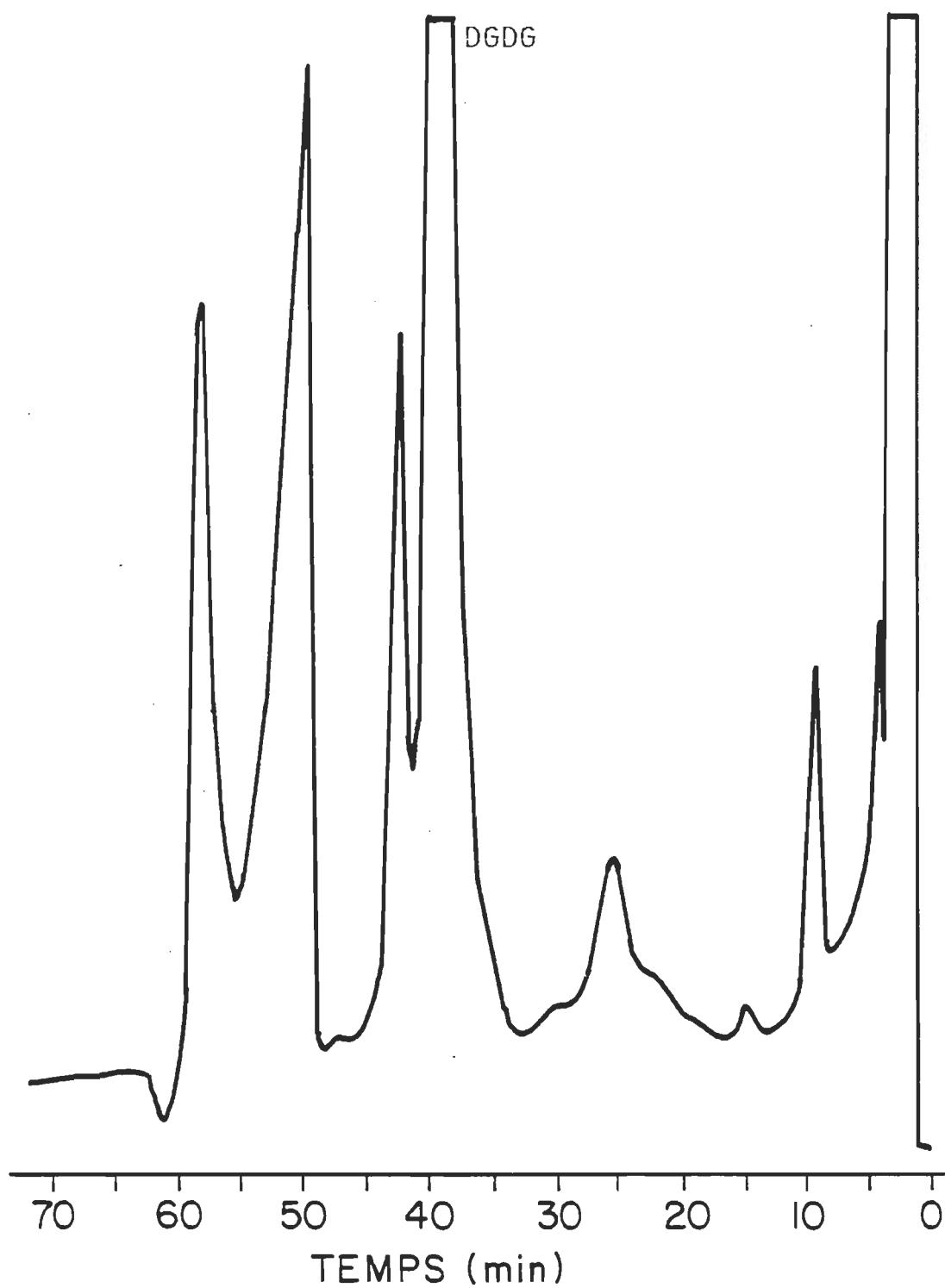


Figure 53. Chromatogramme de la purification du DGDG par CLHP selon la méthode de J -P. Richard.

serait moins contaminé, ou du moins, plus riche en DGDG que le premier échantillon utilisé. La fraction #9, qui est riche en DGDG, divisée en deux aliquots (A et B) et obtenue après la CL, a été injectée dans le système de CLHP. Un de nos chromatogrammes est illustré à la Figure 54. L'échantillon #9 A a été purifié en une succession de quatre injections. Les quatre fractions de DGDG purifié ont été recueillies ensemble. Le temps de rétention moyen du DGDG est de 39 ± 2 minutes. L'échantillon #9 B a été injecté en cinq parties et les fractions obtenues ont été récupérées ensemble. Le temps de rétention moyen de cette dernière purification est de 40 ± 2 minutes.

Nos deux échantillons purifiés ont été réinjectés en une seule fois dans le système CLHP. Dans chaque cas, le pic du DGDG s'est divisé en deux nouvelles composantes que nous avons identifiées #9 A_i, #9 A_{ii}, #9 B_i et #9 B_{ii}, respectivement. Le chromatogramme de la réinjection de l'échantillon #9 A apparaît à la Figure 55. Bien que l'identité du second pic ne soit pas connue, les isothermes de pression de surface indiquent que le DGDG se retrouve dans le premier pic (voir section 5.2). Quoiqu'il en soit, cette méthode de purification ne nous satisfait pas puisque le DGDG ne sort du système qu'après 40 minutes, ce qui rend la purification très longue, d'autant plus qu'il n'y a pratiquement aucun produit qui éluie entre

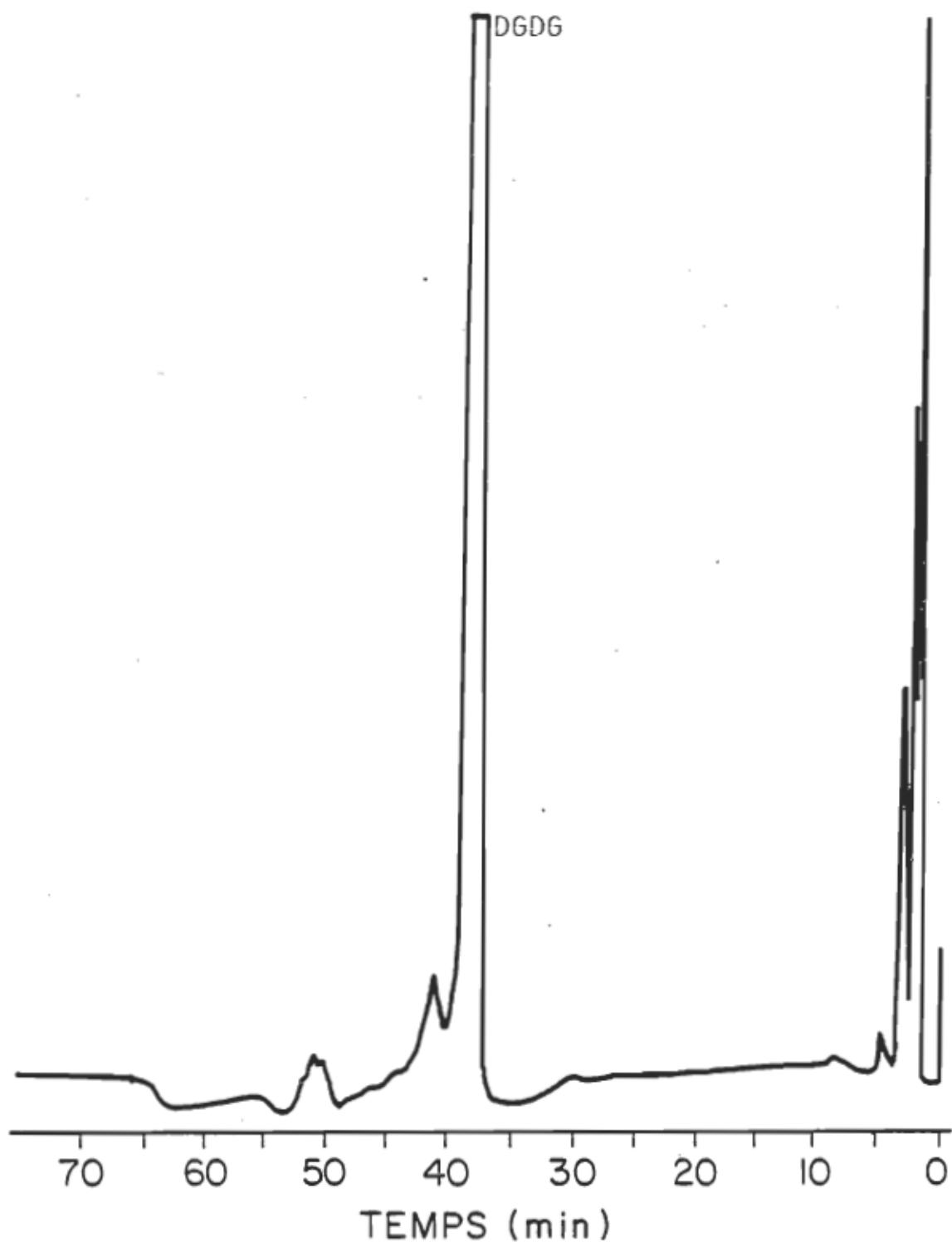


Figure 54. Chromatogramme de la purification du DGDG, extrait de l'orge, par CLHP selon la méthode de J.-P. Richard.

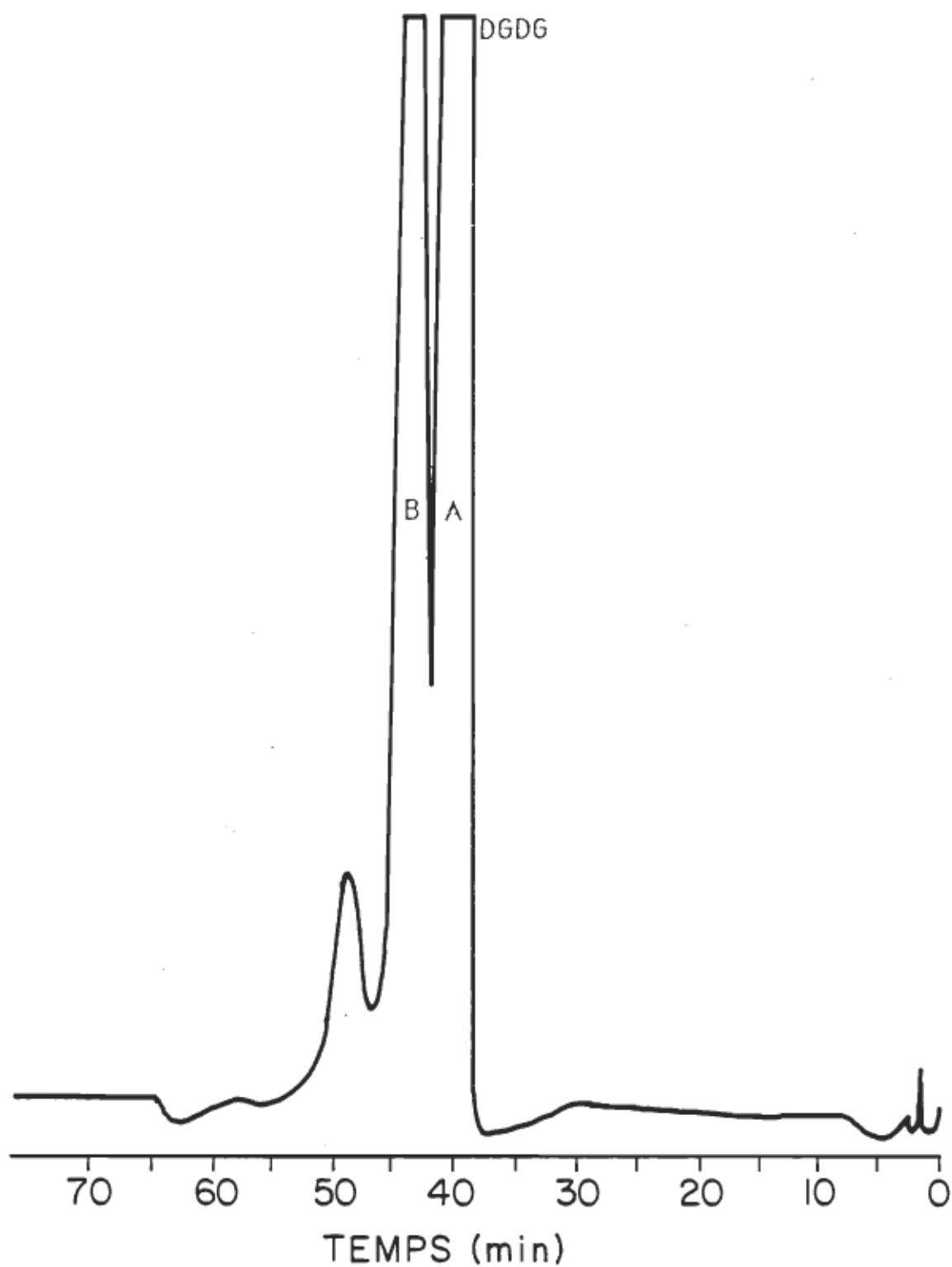


Figure 55. Chromatogramme de la réinjection du DGDG, extrait de l'orge, et purifié par CLHP selon la méthode de J -P. Richard

le temps mort du système et le temps de rétention du DGDG. De plus, en augmentant la rapidité de la méthode de façon à ce que le DGDG élue plus tôt, il devient plus facile de changer les conditions expérimentales afin de dégager le pic du DGDG de son contaminant.

Le système chromatographique utilisé pour les expériences qui suivent est le modèle de Waters dont les conditions expérimentales sont indiquées à la section 2.5.4. Cependant, la colonne utilisée est la même (diamètre interne de 4,6 mm). La phase mobile est isocratique, constituée d'un mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau dans des proportions de 70/30/3, et circule à 2,0 mL/min. La vitesse de déroulement du papier est de 0,5 cm/min. L'échantillon de DGDG injecté est la fraction #8 obtenue par la CL après l'extraction de l'orge. Cet échantillon a été purifié par une succession de 31 injections. Un de ces chromatogrammes est illustré à la Figure 56. Le temps de rétention moyen est de $3,1 \pm 0,1$ min. Bien que ce dernier paramètre soit grandement amélioré par notre changement de phase mobile, on observe tout de même un épaulement au début du pic du DGDG. Ce problème disparaît en utilisant comme éluant le mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau dans des proportions de 70/30/2. Un chromatogramme de la séparation dans ces conditions est illustré à la Figure 57. Cette expérience a été effectuée à l'aide de la colonne mesurant 10,0 mm

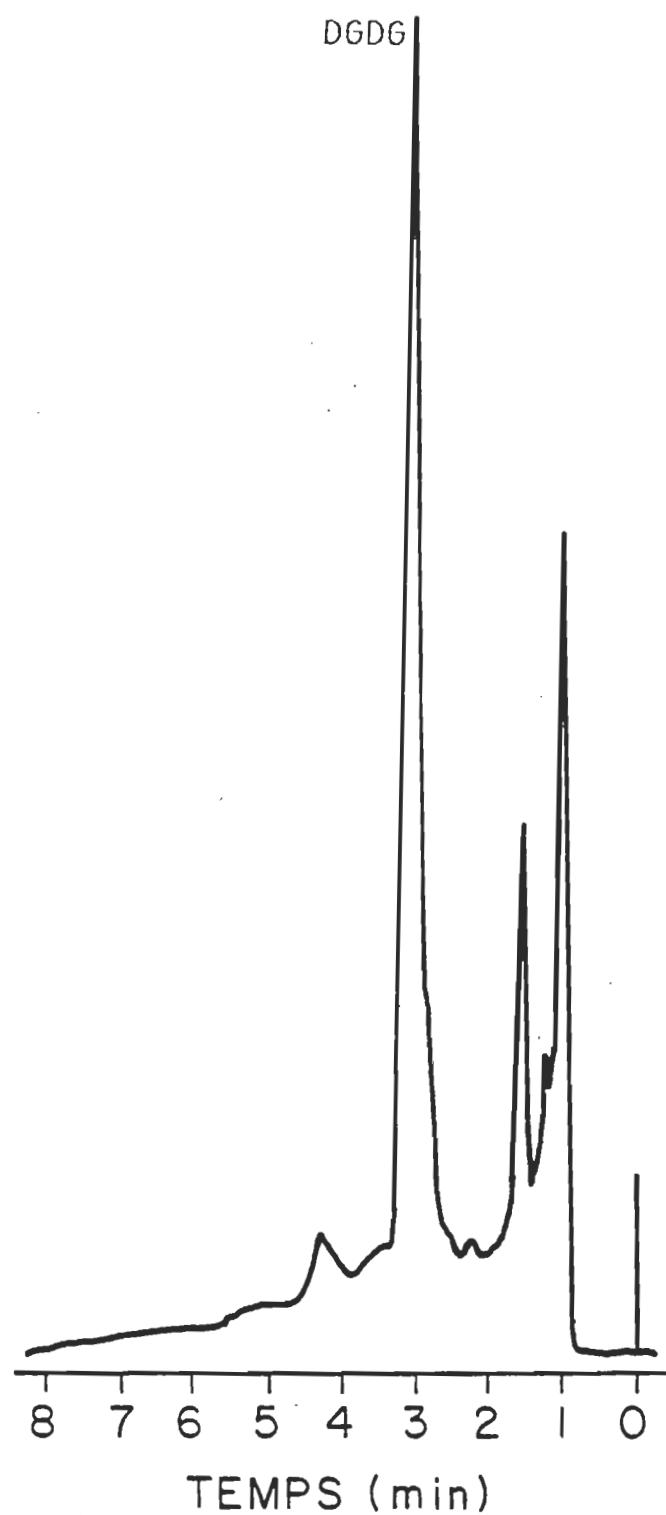


Figure 56. Chromatogramme de la purification en mode isocratique du DGDG, extrait de l'orge, dans l'éluant constitué d'hexane, d'isopropanol et d'eau dans des proportions de 70/30/3.

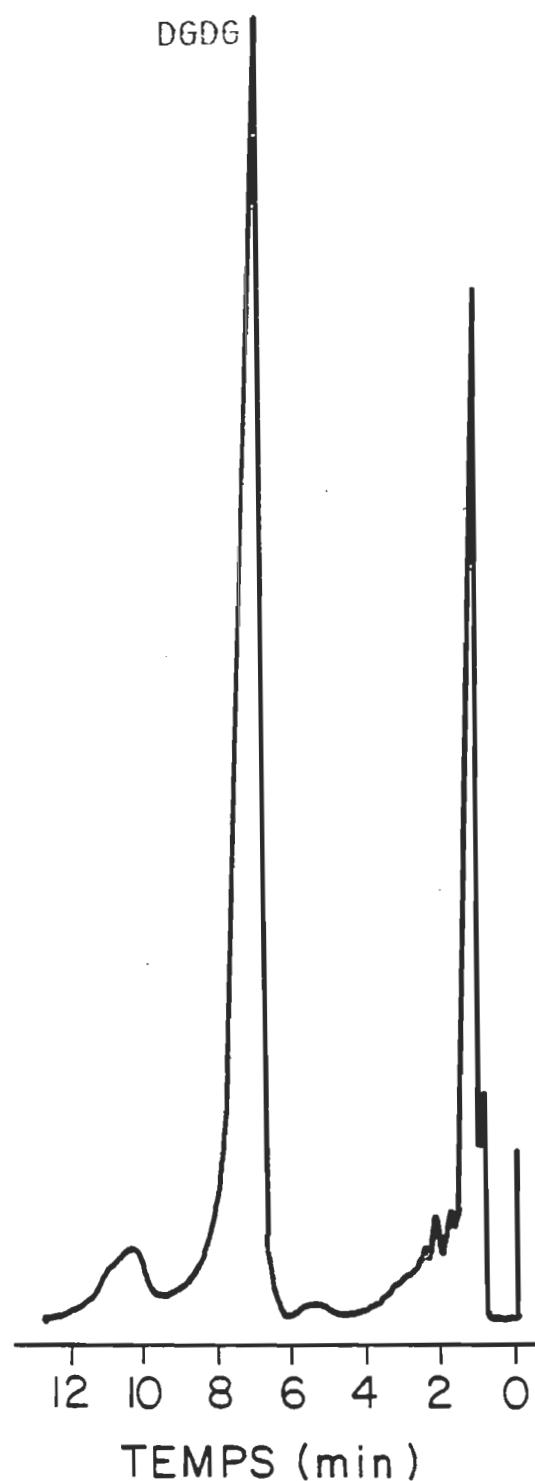


Figure 57. Chromatogramme de la purification en mode isocratique du DGDG, extrait de l'orge, dans l'éluant constitué d'hexane, d'isopropanol et d'eau dans des proportions de 70/30/2.

de diamètre interne. La phase mobile circule à 9,0 mL/min et le déroulement du papier est de 0,5 cm/min. Le temps de rétention du DGDG est de $7,2 \pm 0,1$ min. Le pic est symétrique et ne contient plus d'épaulement.

5.1.2 CG. L'échantillon #9 A_i discuté à la section précédente est le seul DGDG qui ait fait l'objet d'une analyse d'acide gras. Cet échantillon contient 14,5 % d'acide palmitique (C16:0), 2,5 % d'acide oléique (C18:1), 4,0 % d'acide linoléique (C18:2) et 78,9 % d'acide linolénique (C18:3). Son indice d'insaturation est de 2,5 et sa masse molaire est de 931,2 g/mol.

5.2 Isothermes

Les échantillons #9 A_i et #9 A_{ii} ont été utilisés afin d'obtenir les isothermes de pression de surface du DGDG, qui sont reproduites à la Figure 58. Dans le cas de l'échantillon #9 A_i, cette courbe correspond bien à l'isotherme publié par Trosper et Sauer (1968) qui utilisaient des conditions expérimentales semblables aux nôtres. Cependant, notre pression au collapse est supérieure à celle donnée par ces auteurs d'environ 4 mN/m.

L'échantillon #9 A_{ii} nous indique que ce produit n'a pas les mêmes propriétés de surface que le DGDG, même si la CCM ne nous indique aucune différence de R_f entre ce produit et le DGDG. Il s'agit peut-être d'un pro-

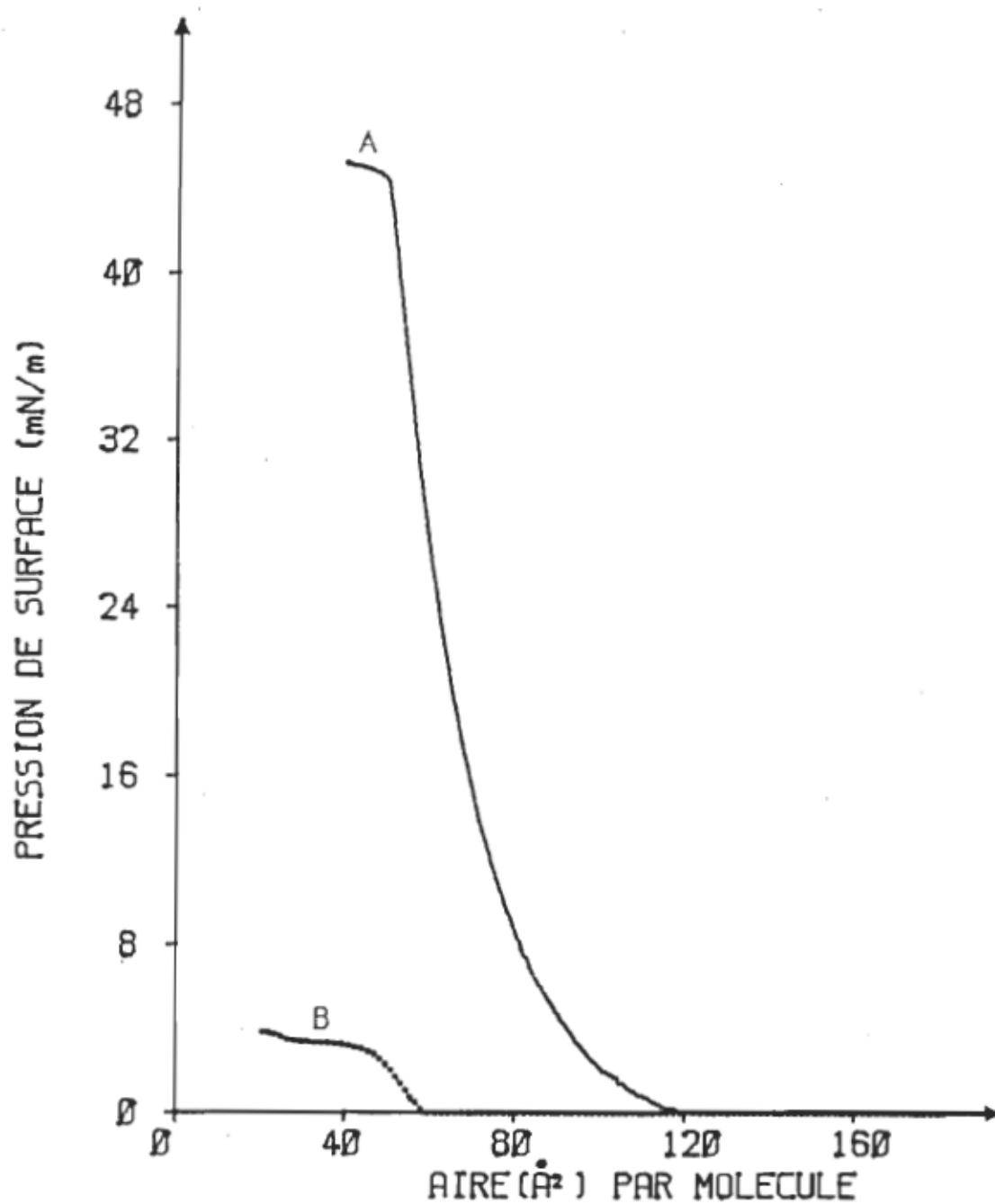


Figure 58. Isothermes de pression de surface du DGDG (#9 A_{ii}) et d'un produit contaminant du DGDG (#9 A_{ii}); A: DGDG purifié; B: produit contaminant.

duit de dégradation du DGDG qui se comporte de façon semblable au DGDG en CCM mais qui est partiellement soluble dans la sous-phase lors des expériences en monocouche.

CHAPITRE 6

SULFOQUINOVOSYLDIACYLGlycérol

6.1 Chromatographie

6.6.1 CLHP et CCM. Les expériences qui suivent ont été effectuées à l'aide du système de CLHP de Beckman et du détecteur à indice de réfraction d'Altex. Les conditions expérimentales initiales qui ont été utilisées proviennent d'un travail fait par J.-P. Richard et apparaissent au Tableau 23. Le débit de la phase mobile n'a pas été vérifié.

Tableau 23

Conditions initiales de CLHP pour la purification du SQDG.

Condition	Valeur
Phase mobile	Chloroforme/méthanol/eau 70/30/2,5
Débit de la phase mobile	2,0 mL/min
Élution	Isocratique
Détection	Indice de réfraction
Atténuation	2
Colonne	Altex Ultrashere-Si 4,6 mm X 250 mm dp: 5µm

Tableau 23 (Suite)

Condition	Valeur
Échantillon	SQDG Lipid Product
Volume d'injection	250 µL
Déroulement du papier	1,0 cm/min

Les résultats obtenus lors de cette purification apparaissent au Tableau 24 et un de nos chromatogrammes est reproduit à la Figure 59.

Tableau 24

Moyenne des trois résultats des expériences de purification du SQDG par CLHP.

Fraction #	t_r moyen des fractions recueillies min	R_f *	Produit
		A/B/E	C/M/E
1	2,0 ± 0,1	0,82	Pigments
2	3,6 ± 0,2	0,18	SQDG
3	6 ± 1	0,08	PC ou PG

*Dans les conditions habituelles (section 2.5.3), p.62.

L'analyse des chromatogrammes obtenus par un détecteur à indice de réfraction est un peu plus complexe que lorsqu'ils sont obtenus par un détecteur ultraviolet. En effet, on remarque que le premier pic, correspon-

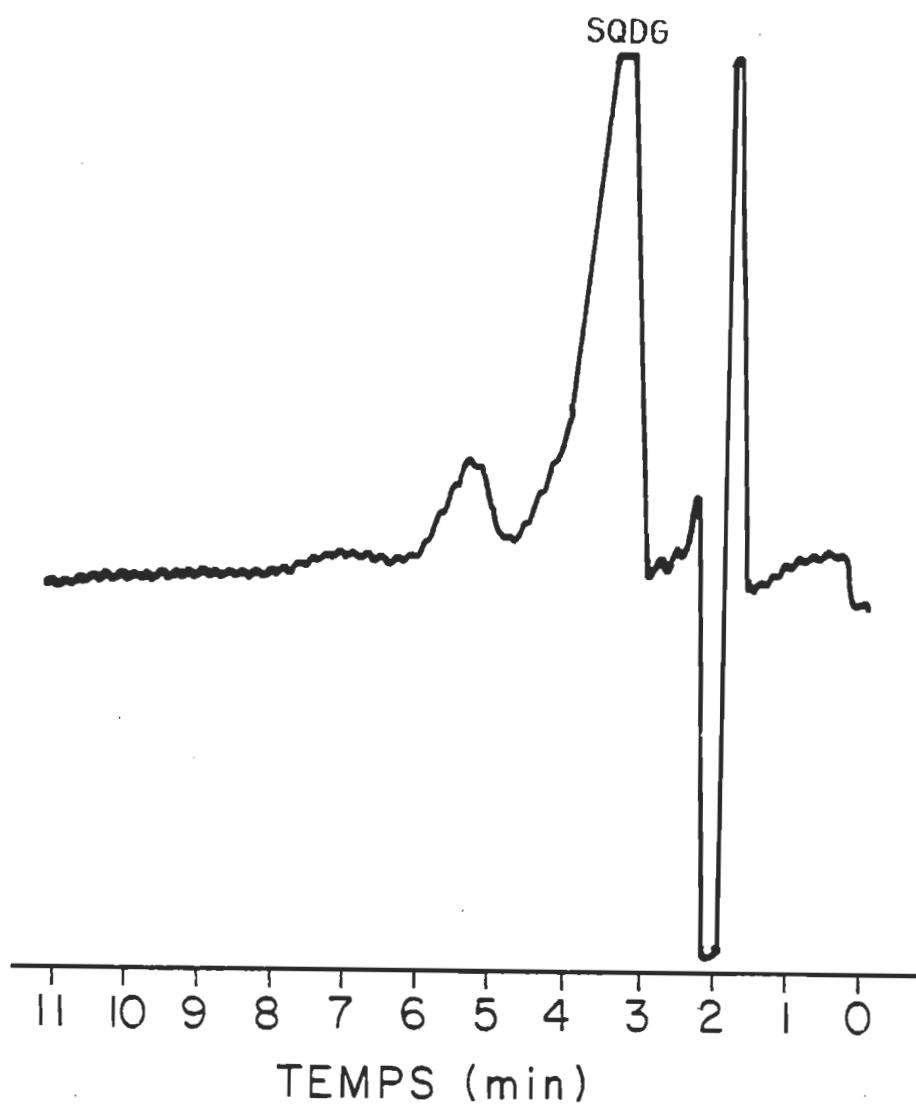


Figure 59. Chromatogramme de la purification du SQDG de L1pid Product par CLHP selon la méthode de J.-P. Richard.

dant à l'élution des pigments, a une forme de première dérivée d'un pic. Ceci est dû à la présence des molécules éluées dans la phase mobile. Celes-ci peuvent modifier l'indice de réfraction à un point tel que le pic est subitement inversé à l'enregistreur. Ce phénomène dépend de la concentration du produit dans la phase mobile.

On remarque également que la ligne de base de nos chromatogrammes est en dents de scie. Ceci est dû aux pulsations des pompes qui provoquent des variations de pression de la phase mobile dans la cellule de détection. Cette modulation de pression induit une alternance d'indice de réfraction de l'éluant qui est alors captée par le détecteur.

Selon les CCM de nos fractions recueillies, le SQDG coïncide avec le pic #2. Malheureusement, nos chromatogrammes ne sont pas assez bien définis pour pouvoir discuter de la résolution du SQDG dans nos conditions. Selon les CCM, il semble que le lipide ne contienne pas de contaminant.

Nous avons tenté d'améliorer la méthode en utilisant un détecteur aux ultraviolets, malgré la présence de chloroforme dans la phase mobile, en espérant pouvoir capter une différence d'absorbance lors de l'élution du SQDG. Malheureusement, le lipide utilisé est principalement saturé et

n'absorbe pas suffisamment pour être détectable. Nous avons alors remplacé notre phase mobile par un mélange d'acétonitrile, de méthanol et d'eau dans des proportions de 88/12/1,5 et ce, afin d'obtenir un éluant de force éluante équivalente à notre mélange contenant le chloroforme, mais qui absorbe beaucoup moins dans l'ultraviolet. Le chromatogramme obtenu est similaire à celui du mélange précédent. Ainsi, peu importe que l'éluant absorbe beaucoup ou peu, le SQDG, lui, n'absorbe pas suffisamment pour permettre sa détection en uv.

Le retour à l'éluant composé de chloroforme, de méthanol et d'eau (70/30/2,5) et du détecteur à indice de réfraction utilisé avec les pompes de Waters sera probablement la meilleure méthode de purification du SQDG, car ce système ne produit pas autant de variations de pression que les pompes de Beckman.

6.1.2 CG. L'échantillon de SQDG de Lipid Product récolté après sa purification en CLHP a été le seul échantillon dont l'analyse de CG a été effectuée. Cet échantillon contient 82 % d'acide palmitique, 1 % d'acide palmitoléique, 9 % d'acide stéarique, 2 % d'acide oléique, 2 % d'acide linoléique et 4 % d'acide linolénique. L'indice d'insaturation de ce SQDG est de 0,2 et sa masse moléculaire est de 803,9 g/mol. On remarque que le

degré de saturation de ce lipide est élevé, ce qui explique sa faible absorption aux ultraviolets.

6.2 Isothermes

Nous avons utilisé l'échantillon de SQDG de Lipid Product, purifié par CLHP, dans le but de mesurer des isothermes de pression de surface. Une de nos isothermes est illustrée à la Figure 60. Les moyennes des aires moléculaires à 10, 20 et 30 mN/m sont 94, 73 et 58 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$, respectivement. La courbe quitte l'abscisse à 240 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ et la pression au collapse est d'environ 37 mN/m. Nous n'avons trouvé aucune référence où notre courbe est comparable à celle publiée.

Bishop et coll. (1980) présentent une isotherme de pression de surface d'un échantillon de SQDG saturé, dont la structure moléculaire est comparable à celle du SQDG que nous avons utilisé. Cette courbe quitte l'abscisse à 75 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ et les aires moléculaires à 10, 20 et 30 mN/m se situent à environ 50, 45 et 40 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$. Par rapport à cette isotherme, notre propre courbe est donc considérablement déplacée vers la droite et très évasée aux grandes aires moléculaires. Cependant, Bishop et coll. (1980) ont obtenu ce résultat sur une sous-phase constituée d'eau pure

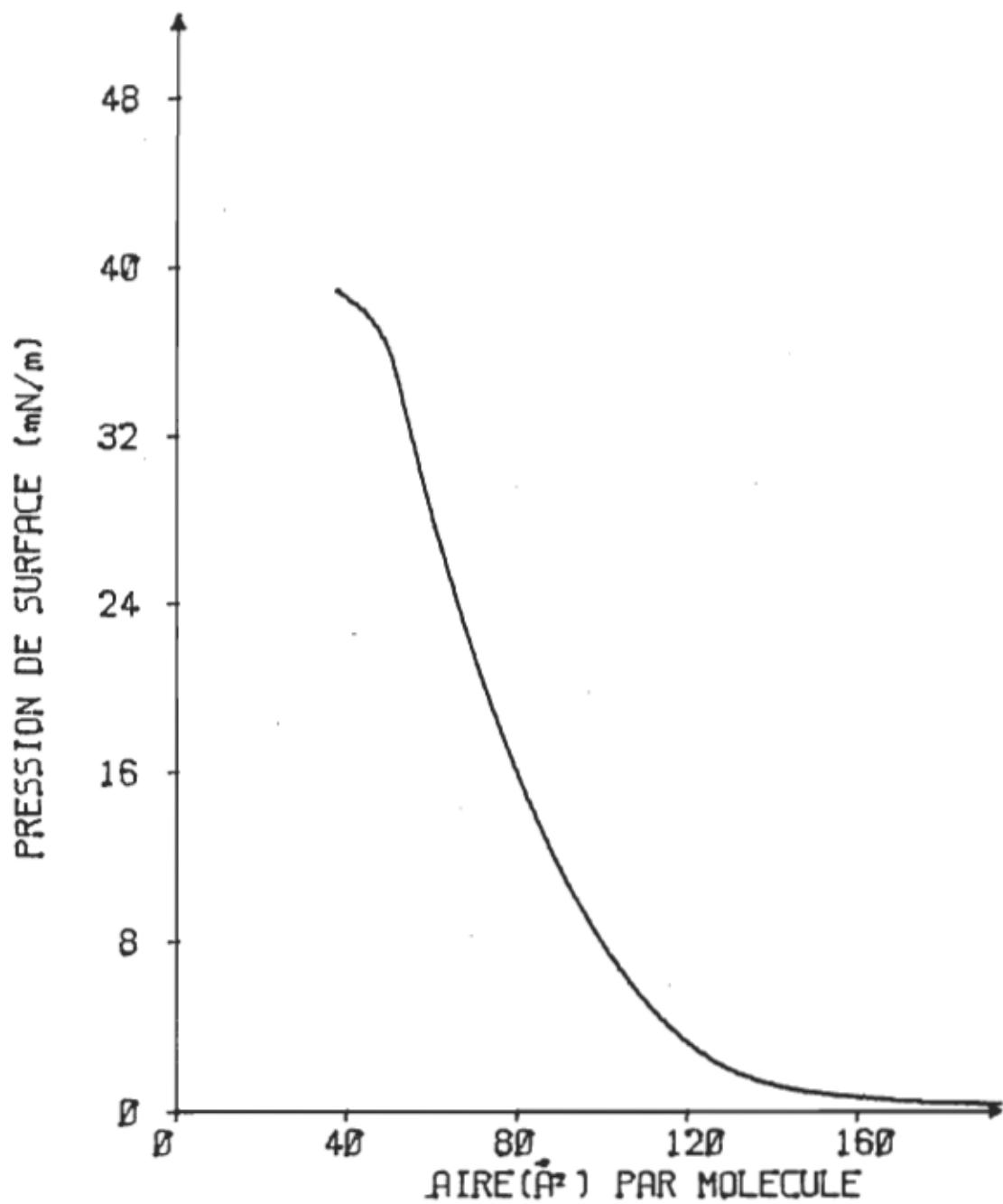


Figure 60. Isotherme de pression de surface du SQDG de Lipid Product, purifié par CLHP.

ayant un pH de 5,2. Ce milieu, qui est 630 fois plus acide que la sous-phase que nous avons employée, peut camoufler la charge du SQDG par un rapprochement entre les groupements sulfoniques (SO_3^-) du lipide et les protons provenant de la sous-phase. Ainsi, la densité de charge effective de la monocouche étant diminuée par une nuage aqueux acide qui entoure les têtes polaires des lipides, la répulsion entre les molécules lipidiques étalées à l'interface décroît. Les lipides peuvent alors s'approcher les uns des autres, ce qui a pour effet de diminuer l'aire moléculaire occupée par le SQDG lorsque celui-ci est déposé sur une sous-phase plus acide.

Barber et Gounaris (1986) ont obtenu une isotherme dont les caractéristiques sont les suivantes. La courbe s'élève au-dessus de l'abscisse à environ $115 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$, et les aires moléculaires correspondantes aux pressions de surface de 10, 20 et 30 mN/m sont respectivement 80, 66 et $58 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Ces auteurs ne spécifient pas l'origine de leur lipide, mais en comparant cette courbe à celles publiées par Bishop et coll. (1980), on observe qu'elle est similaire à l'isotherme d'un SQDG extrait de la betterave dont l'indice d'insaturation est de 1,5. Barber et Gounaris (1986) n'indiquent pas le pH de leur sous-phase mais signalent qu'il s'agit d'eau distillée. Les propositions que nous avons émises précédemment afin

d'expliquer les différences entre notre isotherme et celle publiée par Bishop et coll. (1980), sont également applicables dans le cas de la comparaison entre notre courbe et celle de Barber et Gounaris (1986), mais sous toute réserve, à cause de l'absence d'indication concernant l'origine ou la composition en acides gras du SQDG de ces auteurs.

Enfin, un troisième groupe de chercheurs, Trosper et Sauer (1968) ont également publié une isotherme de pression de surface du SQDG. Leur lipide est extrait de l'épinard et la sous-phase utilisée est un tampon phosphate (10^{-3} M) dont le pH est fixé à 7,6. Leurs conditions expérimentales sont donc semblables à celles que nous avons employées. Pourtant, les résultats obtenus sont passablement différents des nôtres. À ce chapitre, aucune autre isotherme publiée n'est comparable à celle de ces auteurs. Leur courbe quitte l'abscisse à environ $70 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ et le collapse se situe à 42 mN/m. Les pressions de surface à 10, 20 et 30 mN/m sont respectivement 43, 34 et $27 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Or, lorsqu'on dépose en monocouche des molécules d'acide gras, elles occupent en moyenne $20 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ d'aire moléculaire lorsqu'elles sont compressées. Il est donc difficile d'admettre qu'un lipide tel que le SQDG, possédant deux acides gras et une tête polaire chargée (d'où répulsions électriques) puisse se comprimer

de façon à n'occuper qu'une vingtaine d'Å²/molécule avant d'atteindre le collapse de la monocouche. Nous croyons donc que l'isotherme illustrée par ces auteurs est erronée, et la comparaison de ces résultats à notre isotherme est impossible.

CHAPITRE 7

CONCLUSION

L'un des buts de ce projet de recherche était la purification des trois principaux lipides du thylacoïde par CLHP. Ceci a été fait dans les conditions suivantes. Une colonne de gel de silice permet l'isolation du MGDG, en mode d'élution isocratique, lorsque la phase mobile est un mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau dans des proportions de 85/15/0,4. Quant à la purification du DGDG, ce ne sont que les proportions des solvants qui changent à 70/30/2. Pour ces deux lipides, la détection se fait par absorption à 205 nm. La séparation du SQDG utilise la même colonne, mais l'éluant est alors constitué de chloroforme, de méthanol et d'eau dans des proportions de 70/30/2,5. La détection a lieu par indice de réfraction. Tous les échantillons à purifier que nous avons extraits de l'orge (riches en acide linolénique) sont préalablement séparés par CL sur un gel de Sepharose CL-6B. Les isolations des lipides pour l'emploi de ceux-ci en monocouche nécessitent une double purification du matériel lipidique.

Parallèlement à la méthode de purification par CLHP, les CCM et les analyses des acides gras par CG permettent de mieux caractériser les lipides. Plusieurs échantillons commerciaux ont été utilisés et, règle générale, ces lipides sont moins purs que nos échantillons extraits et séparés par CL. De plus, l'identité de ces lipides commerciaux n'est pas assurée (origine et acides gras différents de la spécification du fabricant).

Les isothermes de nos MGDG et DGDG extraits de l'orge et purifiés par CLHP sont comparables à celles publiées dans la littérature scientifique. Notre méthode de purification est donc utilisable lorsque les lipides sont utilisés à cette fin. Contrairement à plusieurs méthodes de CLHP proposées dans la littérature, notre méthode a l'avantage de n'utiliser aucun acide qui pourrait détruire le matériel purifié ou tout autre produit ajouté aux lipides dans les études subséquentes à la purification.

Les études de durée de vie de fluorescence de la chlorophylle *a* diluée (1/100) dans le MGDG, extrait et purifié ou non par CLHP, en monocouche à l'interface azote-eau nous indique que la décroissance de l'état excité du pigment est monoexponentielle. La durée de vie moyenne du pigment est de $5,5 \pm 0,3$ ns. Le MGDG, et ceci est suggéré par le cas de l'échantillon brut, semble interagir avec la chlorophylle de façon à la protéger des impuretés

qui pourraient la dégrader. Nos résultats à l'interface sont comparables avec les systèmes où le lipide est le DOPC. Notre lipide polaire semble donc se comporter auprès de la chlorophylle de façon similaire à ce lipide zwitterionique. Par contre, notre valeur obtenue est différente des résultats en films LB publiés par Picard (1988 et 1990), qui sont biexponentiels. Cette divergence est probablement due au substrat sur lequel est déposé la monocouche. Lorsqu'il s'agit d'une interface azote-eau, l'homogénéisation de la monocouche est idéale, alors que lorsque la monocouche est déposée sur une lamelle de quartz (LB), elle subit les imperfections de cette surface qui induit des microdomaines où les molécules de chlorophylles et de lipides sont orientées différemment.

Les études en monocouche des systèmes similaires où les lipides seront le DGDG et le SQDG permettront de mieux caractériser le type d'interaction qui existe entre l'anneau porphyrique de la chlorophylle α et les têtes polaires des lipides. Nous suspectons que la charge négative portée par le SQDG phéophytinisera la chlorophylle, car ce lipide peut se comporter comme un acide et soustraire l'atome de magnésium central du pigment.

BIBLIOGRAPHIE

Agrawal, M. L., Chauvet, J.-P. et Patterson, L. K. Effects of molecular organization on photophysical behavior: lifetime and steady-state fluorescence of chlorophyll α singlets in monolayers of dioleoylphosphatidylcholine at the nitrogen-water interface. J. Phys. Chem., 1985, 89, 2979-2982.

Allinger, N. L., Cava, M. P., De Jongh, D. C., Johnson, C. R., Lebel, N. A. et Stevens, C. L. Chimie organique. Paris: McGraw-Hill, 1975.

Anderson, J. M. The molecular organization of chloroplast thylakoids. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 416, 191-235.

Barber, J. et Gounaris, K. What role does sulpholipid play within the thylakoid membrane? Photosynthesis Research, 1986, 9, 239-249.

Bishop, D. G. Analysis of molecular species of chloroplast lipids by HPLC. J. Liq. Chromatogr., 1987, 10, 1497-1505.

Bishop, D. G. et Kenrick, J. R. A monolayer study of lipid: protein interactions in the chloroplast membrane. Dans P. Mazliak, P. Benveniste, C.

Costes et R. Douce (Éds.), Biogenesis and fonction of plant lipids. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1980, 415-420.

Bishop, D. G., Kenrick, J. R., Bayston, J. H., MacPherson, A. S. et Johns, S. R. Monolayer properties of chloroplast lipids. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 602, 248-259.

Bishop, D. G., Nolan, W. G., Johns, S. R. et Willing, R. I. Evolution of the lipid components of chloroplast membranes: the role of lipid fluidity in membrane-associated reactions. Dans D. W. Deamer (Éd.), Light transducing membranes: structure, function, evolution. New York: Academic Press, 1978, 269-288.

Brown, J. S. Spectroscopy of chlorophyll in biological and synthetic systems. Photochem. Photobiol., 1977, 26, 319-326.

Chapman, D. J., Millner, P. A., Ford, R. C. et Barber, J. Lipid content of chloroplast thylakoids and regulation of photosynthetic electron transport. Dans J. F. G. M. Wintermans et P. J. C. Kuiper (Éds.), Biochemistry and metabolism of plant lipids. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982, 363-368.

Chauvet, J.-P., Agrawal, M. et Patterson, L. K. Effects of molecular organization on photophysical behavior: steady-state and real-time behavior of

- chlorophyll α fluorescence in spread monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine. J. Phys. Chem., 1988, 92, 4218-4222.
- Christian, G. D. Analytical chemistry (3^{ème} éd.). New York: John Wiley & Sons, 1980.
- Clayton, R. K. Photosynthesis: physical mechanisms and chemical patterns. Londres: Cambridge University Press, 1980.
- Cotton, F. A. et Wilkinson, G. Advanced inorganic chemistry (5^{ème} Ed.). New York: John Wiley & Sons, 1988.
- Cotton, F. A., Wilkinson, G. et Gaus, P. L. Basic inorganic chemistry (2^{ème} Ed.). New York: John Wiley & Sons, 1987.
- Demandre, C., Trémolières, A., Justin, A.-M. et Mazliak, P. Analysis of molecular species of plant lipids by high-performance and gas liquid chromatography. Phytochemistry, 1985, 24, 481-485.
- Demas, J. N. Excited state lifetime measurements. New York: Academic Press, 1983.
- Douce, R. et Joyard, J. Chloroplast envelope lipids: detection and biosynthesis. Method. Enzymol., 1980, 69, 290-301.

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

Guay, D. Étude thermodynamique des systèmes monomoléculaires mixtes Chl a/α-TQ, Chl a/PQ2, Chl a/PQ3 et Chl a/PQ9 à l'interface air-eau. Mémoire, UQTR, 1986.

Heemskerk, J. W. M., Bögemann, G., Helsper, J. P. F. G. et Wintermans, J. F. G. M. Synthesis of mono- and digalactosyldiacylglycerol in isolated spinach chloroplasts. Plant Physiol., 1988, 86, 971-977.

Heemskerk, J. W. M., Bögemann, G., Scheijen, M. A. M. et Wintermans, J. F. G. M. Separation of chloroplast polar lipids and measurement of galactolipid metabolism by high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem., 1986, 154, 85-91.

Hoober, J. K. Chloroplasts. New York: Plenum Press, 1984.

Iriyama, K., Ogura, N. et Takamiya, A. A simple method for extraction and partial purification of chlorophyll from plant material, using dioxane. J. Biochem., 1974, 76, 901-904.

Kates, M. Plant phospholipids and glycolipids. Dans R. Pauletti, D. Kritchevsky (Éds), Adv. Lipid Res.. New York: Academic Press, 1970, 8, 225-

265.

Kenrick, J. R. et Bishop, D. G. The fatty acid composition of phosphatidyl-glycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol of higher plants in relation to chilling sensitivity. Plant Physiol., 1986, 81, 946-949.

Kesselmeier, J. et Heinz, E. Separation and quantitation of molecular species from plant lipids by high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem., 1985, 144, 319-328.

Kesselmeier, J. et Heinz, E. Separation of molecular species of plant glycolipids and phospholipids by high-performance liquid chromatography. Method Enzymol., 1987, 148, 650-661.

Kremmer, T. et Boros, L. Gel chromatography: theory, methodology, applications. New York: John Wiley & Sons, 1979.

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

Lamarche, F., Picard, G., Leblanc, R. M. et Aghion, J. Monolayer studies of binary systems made of biomembrane lipid-analogues, of cytochrome *c* and of chlorophyll *a*. Dans S. Hayano (Ed.), Proceedings of session lectures and scientific presentation on ISF-JOCS world congress 1988.

Tokyo: The Japan Oil Chemists' Society, 1989, 2, 755-760.

Lamarche, F., Téchy, F., Aghion, J. et Leblanc, R. M. Surface pressure, surface potential and ellipsometric study of cytochrome *c* binding to dioleylphosphatidylcholine monolayer at the air-water interface. Colloids Surfaces, 1988, 30, 209-222.

Lehninger, A. L. Principles of biochemistry. New York: Worth Publishers Inc., 1982.

Lindsay, S. High performance liquid chromatography. New York: John Wiley & Sons, 1987.

Lynch, D. V., Gundersen, R. E. et Thompson Jr., G. A. Separation of galactolipid molecular species by high-performance liquid chromatography. Plant Physiol., 1983, 72, 903-905.

Marion, D., Douillard, R. et Gandemer, G. Rapid and isocratic separation of plant phospho- and glyco- glycerolipids by high performance liquid chromatography. Rev. Fr. Corps Gras, 1988, 35, 229-234.

McMurry, J. Organic chemistry. Monterey: Brooks, 1984.

McNair, H. M. et Bonelli, E. J. Basic gas chromatography. Walnut Creek: Varian Aerograph, 1968.

Meyer, V. R. Practical high-performance liquid chromatography. New York: John Wiley & Sons, 1988.

Miller, J. M. Chromatography: concepts and contrasts. New York: John Wiley & Sons, 1988.

Munger, G. Détermination du poids moléculaire de protéine à l'interface air/eau par un nouveau système à faible pression de surface. Mémoire, UQTR, 1979.

Munger, G., Lorrain, L., Gagné, G. et Leblanc, R. M. Adjustable speed and vibration-free hydrolic system for Langmuir-Blodgett films deposition. Rev. Sci. Instrum., 1987, 58, 285-288.

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

Omata, T. et Murata, N. Preparation of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and bacteriochlorophyll *a* by column chromatography with DEAE-Sepharose CL-6B and Sepharose CL-6B. Plant Cell Physiol., 1983, 24, 1093-1100.

Pataki, G. et Keller, M. Einfluss der schichtdicke auf die R_f -werte in der dünnenschichtchromatographie. Helv. Chim. Acta, 1963, 46, 1054-1056.

Pavia, D. L., Lampman, G. M. et Kriz, G. S. Jr. Introduction to organic labora-

tory techniques, a contemporary approach (2^{ème} éd.). Philadelphie: Saunders College Publishing, 1982.

Pharmacia Fine Chemicals AB. DEAE-Sepharose CL-6B CM-Sepharose CL-6B for ion exchange chromatography. Uppsala, 1976.

Pharmacia Fine Chemicals AB. Sepharose CL for gel filtration and affinity chromatography. Uppsala, 1979.

Picard, G. L'effet de l'environnement lipidique et protéique sur la durée de vie de fluorescence de la chlorophylle a en film monomoléculaire et Langmuir-Blodgett. Thèse non publiée, UQTR, 1990.

Picard, S. Purification des sels et tampons utilisés en monocouche. Rapport de recherche non publié, UQTR, 1988.

Pohl, P., Glasl, H. et Wagner, H. Zur analytik pflanzlicher glyco- und phospholipoide und ihrer fettsäuren 1. Eine neue dünnenschichtchromatographische methode zur trennung pflanzlicher lipoide und quantitativen bestimmung ihrer fettsäure-zusammensetzung. J. Chromatogr., 1970, 49, 488-492.

Rawyler, A., Henry, L. E. A. et Siegenthaler, P.-A. Acyl and pigment lipid composition of two chlorophyll-proteins. Calsberg Res. Commun., 1980,

45, 433-451.

Rawyler, A., Unitt, M. D., Giroud, C., Davies, H., Mayor, J.-P., Harwood, J. L. et Siegenthaler, P.-A. The transmembrane distribution of galactolipids in chloroplast thylakoids is universal in a wide variety of temperate climate plants. Photosynthesis Research, 1987, 11, 3-13.

Rheodyne Inc. Operating instructions for model 7126 automatic sample injector. Cotati: Rheodyne Inc., 1984.

Seibertz, H. P., Heinz, E., Linscheid, M., Joyard, J. et Douce, R. Characterization of lipids from chloroplast envelopes. Eur. J. Biochem., 1979, 101, 429-438.

Siegenthaler, P.-A., Rawyler, A. et Giroud, C. Spacial organization and functional roles of acyl lipids in thylakoid membranes. Dans P. K. Stumpf, J. B. Mudd et W. D. Nes (Eds), The metabolism, structure and function of plant lipids. New York: Plenum Publishing Corporation, 1987, 161-168.

Singer, S. J. et Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 1972, 175, 720-731.

Skoog, D. A. Principles of instrumental analysis (3^{ème} éd.). Philadelphie:

Saunders College Publishing, 1985.

Sprague, S. G. Structural and functional consequences of galactolipids on thylakoid membrane organization. J. Bioenerg. and Biomembr., 1987, 19, 691-703.

Stahl, E. (Ed.). Thin-layer chromatography, a laboratory handbook (2^{ème} éd.). Berlin: Springer-Verlag, 1969.

Svec, W. A. The isolation, preparation, characterization, and estimation of the chlorophylls and the bacteriochlorophylls. Dans D. Dolphin (Ed.), Porphyrins, (Vol. 5). New York: Academic Press, 1978, 341-399.

Tancrede, P., Chauvette, G. et Leblanc, R. M. General method for the purification of lipids for surface pressure studies, application to monogalactosyldiglyceride. J. Chromatogr., 1981, 207, 387-393.

Tancrede, P., Munger, G. et Leblanc, R. M. Excess free energies of interaction of chlorophyll α with monogalactosyldiacylglycerol and phytol, a mixed monolayer study. Biochim. Biophys. Acta, 1982, 689, 45-54.

Thornber, J. P. Biochemical characterization and structure of pigment-proteins of photosynthetic organism. Dans L. A. Staehelin et C. J. Arntzen (Éds), Encyclopedia of Plant Physiology, Photosynthesis III

(Vol. 19). Berlin: Springer-Verlag, 1986, 98-142.

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

ANNEXE 1

Indice de polarité des solvants organiques les plus souvent utilisés en

CLHP

Solvant	Indice	Solvant	Indice
Iso-octane	- 0,4	Butanone	4,5
Décane	- 0,3	Cyclohexanone	4,5
Hexane	0,0	Nitrobenzène	4,5
Cyclohexane	0,0	Benzonitrile	4,6
Éther dibutylque	1,7	Dioxane	4,8
Triéthylamine	1,8	Éthanol	5,2
Éther diisopropylque	2,2	Pyridine	5,3
Toluène	2,3	Nitroéthane	5,3
p-Xylène	2,4	Acétone	5,4
Benzène	3,0	Alcool benzylque	5,5
Éther dibenzylque	3,3	Méthoxyéthanol	5,7
Dichlorométhane	3,4	Acétonitrile	6,2
Dichloroéthane	3,7	Acide acétique	6,2
Butanol	3,9	Diméthylformamide	6,4
Acétate d'éthyle	4,3	Diméthylsulfoxyde	6,5
Propanol	4,3	Méthanol	6,6
Isopropanol	4,33	Formamide	7,3
Acétate de méthyle	4,4	Eau	9,0