

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

MEMOIRE PRESENTE A

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

LOUIS MARCOTTE

INVESTIGATION A 85 K ET A 300 K DES PROPRIETES

OPTIQUES DE LA CHLOROPHYLLE a EN

FILMS LANGMUIR-BLODGETT

DECEMBRE 1989

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.

RESUME

L'étude des mécanismes de la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique au niveau de la membrane photosynthétique a montré que la chlorophylle α servait à une double fonction: soit comme molécule antenne de l'énergie électromagnétique et comme molécule intimement liée au(x) mécanisme(s) d'oxidation de l'eau. Considérant l'importance de la chlorophylle α lors des étapes primaires de la photosynthèse, nous avons examiné l'état d'agrégation de ce pigment par utilisation des films Langmuir-Blodgett afin d'apporter une plus grande compréhension des propriétés optiques de cette molécule dans un état condensé. Analysés entre 300 et 85 K, les films monomoléculaires de chlorophylle α pure en milieu sec ou humide révèlent la présence importante de l'eau dans la formation de ces films solides. Comparativement aux multicouches de chlorophylle α , les propriétés d'absorption des monocouches ne montrent qu'une composante principale unique dans le Rouge, située à 678 nm dans tout le domaine de température. Au niveau de l'émission de fluorescence, l'évolution significative du maximum de 700 nm à 720-760 nm, lors du refroidissement à basse température, indique la présence de plus d'une espèce agrégée dans les systèmes humides ou secs. A 300 K, l'application de la relation de Kennard-Stepanov aux spectres d'absorption et de fluorescence de la monocouche révèle un équilibre thermique presque complet de l'énergie d'excitation électronique. Cependant, à basse température la relation n'est que très faiblement satisfaite.

REMERCIEMENTS

La concrétisation d'un projet de recherche, lors d'étude graduée, requiert toute la confiance, l'encouragement et la collaboration d'une équipe de travail. Je voudrais donc remercier mon directeur de mémoire, le Dr. Roger M. Leblanc qui, par sa patience et son appui, a su me diriger dans ma première expérience en tant que chercheur.

Je remercie également messieurs Gaétan Munger, Alain Tessier, Paul Boivin pour leur soutien technique et le Dr. Pierre Nadeau pour son aide précieuse lors de la rédaction de ce mémoire.

Enfin, je suis reconnaissant aux personnes qui ont participé, de près ou de loin, à mon projet de maîtrise.

TABLE DES MATIERES

	Page
RESUME	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIERES	iii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS	xi
CHAPITRES	
1_ INTRODUCTION	1
1.1 Le soleil, cette réalité	2
1.2 But du travail	5
1.3 Notions générales sur la photosynthèse	6
1.4 Evolution de l'évènement primaire au niveau de la membrane du thylacoïde	12
1.5 La chlorophylle <i>a</i> : son rôle et son importance	17
1.6 Système modèle	22
1.6.A_ Modèle <i>in vivo</i>	22
1.6.B_ Modèle <i>in vitro</i>	24
1.6.B.1_ En solution	24
1.6.B.2_ Membranaire	26
1.6.B.3_ Film Langmuir-Blodgett	30

1.7 Propriétés spectroscopiques de la Chla	33
1.7.A_ Structure moléculaire de la Chla	33
1.7.B_ Interaction de la lumière avec la matière	35
1.7.C_ Etats énergétiques de la Chla	38
1.7.D_ Evolution des états excités singulets	41
1.8 Propriétés optiques <i>in vivo</i>	49
1.8.A_ Absorption <i>in vivo</i>	50
1.8.B_ Emission de fluorescence <i>in vivo</i>	50
1.9 Propriétés optiques en solution, <i>in vitro</i>	55
1.9.A_ Absorption de solutions de Chla	55
1.9.B_ Emission de fluorescence de solutions de Chla	55
1.9.B.1_ "Quenching" de concentration	56
1.9.B.2_ Agrégats dans les solutions diluées ou concentrées de Chla	58
1.10 Propriétés optiques dans les films Langmuir-Blodgett	60
1.10.A_ Absorption des monocouches de Chla	60
1.10.B_ Emission de fluorescence des monocouches de Chla ..	60
2_ MANIPULATIONS EXPERIMENTALES	63
2.1_ Préparation d'une solution de Chla	63
2.2_ Monocouche de Chla	63

3_ DESCRIPTION DES APPAREILLAGES	69
3.1_ Bain de Langmuir	69
3.1.A_ Bain	69
3.1.B_ Barrière mobile	71
3.1.C_ Règle graduée	71
3.1.D_ Flotteur de mica	72
3.1.E_ Balancier	72
3.1.F_ Note sur la pression de surface	73
3.2_ Système de refroidissement	74
3.3_ Spectrophotomètre d'absorption	78
3.4_ Spectrofluorimètre	78
4_ RESULTATS	82
4.1_ Interprétation des spectres d'absorption	82
4.2_ Interprétation des spectres d'émission de fluorescence	96
4.3_ Evaluation de l'équilibre thermique de l'énergie d'excitation	126
5_ DISCUSSION	133
6_ CONCLUSION	145
REFERENCES	146
ANNEXE	157

LISTE DES FIGURES

Figures	Page
1. Schéma d'une cellule végétale.	7
2. Les différentes régions du chloroplaste.	8
3. Surface de la membrane plasmique.	10
4. Vue idéalisée du schéma en Z dans le cas des algues.	14
5. Nature chimique de la Chla ⁺ .	15
6. Coupe transversale d'une micelle, d'un feuillet en double couche (BLM) et d'un liposome.	28
7. Structure moléculaire de la Chla.	34
8. Onde électromagnétique.	36
9. Bandes électroniques de la Chla .	39
10. Diagramme des transitions énergétiques.	42
11. Propriétés d'absorption de la Chla <u>in vivo</u> .	51
12. Propriétés d'émission de fluorescence <u>in vivo</u> à diverses températures.	53
13. Fabrication de film Langmuir-Blodgett.	66
14. Bain de Langmuir.	70
15. Schéma du cryostat.	75
16. Système de refroidissement.	76
17. Montage du système optique du spectrofluorimètre "Spex fluorolog II".	80
18. Spectres d'absorption d'une monocouche de Chla sous atmosphère d'azote sec représentés aux différentes températures expérimentales.	88
19. Spectres d'absorption d'une monocouche de Chla sous atmosphère d'azote humide représentés aux différentes températures expérimentales.	89

20.	Spectres d'absorption d'une monocouche de Chla sous atmosphère d'hélium sec représentés aux différentes températures expérimentales.	90
21.	Spectres d'absorption d'une monocouche de Chla sous atmosphère d'hélium humide représentés aux différentes températures expérimentales.	91
22.	Comparaison des spectres d'absorption pour une monocouche de Chla obtenus à la température initiale de départ (300 K) et à basse température (85 K) (atmosphère : azote sec).	93
23.	Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'azote sec lors du refroidissement de 300 à 85 K.	105
24.	Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'azote sec lors du retour de 85 à 300 K.	106
25.	Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'azote humide lors du refroidissement de 300 à 85 K.	107
26.	Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'azote humide lors du retour de 85 à 300 K.	108
27.	Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'hélium sec lors du refroidissement de 300 à 85 K.	109
28.	Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'hélium sec lors du retour de 85 à 300 K.	110
29.	Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'hélium humide lors du refroidissement de 300 à 85 K.	111
30.	Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'hélium humide lors du retour de 85 à 300 K.	112
31.	Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'argon sec lors du refroidissement de 300 à 85 K.	113

32.	Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'argon sec lors du retour de 85 à 300 K.	114
33.	Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'argon humide lors du refroidissement de 300 à 85 K.	115
34.	Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'argon humide lors du retour de 85 à 300 K.	116
35.	Comparaison des spectres de fluorescence pour des monocouches de Chla (2xMnc) en milieu sec ou humide aux températures de 300 et 85 K (atmosphère : argon).	118
36.	Comparaison des spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) obtenus à la température initiale de départ (300 K) et à basse température (85 K) (atmosphère : azote humide).	123
37.	Comparaison des spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) obtenus à la température initiale de départ (300 K) et au retour de température (300 K*) (atmosphère : hélium sec).	125
38.	Relation de Kennard-Stepanov pour une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'hélium sec et à la température ambiante.	128
39.	Relation de Kennard-Stepanov pour une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'hélium sec et à basse température.	129

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Page
1. Spectres d'absorption d'une monocouche de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'azote sec.	84
2. Spectres d'absorption d'une monocouche de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'azote humide.	84
3. Spectres d'absorption d'une monocouche de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium sec.	85
4. Spectres d'absorption d'une monocouche de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium humide.	85
5. Valeurs moyennes des maximums d'absorption pour les monocouches de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'azote sec.	86
6. Valeurs moyennes des maximums d'absorption pour les monocouches de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'azote humide.	86
7. Valeurs moyennes des maximums d'absorption pour les monocouches de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium sec.	87
8. Valeurs moyennes des maximums d'absorption pour les monocouches de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium humide.	87
9. Valeurs moyennes des largeurs de bandes à la demi-hauteur pour la bande Rouge des monocouches de Chl _a (2x1Mnc) aux différents atmosphères.	94
10. Valeurs moyennes des rapports d'intensité des bandes Soret/Rouge pour les monocouches de Chl _a (2x1Mnc) aux différents atmosphères.	97
11. Spectres d'émission de fluorescence d'une monocouche de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'azote sec.	99
12. Spectres d'émission de fluorescence d'une monocouche de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'azote humide.	100
13. Spectres d'émission de fluorescence d'une monocouche de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium sec.	101
14. Spectres d'émission de fluorescence d'une monocouche de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium humide.	102
15. Spectres d'émission de fluorescence d'une monocouche de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'argon sec.	103

16.	Spectres d'émission de fluorescence d'une monocouche de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'argon humide.	104
17.	Valeurs moyennes des bandes de fluorescence pour les monocouches de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'azote sec.	119
18.	Valeurs moyennes des bandes de fluorescence pour les monocouches de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'azote humide.	119
19.	Valeurs moyennes des bandes de fluorescence pour les monocouches de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium sec.	120
20.	Valeurs moyennes des bandes de fluorescence pour les monocouches de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium humide.	120
21.	Valeurs moyennes des bandes de fluorescence pour les monocouches de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'argon sec.	121
22.	Valeurs moyennes des bandes de fluorescence pour les monocouches de Chl _a (2x1Mnc) sous atmosphère d'argon humide.	121
23.	Comparaison des valeurs moyennes des températures expérimentales et effectives (relation Kennard-Stepanov) pour les monocouches de Chl _a sous atmosphère d'azote sec.	130
24.	Comparaison des valeurs moyennes des températures expérimentales et effectives (relation Kennard-Stepanov) pour les monocouches de Chl _a sous atmosphère d'azote humide.	130
25.	Comparaison des valeurs moyennes des températures expérimentales et effectives (relation Kennard-Stepanov) pour les monocouches de Chl _a sous atmosphère d'hélium sec.	131
26.	Comparaison des valeurs moyennes des températures expérimentales et effectives (relation Kennard-Stepanov) pour les monocouches de Chl _a sous atmosphère d'hélium humide.	131

LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

Les chiffres placés entre parenthèses et mis sous forme d'exposant identifient les références situées à la fin du travail.

Afin d'alléger le texte certains symboles et abréviations sont utilisés. Voici leurs significations :

ADP	: adénosine diphosphate
ATP	: adénosine triphosphate
CCl ₄	: tétrachlorure de carbone
CdCl ₂	: chlorure de cadmium
Chl	: chlorophylle
Chl _a	: chlorophylle <u>a</u>
Chl _b	: chlorophylle <u>b</u>
C ₆ H ₁₂ O ₆	: molécule de glucose
Cyt	: cytochrome
H ⁺	: ion hydrogène
L	: ligand
Mnc	: monocouche
N	: atome d'azote
NADP ⁺	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydée
NADPH	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
O	: atome d'oxygène
Pc	: phthalocyanine
Pi	: molécule de phosphore
Pq	: plastoquinone
PSI	: photosystème 1
PSII	: photosystème 2
PVA	: alcool polyvinyle
Q	: quinone
S	: atome de soufre

1- INTRODUCTION

L'énergie est sans doute un élément aussi essentiel à la vie que le sont l'air et l'eau. Les premiers humains utilisèrent le feu pour se protéger du froid, cuire leurs aliments et s'éclairer la nuit. De nos jours, le bois constitue toujours la principale source d'énergie pour la majorité des humains de la planète.

Malheureusement cette ressource s'épuise et deux milliards d'humains vivent actuellement dans des régions où le bois se fait rare. Pourtant, les exigences énergétiques des habitants du Tiers-Monde sont modestes comparativement à celle des sociétés occidentales. En fait, un Nord-Américain moderne consomme 80 fois plus d'énergie qu'un Africain moyen. Globalement, un quart de la population mondiale accapare les trois quarts de son énergie primaire⁽¹⁾.

La combustion des fossiles représente une autre forme d'énergie. Quand on parle d'hydrocarbure et de charbon sur le plan énergétique, on remarque que la civilisation humaine est encore essentiellement à l'âge du feu.

Jusqu'à présent, la sur-utilisation des combustibles fossiles, combiné à la diminution des surfaces boisées de la planète, provoque un déséquilibre inquiétant du cycle du carbone. En fait, le CO₂ libéré durant la combustion du bois et des fossiles modifie l'équilibre thermique de la terre en créant ce que l'on appelle l'effet de serre. De plus, l'utilisation des combustibles fossiles libère de grandes quantités d'oxydes de soufre et d'azote. Au cours de leur long voyage dans l'atmosphère, ces composés ainsi que des hydrocarbures légers se transforment en acides sulfurique et nitrique, en sels

d'ammoniacs et en ozone. Ce sont les précipitations acides que le Québec connaît bien maintenant.

Notons toutefois qu'en matière de production d'énergie sans danger pour l'environnement, on mentionne souvent que l'énergie nucléaire représente théoriquement l'option idéale. Cependant deux graves accidents sont venus miner sérieusement la crédibilité de l'industrie nucléaire. Ce sont ceux de Three Mile Island aux Etats-Unis (1979) et de Tchernobyl en U.R.S.S. (1986).

Il n'y a donc pas d'énergie propre. Même l'hydro-électricité existant au Québec crée des problèmes au niveau de l'écologie de la faune naturelle. L'alimentation énergétique de la planète est devenue un risque environnemental bien calculé où les choix prennent parfois l'allure de compromis.

1.1 Le soleil, cette réalité

L'histoire de la vie sur terre, comme l'histoire de la terre elle-même, commence avec le soleil. La terre est une planète baignée de lumière. A l'exception de l'exploitation par l'homme de la puissance générée par les interactions de noyaux atomiques, le soleil est la seule source d'énergie pour presque toute forme de vie. Il n'est donc pas étonnant que nombre d'organismes qui se sont développés sur terre aient acquis des mécanismes leurs permettant de capter l'énergie lumineuse. La photosynthèse, entre autre, est la transformation biologique de l'énergie lumineuse en

énergie chimique. Elle représente le phénomène principal par lequel la vie et la lumière interagissent. On la définit comme étant la base moléculaire de la vie⁽²⁾.

D'un point de vue énergétique, la photosynthèse est à l'origine de toutes les formes alimentaires (et même de l'oxygène atmosphérique) qui sont indispensables à l'ensemble des êtres vivants. La plupart des cellules vivantes, de l'algue primitive aux grandes plantes supérieures terrestres, se développent par photosynthèse. Puisque l'homme consomme autant les plantes vertes que les animaux mangeant ces plantes, il dépend indirectement de l'énergie solaire.

Il est intéressant de noter qu'en provenance des radiations solaires, la surface de la terre reçoit annuellement environ 5.5×10^{23} calories, ou près de 100,000 cal/cm²/an⁽³⁾. Près du tiers de ce total est employé dans l'évaporation de l'eau, laissant presque 67,000 cal/cm²/an pour la photosynthèse et autres usages. Chaque année, la photosynthèse par les plantes vertes convertit 200 billions de tonnes de carbone (provenant du dioxyde de carbone atmosphérique) en sucre. Cela correspond à environ cent fois la masse combinée de toute la marchandise que l'homme produit durant une année.

Par contre, bien que la photosynthèse est le plus répandu des processus chimiques sur terre, les plantes sont relativement inefficaces dans l'utilisation de l'énergie venant du soleil. La photosynthèse annuelle, pour la terre entière, est en moyenne de 33 cal/cm². Cela signifie donc que la photosynthèse convertit seulement

1/2000 de l'énergie disponible.

Au niveau pratique, lorsqu'on parle d'acquisition de nouvelles sources d'énergie afin de palier à un besoin de plus en plus considérable pour le futur, de récentes études indiquent que le seul potentiel disponible et réalisable réside au niveau de l'énergie venant du soleil⁽⁴⁾.

Depuis nombre d'années, plusieurs expériences ont été effectuées pour capter la puissance énergétique venant du soleil. Quelques méthodes directes de collection de l'énergie ont été mises au point. Elles consistent en appareils de chauffage solaire, cellules photovoltaïques ... biomasse solaire. Cependant, lorsqu'on parle d'entreposage de cette énergie les travaux sont encore loin du but.

Pourtant, c'est au niveau de la photosynthèse que se situe toute la base fondamentale de ces recherches. Non seulement nous devons comprendre l'ensemble des phénomènes photosynthétiques, mais l'enjeu comporte aussi des applications importantes telles que l'élaboration de piles photoélectrochimiques, interrupteurs optiques utiles en télécommunication, biosenseurs pouvant évaluer la concentration de polluants et diverses méthodes pouvant évaluer l'état physiologique des plantes soumises à des stress environnementaux.

Sachant que l'énergie solaire a un potentiel énorme, la collection, la conversion et l'emmagasinage de cette énergie seront les problèmes à résoudre dans les années à

venir. La compréhension du processus photosynthétique entier est un défi de taille et complexe qui requiert le recouvrement de sciences multi-disciplinaires⁽⁵⁾.

La photobiophysique réside parmi de telles disciplines. A partir de molécules d'intérêts biologiques, elle permet d'approfondir la connaissance sur la façon dont ces molécules absorbent et dissipent l'énergie fournie par un photon. Entre autre, l'étude d'un pigment tel que la chlorophylle *a* (Chla) est d'une importance capitale lors de l'investigation du processus primaire photosynthétique.

1.2 But du travail

Le présent travail est relié à l'étude de l'effet d'agrégation de la Chla dans un milieu humide ou sec par utilisation d'un système modèle simple, le film Langmuir-Blodgett. Certaines études infrarouge^(6,7), d'absorption dans le visible et de photoacoustique⁽⁸⁾ ont déjà été établies en ce qui concerne les monocouches et multicouches de Chla. En relation avec ces travaux, notre étude vise à évaluer l'importance et les formes ou diverses espèces agrégées existant à l'intérieur des films de Chla. Ce travail évalue les possibilités d'agrégation de la Chla à l'eau en utilisant les propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence de monocouches de Chla obtenues à différente température expérimentale.

Dans le but de bien saisir l'importance de la molécule de Chla au niveau de la photosynthèse, nous introduisons les sections suivantes au niveau de l'évènement photosynthétique ainsi qu'au rôle que joue la Chla durant le processus primaire. Les interrogations quant aux diverses formes de Chla, les systèmes modèles investigués et les caractéristiques de notre modèle seront abordées par la suite.

1.3 Notions générales sur la photosynthèse

La feuille possède une structure interne organisée qui contrôle sa fonction. Les cellules (figure 1) de ses tissus renferment des organites, les chloroplastes, qui sont le siège des mécanismes photochimiques et biochimiques des étapes primaires de la photosynthèse.

Ces chloroplastes (figure 2), organites volumineux, comportent des membranes internes et externes contenant des perméases qui assurent le contrôle des entrées et sorties des métabolites. La longueur d'un chloroplaste peut aller jusqu'à 10 μm et son épaisseur varier de 0.5 à 2 μm . Ses dimensions et sa forme varient selon les cellules, spécialement chez les algues. Les lipides représentent 35 % du poids sec du chloroplaste, les protéines 5 % et les pigments 7%. Le principal pigment est la Chla, substance qui capte la lumière et donne au chloroplaste sa couleur verte.

Les chloroplastes renferment aussi un système membranaire interne important composé de vésicules de thylacoïdes (figure 2). Ce sont des vésicules fermées et aplatis

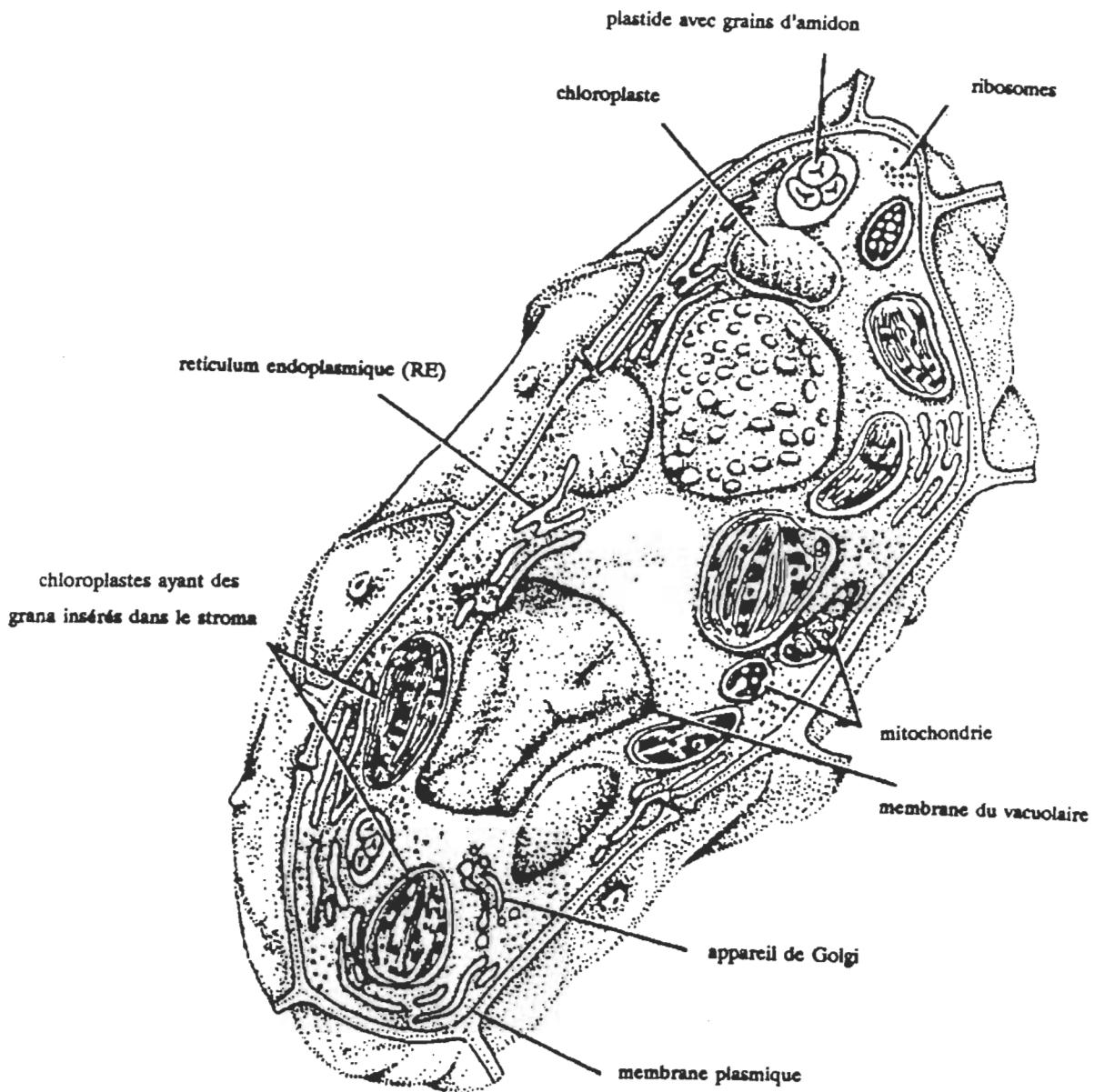


Figure 1. Schéma d'une cellule végétale⁽⁹⁾.

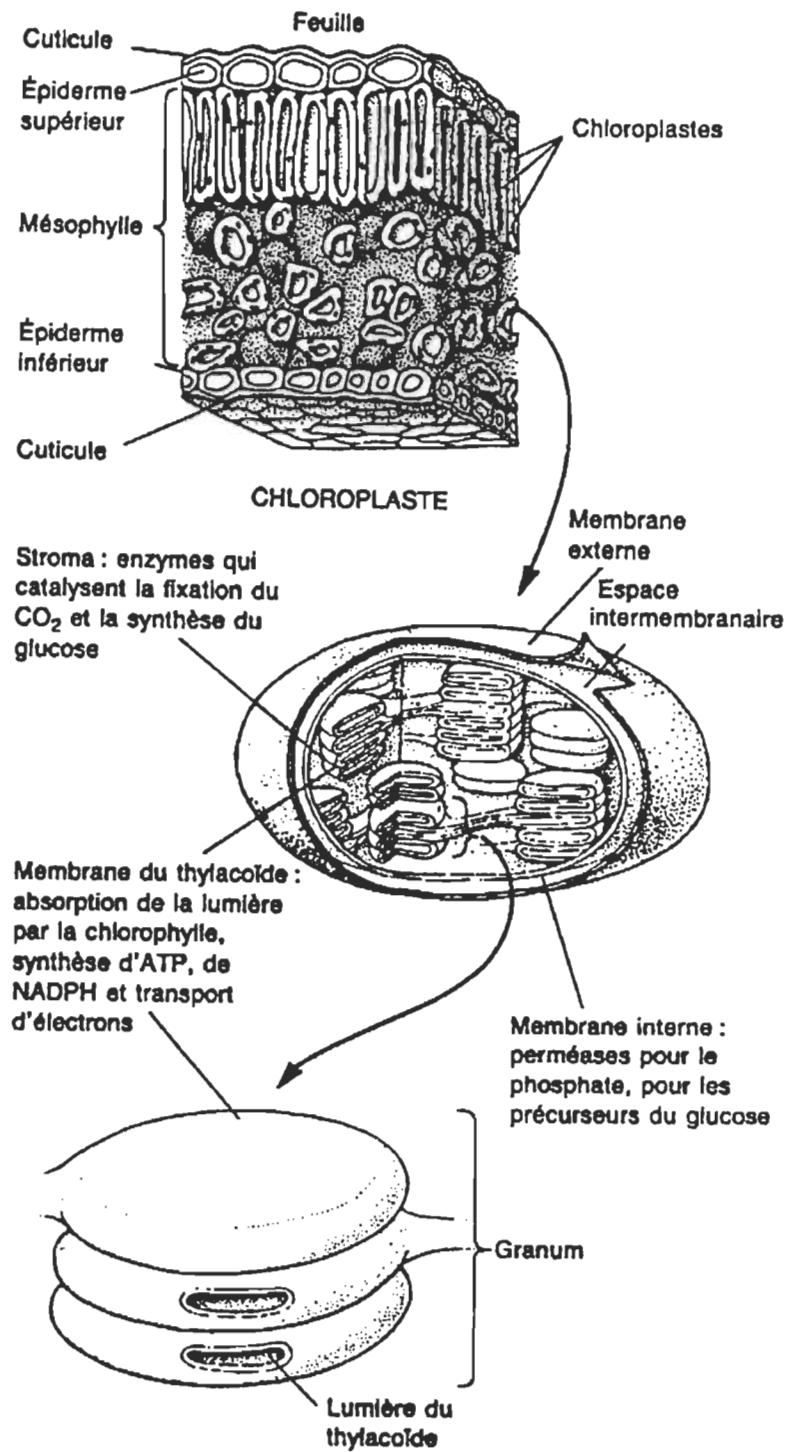


Figure 2. Les diverses réactions de la photosynthèse sont effectuées dans différentes régions du chloroplaste. Le processus photosynthétique se produit sur les membranes du thylacide qui sont une série de vésicules aplatis dont les lumières communiquent⁽¹⁰⁾.

de forme discoïdale. Les vésicules des thylacoïdes sont souvent empilées les unes sur les autres pour former des agrégats, les grana. Le stroma est, quant à lui, l'espace qui entoure les vésicules thylacoïdes et les grana.

C'est précisément au niveau de ces thylacoïdes, où prédominent l'organisation de complexes hydrophobes de molécules de Chla et de protéines, que le mécanisme photosynthétique se déroule. En fait la membrane du thylacoïde renferme plusieurs protéines intervenant dans la capture de la lumière, le transport des électrons, le pompage des protons et d'autres réactions enzymatiques. Chacune de ces protéines (et chacun de ces complexes protéiques) a une orientation spécifique dans la membrane du thylacoïde. Quelques unes ne sont situées que d'un côté ou de l'autre de la membrane ; d'autres traversent la membrane selon une orientation précise (figure 3). Cette asymétrie permet d'établir les gradients de protons nécessaires à la production d'ATP.

On subdivise la photosynthèse en trois étapes⁽¹⁰⁾, chacune d'elle se produisant dans une région définie du chloroplaste:

Etape 1

- capture de quanta de lumière par la chlorophylle. Utilisation de l'énergie lumineuse absorbée afin d'enlever des électrons et des protons à l'eau et former de l'oxygène. Transfert des électrons à travers la membrane du thylacoïde vers le dernier accepteur

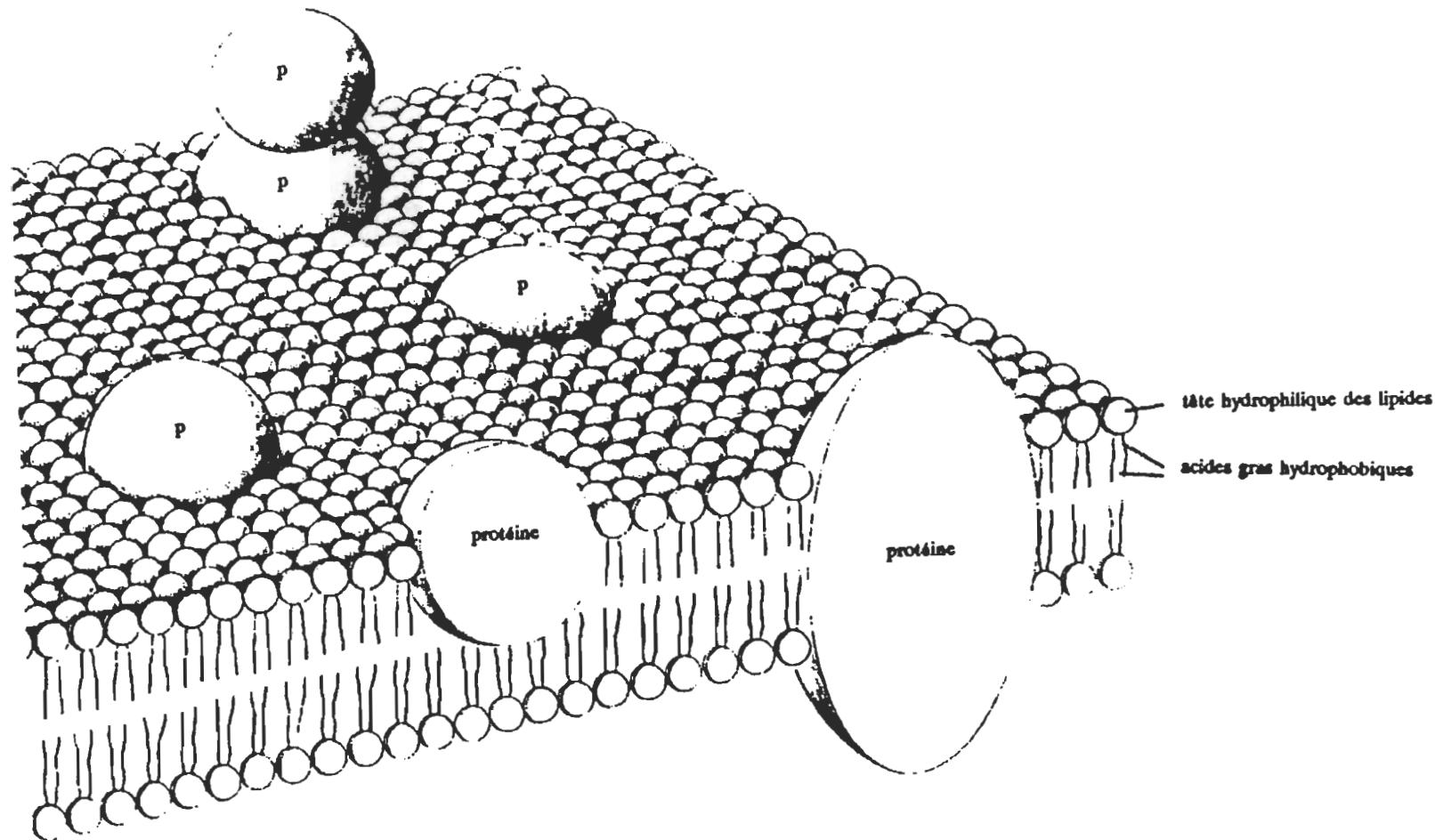


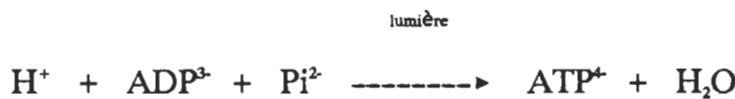
Figure 3. Protéines incrustées au travers ou attachées à la surface de la membrane plasmique⁽⁶⁾.

d'électrons, le NADP⁺, qui forme le NADPH réduit dans le stroma. Cette première étape est représentée par la réaction totale :



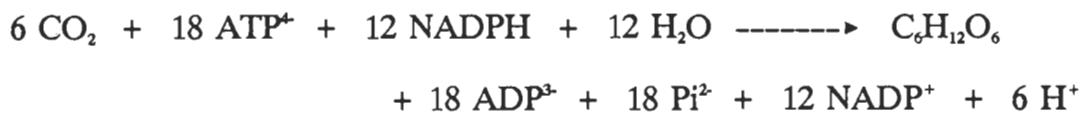
Etape 2

- mouvement des protons dans le sens de leur gradient de concentration, depuis la lumière du thylacoïde vers le stroma. Ceci se fait par l'intermédiaire d'une protéine spécialisée (logée dans la membrane du thylacoïde) qui couple ce mouvement à la synthèse de l'ATP à partir d'ADP et de Pi, selon la réaction suivante :



Etape 3

- l'ATP⁴⁺ et le NADPH ainsi produits servent à la synthèse du glucose à partir du CO₂ et de H₂O par la réaction générale :



Cette réaction est en fait une simplification de la chaîne de réactions appelée cycle de Calvin⁽¹¹⁾. Elle représente ce que l'on nomme "réaction de la phase obscure" car le glucose peut être formé à l'obscurité, utilisant les réserves d'ATP et de NADPH produites par l'énergie lumineuse. Les réactions des étapes 1 et 2 sont directement dépendantes de l'énergie lumineuse et pour cette raison, elles sont appelées "réactions de la phase lumineuse". C'est d'ailleurs au niveau de cette dernière phase que nous retenons votre attention.

1.4 Evolution de l'évènement primaire au niveau de la membrane du thylacoïde

Les réactions à la lumière pour les algues et les plantes vertes requièrent l'interaction de deux types de systèmes appelés photosystèmes I et II. L'utilisation de deux photosystèmes permet de surmonter un gradient électrochimique de 1.23 volt nécessaire à l'oxydation de l'eau⁽⁴⁾. Ces systèmes sont de structure différente dans le chloroplaste mais leur fonction est similaire : piégeage de l'énergie lumineuse et transfert d'électrons aux molécules accepteurs.

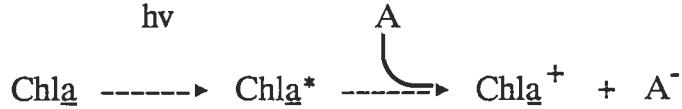
L'activité des deux photosystèmes est inter-reliée par un système de transport d'électrons. Parmi les composants de cette chaîne de transfert d'électrons nous retrouvons les plastoquinones (pQ), les cytochromes (cyt) f et b₅₆ ainsi que la protéine bleue-cuivrée, plastocyanine (pC) pour n'en nommer que quelques uns. C'est grâce à ces divers intermédiaires que la fonction totale du processus primaire, produisant le

NADPH et l'ATP, est efficacement coordonnée. Ce système est bien représenté par le schéma en Z (figure 4).

Lorsque la chlorophylle capte un photon de lumière, elle devient excitée, i.e., qu'un de ces électrons est élevé à un état supérieur. Cette excitation est rapidement transférée à d'autres molécules de chlorophylle voisines jusqu'à ce que, par hasard, elle atteigne le centre photochimique des photosystèmes I (P700) et/ou II (P680). Ce centre réactionnel est lui même composé de molécule(s) de chlorophylle, plus précisément de Chla.

Puisque P700 et P680 demandent peu d'énergie pour leur excitation, l'énergie transmise au centre de réaction est suffisante pour exciter l'une ou l'autre de ces molécules à un état dans lequel un électron peut interagir avec son environnement immédiat. La chlorophylle excitée (Chla^{*}) donne donc un électron à un accepteur formant un radical A⁻ et laissant la chlorophylle sous forme d'un radical oxydé (Chla⁺).

Selon la réaction :



La nature chimique de Chla⁺ est représentée à la figure 5.

Si on regarde attentivement le schéma en Z on remarque qu'au sein du

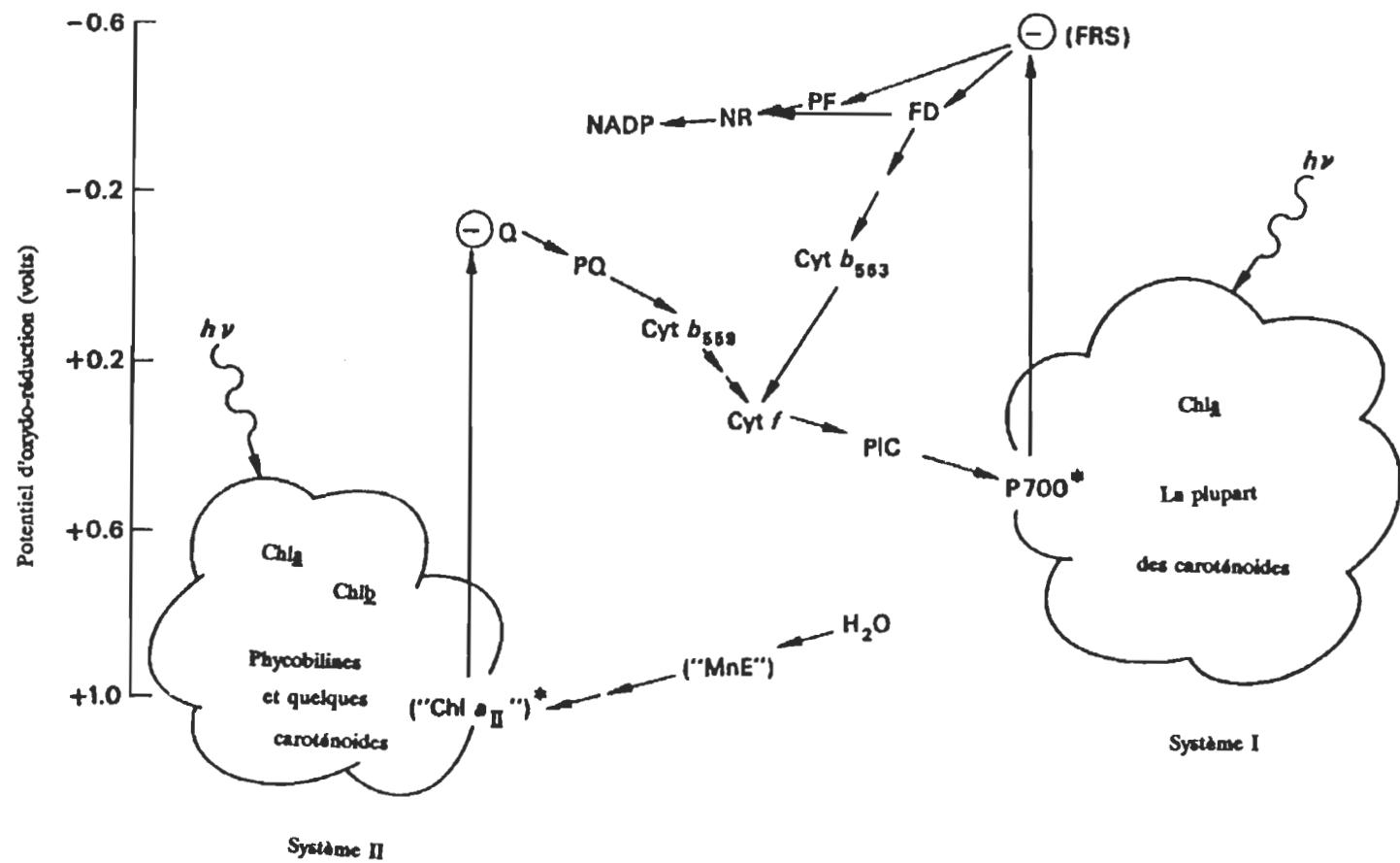
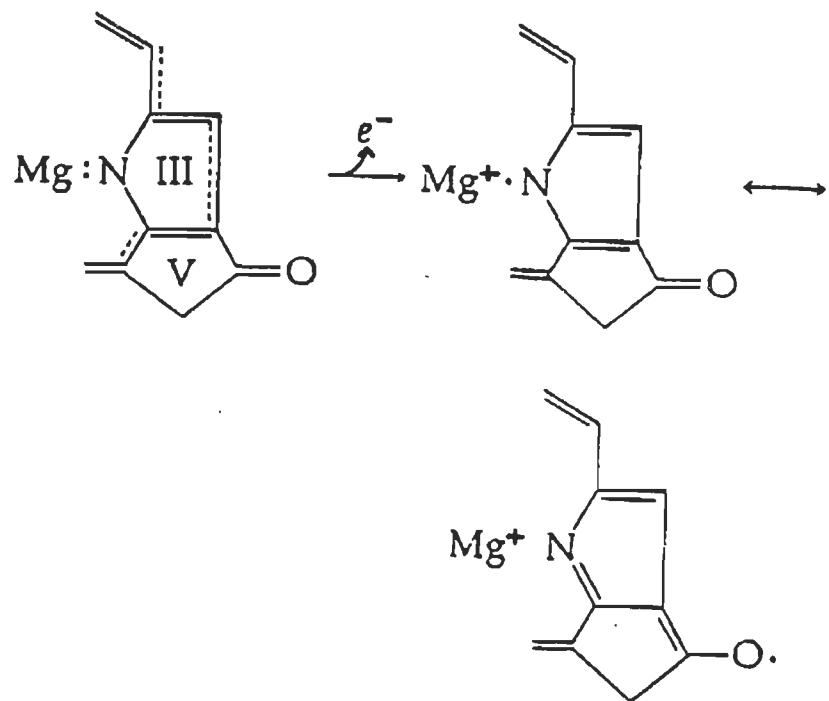


Figure 4. Vue idéalisée du schéma en $Z^{(12)}$ dans le cas des algues.



(Le carbonyle de l'anneau V semble être impliqué dans la stabilisation de l'ion radical formé par éjection d'un électron de l'anneau III adjacent).

Figure 5. Nature chimique de la Chla^{+} ⁽¹³⁾.

complexe appelé photosystème II (P680) un photon de lumière induit une séparation de charges.

L'électron expulsé du centre réactionnel (P680) traverse le complexe moléculaire pour atteindre un récepteur d'électrons (Q) composé de quinone (correspond à notre molécule A dans la réaction ci-haut). De là, il passe par une série complexe d'intermédiaires moléculaires qui forment la chaîne de transfert électronique de la membrane. Bien que le rôle de ces divers intermédiaires (pQ, cyt-b₅₆-f, pC ...) ne soit pas encore bien compris, leur ordre dans le système est connu.

Finalement, comme on l'a mentionné précédemment, l'électron vient réduire la molécule de NADP⁺ en NADPH (molécule de haute énergie utilisée par les cellules pour la synthèse du glucose). Notez qu'avant d'arriver à la molécule de NADP⁺, l'électron passe par un second photosystème (PSI) où il reçoit une seconde impulsion d'énergie sous la forme de photon.

Durant l'évènement primaire, quatre électrons sont extraits d'une molécule d'eau afin de réduire le P680 oxydé au niveau du PSII. Cette molécule d'eau est fermement liée à une protéine renfermant deux ions de manganèse (Mn²⁺) qui se trouve à la surface du complexe P680, du côté de la lumière du thylacoïde. Selon des études spectroscopiques, le photosystème II aurait un cycle à 5 états d'oxydation différents, de S₀ à S₄, permettant la réduction de P680^(10,14). La protéine renfermant le Mn²⁺ semble intervenir dans la réaction de clivage de l'eau où deux molécules d'eau sont

décomposées en quatre protons, quatre électrons et une molécule d'oxygène. Les protons produits sont pompés à travers la membrane du thylacoïde créant un gradient électrochimique et conduisant à la synthèse de l'ATP par le complexe "ATP synthétase". Les électrons provenant de l'eau sont transférés au centre réactionnel P680, où ils régénèrent la forme réduite de la chlorophylle.

Jusqu'à présent, nous n'avons que brièvement parlé de la Chla et de son rôle en photosynthèse. La prochaine section nous le feras découvrir.

1.5 La chlorophylle a : son rôle et son importance

Afin de bien réaliser la production d'oxygène et la formation de NADPH, il faut respecter trois organisations précises qui sont⁽¹⁵⁾ :

(a) géométrie de pigments contenus dans des complexes protéiques antennes organisés à l'intérieur de la bicoche très fluide de la membrane des thylacoïdes. De cette façon, ils permettent une capture rapide des photons incidents ainsi qu'une répartition optimale de cette énergie en direction des photosystèmes I et II et cela, avec une efficacité totale maximale. Ces divers pigments tels que les Chla et b, caroténoïdes, phycobilines ... ont donc un rôle d'antenne.

(b) une structure spécialisée, mais encore mal connue, de molécule(s) de Chla dans les complexes protéiques des photosystèmes I et II, jouant le rôle de centre de réaction. Ces

derniers réalisent une séparation de charges de part et d'autre de la membrane photosynthétique. Sous des conditions oxydo-réductrice adéquates, l'efficacité est étonnamment élevée (supérieure à 90 %).

(c) une structure membranaire contenant la chaîne de transporteurs successifs d'électrons minimisant les pertes d'énergie par réactions secondaires.

Par conséquent, la clé de la logique moléculaire du processus primaire photosynthétique (incluant la capture des photons, le transfert d'électrons et la translocation des protons) réside dans l'organisation des molécules de pigments, de protéines et de lipides dans les thylacoïdes.

Ayant un rôle bien établi en photosynthèse, il faut maintenant comprendre l'importance d'une molécule telle que la Chla. Afin d'y parvenir, il est nécessaire de connaître les exigences⁽¹⁶⁾ de la photosynthèse. Ce sont les suivantes :

1_ Ce premier besoin de l'appareil photosynthétique est déterminé par la physique des radiations solaires. Le soleil est essentiellement un corps noir d'une température d'environ 6000 Kelvin et son émission de photons représente une large bande située près de 600 nm (radiation de Planck).

L'absorption dans cette région visible requiert une assez large molécule, telle que l'anneau porphyrrique de la Chla. La complexité d'une telle molécule mène

habituellement à des bandes d'absorption multiples et larges, qui vont très bien avec le spectre solaire.

2 Le second besoin de la photosynthèse requiert un pigment photochimiquement actif. Par le passé, on a souvent associé photoactivité à fluorescence. Nous savons aujourd'hui que cette corrélation signifie que l'état excité singulet vit assez longtemps d'une radiation spontanée.

La structure de la porphyrine a les propriétés photochimiques requises. Ces propriétés doivent être reliées de très près à la bande d'énergie du "gap" entre le plus bas état excité singulet (S_1) et l'état fondamental(S_0). Ce "gap" ralenti la transition non-radiative à l'état fondamental, et alors, augmente le rendement de fluorescence et le croisement intersystème (transition interdite entre S_1 et l'état triplet, T_1).

3 La troisième exigence de la photosynthèse suit l'hypothèse, bien connue et vrai pour les photosynthèses bactériennes, que la photoréaction première est un transfert de charges. Les chlorophylles sont des molécules qui perdent ou gagnent rapidement un ou plusieurs électrons. Ceci survient aussi bien à l'état fondamental qu'à l'état excité.

4 Cette dernière exigence est reliée à la stabilité du pigment et de ses conjugués redox. La stabilité thermodynamique des porphyrines est assurée par leur stabilisation aromatique ou par énergie de résonance.

Dans le cas des photosystèmes, l'importance de stabilité chimique est aussi grande que la stabilité thermodynamique. Le seul inconvénient avec la chlorophylle est sa susceptibilité face aux réactions oxydatives. Dans les plantes, on suggère que la protection de la chlorophylle contre de telles réactions résulte d'une agrégation possible avec les caroténoïdes.

En résumé, la chlorophylle α remplit les exigences de la photosynthèse qui sont:

- absorption de la lumière visible
- aptitude photochimique
- bien fournie au niveau redox
- stabilité chimique élevée

Connaissant désormais l'importance du pigment Chla en photosynthèse, la compréhension du phénomène primaire photosynthétique nous amène à nous poser deux questions essentielles. Elles sont définies comme les suivantes :

A_ Quels sont les mécanismes de régulation des transports excitoniques de l'antenne vers les centres de réactions du PSI et du PSII ?

B_ Quel(s) type(s) de structure(s) géométrique(s) des complexes chla-protéines (en particulier les centres réactionnels des PSI et PSII) permettent l'efficacité mentionnée précédemment et, de plus, existe-t-il des relations entre ces structures et les fonctions des complexes ?

Pour entreprendre une telle étude structurale, nous faisons cependant face à quelques difficultés expérimentales exprimées comme suit :

1_ La membrane apparaît fortement complexe dans le sens qu'elle possède un grand nombre de pigments différents. Donc, toute étude détaillée ne pourra être entreprise qu'à partir de complexes isolés et purifiés biochimiquement. De cette façon, une telle approche exige la mise au point de méthodologies non-dénaturantes pour la préparation des complexes.

2_ L'analyse de ces complexes par des techniques classiques de cristallographie a été impossible jusqu'à très récemment en ce qui concerne les plantes vertes et supérieures. Cela est principalement due à la nature hydrophobe membranaire des complexes photosynthétiques.

Bien que la connaissance de l'ensemble des processus chimiques a mené au développement d'un grand nombre de systèmes photosynthétiques artificiels, afin de résoudre ces interrogations, l'arrangement et l'environnement des molécules de chlorophylle *in vivo* n'est pas encore compris. On ne pourra résoudre le phénomène de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique qu'au moment où l'architecture moléculaire, décrivant toute relation possible entre la chlorophylle, les caroténoïdes et les autres substances dans la membrane sera connue⁽¹⁷⁾.

L'utilisation de système modèle artificiel afin de contourner les difficultés in vivo est tout de même essentiel.

1.6 Système modèle

1.6.A Modèle in vivo

Pour avoir du succès dans l'élaboration d'un modèle in vivo, une compréhension des particularités de ce système est essentielle. Depuis longtemps, on mentionne que les propriétés d'absorption de la chlorophylle in vivo sont anormales⁽¹⁸⁾. L'anormalité vient du fait que dans la plante, la Chla absorbe la lumière entre 680 et 700 nm. Par contre, dans les solvants polaires (chlorophylle monomérique en solution, soit in vitro) le maximum d'absorption pour ces mêmes molécules est déplacé vers le bleu, soit de 662 à 665 nm. Il y a donc un déplacement significatif entre les spectres électroniques des molécules de chlorophylle in vivo et in vitro.

Une connaissance de l'organisation moléculaire de la Chla in vivo est par conséquent cruciale pour un discernement approfondi du phénomène dans lequel l'énergie lumineuse est transférée parmi les composants capteurs de lumière (pigments antenne) et photoinduit une séparation de charges au niveau du centre de réaction.

Diverses hypothèses ont été suggérées pour identifier la nature des molécules de chlorophylle in vivo afin d'expliquer les déplacements vers le rouge des maximums

d'absorption.

Selon certains chercheurs, le contexte biologique serait attribué à cette incompréhension. On fait même état qu'une interaction spécifique entre la Chla et une protéine serait la cause du déplacement de bande vers le rouge in vivo. Les protéines pourraient servir à maintenir une orientation optimale au transfert de l'énergie entre les molécules de Chla. Toutefois leur orientation à l'intérieur de la membrane n'a pas encore été précisée.

Par contre, d'autres laboratoires^(19,20) ont démontrés que les molécules de Chla, dans un arrangement géométrique approprié, pouvaient produire des interactions π - π de coordinations occasionnant des déplacements de bande vers le rouge. Mais encore de nos jours, suite à ces recherches, on se pose toujours la question à savoir quel type d'interaction est responsable des propriétés d'absorption in vivo.

Pour s'approcher de l'idéalité, un bon modèle in vivo doit inclure les pigments, les protéines et les lipides afin de bien reproduire ou simuler l'appareil photosynthétique. Les porphyrines⁽⁴⁾ ont été généralement utilisées comme composés modèles pour les molécules de chlorophylle in vivo. Les études de modèles utilisant des complexes Mg-porphyrine-protéine (sans incorporation de lipide) indiquent que les déplacements vers le rouge sont petits comparés à ceux des systèmes photosynthétiques. Il est possible que ces effets deviennent plus spécifiquement développés dans les systèmes photosynthétiques lors de l'évolution de la photosynthèse.

1.6.B_ Modèle in vitro

Puisqu'il est difficile d'isoler le centre réactionnel intact et que l'utilisation d'un modèle in vivo est trop complexe à produire, il faut s'orienter vers un modèle plus simple, in vitro, pouvant simuler quelques propriétés spectroscopiques telles que rencontrées dans la nature.

Un modèle proprement sélectionné peut grandement faciliter l'interprétation de résultats obtenus de systèmes biologiques complexes. En outre, il peut améliorer le choix d'expérimentations in vivo et donner de meilleures interprétations.

1.6.B.1_ En solution

L'atome central de magnésium (Mg) de la Chl_a possède un nombre de coordination de quatre. On dit qu'il est insaturé. Il est donc déficient en électron et il existe une importante force pour l'acquisition et l'insertion de donneur d'électron (nucléophile) à l'une et/ou l'autre des deux positions axiales de l'atome de magnésium. Les donneurs typiques sont des molécules contenant des atomes O, N ou S possédant des électrons non-pairés. Cette particularité de la Chl_a nous amène à introduire un nouveau modèle soit celui des solutions. Ce système fait appel au concept donneur-accepteur d'électron.

A partir de ce concept, l'utilisation d'une solution de Chl_a dans un solvant

polaire (ex: acétone, éther ...) démontre que ce dernier agit comme donneur d'électron. La Chla étant fortement solvatée demeure sous forme monomérique. Ces ligands polaires occupent les positions axiales de l'atome de magnésium pour former Chla:L₁ ou Chla:L₂.

Il est important de noter que très peu, sinon aucune, des chlorophylles de l'unité photosynthétique n'a les propriétés redox, optique et magnétique correspondant aux molécules de chlorophylles monomériques.

D'un autre côté, lorsqu'on parle de solvants non-polaires (ex: benzène, CCl₄, ...) on fait état d'absence de nucléophiles étranger (donneur d'électron). Seule une autre molécule de Chla agit comme donneur grâce à sa fonction C=O de l'anneau V. Il y a donc création de dimères ... d'oligomères (agrégats supérieurs), tout dépendant de la concentration de chlorophylle et de la nature du solvant non-polaire utilisé pour former la solution.

D'autres complexes peuvent être générés en utilisant des mélanges de solvants, tout particulièrement le nucléophile H₂O. Dans ce cas, on parle de systèmes auto-assemblés, résultant de coordinations et/ou d'interactions faisant intervenir des liens hydrogènes (pouvant juxtaposer les macrocycles de chlorophylles de façon à perturber leurs systèmes d'électrons π). Les travaux de Katz^(18,19) relatifs à la paire spéciale de Chla représentent un outil extrêmement important dans la compréhension du rôle de l'eau

au niveau des centres réactionnels photosynthétiques. Les agrégats Chla-eau sont cruciaux dans le développement de modèles du centre photoréactionnel in vivo.

Pourtant, afin de reproduire les phénomènes tels qu'ils se produisent en réalité dans l'appareil photosynthétique, il est primordial de simuler les conditions, les interactions rencontrées dans la nature et cela avec autant de précision possible. Ces interactions ne se réalisent pas en solution où l'on observe des molécules de chlorophylle agrégées, mais de façon plus ou moins orientées. C'est plutôt au niveau des systèmes partiellement orientés que l'on doit diriger notre recherche.

1.6.B.2 Membranaire

Le processus de transfert d'énergie entre les pigments de la membrane du thylacoïde joue un rôle important en photosynthèse. Il dépend de l'orientation des pigments dans la membrane⁽²¹⁾. Pour comprendre le transfert d'énergie et l'orientation des pigments dans la membrane biologique (structure encore sujette à controverse) l'étude d'un système modèle membranaire bien défini semble nécessaire.

En dépit de leur composition variable, toutes les membranes biologiques sont construites selon le même modèle⁽¹⁰⁾. Rappelons que les phospholipides sont des molécules amphiphiles possédant un pôle hydrophobe et un pôle hydrophile. Les interactions hydrophobes entre les chaînes d'acides gras des molécules lipidiques sont des forces physiques primaires permettant une organisation des membranes biologiques.

De ces interactions découlent l'organisation d'une double couche de phospholipides. Ces feuillets contiennent deux couches de molécules de phospholipides dont les groupes polaires font face au milieu aqueux environnant, tandis que les chaînes d'acides gras forment une couche interne hydrophobe continue.

Les vésicules, les liposomes et les bicouches lipidiques (BLM)^(10,22) représentent des modèles se rapprochant d'une certaine façon de la membrane du thylacoïde. En majorité, ce sont des systèmes dont les structures impliquent des lipides de provenance naturelle pouvant incorporer des pigments photosynthétiques.

Les bicouches (figure 6) sont communément réalisées en deux configurations : la forme "ouverte" dans laquelle une membrane lipidique (BLM) traverse une ouverture entre deux phases aqueuses et la forme "fermée" dans laquelle une bicouche non-symétrique renferme un petit volume aqueux (vésicule). Il est cependant difficile d'incorporer assez de Chla dans les BLM afin d'obtenir de bons spectres d'absorption ou de fluorescence. Il en est de même lorsqu'on veut étudier les effets d'agrégation, lesquels surviennent probablement à haute concentration in vivo.

Ces problèmes n'existent pas avec les vésicules lipidiques où il apparaît possible d'incorporer une plus grande concentration de Chla et où on peut dans bien des cas utiliser un échantillon plus épais. Le seul problème consiste en la reproduction de vésicules de même dimension, bien définies et entourées d'une bicouche simple.

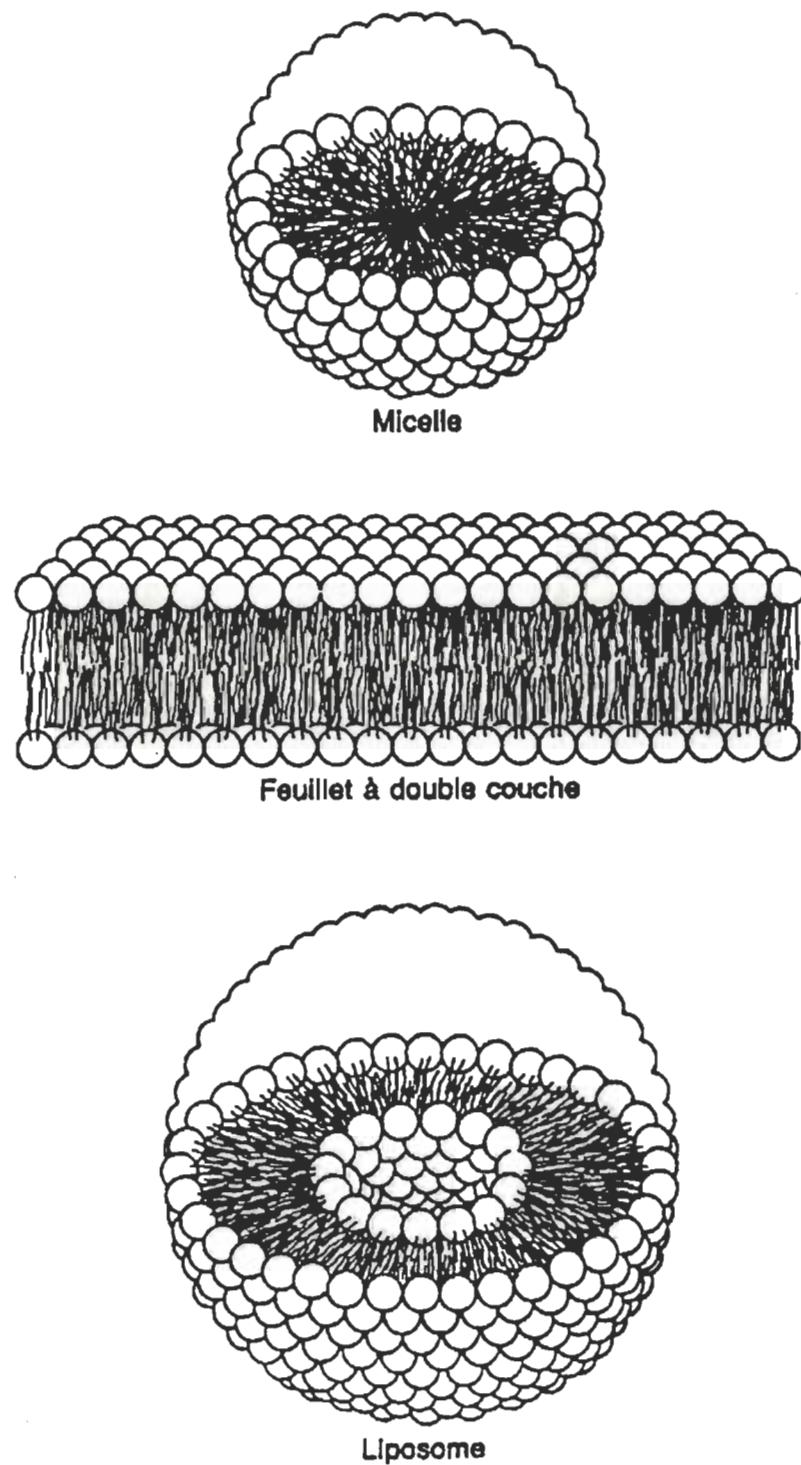


Figure 6. Coupe transversale d'une micelle, d'un feuillet en double couche (BLM) et d'un liposome. Chaque cercle représente la tête hydrophile et les lignes ondulées correspondent aux chaînes latérales d'acides gras⁽¹⁰⁾.

Les liposomes (figure 6), quant à eux, sont des structures sphériques en double couche à contenu aqueux. Le type de structure formée par un phospholipide pur ou un mélange de phospholipides dépend de la longueur et du degré de saturation des chaînes d'acides gras, de la température, de la composition ionique du milieu aqueux et du mode de dispersion des phospholipides en solution. Ils comportent le même problème que les BLM lorsque l'on veut insérer des molécules de Chla.

Lorsqu'une solution de phospholipides est dispersée avec force dans l'eau, les phospholipides se regroupent d'une façon typique et l'on obtient des micelles (figure 6). Ce modèle, peut-être plus réaliste que les précédents, permet d'observer les associations possibles entre les chlorophylles avec les lipides et les protéines in vivo.

Enfin, bien que n'ayant pas la vraisemblance physiologique des systèmes de protéines et de vésicules, d'autres modèles in vitro sont intéressants et originaux. Ceux-ci regroupent les complexes Chla-protéines non-photosynthétiques^(23,24,25), les systèmes ordonnés de Chla dans les cristaux liquides^(26,27,28) et l'adsorption de la Chla à des substrats solides tels que les particules minérales ou de plastiques (PVA)⁽²⁹⁾.

Cependant, parmi les membranes artificielles non mentionnées ci-haut, un modèle des plus prometteurs dans l'investigation du processus de transfert d'énergie non radiatif in vivo réside dans le film Langmuir-Blodgett. Ce modèle, qui est celui utilisé dans le présent travail, est détaillé dans la section suivante.

1.6.B.3_ Film Langmuir-Blodgett

Considérant la grandeur des granums des chloroplastes (0.1 μ de diamètre) dans lesquels la plupart des pigments sont actuellement concentrés, on estime à 0.1 M la concentration en chlorophylle⁽³⁰⁾. Une concentration aussi élevée en chlorophylle dans l'appareil photosynthétique nous amène à nous poser la question : de quelle manière est distribuée la chlorophylle et plus spécifiquement la Chl_a ?

Comme le transfert d'énergie à l'intérieur des photosystèmes survient avec une très haute efficacité, il est facile de convenir que les molécules de pigments sont proprement orientées et espacées d'une distance connue⁽¹⁷⁾.

Etant donné que la Chl_a est une molécule amphiphile, i.e. qu'elle possède une partie hydrophile et hydrophobe, elle est alors sujette à un effet d'organisation potentiel⁽³¹⁾. Plus précisément, chaque molécule doit s'orienter de façon à satisfaire du mieux possible les besoins thermodynamiques de ses deux parties. La structure chimique de la Chl_a suggère donc qu'une telle molécule peut être située à une interface formée entre les phases hydrophiliques et hydrophobiques de l'unité photosynthétique. L'existence d'une telle interface fut proposée par la présence de structures lamellaires situées dans les grana des chloroplastes et révélée par la microscopie électronique. On a même estimé que la surface totale lamellaire pouvait accommoder toutes les molécules de Chl dans une couche monomoléculaire très entassée.

Les concepts d'agrégation de la Chla in vivo ont conduit plusieurs chercheurs^(32,33,34) à simuler la structure fonctionnelle de l'appareil photosynthétique avec les couches monomoléculaires de Chla très orientées.

Certaines propriétés des chlorophylles in vivo peuvent être reproduites et élucidées en étudiant les agrégats de Chla in vitro lesquels incluent les dimères anhydres et hydratés, ainsi que les oligomères^(19,35,36). Quelques structures modèles consistant en molécules de Chla étroitement espacées furent principalement étudiées dans le but de reproduire les propriétés de la paire spéciale de Chla (P700)^(18,37,38).

Tout bon système modèle doit avoir la caractéristique suivante : mimer l'appareil photosynthétique. La technique de Langmuir-Blodgett représente une méthode simple et élégante permettant la fabrication d'assemblage moléculaire organisé⁽³⁹⁾. Cette méthode, ayant la possibilité de déposer des couches monomoléculaires sur des substrats solides, remonte à 1935⁽⁴⁰⁾. En réalité, la technique de film Langmuir-Blodgett nous permet de nous rapprocher du système idéal car elle fait appel à :

- l'introduction du pigment Chla
- l'utilisation de hautes concentrations en pigment
- la production d'arrangement moléculaire privilégié

Ces trois points sont retrouvés dans les systèmes naturels.

L'existence de forces ou interactions hydrophobes entre molécules de Chla permet de générer une organisation spatiale de molécules ayant toutes la même orientation. On parle d'organisation structurale, de propriétés moléculaires précises qui ne sont pas possibles avec des molécules non orientées (cas des molécules en solution ... trop fluide, trop de mouvements moléculaires aléatoires).

Au contact de l'eau, les substances hydrophobes adoptent un arrangement en couche qui rappelle la structure de la membrane vivante, ou tout au moins de sa moitié. Le bain de Langmuir permet de reconstituer une membrane double se rapprochant davantage de la réalité. Dépendant du besoin, la composition et la concentration des pigments peuvent être ajustées dans un large domaine. Les molécules constitutives sont aussi pré-orientées dans le processus de formation de la couche monomoléculaire sur la surface aqueuse.

Pour l'étude du processus de transfert d'énergie non radiatif dans les systèmes moléculaires larges (tel que l'antenne de l'appareil photosynthétique), ainsi que la caractérisation des phénomènes dépendant de l'agrégation (ex : "quenching" des états excités et changement dans les spectres d'absorption et de fluorescence), les films Langmuir-Blodgett semblent être utiles et d'avenir prometteur.

En braquant les instruments photométriques sur ces membranes artificielles, on peut déterminer le comportement à la lumière des divers pigments, ou observer l'influ-

ence d'une membrane particulière par interaction de la Chla avec la lumière. Par utilisation des films Langmuir-Blodgett, les interactions spécifiques intermoléculaires entre molécules de chlorophylles peuvent être étudiées dans plusieurs domaines d'analyse tels que l'IR, l'absorption dans le visible, la photoacoustique ...

1.7 Propriétés spectroscopiques de la chla

1.7.A Structure moléculaire de la Chla

Avant d'aborder les propriétés optiques de la Chla, il est important de connaître les caractéristiques structurales de cette molécule.

La molécule de Chla (figure 7) consiste en un noyau tétrapyrrolique présentant un système cyclique de 9 doubles liaisons conjuguées et dont les quatre atomes d'azote (N) coordonnent un métal, soit le magnésium (Mg). Cet ensemble tétrapyrrolique de la molécule est plan: il a environ 15 Å de côté et son épaisseur est un peu inférieure à 4 Å ⁽⁴²⁾. Il forme ce que l'on appelle parfois la "tête" de la molécule.

On remarque que sur l'un des substituants des noyaux pyrroliques, une chaîne propanoïque estérifie un alcool à 20 atomes de carbone. Cet alcool primaire mono-insaturé s'appelle le phytol, souvent appelé "queue" de la molécule. Il correspond à la deuxième partie de la molécule qui est très flexible et lipophile. Ce phytol, de longueur d'une quinzaine d'Angstrom, peut interagir avec des entités moléculaires qui lui ressem-

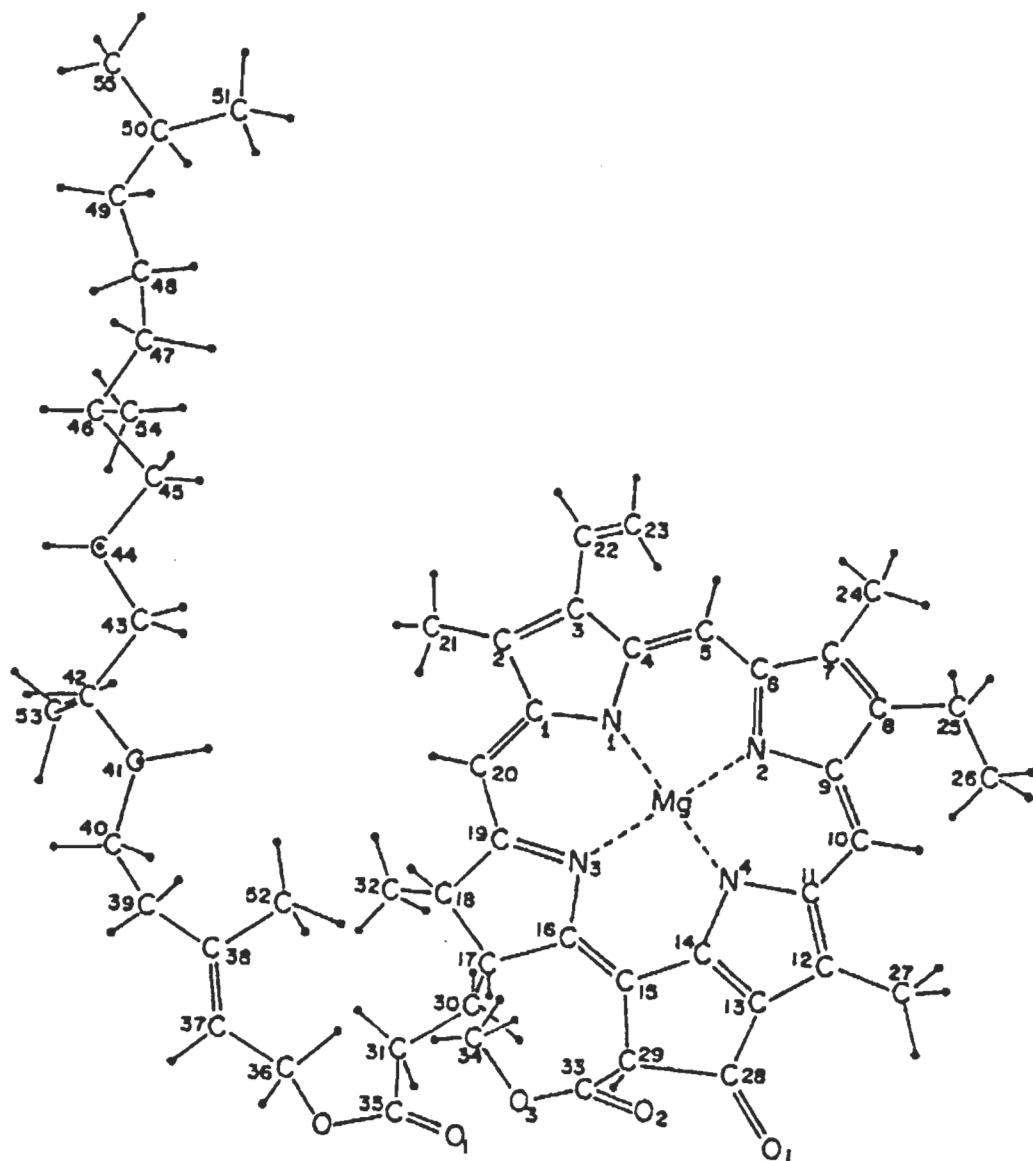


Figure 7. Structure moléculaire de la Chla⁽⁴¹⁾.

blent, par exemple les chaînes d'acide gras, d'autres pigments comme les caroténoïdes et les chaînes des quinones. Il a surtout comme fonction d'auto-associer le photorécepteur dans la membrane photosynthétique. Au contraire, la partie polyénique du cycle tétrapyrrolique est le siège des échanges d'énergie entre photons et molécules: l'absorption de photons se traduit par l'apparition de différents états excités de la chlorophylle. C'est ce que nous allons aborder dans les prochaines sous-sections.

1.7.B Interaction de la lumière avec la matière

Considérez une paire de particules portant d'égale charge mais étant opposée électriquement. Lorsque regardé d'une distance qui est grande comparée à leur séparation, la paire de charges est appelée dipôle électrique. Imaginons que ces charges oscillent dans le temps le long d'une ligne les reliant, telle une fonction sinus⁽⁴³⁾ :



Ce mouvement, génère autour des charges un patron différent des forces électriques et magnétiques appelé onde électromagnétique, laquelle est représentée dans la figure 8. A tout instant la force électrique, indiquée par le vecteur E , varie avec la distance à partir du dipôle à la manière d'une onde sinusoïdale. Le patron entier s'éloigne du dipôle à la vitesse v . La force magnétique non montrée, est quelque part perpendiculaire et proportionnelle à la force électrique, et toutes deux sont perpendicu-

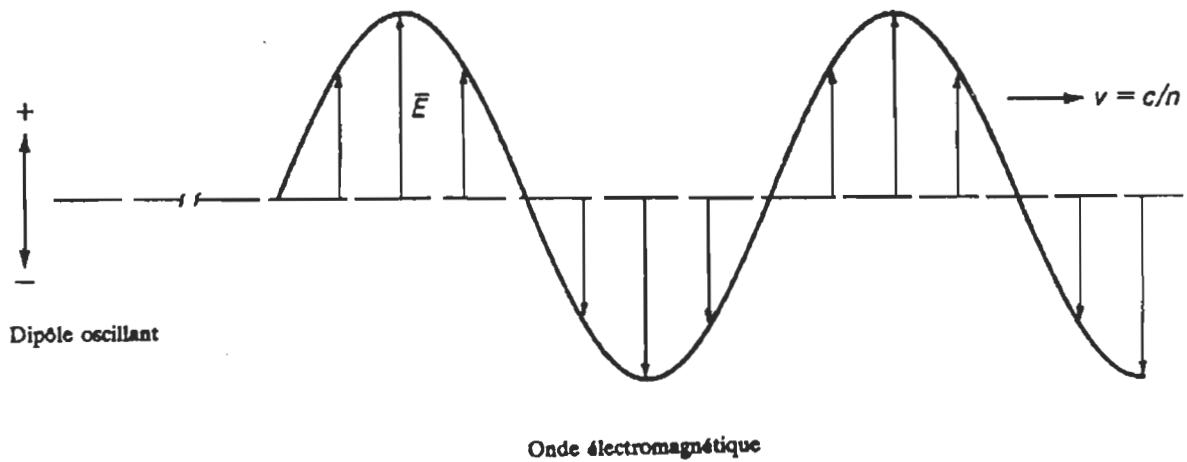


Figure 8. Un dipôle oscillant est une source d'onde électromagnétique. (\bar{E}) représente la force électrique, (v) la vitesse de l'onde, (c) la vitesse de la lumière dans le vide et (n) la densité du milieu⁽⁴³⁾.

laires à l'axe de propagation. La distance d'une crête à l'autre pour l'onde sinusoïdale est appelée longueur d'onde (λ), et ν est la fréquence à laquelle les crêtes successives passent à un point donné. Le produit de λ et ν donne la vitesse de l'onde (v). Soit précisément λ (cm) \times ν (sec⁻¹) = v (cm·sec⁻¹).

Tel qu'un dipôle oscillant pouvant générer une onde électromagnétique, les forces représentées par l'onde peuvent faire osciller un autre dipôle. L'onde transporte alors l'énergie d'un dipôle à l'autre. Le travail est fait en maintenant constante l'oscillation du premier dipôle, lequel émet l'énergie électromagnétique. Le second dipôle acquiert une partie de cette énergie lorsqu'il se met en branle ("set into motion"). La densité d'énergie dans l'onde est proportionnelle au carré du vecteur électrique, E^2 .

La mécanique quantique a établi que la lumière possède à la fois des propriétés propres aux ondes et aux particules. La lumière est donc une forme de radiation électromagnétique. Quand elle réagit avec la matière, la lumière peut être conçue en terme de quantité d'énergie ou quanta, également connus sous le nom de photons. L'énergie ϵ d'un photon est proportionnelle à la fréquence du champ électromagnétique:

$$\epsilon = h\nu \quad (1)$$

où h est la constante de Planck (6.63×10^{-34} J·sec⁻¹) et ν est la fréquence de la lumière. En biologie, il arrive souvent de faire allusion à la longueur d'onde de la lumière, plutôt

qu'à la fréquence ν de sorte que l'équation devient:

$$\epsilon = hc / \lambda \quad \text{sachant que } \nu = c / \lambda \quad (2)$$

où c est la vitesse de la lumière ($3 \times 10^{10} \text{ cm sec}^{-1}$) dans le vide.

A l'échelle atomique ou moléculaire, les électrons et noyaux positifs peuvent se déplacer relativement à chacun à la manière d'un dipôle oscillant. Ainsi lorsqu'une molécule contenant un système de double liaisons conjuguées, ayant une répartition régulière de charges électriques le long du système, se trouve dans une région de l'espace où se déplacent des photons, certains de ces photons, en fonction de leurs fréquences, entrent en interaction avec le système conjugué. L'un des électrons de ce système change d'état énergétique par rapport au reste du squelette de la molécule : on dit que la molécule subit une transition entre deux états électroniques. Le nouvel état de la molécule est connu comme un état électronique excité et son énergie est supérieure à l'état dit initial ou fondamental.

1.7.C Etats énergétiques de la Chla

Le diagramme de la figure 9 donne une représentation schématique des différents états électroniques d'excitation pour la Chla. Par rapport à un axe d'ordonnées, différents niveaux symbolisent les états énergétiques possibles que peut prendre la molécule ou

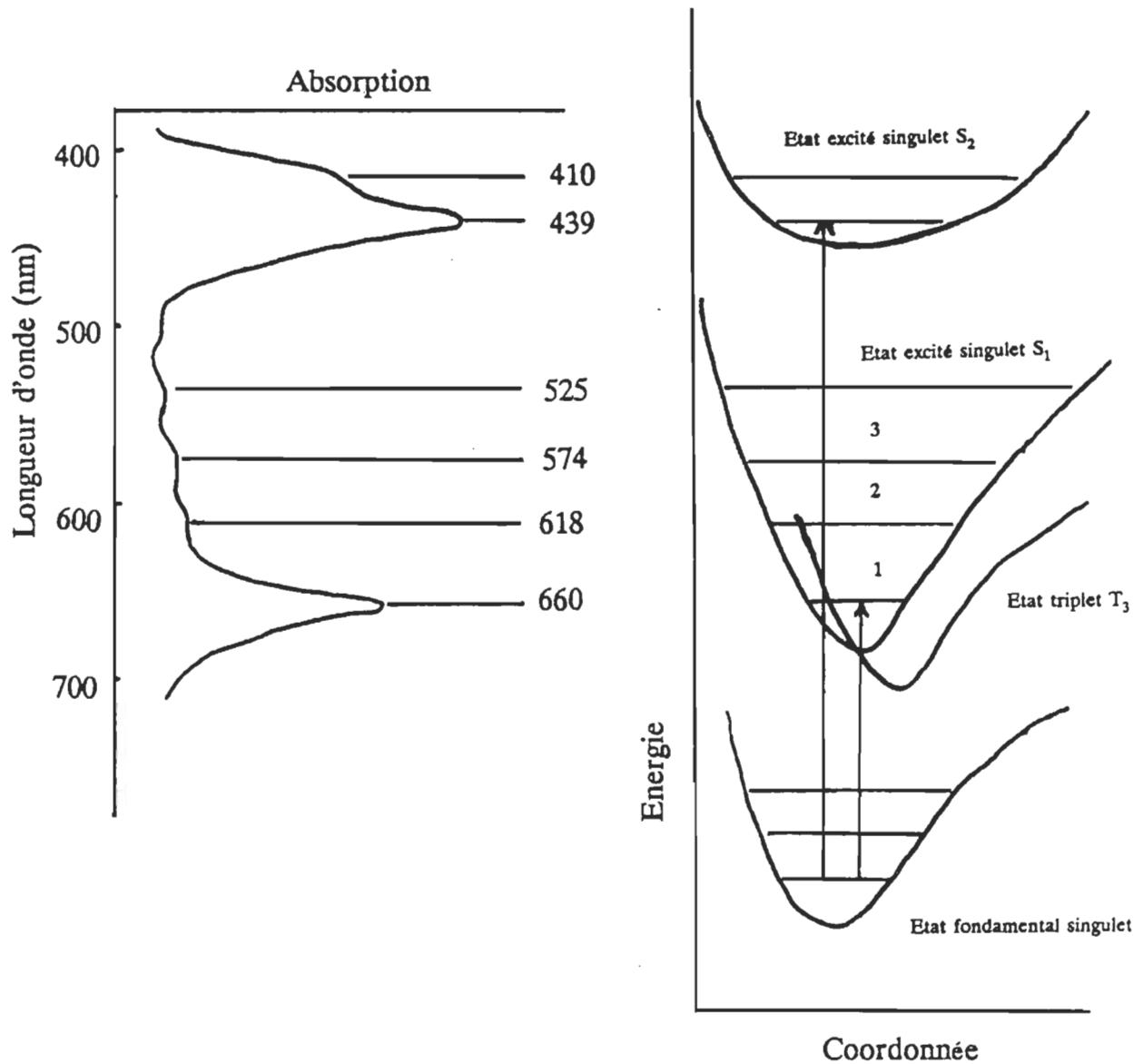


Figure 9. Représentation des bandes électroniques de la Chla (Soret et Rouge) et de son spectre d'absorption correspondant⁽⁴⁴⁾.

l'un de ses électrons suite à l'absorption d'un photon. On reconnaît deux états singulets: S_1 et S_2 (transitions électroniques permises) ainsi qu'un état triplet T_1 (transition électronique non permise).

Chaque transition électronique est caractérisée par:

- son énergie ϵ ou $\epsilon = h\nu$ ou $\nu = c / \lambda$
- son intensité, mesurée par l'intégration de la force oscillatoire F de l'oscillateur, sur la totalité de la transition (surface du pic d'absorption)
- sa polarisation dans la molécule
- sa structure vibrationnelle.

Un spectre d'absorption, lequel peut être déterminé expérimentalement est un graphique de la probabilité ou intensité de la radiation d'absorption versus l'énergie (habituellement tracé en fonction de la longueur d'onde de la radiation). Pour les molécules telles que la Chla, les niveaux d'énergies sont plutôt larges due à la possibilité de vibrations moléculaires lors de transitions électroniques.

Le spectre électronique de la Chla consiste donc en un groupe de bandes raisonnablement bien définies s'étendant de l'ultraviolet et du visible jusqu'au proche infrarouge. Le processus d'excitation résulte en un changement dans la distribution électronique à l'intérieur de la structure nucléaire de la molécule. Typiquement, la redistribution de la densité électronique est confinée largement à un ou à très peu de la majorité des électrons π conjugués de l'anneau porphyrine. Les bandes d'absorption

de la Chla sont intenses. Elles sont l'indication de transition fortement permise entre l'état fondamental et excité et sont d'une grande valeur dans la capture efficace des photons en photosynthèse.

Suite à l'absorption de l'énergie lumineuse par les pigments photosynthétiques, il existe une certaine probabilité que la migration de l'exciton (énergie d'excitation électronique) puisse être dissipée en fluorescence ou en processus non-radiatif tel que la chaleur, plutôt que d'atteindre son objectif, le centre de réaction⁽²⁴⁵⁾.

1.7.D_ Evolution des états excités singulets

Les phénomènes d'absorption (bien illustrée à la figure 9) et d'émission de lumière sont représentés par le diagramme de niveau d'énergie de la figure 10. Les états électroniques fondamental, premier et second sont dénotés E_0 , E_1 , et E_2 respectivement. Les fluorophores peuvent exister dans plusieurs niveaux d'énergie vibrationnels, dénotés 0, 1, 2 ... etc, à chacun des niveaux d'énergies électroniques.

A la température de la pièce, la plupart des molécules de Chla sont présentes dans le plus bas état vibrationnel et l'absorption de la lumière provient principalement des molécules de ce niveau d'énergie. Due à la grande différence d'énergie entre E_0 et E_1 , essentiellement aucun fluorophore (molécule de Chla) ne peut peupler l'état E_1 ,

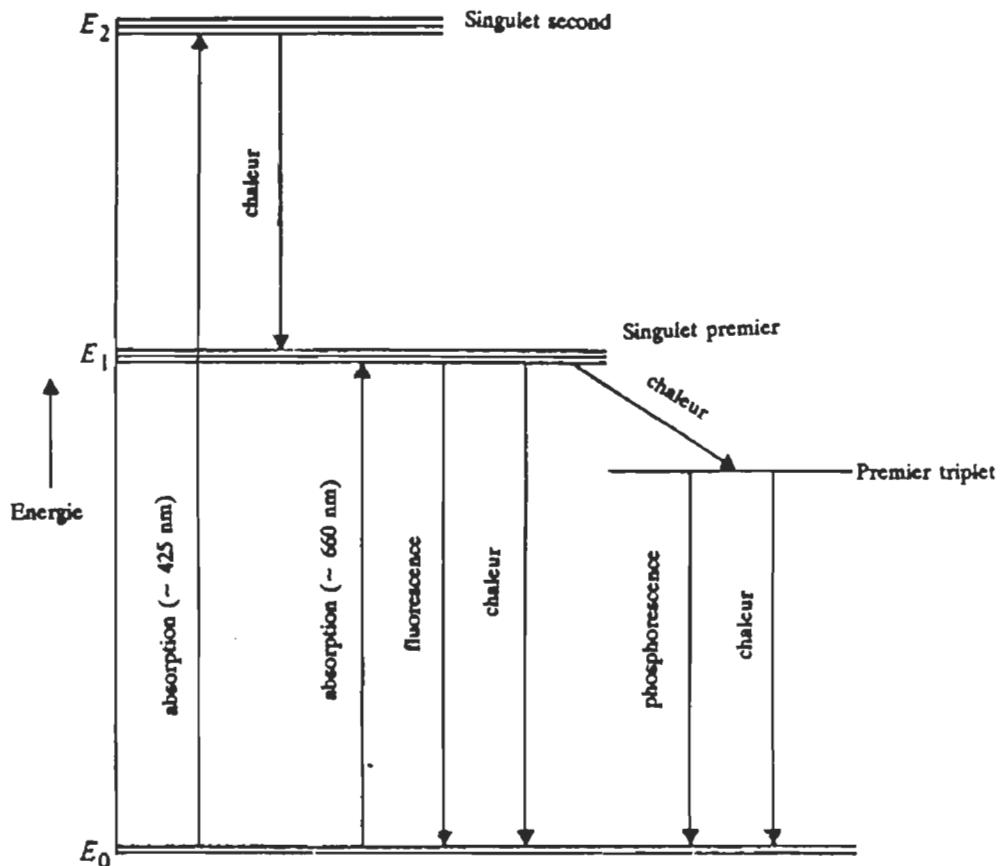


Figure 10. Diagramme simple illustrant les transitions énergétiques possibles lorsqu'une molécule de pigment absorbe une radiation⁽⁴⁶⁾.

sous la seule influence de l'énergie thermique.

Ce n'est seulement que lors de l'absorption d'un quantum d'énergie, qu'une molécule de Chla dans l'état fondamental E_0 , passe dans l'état excité, Chla*, dans le temps d'une période de vibration de l'onde lumineuse (10^{-14} à 10^{-15} sec). Durant cette excitation les électrons de la liaison demeurent à spins antiparallèles ($\uparrow\downarrow$): c'est l'état excité singulet E_n .

Il convient de rappeler qu'un électron a des propriétés magnétiques qui sont représentées par une grandeur vectorielle : le moment angulaire de spin de l'électron. Dans un système chimique coordonné et stable, un électron n'est jamais seul et appartient toujours à une paire. Si les vecteurs associés à chaque électron sont antiparallèles ($\uparrow\downarrow$) on parle d'état énergétique dit singulet. S'ils sont parallèles ($\uparrow\uparrow$) on définit un état énergétique : triplet.

La durée de vie d'une molécule dans l'état excité (E_n) ci-haut est très courte. A partir de l'état singulet excité le plus haut, la molécule Chla* (E_2) passe par conversion interne à la molécule à l'état singulet excité le plus bas Chla* (E_1), qui a la durée de vie la plus longue.

Avec quelques rares exceptions, les molécules relaxent rapidement au niveau vibrationnel le plus bas de l'état E_1 ⁽⁴³⁾. Ce processus est appelé conversion interne et

généralement il survient en 10^{-12} sec. Puisque la durée de vie de fluorescence est typiquement près de 10^{-8} sec, la conversion interne est généralement complète avant d'obtenir l'émission. Donc l'émission de fluorescence provient généralement d'états excités thermiquement équilibrés. Comme pour l'absorption, la transition électronique vers le plus bas niveau électronique (fondamental) résulte aussi en un état excité vibrationnel. Cet état atteindra l'équilibre thermique dans 10^{-12} sec.

Une conséquence importante de ces considérations est que le spectre d'absorption de la molécule reflète les niveaux vibrationnels des états excités électroniquement et le spectre d'émission reflète les niveaux vibrationnels de l'état électronique fondamental. Généralement, l'excitation électronique n'altère pas beaucoup l'espacement des niveaux d'énergie vibrationnels. Les structures vibrationnelles obtenues en absorption et en émission sont donc similaires.

La découverte de la symétrie miroir⁽⁴⁷⁾ existant entre les spectres d'absorption et de fluorescence a d'ailleurs révolutionné la théorie de la luminescence. Une relation universelle permettant le calcul des spectres de fluorescence à partir de la connaissance de la bande d'absorption aux hautes longueurs d'onde (Rouge) a été établie.

Suite à certaines expériences en solution, il a été démontré qu'entre l'acte de l'absorption de la lumière et sa réémission, il existe un processus de redistribution de l'énergie vibrationnelle sur les divers degrés de liberté vibrationnels de la molécule excitée aussi bien qu'un échange d'énergie entre les molécules excitées et les molécules

de solvant. Ce processus est si rapide qu'à l'intérieur d'un temps de l'ordre 10^{-10} à 10^{-12} sec (temps considérablement plus court que celui alloué à l'état excité électronique) un équilibre de distribution de l'énergie vibrationnel est établi sur les degrés de liberté et les niveaux vibrationnels de la molécule excitée.

Dans les monocouches de Chla nous sommes en présence de films dont la densité des molécules est élevée. Ces films condensés permettent au transfert de l'énergie non-radiative de procéder très rapidement de sorte que l'énergie d'excitation est disponible pour les molécules ayant plus ou moins différent niveaux d'énergie dans l'état excité. La dépendance à la température au niveau des spectres de fluorescence nous amène à nous poser la question : est-ce que les populations des espèces dans l'état excité aux courtes et hautes longueurs d'ondes sont en équilibre du au transfert d'énergie ?

Cette question peut aussi être formulée en relation à un autre aspect de l'émission de la lumière par ces échantillons. La décroissance de fluorescence dans les films Langmuir-Blodgett condensés fut trouvée extrêmement courte, soit inférieure à 0.2 ns, sous la résolution de la méthode appelée "photon counting"⁽⁴⁸⁾. Elle est non détectable avec la technique de la picoseconde, dont la présence d'oligomères peut mener à la réduction de la durée de vie de fluorescence. Par conséquent, la question peut être posée comme suit : est-ce qu'une durée de vie aussi courte est suffisante pour établir une distribution thermiquement équilibrée de l'énergie d'excitation sur la grande variété des niveaux d'énergie électroniques et vibrationnels ?

La forme que prend cette distribution est totalement donnée par la température du solvant. Un critère permettant l'actuel établissement de l'équilibre de distribution pour tout système spécifique est fourni par le fait que le rendement quantique et le spectre de fluorescence sont indépendant de la fréquence de la lumière d'excitation (bande de Stokes).

La relation universelle concernant les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence fut dérivée par Stepanov (1957) ⁽⁴⁹⁾. La validité de cette relation vient de l'hypothèse que les états électroniques fondamentaux et excités sont en équilibre thermique vibrationnel à la température ambiante.

Au niveau de la photosynthèse, les événements qui précèdent la photochimie sont lents comparés à la relaxation thermique des états supérieurs. Lorsque la Chla est excitée par la lumière, il y a presque toujours relaxation à l'état excité le plus bas avant que soit utilisé cette énergie pour la photochimie. Il s'ensuit que les photons de la lumière bleue, produisant les états supérieurs excités de la Chla, ne sont pas plus utiles pour la photosynthèse que les photons rouges, moins énergétiques, qui génèrent l'état excité le plus bas.

Un important processus en photosynthèse est le transfert de l'énergie d'excitation d'une molécule de chlorophylle à une autre. Ce processus ressemble à l'interaction de pendules couplés mécaniquement et est appelé transfert par résonnance.

L'oscillation d'un dipôle, lors de la de-excitation d'une molécule, est couplé de très près à l'oscillation d'une molécule voisine. La première molécule donne son énergie directement à la seconde, causant l'excitation de cette dernière, sans intervention de la fluorescence ou de l'absorption tel qu'habituellement. Si les deux molécules sont différentes, tel que lors du transfert de l'énergie de la Chl_b à la Chl_a, l'énergie perdue par l'une doit égaler l'énergie gagnée par l'autre.

Le transfert d'énergie parmi des molécules identiques, tel que dans un lit dense de Chl_a, peut être décrit d'une autre façon. L'ensemble des molécules peuvent être traités comme une supermolécule simple. L'état excité devient la propriété de la supermolécule et non pas des molécules individuelles. En biophysique moléculaire, un état électronique excité dont l'énergie réside sur plus d'un groupe de molécules identiques, durant la durée de vie de l'état excité, est appelé un exciton⁽⁵⁰⁾. Le quantum d'énergie d'excitation est alors délocalisé sur la supermolécule entière. La différence entre les deux types de transfert précédents (saut d'énergie d'une molécule à l'autre ou délocalisation de l'énergie sur plusieurs) dépend de la force d'interaction du dipôle électrique entre molécules voisines.

C'est ainsi que l'énergie d'un photon absorbée par une molécule de Chl peut être intégralement ou partiellement (avec dégagement de chaleur) transmise d'une molécule de Chl_a ou _b, à une molécule de caroténoïde, ou à tout autre accepteur capable d'être excité. C'est par ce mécanisme de transfert d'énergie, à partir de l'état singulet, que les molécules de Chl peuvent jouer le rôle de collecteurs de photons dans les chloroplastes. Il y a propagation de l'énergie d'un photon à partir d'un site primitif

d'absorption.

Donc si l'énergie absorbée par la Chl sous forme de lumière n'est pas rapidement acheminée par l'électron du chloroplaste, celui-ci retourne à son état original et l'énergie est dissipée sous forme de fluorescence. Pour la plupart des systèmes photosynthétiques le temps de transfert est de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-9} sec. Ceci est assez long pour permettre un équilibre thermique complet dans l'antenne photosynthétique, et assez court de sorte que les pertes en fluorescence et en chaleur sont faibles ($\leq 10\%$) durant le parcours de l'électron vers le centre réactionnel. Au niveau du centre de réaction, le taux d'utilisation photochimique est trop élevé pour permettre un tel équilibre. Une fois que le quantum d'excitation a fait le saut dans ce centre photochimiquement actif il sera probablement utilisé pour la photochimie en 10^{-11} sec ou moins.

En réalité, les réactions de piégeage de la lumière sont en compétition avec la fluorescence et c'est ce qui explique pourquoi elles doivent être si rapides. Il est bien entendu que sous des conditions optimales de fonctionnement de l'appareil photosynthétique, l'émission de fluorescence de la Chla et la chaleur sont faibles. Par contre, ils deviendront non négligeables si la chaîne de transport d'électron de la photosynthèse est inhibée.

La faible fluorescence est néanmoins un outil d'une extrême utilité dans l'étude de la distribution et la migration de l'énergie dans les membranes photosynthétiques.

Elle est une mesure directe des états électroniques excités résultant de l'absorption de la lumière. Cette propriété optique agit comme une sonde importante dans la compréhension des divers processus de la photosynthèse. D'ailleurs la plupart de notre connaissance sur la nature des deux photosystèmes et de l'événement primaire de la photosynthèse vient de l'étude de la fluorescence de la chlorophylle, autant in vivo qu'in vitro⁽⁵¹⁾.

Il est malheureux, par contre, qu'au niveau moléculaire l'information structurale en photosynthèse ne soit pas dérivable d'étude optique. Isolés à partir d'organismes vivants, même le plus simple et le mieux caractérisé des systèmes photosynthétiques actifs est encore fortement complexe. La cause se situe au niveau du manque de connaissance des composantes du système. L'utilisation d'un système modèle simple, simulant certaines propriétés in vivo, devient donc important dans l'investigation des propriétés optiques du pigment Chla.

1.8 Propriétés optiques in vivo

Il n'y a pas de substances aussi simple que la Chla qui ait été étudiée dans un nombre aussi considérable d'environnements, par exemple: solutions, micelles, liposomes, vésicules, etc...

Du point de vue biochimique, de récentes études sur les manipulations des membranes de protéines ont rendu possible l'isolation des complexes Chla-protéine dans

un état relativement intact. On a noté que dans les photosystèmes I et II il existait un complexe jouant le rôle de centre réactionnel photochimique (RC) et un complexe pigment-protéine capteur de lumière (LHCP).

1.8.A_ Absorption in vivo

L'organisation spatiale de l'appareil photosynthétique distribue le LHCP et le PSII dans les empilements granaires, tandis qu'on retrouve le PSI dans la région non-empilée appelée stromale.

Ces divers composants absorbent différemment, donc possèdent des propriétés spectrales spécifiques telles que représentées à la figure 11. Ces spectres d'absorption, aussi réalisés à basse température, ont été analysés par la quatrième dérivée⁽⁵³⁾ ainsi que par ajustement de courbe⁽⁵⁴⁾. Ils indiquent que le PSI possèdent des constituants de Chla ayant des bandes autour de 662, 668, 679, 687, 695 et 705 nm. Le RC2 (centre de réaction du PSII), quant à lui, contient les bandes 660, 670, 677, et 683 nm. Enfin, pour ce qui est du LHC2 (complexe antenne du PSII), il possède des composantes de Chla à 660, 670, 677 et 684 nm ainsi que de la Chlb à 640 et 690 nm.

1.8.B_ Emission de fluorescence in vivo

Tous les pigments (excluant les caroténoïdes) extraits des membranes photosynthétiques par des solvants organiques polaires présentent des spectres de

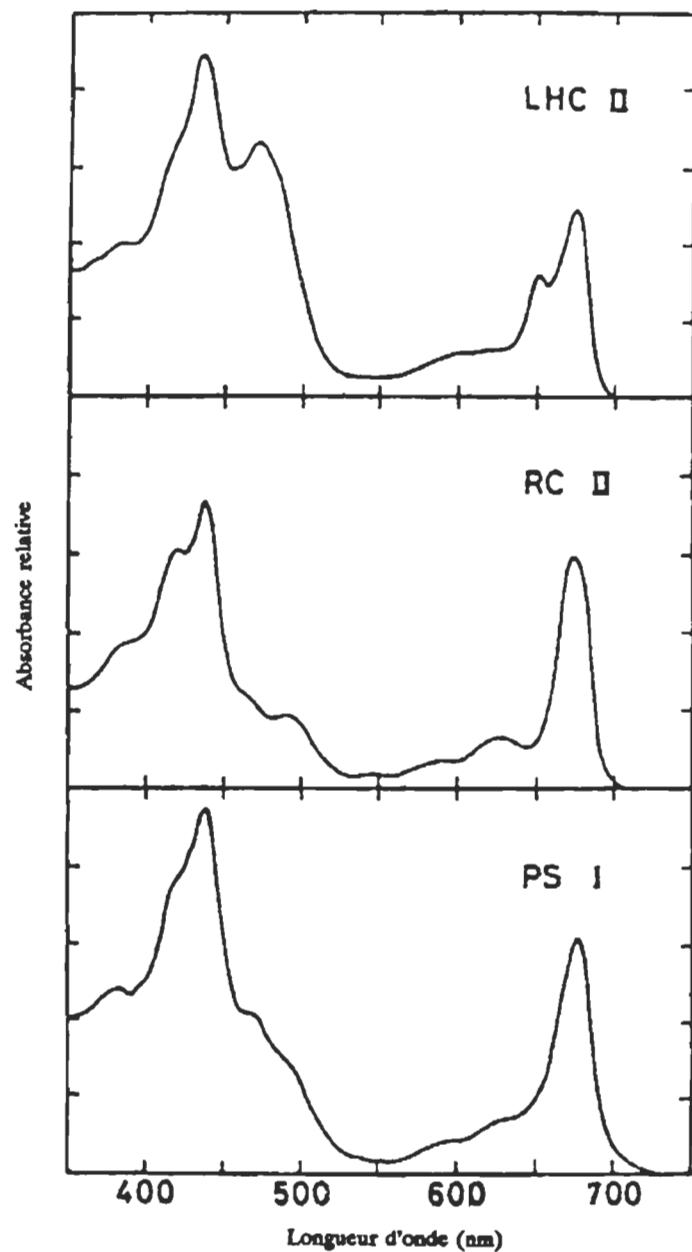


Figure 11. Propriétés d'absorption de la Chla *in vivo* pour les trois principaux complexes Chl-protéine. LHCII (complexe antenne Chla/b protéine du PSII), RCII (centre de réaction photochimique du PSII) et PSI (photosystème I)⁽⁵²⁾.

fluorescence caractéristiques ayant un haut rendement quantique d'émission. Mais ce ne sont pas tous les pigments qui peuvent fluorescer. Par exemple, dans les complexes LHC_I et LHC_{II}, le transfert d'énergie d'excitation de la Chl_b à la Chl_a est si efficace que la fluorescence n'est émise que par la Chl_a sans émission provenant de la Chl_b.

Le cas des thylacoïdes, isolés des chloroplastes intacts ainsi que des cellules intactes, montre un transfert d'énergie du LHC_{II} au RC_{II}. L'efficacité de ce transfert est élevé de sorte qu'on peut difficilement observer la fluorescence de LHC_{II}. A la température ambiante, la fluorescence des cellules intactes et des chloroplastes isolés de plantes supérieures et algues vertes est principalement attribuée au PS_{II} puisque la fluorescence du PS_I est relativement faible.

Le spectre de fluorescence de la Chl_a dans les membranes des thylacoïdes (figure 12), à la température ambiante, montre une bande à 683-685 nm et un large épaulement autour de 730 nm (environ 10% de toute la fluorescence). Par fragmentation des membranes, minimisant les distorsions du spectre dues à l'auto-absorption, la bande est située à une longueur d'onde relativement constante soit à 683 nm. Les chloroplastes isolés et les membranes des thylacoïdes montrent essentiellement le même spectre de fluorescence que les cellules intactes puisque les interactions chlorophylle-protéine ne sont pas altérées durant leur isolation.

Par refroidissement des cellules intactes, des chloroplastes isolés et des membranes des thylacoïdes⁽⁵⁷⁾, les spectres d'émissions de fluorescence changent et leur

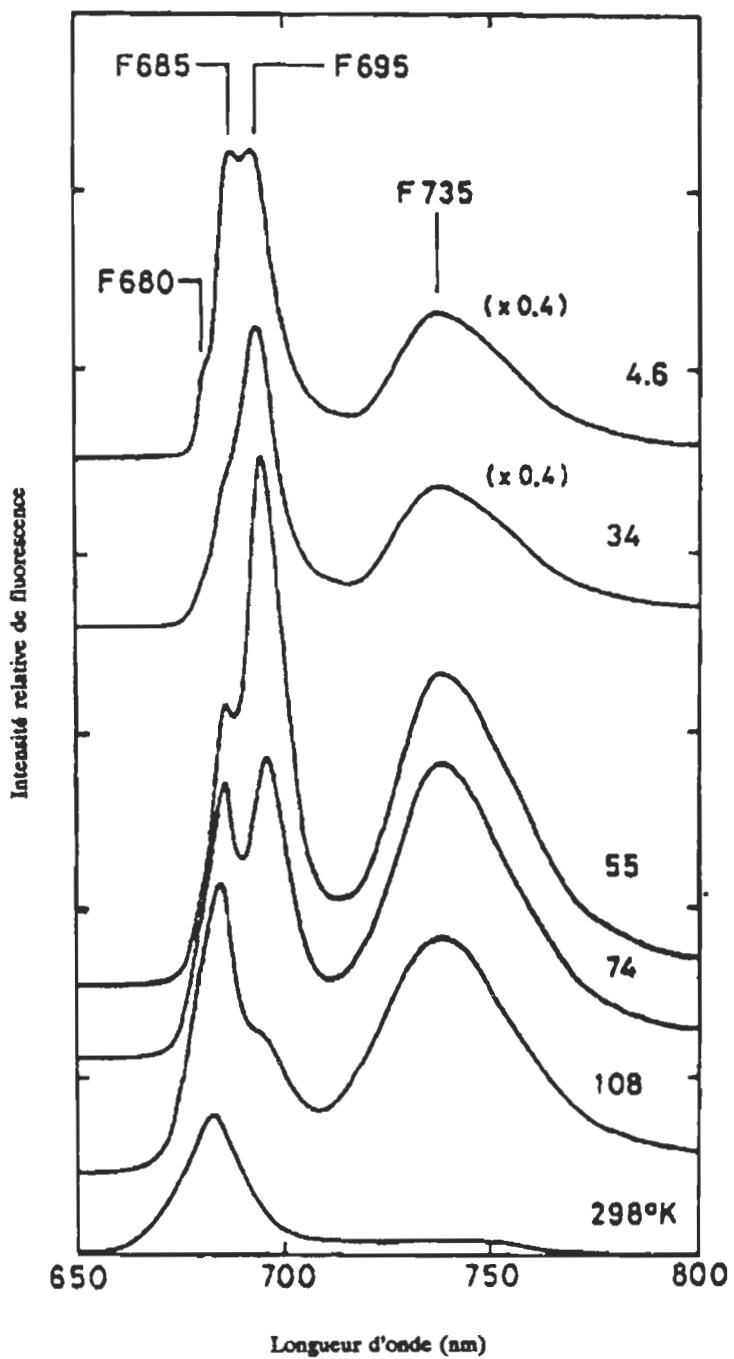


Figure 12. Propriétés d'émission de fluorescence *in vivo* à diverses températures⁽³⁵⁾.

rendement de fluorescence s'accroît⁽⁵⁶⁾. Pour une variété d'organismes photosynthétiques on observe trois bandes d'émissions à 77 K. Elles sont situées respectivement à 685, 695 et 715-740 nm. F685 et F695 sont les émissions importantes (à 77 K) des cellules intactes, des chloroplastes et des membranes des thylacoïdes pour la plupart des espèces d'algues et de plantes supérieures. La bande de haute longueur d'onde est très large et son emplacement exact varie de 715 à 740 nm, selon l'espèce de plante et les conditions de croissances.

On décompose la région 715-740 nm en deux zones d'émissions soit: 715-725 et 735-745 nm, lesquelles sont référencées à F720 et F735 respectivement. F685 et F695 sont émises par la Chla du PSII; F720 et F735 proviennent de la Chla du PSI^(52,57).

Finalement, F685, F695 et F735 ont des profils de température caractéristique (figure 12). L'accroissement de fluorescence par refroidissement est plus prononcée dans les régions entre 275 et 100 K pour F735, entre 100 et 50 K pour F695 et entre 50 et 4 K pour F685. Ces effets de température sont observés pour les cellules intactes, les membranes des thylacoïdes et les complexes Chla-protéine, mais non pour la Chla dissoute dans des solvants organiques.

1.9 Propriétés optiques en solution, in vitro

1.9.A Absorption de solutions de Chla :

Dans les solutions le concept donneur-accepteur d'électron est très important. Pour le cas de la chlorophylle, il est relié aux propriétés de coordination du magnésium.

Les bandes électroniques principales de la chlorophylle en solution sont résumées comme suit^(18,58) :

- 662 à 665 nm: Chla monomérique
- entre 675 et 680 nm: interaction C=O --- Mg, donc formation de dimères (Chla)₂ et d'oligomères (Chla)_n
- bandes de longueur d'onde supérieures à 680 nm, due à la formation d'agrégat de Chla avec un ligand bifonctionnel tel que H₂O, RXH (où R = alkyle et X = O,N,S)

Notez que l'agent de ligation bifonctionnel peut, en principe, être une fonction nucléophile de protéine située près de la chlorophylle.

1.9.B Emission de fluorescence de solutions de Chla

La Chla est l'une des substances dont la fluorescence est largement atténuée en

solution concentrée ou même diluée lorsque, par un moyen quelconque, les molécules sont associées en dimères ou oligomères.

Cela nous amène à parler de "quenching" de concentration.

1.9.B.1 "Quenching" de concentration

En considérant la capacité de la chlorophylle pour le transfert d'énergie efficace de l'état singulet au centre réactionnel, l'observation du "quenching" de fluorescence à haute concentration en solution est aussi inattendue que mystérieux. On connaît bien le "quenching" de concentration dans les solutions et on l'attribue à la présence de dimères non-fluorescents, lesquels piègent et atténuent l'énergie de l'état excité singulet. Bien que plusieurs sortes de dimères de la chlorophylle soient connus, ces derniers ne semblent pas être présents dans les solutions concentrées de solvants polaires où le "quenching" est observé.

Prenons le cas d'une solution de Chla dans l'éther. Un grand nombre de tentatives ont été entreprises dans le but d'estimer quantitativement les données obtenues par Watson et Livingston (1950)⁽⁵⁹⁾ sur le "quenching" de fluorescence.

En 1976, Beddard et Porter⁽⁶⁰⁾ attribuaient le "quenching" du transfert d'énergie non pas aux dimères, mais à des "paires statistiques" de molécules, lesquelles interagissaient trop faiblement pour affecter davantage leur spectre d'émission, mais

assez fortement pour atténuer la fluorescence.

Cependant, une conclusion alternative était tirée par Bojarski (1982)⁽⁶¹⁾, qui énonça à partir d'évidences expérimentales, qu'une faible probabilité ($\approx 1\%$) de perte d'énergie de l'état excité était obtenue par transfert plutôt que par le "quenching" par paires.

Il est donc nécessaire d'éclaircir cette question par l'acquisition de données expérimentales de grande précision provenant de divers milieux.

Lorsqu'on souligne le "quenching" dynamique cela implique une désactivation par collision entre un donneur excité et une molécule accepteur. Ce "quenching" est possible à haute concentration et dans les solvants tels que l'éther. Pour ce qui est des liquides visqueux et des solutions solides, cette possibilité est négligée. Le "quenching" de concentration de la fluorescence de la chlorophylle a été étudié dans les films de cholestérol et autres tels que l'huile de castor et la lécithine. Aucun cas d'évidence spectrale de dimères ou de fluorescence autre que par les molécules monomères de chlorophylle était signalé. Néanmoins, dans l'huile de castor et la lécithine, la réduction de la durée de vie de l'état excité était plus grande comparée à la réduction de l'intensité de fluorescence lorsqu'on augmentait la concentration de chlorophylle. Cela indiquait la présence de "quenching" statique due à l'absorption de la lumière par des associations (complexes) de chlorophylle non-fluorescentes⁽⁶²⁾.

A noter que les molécules de chlorophylle peuvent s'associer en trois façons distinctes :

- (1) par les chaines phytols;
- (2) par interaction des anneaux conjugués de porphyrine;
- (3) par association du noyau magnésium (Mg) avec des groupes carbonyles et quelques fois une molécule de solvant.

Ce qui nous incite à parler d'agrégat de Chla.

1.9.B.2 _ Agrégats dans les solutions diluées ou concentrées de Chla

Il est bien connu que la Chla dans les solvants secs ou humides d'hydrocarbures à température ambiante se présente sous forme de dimères et d'oligomères. Comme ces agrégats ont quelques fois été suggérés comme modèle d'association de la Chla in vivo, leurs aptitudes à fluorescer, i.e. de posséder des états excités singulets avec des durées de vie suffisamment longues pour la chimie, ont suscité beaucoup d'intérêt.

Dans les hydrocarbures secs, la Chla est pratiquement non-fluorescente, mais par l'addition de petite quantité de substances polaires telles que les alcools, amines, éthers ... on peut activer la fluorescence.

Le fait que les dimères de Chla anhydre et les oligomères fluorescent à basse température n'est pas très clair. On doute que l'eau ou autres impuretés polaires soient

réellement absentes.

D'ailleurs l'évidence pour la fluorescence de dimères de Chla et oligomères dans les hydrocarbures humides à faible température est bien établie. Kooyman et al. (1977) ⁽⁶³⁾ identifiait quatre bandes de fluorescence de la Chla dans le n-octane humide à 4.2 K. Ces bandes 669, 687, 725 et 750 nm possédaient des intensités qui variaient avec la concentration. On assignait ces bandes : à un monomère hydraté : Chla·H₂O, à un dihydrate : Chla·(H₂O)₂, au dimère: (Chla·H₂O)₂ et au polymère : (Chla·H₂O)_n. Des résultats similaires furent obtenus plus récemment par Alfano et al. (1985) ⁽⁶⁴⁾.

En résumé, les agrégats de chlorophylle formés à partir de solutions diluées ne démontrent pas de fortes bandes de fluorescence. Par contre, par refroidissement l'intensité de ces bandes s'accroît.

Puisque les paires de chlorophylle faiblement interagissantes sont apparemment capables de désactiver rapidement l'état excité singule dans les solvants polaires, il est surprenant de voir que quelques associations de chlorophylle fortement interagissantes, dans les solvants non-polaires, soient non-fluorescentes. C'est le cas des solutions concentrées.

Dans plusieurs cas, le rendement de fluorescence est élevé et comparable à la fluorescence de monomère à température ambiante. Pour la majeure partie des cas, la

fluorescence s'accroît considérablement avec une diminution de température. Ces systèmes apparaissent extrêmement complexes et il est impossible de dire quels types d'association mènent aux espèces fluorescentes.

1.10 Propriétés optiques dans les films Langmuir-Blodgett

1.10.A Absorption des monocouches de Chla

L'étude de Désormeaux et Leblanc⁽⁸⁾ sur des monocouches de Chla pure indiqua une grande ressemblance dans l'allure spectrale entre les spectroscopies d'absorption dans le visible et de photoacoustique. Ces résultats révèlèrent des bandes maximales à 439 nm (bande de Soret) et à 678 nm (bande Rouge).

Par ailleurs, le spectre d'absorption d'une monocouche de Chla pure à l'interface azote-quartz exhibait une forte bande de Soret (absorbance de 0.012) à 440 nm, et une bande dans le rouge (absorbance de 0.009) à 680 nm⁽⁴⁸⁾. Ceci est en accord avec les résultats publiés dans des expériences similaires⁽³³⁾ et à l'interface air-eau⁽⁶⁵⁾.

1.10.B Emission de fluorescence des monocouches de Chla

Tôt on remarqua que la fluorescence des monocouches de Chl était presque complètement atténuée⁽⁶⁶⁾. La fluorescence réapparaissait si la Chl était diluée avec un

surfactant miscible tel que l'alcool oléique, le phytol et les galactolipides, mais pas avec les diluants immiscibles tel que l'alcool stearique. Par conséquent, la fluorescence de la Chl est sujette au "quenching" de concentration dans les monocouches, comme pour les autres systèmes, et aussi sujette à la dépolarisation de concentration par transfert d'énergie. Le transfert d'énergie à partir de la Chlb à la Chla a été observé comme le transfert limité de la carotène à la Chla. La fluorescence est aussi atténuée par le transfert d'énergie ou d'électron au Cu-Phéo_a, ou aux quinones lipophiliques.

D'un autre côté, Gonen et al. (1981)⁽⁶⁷⁾ firent l'intéressante observation que les monocouches de Chla diluées 1:1 avec de l'hexadécane étaient encore fluorescentes, alors qu'une dilution 1:10 avec l'alcool oléique démontrait peu de fluorescence. Ils proposèrent que l'hexadécane, lorsqu'étendu à la surface de l'eau, gênait l'approche mutuel et la rotation des molécules de chlorophylle.

Dues à leurs faibles intensités, les spectres de fluorescence des monocouches de Chl, diluées ou non, sont difficile à caractériser avec précision. Gaines et al. (1964)⁽⁶⁸⁾ rapportaient des bandes près de 710 et 680 nm de monocouches, non-diluées et diluées. Aoshima et al. (1975)⁽⁶⁹⁾ détectaient des bandes à 685, 695 et 715 nm pour des couches non diluées de Chla et à 667 et 685 nm pour la Chlb. La fluorescence de couches diluées avec de l'hexadécane était résolue en 3 bandes près de 670, 682 et 690 nm, lesquelles variaient avec la compression (Gonen et al., 1981)⁽⁶⁷⁾. A basse température, soit 77 K, la fluorescence des monocouches de Chla s'intensifiait, et les pics devenaient

importants à 682-685, 700 et 720-724 nm (Litvin and Gulyaev, 1964) ⁽⁷⁰⁾. Donc un certain nombre de bandes apparaissent à des longueurs d'onde élevées pour de grande compression et de faible température. Les monocouches de Chl ressemblent alors aux solutions concentrées, dans lesquelles la fluorescence d'espèces agrégées est favorisée comparée à celle des monomères.

Plus récemment⁽⁴⁸⁾, les monocouches de Chl_a pure exhibaient un maximum large, centré à 700 nm. Par contre, par dilution de la monocouche avec de la phosphatidylcholine (Pc) à un ratio de 1:100, l'indication de la forme monomérique de la Chl_a située à 678 nm (bande principale de fluorescence) était révélée. De plus, un épaulement large à 736 nm (de faible intensité) était perçu, signifiant la présence d'espèces agrégées.

Les formes agrégées, dans des films Langmuir-Blodgett hydratés, furent mises en évidence lors des travaux de Krawczyk *et al.* (1988) ⁽⁷¹⁾. Par investigations de multicouches de Chl_a pure en milieu sec et humide, cette étude révéla la présence de bandes larges (probablement composées de dimères, trimères et ... oligomères de Chl-a) positionnées entre 700 et 760 nm dépendamment du milieu sous étude.

Préalablement à la présentation des résultats expérimentaux sur les propriétés d'absorption et de fluorescence des monocouches de Chl_a, nous examinons dans la section suivante les manipulations expérimentales inhérentes à l'obtention des dits résultats. Une description sommaire des appareillages suit les expérimentations.

2- MANIPULATIONS EXPERIMENTALES

2.1 Préparation d'une solution de Chla

La Chla est extraite de plants d'orge et est purifiée selon la méthode employée par Omata et Murata⁽⁷²⁾. On garde dans des bouteilles fermées, à la noirceur et sous atmosphère d'argon la Chla cristalline et dissoute. La pureté du chromophore est plus élevée que 95% tel que révélé par chromatographie en couche mince sur gel de Silice G (250 mm Analtech Inc., Newark, DE) en utilisant comme phase mobile un mélange (7:3, v:v) d'hexane:acétone.

Pour l'expérimentation, on dissout 1 mg de Chla fraîchement obtenue dans 2 ml de benzène redistillé contenu dans une bouteille à échantillon. Afin de permettre une dissolution complète du pigment on utilise un bain à ultra-son.

Par mesure de précaution face aux attaques oxydatives, toute solution de Chla n'est gardée que 5 jours maximum dans un milieu réfrigéré.

2.2 Monocouche de Chla

Pour les mesures optiques, les films monomoléculaires de Chla pure furent transférés sur des lames de quartz non fluorescentes. La dimension de ces lames est de 0.1 cm x 1.0 cm x 2.6 cm. La propreté de ces lames de quartz est de première importance. La procédure de nettoyage des lames requiert une attention spéciale

puisqu'elle peut affecter le rapport de déposition (RD = aire monomoléculaire retirée de la surface aqueuse / aire de la lame recouverte) de la monocouche et subseq̄uement, la qualité des mesures spectroscopiques. Chaque lame est préalablement nettoyée au détergent "Sparkleen" puis trempe durant 3 jours dans de l'acide sulfochromique concentré. Après ce laps de temps, elle est ensuite rincée dix fois à l'eau courante et déminéralisé puis mise 5 min au bain ultra-son dans une solution de NaOH (0.1 M). Faisant suite à un rinçage de dix fois à l'eau déminéralisée et bidistillée, la lame est finalement placée au bain ultra-son dans de l'eau bidistillée pour 15 min.

La première étape dans la construction d'un film monomoléculaire consiste en l'étalement d'un volume de 100 μ L de la solution de Chla (1×10^{-4} M) à la surface d'un tampon phosphate (10^{-3} M) contenu dans le bain de Langmuir (la description de ce montage suit les présentes manipulations). Ce tampon a auparavant été introduit dans le bain et sa surface nettoyée après une attente de 15 à 30 min. La préparation du tampon se fait à partir d'un phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4) purifié duquel le pH est ajusté à 8.0 à l'aide du phosphate de sodium monobasique ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Les deux sels ci-dessus proviennent de la compagnie chimique Sigma.

Du bain de Langmuir, on laisse évaporer le solvant benzène sous atmosphère d'azote durant 15 min. Par la suite, à l'aide d'une manivelle ou par utilisation d'un moteur électrique relié à un circuit d'asservissement, réglant la position de la barrière

mobile, on amène les molécules de Chla à une pression de surface égale à 20 mNm⁻¹ (fil de torsion = 7.7°).

Dans le premier cas, comme c'est l'opérateur qui effectue l'asservissement, il doit s'assurer que le faisceau laser (qui est réfléchi sur un miroir relié au fil de torsion du montage) soit maintenu constant sur une cible fixée au mur. Dans le second cas, le circuit électronique maintient la pression en gardant une distance fixe entre un capteur à effet Hall et un aimant attaché au levier du fil de torsion.

Due à la faible surface des petites lames de quartz utilisées dans le cas des monocouches, la compression manuelle fut utilisée m'assurant un meilleur contrôle de la surface moléculaire à transférer. Pour empêcher toute vibration possible à la surface du tampon (pouvant rompre le film moléculaire homogène) des pneumatiques supportent le bain de Langmuir. De plus, le système de ventilation de la chambre de travail est interrompu (tout en s'assurant de garder une température entre 18 et 20°C) lors de la manipulation du film. Afin d'éviter toute altération ou dégradation de la Chla, chaque expérience se déroule sous une lumière verte et sous atmosphère d'azote.

On fixe la lame de quartz à un support solide et on la descend dans la sous-phase du bain (par utilisation d'une poulie reliée à un système mécanique). La descente se fait lentement et lorsque la lame remonte du bain, la Chla est transférée au substrat solide (figure 13 a). Cette dernière partie requiert une plus grande attention car on doit

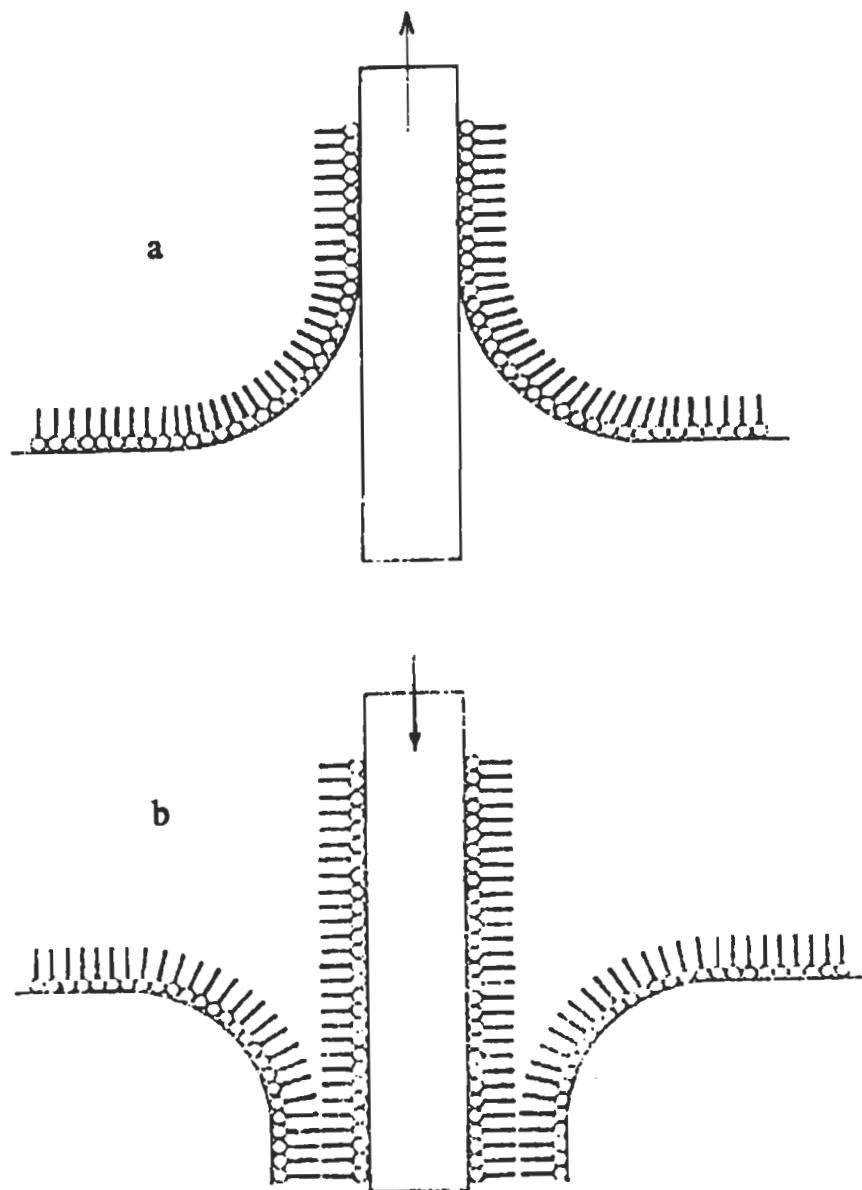


Figure 13. Fabrication de film Langmuir-Blodgett. (a) film monomoléculaire (b) film multimoléculaire⁽⁷⁾.

maintenir une pression de surface constante sur les molécules lors du transfert (ne pas créer de trou ni d'amoncellement de molécules de Chla sur la lame, mais plutôt un film uniforme).

Suite au transfert des molécules de Chla sur le quartz, on laisse la monocouche sécher quelques minutes. Puis, rapidement, on l'ajuste au porte-lame du cryostat et on l'insère dans un tube de polyéthylène gonflé à l'azote (degré K de pureté) pour éviter du mieux possible tout contact avec l'air ambiant. Cette mesure de sécurité vise à prévenir le danger de phéophytinisation. Enfin, on se dirige aux appareils pouvant enregistrer les propriétés optiques.

La construction des multicouches de Chla est semblable (figure 13 b). Dans ce cas, il est primordial de fixer un sel de cadmium à la surface des lames de quartz avant de transférer toute molécule de Chla. Le but de cette fixation est de permettre d'avoir de plus fortes interactions (forces de van der Waals) entre la lame de quartz et la Chla. Ces interactions se font par les parties hydrophobes des deux constituants. Comparativement aux monocouches (liaisons hydrophiles directes avec la lame), cela permet d'adsorber plusieurs couches de molécules.

La préparation de telles multicouches requiert l'utilisation d'un tampon tris (10^3 M). Ce dernier est formé à partir du Trizma-HCl[tris(hydroxyméthyl)amino-méthane hydrochloride] de la compagnie chimique Sigma, et du CdCl₂ (10^4 M). Dans

ce cas, le pH est ajusté à 8.5 . Une solution d'acide arachidique (10^{-3} M) dans le benzène est déposée à la surface du bain et, suite à l'évaporation du solvant, 5 couches d'arachidate de cadmium sont transférées sur le quartz à une pression de surface de 30 mNm^{-1} et une température comprise entre 21 et 24°C. La procédure d'adsorption de la Chla sur ces lames suit celle décrite précédemment pour les monocouches.

3- DESCRIPTION DES APPAREILLAGES

3.1 Bain de Langmuir

La technique de fabrication des monocouches de Chla, de mesure de leur pression de surface-aire monomoléculaire caractéristique et du transfert des monocouches d'une surface aqueuse à un substrat solide a été décrite par Ke (1966) ⁽⁷⁴⁾.

L'instrument de travail utilisé est le bain de Langmuir (figure 14) qui permet d'introduire des couches moléculaires de substances hydrophobes à la surface de l'eau. A partir de systèmes artificiels ayant quelques degrés d'orientation, les monocouches de Chla sont peut-être un concept simple, bien que difficile à travailler expérimentalement.

Développé par Langmuir (1917) ⁽⁷⁵⁾, ce bain est décrit ci dessous.

3.1.A Bain

Il possède les dimensions intérieures suivantes : 33.0 cm de long, 14.7 cm de large et 2.0 cm de profondeur. Il est constitué de plaques de verre maintenues ensemble par une colle à base de silicone, et est entièrement recouvert d'une feuille de Teflon interchangeable (Fluoro-carbon Dilectrix Division, Lockport, NY). Pour éviter toute

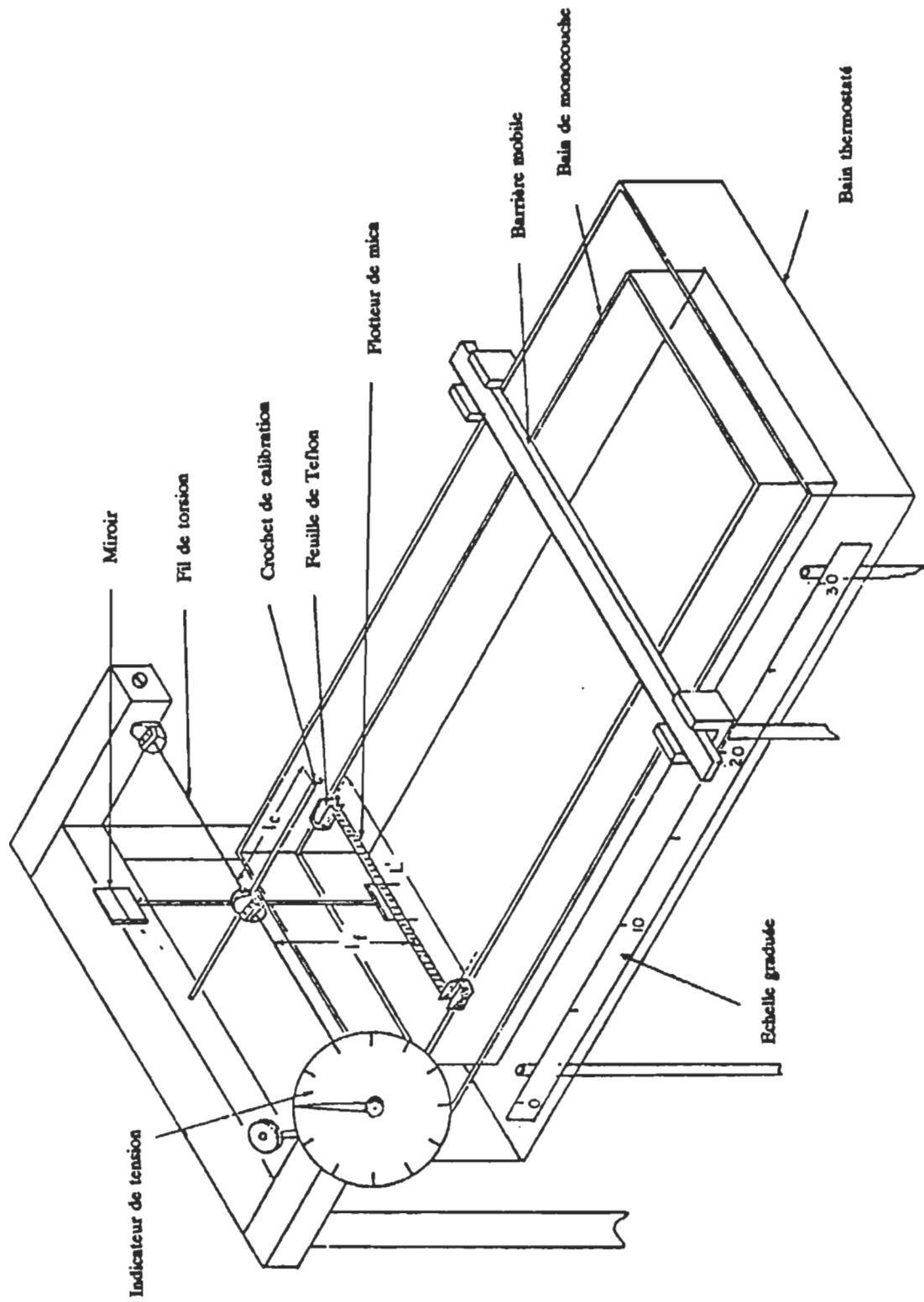


Figure 14. Bain de Langmuir.

contamination de la sous-phase (tampon), il est nécessaire de procéder à un nettoyage régulier du bain.

3.1.B_ Barrière mobile

Pièce de laiton de dimension 0.5 x 1.0 x 17.0 cm, recouverte d'une feuille de Teflon. Elle repose sur les rebords du bain où son poids assure un bon contact, prévenant ainsi toute fuite de matériel hors de la surface occupée par le film.

Relié à une vis sans fin située sous le bain, elle est mue soit manuellement ou par un moteur électrique isolé du bain afin d'éviter que les vibrations ne perturbent la surface de l'eau. Sur l'une des deux pièces de métal reliant la barrière mobile à la vis sans fin, est fixé un pointeur qui permet une lecture aisée de la position de la barrière sur une règle graduée.

3.1.C_ Règle graduée

Elle est maintenue d'une façon rigide et parallèle sur les parois du bain. Par ajustement, on fait coïncider le zéro de la règle avec le rebord du flotteur du côté de la barrière mobile. On ajuste la règle en présence de la sous-phase, la partie supérieure du ménisque excédant de 1mm le rebord du bain.

3.1.D_ Flotteur de mica

Dimension : 12.7 x 0.6 cm. Il est relié aux parois du bain par de minces feuilles de Teflon (0.075 x 1 x 5 cm, Fluoro-carbon Dilectrix Division, Lockport, NY) et maintenue en place par de la cire. Il possède deux trous (1 mm de diamètre) pouvant recevoir les dents de la fourchette terminant la partie verticale du balancier.

Enfin, la forme demi-cercle des feuilles de Teflon est imposée afin de permettre le libre mouvement du flotteur lors de son déplacement.

3.1.E_ Balancier

Il est constitué de tiges de métal soudées les unes aux autres. Il est fixé sur le fil de torsion au moyen d'une vis et son extrémité verticale est terminée par une fourchette qui s'introduit dans le flotteur. Le mouvement de ce flotteur est par conséquent communiqué à l'ensemble du balancier.

Le bras horizontal porte un plateau sur lequel on dépose les poids servant à calibrer l'appareil de mesure.

3.1.F Note sur la pression de surface

Tous les liquides possèdent une tension superficielle (Y_0) caractéristique. Par la méthode du capillaire, l'eau a une tension superficielle égale à 72.78 mNm^{-1} , à 20°C . Tout dépôt de matières insolubles à l'interface air-eau modifie la valeur Y_0 de l'eau. Langmuir a établi un système de mesure permettant de mesurer la différence de tension superficielle entre une étendue d'eau propre (exempte de toutes molécules surfactantes) et une autre où l'on dépose les molécules étudiées (ex.: Chla).

L'enregistrement du déplacement du flotteur (rélié au fil de torsion) permet de mesurer une différence de tension superficielle entre les deux étendues d'eau qui est à l'origine de la force mesurée par le système de Langmuir.

Soit la relation :

$$\pi = Y_0 - Y \quad (\text{unité : } \text{mNm}^{-1}) \quad (3)$$

où π est la pression de surface, Y_0 la tension superficielle de l'eau pure et Y la tension superficielle de l'étendue d'eau à la surface de laquelle un film monomoléculaire a été déposé.

3.2_ Système de refroidissement

Chaque mesure spectroscopique fut réalisée en plaçant l'échantillon dans un cryostat de marque "Oxford Instrument" de modèle CF 204. Cet appareil est représenté à la figure 15. Il est équipé d'un contrôleur de température, soit le DTC-2.

Le cryostat à flux continu (CFC) opère sur le principe d'un transfert continu et contrôlé du réfrigérant (azote liquide) contenu dans un réservoir, vers un vide isolé, protégé des radiations et vers le compartiment à échantillon. La température de l'échantillon peut être maintenue à une certaine température à l'intérieur d'une gamme connue du CFC, en contrôlant le flux du réfrigérant et la puissance de l'appareil électrique de chauffage relié à un débiteur de chaleur (figure 16).

Le flux du réfrigérant est produit en générant une différence de pression entre le réservoir à azote liquide et la ligne de retour d'azote, en utilisant une pompe débitant le flux du gaz. Le flux et la pression de la ligne de retour de l'azote sont contrôlés par un contrôleur de flux. La température est indiquée sur le contrôleur de température et est normalement mesurée par un thermocouple relié au débiteur de chaleur. L'obtention d'une basse température et la consommation de l'azote liquide dépend de plusieurs facteurs tels que fuite de chaleur dans la ligne de transfert, perte du vide à l'intérieur du cryostat, etc.

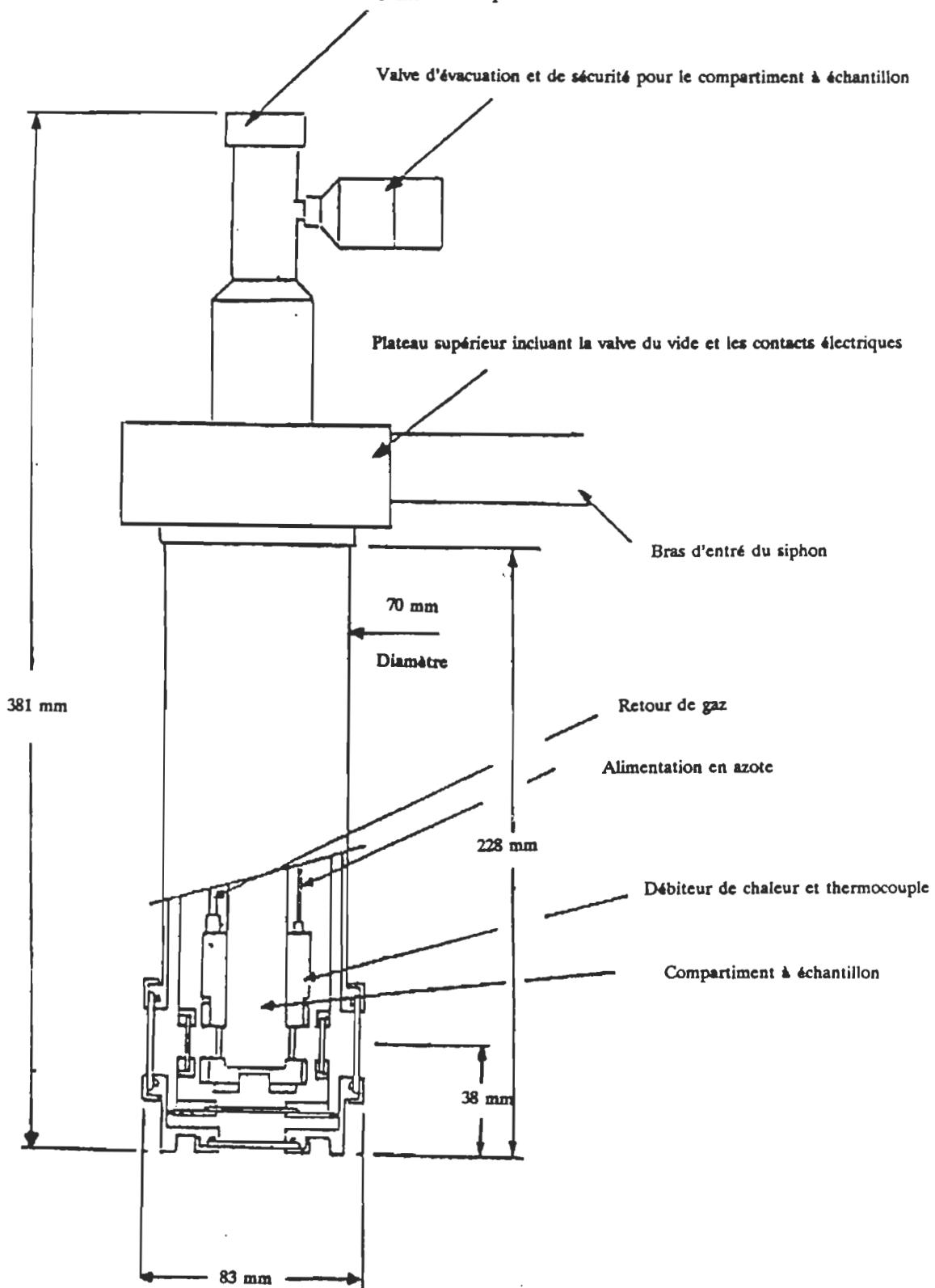


Figure 15. Schéma du cryostat.

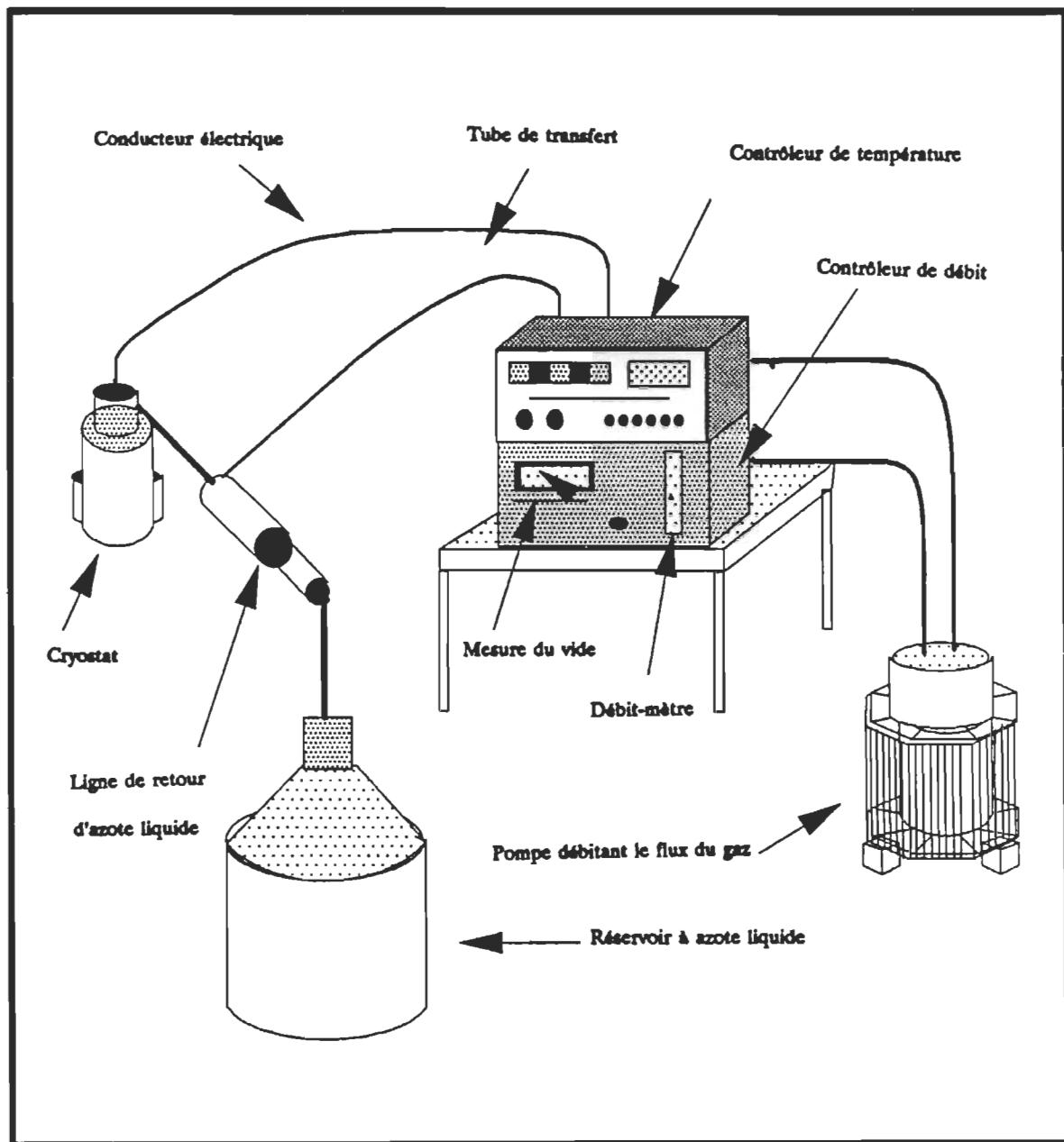


Figure 16. Système de refroidissement.

Le vide à l'intérieur du cryostat fut obtenu grâce à une pompe de type cryogénique soit la "CTI Cryogenics, Cryotorr-7" (pression limite 10^{-6} Torr), ou par utilisation d'une pompe mécanique de type turbomoléculaire soit la "DRYTEL-30" (pression limite 10^{-5} Torr) de la compagnie Alcatel.

L'étude des échantillons sous un milieu humide fut réalisée en faisant passer un gaz d'humidité relative supérieure à 90% dans le compartiment à échantillon. Pour ce qui est des essais sous atmosphère sec, le gaz fut introduit à travers du chlorure de calcium anhydre, afin d'enlever toute trace d'humidité avant de pénétrer autour de l'échantillon. Les gaz utilisés furent l'azote, l'hélium et l'argon, tous de la meilleure qualité. Tous trois proviennent de la compagnie Air liquide Ltée. Ces gaz ont été choisis pour leurs inerties vis-à-vis les molécules de Chla.

Lors de la descente de température, tout flux de gaz humide ou sec fut arrêté à la température d'environ 15°C. Il fut redémarré à la même température au moment du réchauffement de l'échantillon (retour à la température ambiante). Cette manipulation visait à prévenir toute condensation excessive de molécules d'eau et d'oxygène venant possiblement de l'air atmosphérique et cela, lors du changement brusque de température. Bien que le système soit étanche la probabilité d'entrée d'air extérieur est non nulle.

3.3_ Spectrophotomètre d'absorption

Les spectres électroniques furent enregistrés par utilisation du spectrophotomètre UV-VIS "Cary 17-D", double faisceau, de la compagnie Varian Instrument Division. Toute valeur d'absorption fut enregistrée et traitée par ordinateur.

Afin d'éliminer toutes altérations des spectres causés par des phénomènes de dispersion due à des échantillons absorbant fortement, les lames furent positionnées perpendiculairement au faisceau lumineux incident⁽⁷⁾. Le domaine de longueur d'onde balayé était compris entre 360 et 780 nm. L'échelle d'absorption était fixée à 0.02 d'absorbance. Enfin 4 lames de quartz propres représentant les fenêtres du cryostat agissaient comme référence. Pour ce qui est de la ligne de base, une lame de quartz provenant du même lot que celle de l'échantillon était analysée et enregistrée sous forme de fichier informatique. Tenant compte de l'absorption ou de la diffusion de la lame de quartz, elle servait à la correction des valeurs d'absorption de chacune des monocouches.

3.4_ Spectrofluorimètre

L'appareil utilisé pour obtenir les spectres d'émission de fluorescence fut le "Spex Fluorolog II" simple faisceau, équipé d'un "Datamate DM1" accessoire (système d'acquisition des données). Le schéma optique du spectrofluorimètre est représenté à la figure 17. La calibration des longueurs d'ondes des monochromateurs d'excitation et

d'émission fut accomplie à l'aide d'une lampe à vapeur de mercure. Pour ce qui est de la calibration de la sensibilité spectrale de l'appareil entre 600 et 800 nm, la lampe standard "Optronic Laboratories" modèle 220-M fut employée.

Le faisceau de lumière d'excitation provient d'une lampe au Xénon. La détection de l'émission se fait grâce à l'utilisation d'un photomultiplicateur. Ce dernier contenu dans un tube où il existe un vide poussé, comprend une surface sensible à la lumière, appelée photocathode. Cette photocathode transforme le flux de photons en un flux d'électrons, qui est par la suite amplifié en un courant électrique grâce à une série de dynodes. Ce courant est finalement collecté à une anode à l'intérieur du phototube. Un haut voltage résulte en un nombre accru d'électrons éjectés de chaque dynode, et donc d'une amplification supérieure.

Toute émission de fluorescence fut enregistrée à un angle de 90° entre le faisceau de lumière incident et l'axe de détection (en tenant compte que l'échantillon sur la lamelle était lui orienté à 45° par rapport au faisceau incident). L'intensité de fluorescence de chaque spectre représente une valeur relative par unité d'intervalle de longueur d'onde. L'excitation des molécules de Chla fut réalisée à une longueur d'onde variant entre 436 et 440 nm (au maximum d'émission). L'émission, quant à elle fut balayée dans le domaine spectral compris entre 600 à 800 nm.

Un polariseur a été placé devant le faisceau de détection avec un plan de polarisation horizontal afin d'éliminer l'influence de l'anomalie de Wood⁽⁷⁸⁾. Un filtre

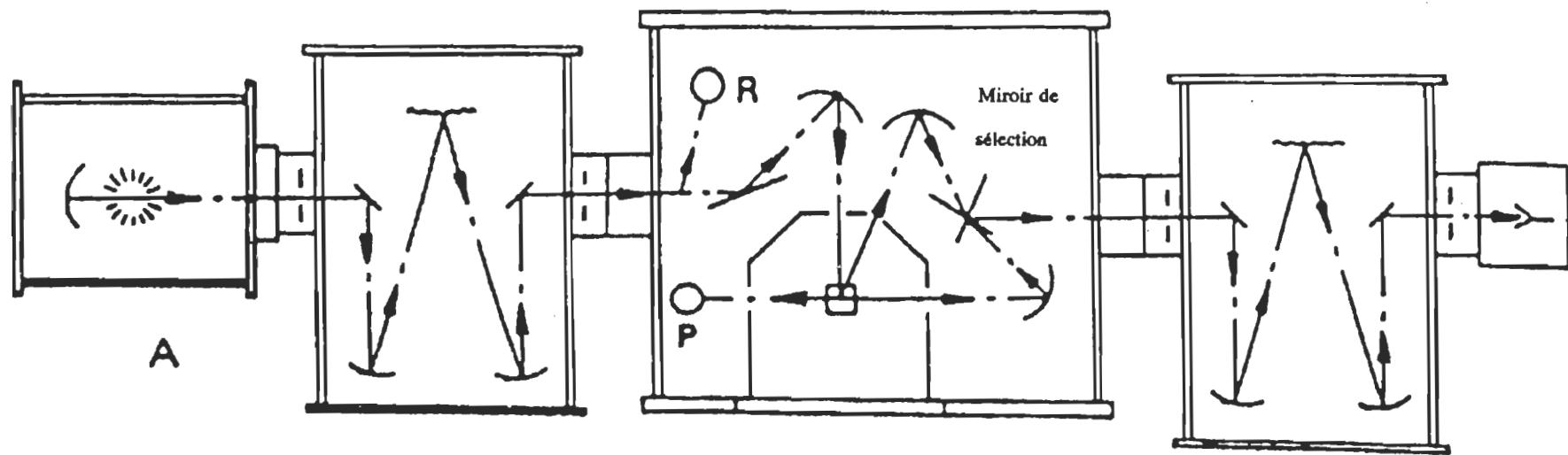


Figure 17. Montage du système optique du spectrofluorimètre "Spex fluorolog II"

laissant passer les longueurs d'onde plus élevées que 550 nm fut utilisé pour couper toute lumière pouvant nuire à l'émission entre 600 nm et plus.

Finalement, chaque spectre d'émission de fluorescence fut corrigé par rapport à la sensibilité spectrale du photomultiplicateur et des monochromateurs aussi bien que de la variation dans la sortie de la source lumineuse. Ce facteur de correction tient compte du monochromateur d'émission, qui ne laisse pas passer toutes les longueurs d'onde de la même façon, des miroirs du système optique qui ne réfléchissent pas tous les faisceaux d'une façon identique et finalement, du photomultiplicateur, qui ne détecte pas chaque longueur d'onde d'émission de manière constante.

4- RESULTATS

Dans ce présent travail les films monomoléculaires de Chla pure ont été analysés par spectroscopie d'absorption et d'émission de fluorescence.

Ces monocouches de Chla ont été soumises à deux types de facteurs physiques importants : l'effet de l'eau et de la température. Trois atmosphères gazeux comprenant l'azote, l'hélium et l'argon furent utilisés pour créer un milieu humide ou sec autour de la monocouche sous étude. Au total, pour chaque atmosphère gazeux, cinq essais en milieu sec et cinq essais en milieu humide sont rapportés dans ce travail. Seule les monocouches de Chla ayant un rapport de déposition de 1.0 ± 0.3 sont analysées.

L'interprétation de l'ensemble des données obtenues est divisée en deux parties distinctes concernant l'absorption et l'émission de fluorescence. Une troisième partie s'ajoute. Elle correspond au calcul des températures effectives nécessaire à l'évaluation de l'équilibre thermique de l'énergie d'excitation permettant de relier les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence dans un milieu solide.

4.1 Interprétation des spectres d'absorption

Les données d'absorption des monocouches de Chla sont présentées dans les tableaux 1 à 8. Les tableaux 1 à 4 représentent un exemple parmi chaque atmosphère investiguée. Ceci a été fait dans le but d'éviter toute confusion due au nombre considérable de données et de permettre une meilleure comparaison entre les essais

réalisés sous différentes atmosphères. Les tableaux 5 à 8 concernent les valeurs moyennes des bandes principales pour chaque milieu utilisé et à une température expérimentale donnée.

Il est à noter qu'aucun résultat sous atmosphère d'argon en milieu sec ou humide n'est présenté dans les tableaux concernant l'absorption. Deux essais en milieu argon sec furent réalisés durant la période d'expérimentation et ont démontré des résultats identiques (au niveau des maximums et de l'allure des bandes) à ceux obtenus en milieu azote et hélium. Aucune données supplémentaires n'a pu être obtenues dans cet atmosphère gazeux pour la simple raison que la cryostat avait une fuite du vide au niveau d'une de ses trois fenêtres. Ceci nous a donc obligé à n'utiliser que deux fenêtres sur trois et à faire un compromis entre leur alignement linéaire (absorption) ou perpendiculaire (fluorescence). Nous basant sur les résultats précédents des milieux azote et hélium (sec ou humide) ainsi que sur les quelques spectres d'absorption obtenus sous atmosphère d'argon, nous avons préféré concentrer nos mesures au niveau de l'émission de fluorescence, beaucoup plus informative. Nous avons donc fait l'hypothèse que les monocouches de Chla en milieu argon n'apporteraient aucune information nouvelle en absorption.

Si on aborde les résultats des spectres électroniques, l'examen de chaque monocouche, prise individuellement, ne révèle que de très faibles variations en fonction de la température (figures 18 à 21). En réalité, par une vue d'ensemble de chaque atmosphère, humide ou sec, le positions de maximums Soret et Rouge sont les mêmes à quelques nanomètres près (tableaux 1 à 8). L'allure spectrale est conservée d'un

Tableau 1

Spectres d'absorption d'une monocouche
de Chla (2x1Mnc) sous atmosphère d'azote sec (17).
RD = 1.01 ± 0.3 (± 0.5 nm)

Température (K)	Bande de Soret		Bande Rouge	
	Maximum (nm)	Intensité (x 0.01)	Maximum (nm)	Intensité (x 0.01)
303.1	439.0	2.52	678.0	1.79
227.9	439.0	2.51	680.0	1.89
155.6	439.0	2.50	677.0	1.95
84.9*	439.0	2.59	677.0	2.03
156.5*	439.0	2.74	679.0	2.15
228.2*	436.0	2.47	677.0	1.84
301.9	439.0	2.49	678.0	1.76

Tableau 2

Spectres d'absorption d'une monocouche
de Chla (2x1Mnc) sous atmosphère d'azote humide (23).
RD = 0.99 ± 0.3 (± 0.5 nm)

Température (K)	Bande de Soret		Bande Rouge	
	Maximum (nm)	Intensité (x 0.01)	Maximum (nm)	Intensité (x 0.01)
301.8	440.0	2.29	678.0	1.69
226.8	440.0	2.40	678.0	1.84
155.5	439.0	2.40	677.0	1.89
84.8*	440.0	2.24	678.0	1.87
156.3*	440.0	2.11	677.0	1.79
228.0*	440.0	2.39	677.0	1.77
301.9	440.0	1.99	677.0	1.35

(* : retour à la température ambiante)

Tableau 3

Spectres d'absorption d'une monocouche
de Chl_a (2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium sec (35).
RD = 1.14 ± 0.3 (± 0.5 nm)

Température (K)	Bande de Soret		Bande Rouge	
	Maximum (nm)	Intensité (x 0.01)	Maximum (nm)	Intensité (x 0.01)
302.0	437.0	2.59	678.0	1.81
227.8	437.0	2.64	677.0	1.96
155.4	437.0	2.76	677.0	2.11
84.7*	438.0	2.73	680.0	2.12
155.5*	437.0	2.63	677.0	2.03
228.5*	437.0	2.56	677.0	1.84
301.4	437.0	2.51	677.0	1.71

Tableau 4

Spectres d'absorption d'une monocouche
de Chl_a (2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium humide (28).
RD = 0.99 ± 0.3 (± 0.5 nm)

Température (K)	Bande de Soret		Bande Rouge	
	Maximum (nm)	Intensité (x 0.01)	Maximum (nm)	Intensité (x 0.01)
302.1	440.0	2.37	681.0	1.87
227.6	439.0	2.39	681.0	1.98
155.1	440.0	2.52	681.0	2.06
84.9	440.0	2.65	681.0	2.15
155.7*	440.0	2.69	678.0	2.21
227.4*	438.0	2.52	678.0	2.00
301.2*	439.0	2.30	681.0	1.78

(* : retour à la température ambiante)

Tableau 5

Valeurs moyennes des maximums d'absorption pour les monocouches de Chl_a (2x1Mnc) sous atmosphère d'azote sec.

Température (K)	Bandé de Soret (nm)	Bandé Rouge (nm)
300	438.8 ± 0.8	678.4 ± 0.5
228	438.6 ± 0.5	678.2 ± 1.3
156	438.4 ± 1.1	677.6 ± 0.9
85	438.2 ± 0.8	677.4 ± 1.5

Tableau 6

Valeurs moyennes des maximums d'absorption pour les monocouches de Chl_a (2x1Mnc) sous atmosphère d'azote humide.

Température (K)	Bandé de Soret (nm)	Bandé Rouge (nm)
300	439.2 ± 0.4	677.8 ± 1.3
228	438.6 ± 1.3	676.8 ± 1.1
156	438.4 ± 1.1	676.4 ± 1.1
85	438.8 ± 1.1	677.0 ± 1.0

Tableau 7

Valeurs moyennes des maximums d'absorption pour les monocouches de Chl_a (2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium sec.

Température (K)	Bandé de Soret (nm)	Bandé Rouge (nm)
300	437.8 ± 1.1	678.8 ± 0.8
228	438.0 ± 0.7	678.0 ± 0.7
156	438.0 ± 1.0	677.4 ± 0.5
85	438.6 ± 0.9	678.4 ± 1.3

Tableau 8

Valeurs moyennes des maximums d'absorption pour les monocouches de Chl_a (2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium humide.

Température (K)	Bandé de Soret (nm)	Bandé Rouge (nm)
300	439.8 ± 0.8	679.8 ± 1.1
228	438.6 ± 0.9	679.0 ± 1.9
156	439.0 ± 1.4	679.0 ± 2.0
85	439.4 ± 0.9	678.6 ± 1.8

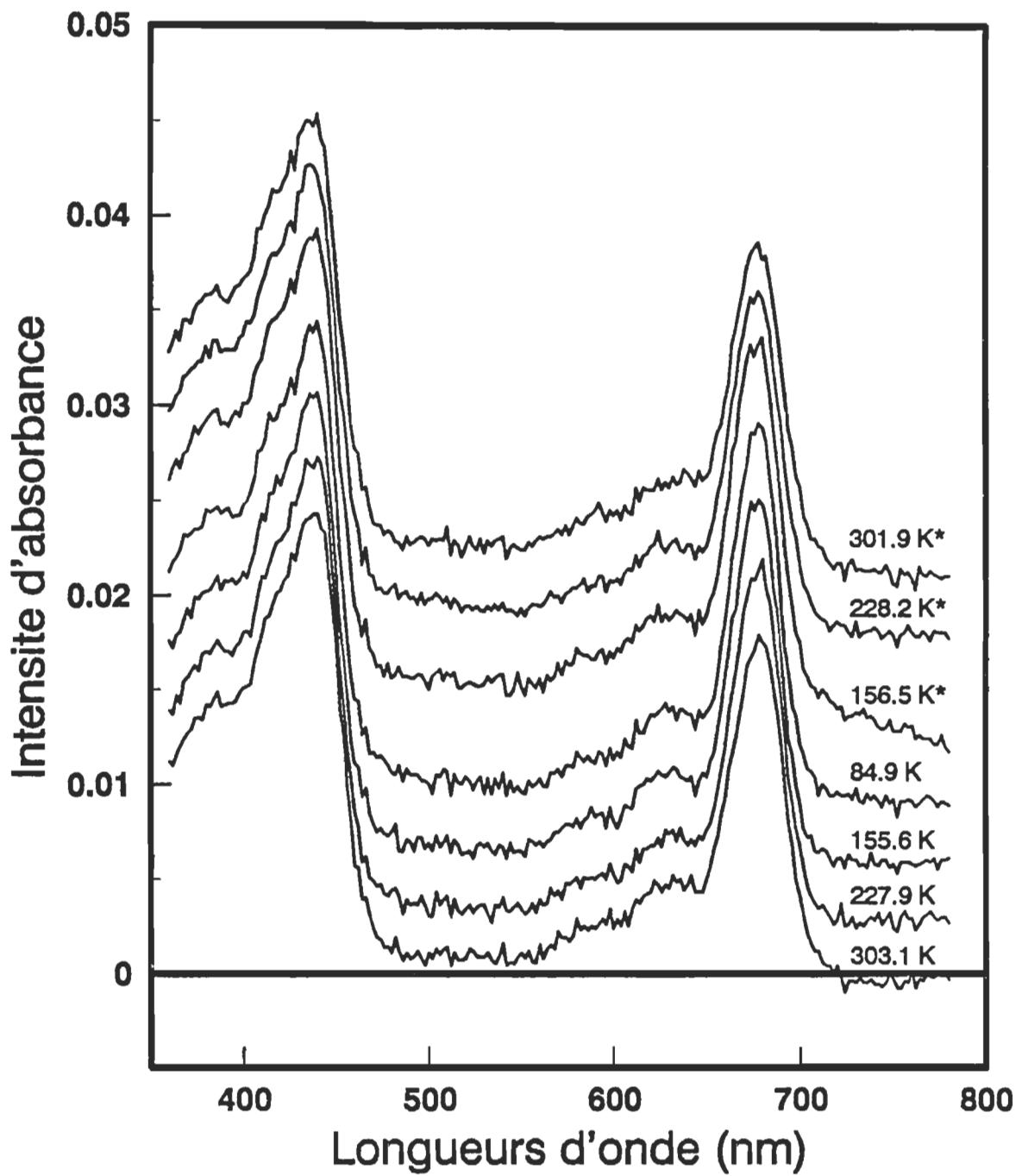


Figure 18. Spectres d'absorption d'une monocouche de Chla sous atmosphère d'azote sec (2xMnc) représentés aux différentes températures expérimentales.
(* : retour à la température ambiante)

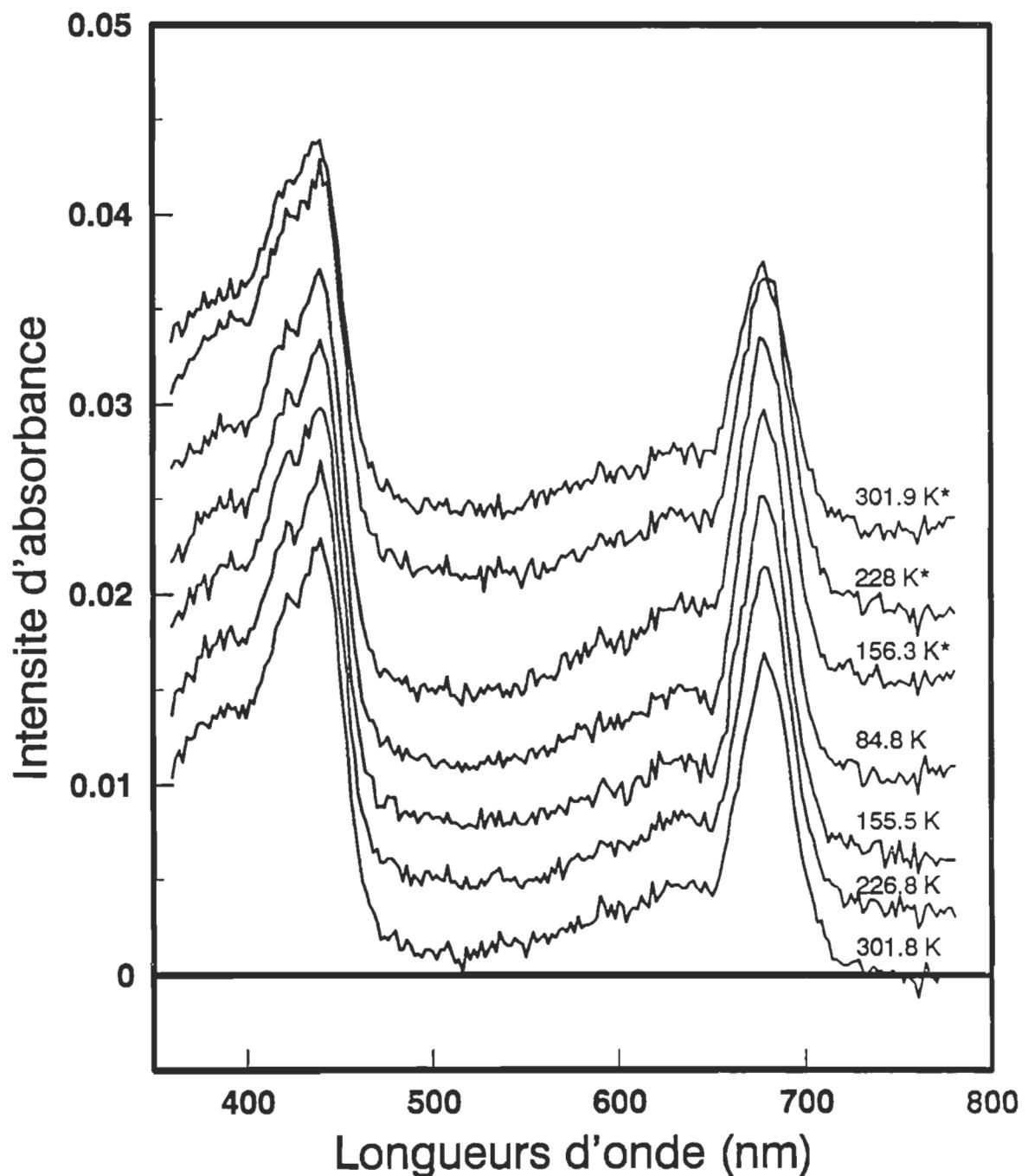


Figure 19. Spectres d'absorption d'une monocouche de Chl_a sous atmosphère d'azote humide (2xMnc) représentés aux différentes températures expérimentales. (* : retour à la température ambiante)

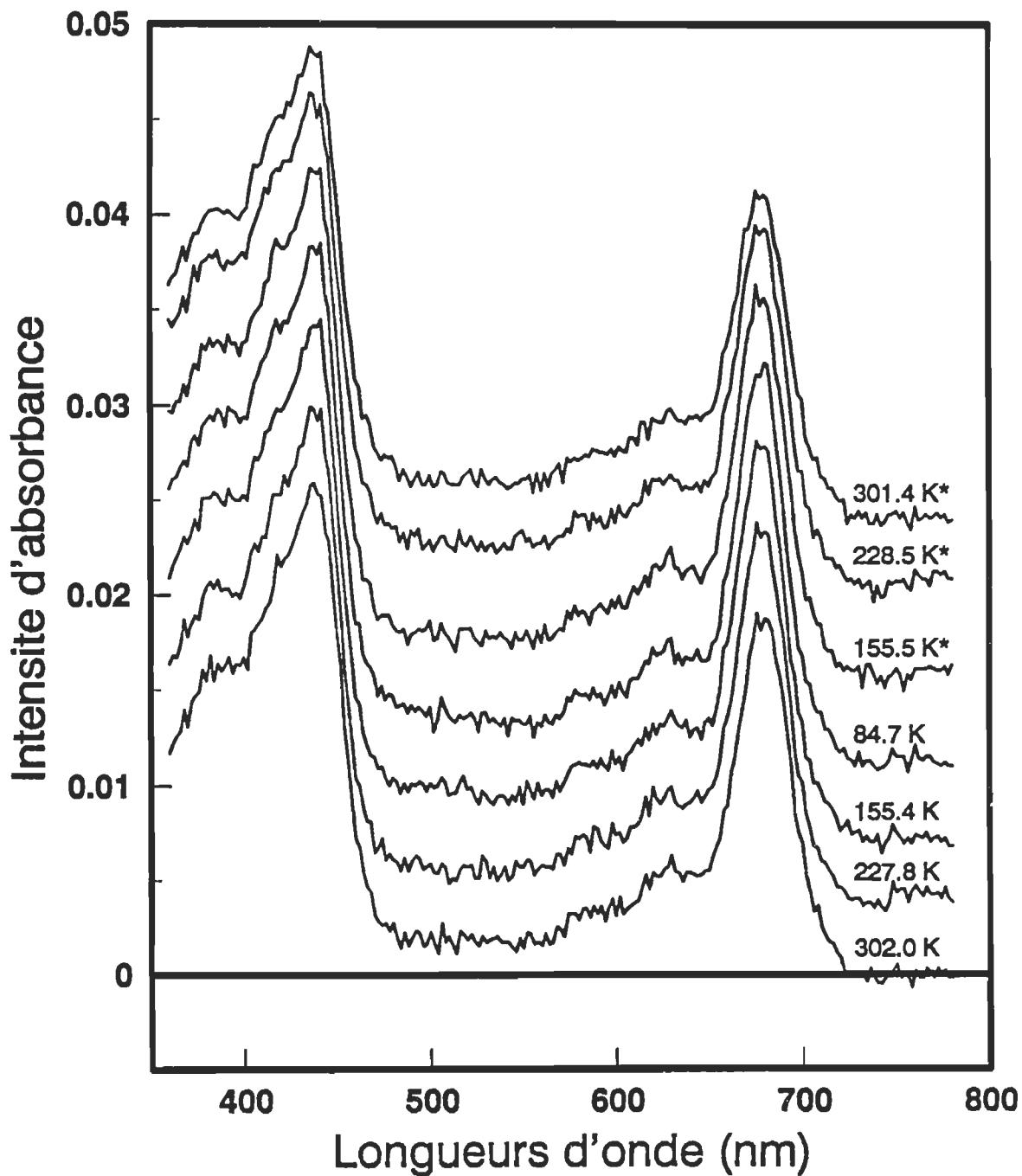


Figure 20. Spectres d'absorption d'une monocouche de Chla sous atmosphère d'hélium sec (2xMnc) représentés aux différentes températures expérimentales.
(* : retour à la température ambiante)

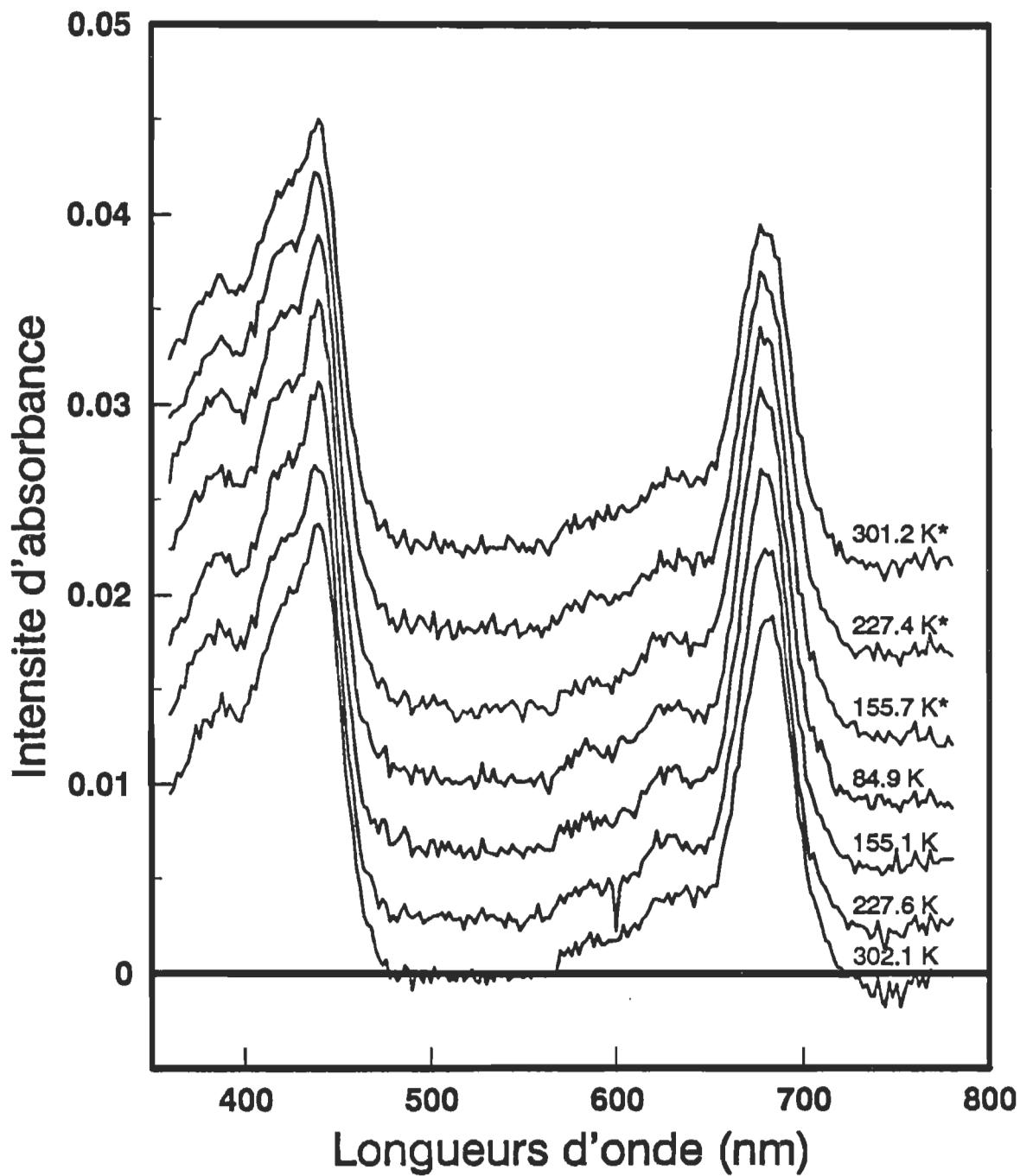


Figure 21. Spectres d'absorption d'une monocouche de Chla sous atmosphère d'hélium humide (2xMnc) représentés aux différentes températures expérimentales.
(* : retour à la température ambiante)

échantillon à l'autre, de la température ambiante à la basse température. Notez que les résultats d'absorption ont été décalés afin de mieux percevoir les détails mineurs existants aux différentes températures. La représentation de l'échelle de l'intensité d'absorbance correspond au résultat obtenu pour la monocouche à 300 K.

De façon général, toute monocouche à basse température voit son intensité d'absorption augmentée à chacun de ses maximums. Au niveau de la bande Rouge, dont l'augmentation est plus forte, elle est compensée par une largeur de bande plus étroite que celle obtenue à la température ambiante (figure 22). Cela correspond très bien avec la littérature⁽⁸³⁾ ainsi qu'avec d'autres études du films Langmuir-Blodgett déjà publiées^(8,71). Tout comme ces études, cette augmentation, bien que faible, ne dépend pas de la polarisation d'une transition électronique donnée. Elle n'est donc pas due à un réarrangement structural dans la monocouche, mais reflète seulement l'effet de la température sur la probabilité des transitions électroniques vibrationnelles⁽⁷¹⁾.

Afin d'appuyer ce qui est constaté ci-haut, la largeur de bande à la demi-hauteur du maximum de la bande Rouge a été mesurée pour les différents milieux gazeux. Ces valeurs sont présentées dans le tableau 9. Encore une fois il existe très peu de différences entre les atmosphères azote et hélium de même qu'en milieu sec ou humide. Nos valeurs se situant entre 30 et 35 nm sont similaires à celles obtenues dans les monocouches de Chla pure de André Désormeaux⁽⁸⁶⁾. Ce dernier mentionnait des valeurs comprises entre 32.13 et 37.41 nm. Par contre, cette bande rouge non-symétrique est plus large que les valeurs obtenues dans les multicouches de Chla⁽⁷¹⁾.

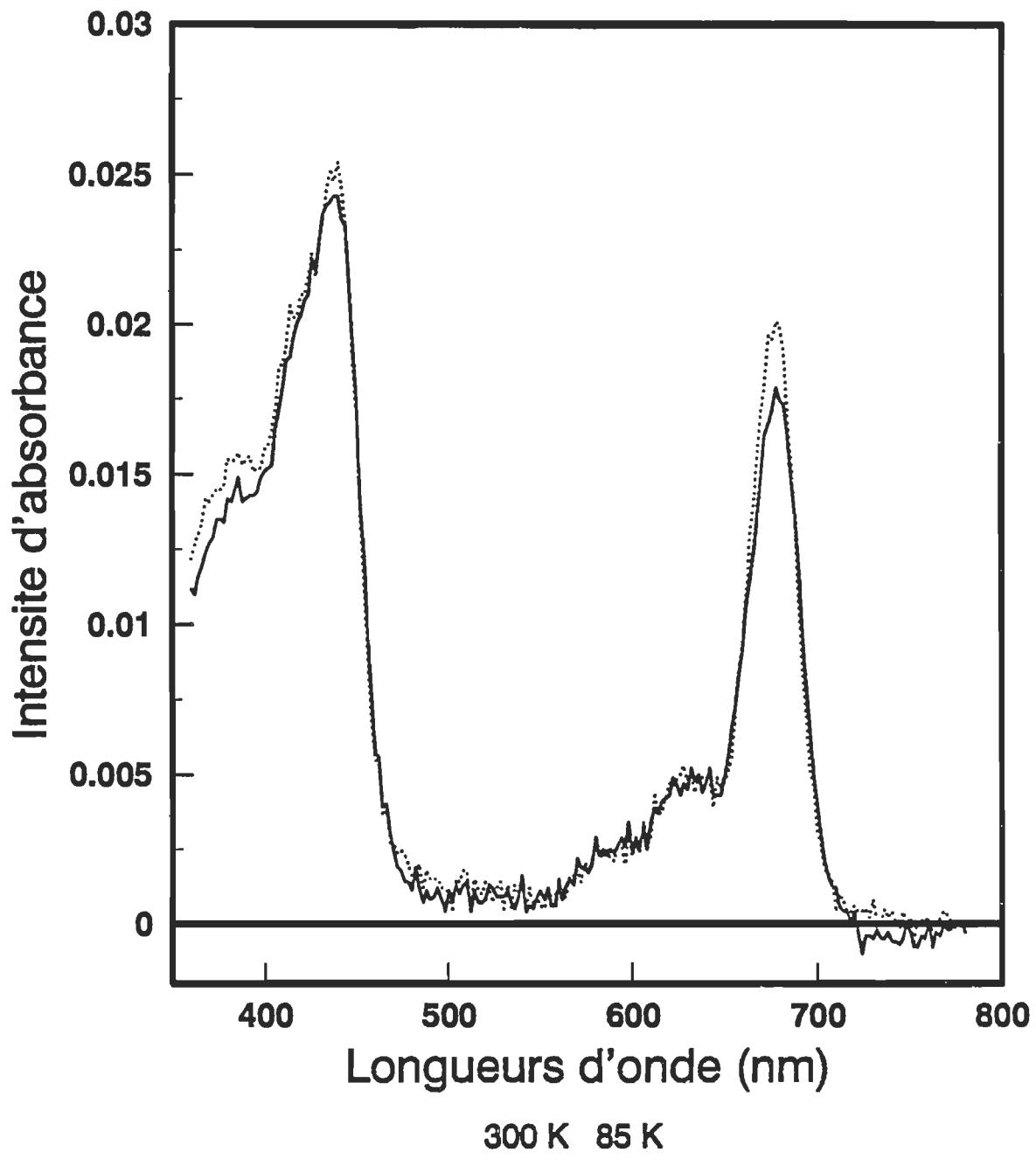


Figure 22. Comparaison des spectres d'absorption pour une monocouche de Chla (2xMnc) obtenus à la température initiale de départ (300 K) et à basse température (85 K). Atmosphère : azote sec.

Tableau 9

Valeurs moyennes des largeurs de bandes à la demi-hauteur pour la bande Rouge des monocouches de Chla (2x1Mnc) aux différents atmosphères.

Température (K)	Azote sec (nm)	Azote humide (nm)	Hélium sec (nm)	Hélium humide (nm)
300	34 ± 1	35 ± 2	35 ± 2	34 ± 1
228	32 ± 2	33 ± 3	33 ± 3	33 ± 1
156	32 ± 1	33 ± 2	32 ± 1	31 ± 1
85	30 ± 1	31 ± 1	31 ± 1	31 ± 1
156 [*]	33 ± 1	31 ± 2	32 ± 3	32 ± 1
228 [*]	33 ± 2	33 ± 1	33 ± 2	33 ± 1
300 [*]	34 ± 1	34 ± 2	35 ± 3	34 ± 1

(* : retour à la température ambiante)

ayant 24 à 28 nm en largeur, et elle représente plus du double les valeurs recueillies dans le cas des solvants polaires⁽⁵⁸⁾.

Cette bande rouge est très importante puisque sa largeur de bande est directement reliée à l'état d'agrégation. Elle est l'indication d'interaction intermoléculaire survenant dans nos monocouches. Non seulement la largeur de bande nous le confirme, mais par comparaison aux solutions de Chla dans les solvants polaires, le maximum d'absorption dans le rouge est déplacé vers les hautes longueurs d'onde par rapport à la forme monomérique rencontrée en solution. Il passe de 667 nm en solution, à 678 nm pour les monocouches de Chla et à 680 nm pour les multicouches (films compacts et condensés). De plus, comme nous le verrons plus loin, les données d'émission de fluorescence appuient cette affirmation puisqu'un déplacement de Stokes de 25 nm pour les monocouches est enregistré par rapport à 7.5 nm pour la forme monomérique en solution⁽⁷⁹⁾. Similairement dans les multicouches hydratées⁽⁷¹⁾ on observaient un déplacement de 60 nm, indiquant la présence d'agrégats de molécules de Chla dans le système.

D'ailleurs la nature composite des films Langmuir-Blodgett fut clairement analysée dans les multicouches de Chla de Krawczyk *et al.*⁽⁷¹⁾. De cette étude une bande large, mais de faible intensité apparaissait en absorption à 710 nm à basse température. On attribuait cette bande de hautes longueurs d'onde à une série de bandes étalées sur un domaine de longueur d'onde. Ceci était principalement confirmé en fluorescence où, par diminution de température, le déplacement du maximum de fluorescence de 740

à 760 nm n'était pas accompagné de structure vibrationnelle dans les bandes.

Dans le cas des présentes monocouches de Chla, aucune bande d'absorption supérieure à 680 nm n'est perçue par refroidissement à 85 K. L'effet de l'eau semble masqué puisqu'il n'existe aucune différence entre les essais humide et sec si l'on compare aux multicouches. Ceci fait référence aux tableaux 1 à 9 où de faibles variations existent entre les échantillons. De plus, ces différences minimes sont comparables à l'incertitude expérimentale causée par le bruit de fond important dans les spectres électroniques des monocouches de Chla et rendant difficile un positionnement précis des maximums Soret et Rouge.

Finalement le tableau 10 résume les rapports d'intensité des maximums Soret / Rouge. Ces derniers corroborent très bien ceux obtenus par André Désormeaux⁽⁸⁶⁾ qui, à la température ambiante, observait des rapports variant de 1.33 à 1.45. Dans notre cas nos résultats sont compris entre 1.32 et 1.44 à la température ambiante et entre 1.24 et 1.34 à basse température. Ces valeurs indiquent, tel que mentionné précédemment, que par diminution de température, l'intensité de la bande Rouge augmente par rapport à la bande de Soret.

4.2 Interprétation des spectres d'émission de fluorescence

Alors que les spectres électroniques des monocouches de Chla ne démontrent aucune variation spectrale favorisant une espèce agrégée par rapport à une autre, aux

Tableau 10

Valeurs moyennes des rapports d'intensité des bandes Soret/Rouge pour les monocouches de Chla (2x1Mnc) aux différents atmosphères.

Température (K)	Azote sec	Azote humide	Hélium sec	Hélium humide
300	1.34 ± 0.05	1.44 ± 0.06	1.42 ± 0.09	1.32 ± 0.05
228	1.30 ± 0.06	1.38 ± 0.09	1.34 ± 0.09	1.27 ± 0.08
156	1.27 ± 0.02	1.34 ± 0.09	1.31 ± 0.09	1.24 ± 0.05
85	1.26 ± 0.03	1.34 ± 0.09	1.28 ± 0.06	1.24 ± 0.06
156 [*]	1.33 ± 0.05	1.41 ± 0.17	1.33 ± 0.13	1.35 ± 0.18
228 [*]	1.35 ± 0.03	1.37 ± 0.10	1.36 ± 0.13	1.30 ± 0.05
300 [*]	1.37 ± 0.05	1.42 ± 0.23	1.41 ± 0.08	1.37 ± 0.10

(* : retour à la température ambiante)

différentes températures ainsi qu'aux différents atmosphères gazeux (sec ou humide), cela n'est point le cas en fluorescence. L'émission de fluorescence de nos monocouches montrent des différences considérables au niveau des principaux maximums ainsi que dans la largeur et proportion de certaines bandes en fonction de la température.

Ceci pourrait porter à confusion et conclure à certains artefacts expérimentaux. Par contre, par examen attentif des données expérimentales (voir tableaux 11 à 16 et les figures 23 à 34) on remarquera que l'ensemble des propriétés d'émission des monocouches de Chla est réversible. Le même phénomène est observé en absorption pour certaines monocouches mais des problèmes de bruit de fond et de diffusion viennent perturber la majorité des essais amenant donc des fluctuations dans leur réversibilité.

DU au nombre important de données expérimentales recueillies en fluorescence, nous n'entrerons pas dans une description qualitative de chaque essai pris individuellement. Il existe plutôt un patron spectral général respecté à divers degré par chaque monocouche. Nous allons donc examiner les détails mineurs et majeurs caractérisant chaque série d'échantillons pour une atmosphère donnée. Il faut mentionner que chaque spectre a été normalisé au maximum de la bande principale pour fin de comparaison. Tout comme les figures en absorption, les spectres des échantillons ont été décalés afin de mieux percevoir les détails existants aux différentes températures. La représentation de l'échelle de l'intensité relative de fluorescence correspond au résultat obtenu à 300 K.

Tableau 11

Spectres d'émission de fluorescence d'une monocouche de Chla
(2x1Mnc) sous atmosphère d'azote sec (17). (± 0.5 nm)

Température (K)	Excitation (nm)	Emission (nm)	Intensité d'émission (x 100)	Type de bande
303.1	438.0	696.0	6.9118	p
		738.0	5.1766	
228.1	438.0	698.0	13.121	p
		752.0	13.790	
156.1	438.0	698.0	10.200	e
		750.0	14.308	
85.2	438.0	700.0	10.464	e
		732.0	13.590	
155.3 [*]	438.0	698.0	7.8923	e
		750.0	10.999	
228.2 [*]	438.0	696.0	7.1197	p
		752.0	7.1700	
301.1 [*]	438.0	694.0	4.8819	p
		762.0	4.2154	

() numéro de l'échantillon

(* : retour à la température ambiante)

p : principale

s : satellite

e : épaulement

Tableau 12

Spectres d'émission de fluorescence d'une monocouche de Chla
(2x1Mnc) sous atmosphère d'azote humide (23). (± 0.5 nm)

Température (K)	Excitation (nm)	Emission (nm)	Intensité d'émission (x 100)	Type de bande
301.8	438.0	700.0	94.273	p
		744.0	54.678	s
227.5	438.0	706.0	108.67	p
		752.0	95.329	s
155.6	438.0	702.0	132.22	e
		742.0	185.48	p
85.8	438.0	708.0	151.17	e
		734.0	206.99	p
155.2 [*]	438.0	704.0	136.61	e
		742.0	190.90	p
228.0 [*]	438.0	706.0	94.840	p
		756.0	82.528	s
302.2 [*]	438.0	700.0	71.479	p
		758.0	42.887	s

() numéro de l'échantillon

(* : retour à la température ambiante)

p : principale

s : satellite

e : épaulement

Tableau 13

Spectres d'émission de fluorescence d'une monocouche de Chla
(2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium sec (35). (± 0.5 nm)

Température (K)	Excitation (nm)	Emission (nm)	Intensité d'émission (x 100)	Type de bande
301.9	436.0	698.0	55.514	p
		754.0	29.145	s
228.7	436.0	702.0	72.479	p
		762.0	52.886	s
156.3	436.0	694.0	64.431	e
		716.0	81.768	p
		758.0	69.573	s
85.6	436.0	694.0	58.145	e
		716.0	85.528	p
155.5 [*]	436.0	694.0	61.677	e
		714.0	75.962	p
		758.0	65.201	s
227.8 [*]	436.0	698.0	57.954	p
		758.0	42.201	s
301.3 [*]	436.0	696.0	46.720	p
		756.0	27.051	s

() numéro de l'échantillon

(* : retour à la température ambiante)

p : principale

s : satellite

e : épaulement

Tableau 14

Spectres d'émission de fluorescence d'une monocouche de Chla
(2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium humide (28). (± 0.5 nm)

Température (K)	Excitation (nm)	Emission (nm)	Intensité d'émission (x 100)	Type de bande
301.9	436.0	702.0	85.053	p
228.8	436.0	696.0	88.850	e
		712.0	105.90	p
156.2	436.0	696.0	73.639	e
		726.0	119.62	p
85.3	436.0	694.0	54.550	e
		728.0	130.16	p
156.3 [*]	436.0	696.0	56.312	e
		726.0	90.679	p
227.9 [*]	436.0	708.0	73.417	p
301.1 [*]	436.0	698.0	58.254	p
		762.0	29.127	s

() numéro de l'échantillon

(* : retour à la température ambiante)

p : principale

s : satellite

e : épaulement

Tableau 15

Spectres d'émission de fluorescence d'une monocouche de Chla
(2x1Mnc) sous atmosphère d'argon sec (52). (± 0.5 nm)

Température (K)	Excitation (nm)	Emission (nm)	Intensité d'émission (x 100)	Type de bande
302.6	438.0	700.0	85.93	p
		750.0	59.29	s
227.9	438.0	702.0	118.64	p
		742.0	110.40	s
155.8	438.0	698.0	102.13	e
		736.0	127.29	p
85.3	438.0	700.0	97.067	e
		724.0	133.87	p
155.7 [*]	438.0	696.0	81.238	e
		732.0	104.57	p
227.9 [*]	438.0	700.0	67.176	p
		744.0	57.032	s
301.0 [*]	438.0	696.0	60.415	p
		746.0	45.311	s

() numéro de l'échantillon

(* : retour à la température ambiante)

p : principale

s : satellite

e : épaulement

Tableau 16

Spectres d'émission de fluorescence d'une monocouche de Chla (2x1Mnc) sous atmosphère d'argon humide (54). (± 0.5 nm)

Température (K)	Excitation (nm)	Emission (nm)	Intensité d'émission (x 100)	Type de bande
301.0	438.0	706.0	257.58	p
227.9	438.0	710.0	361.62	p
		758.0	280.25	s
156.5	438.0	708.0	340.43	e
		736.0	430.73	p
85.3	438.0	714.0	461.47	e
		732.0	601.28	p
156.0*	438.0	714.0	333.54	e
		732.0	397.60	p
227.7*	438.0	712.0	181.72	p
		756.0	141.41	s
301.5*	438.0	706.0	169.97	p
		756.0	98.583	s

() numéro de l'échantillon

(* : retour à la température ambiante)

p : principale

s : satellite

e : épaulement

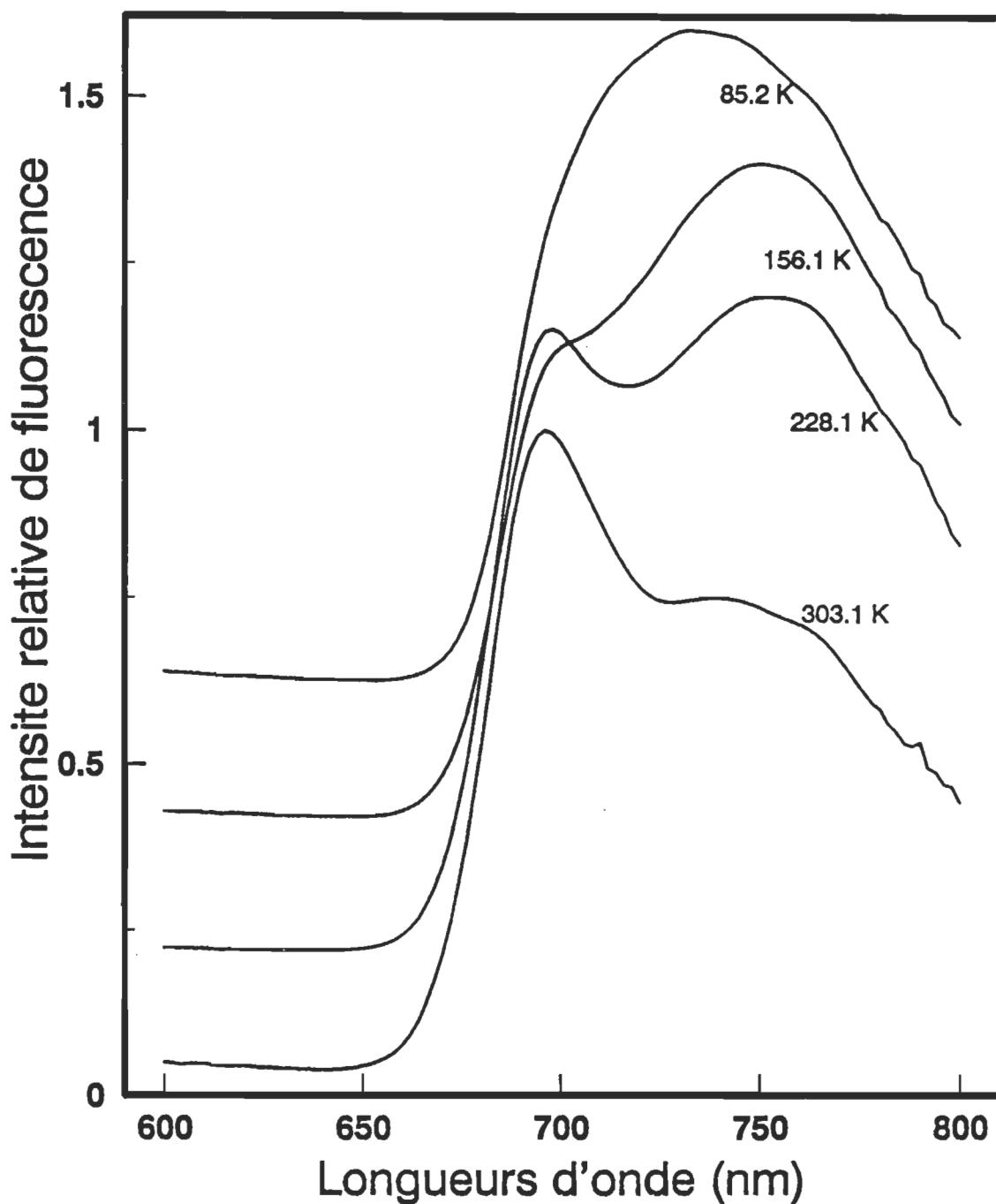


Figure 23. Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'azote sec lors du refroidissement de 300 à 85 K.

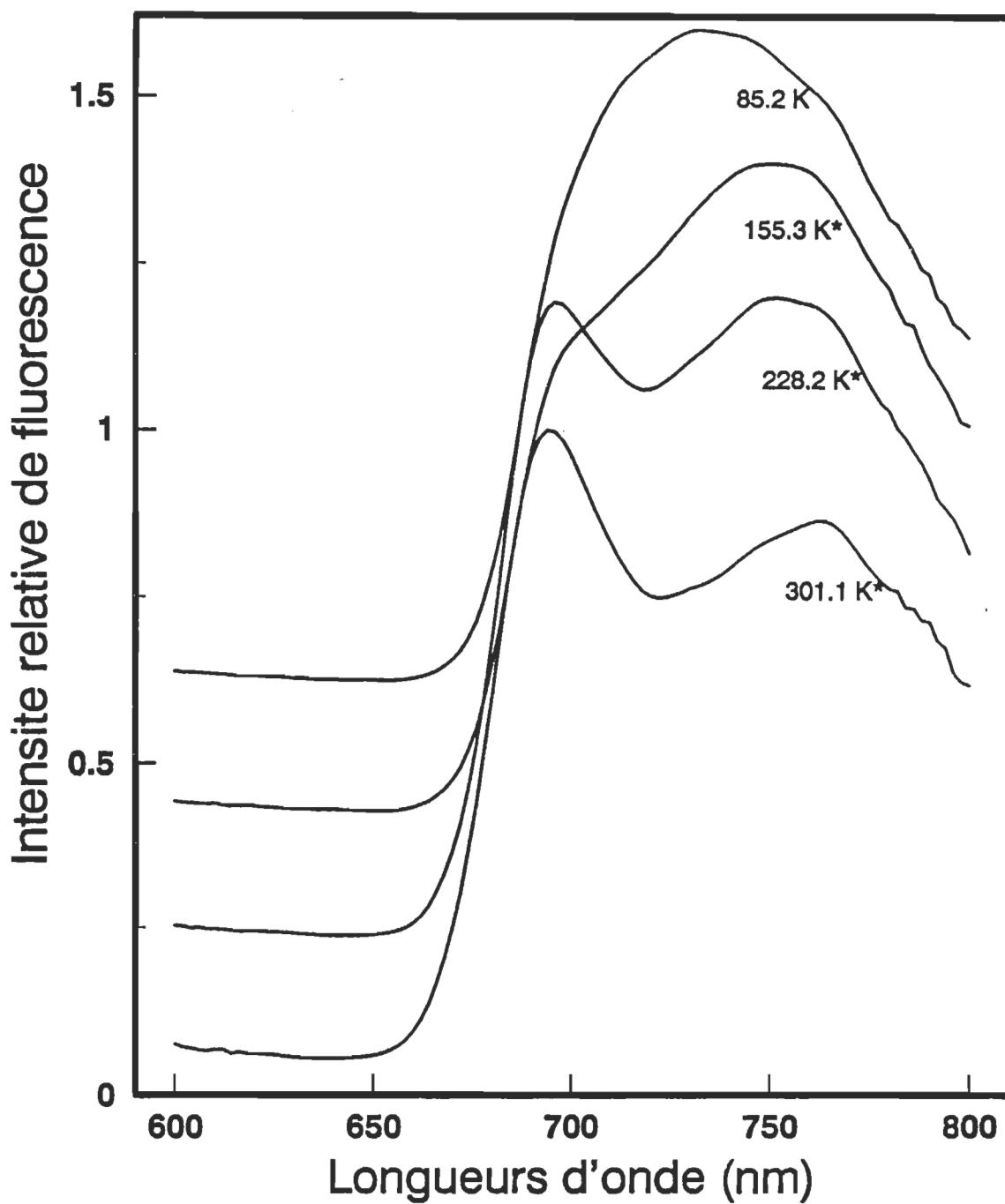


Figure 24. Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'azote sec lors du retour de 85 à 300 K.

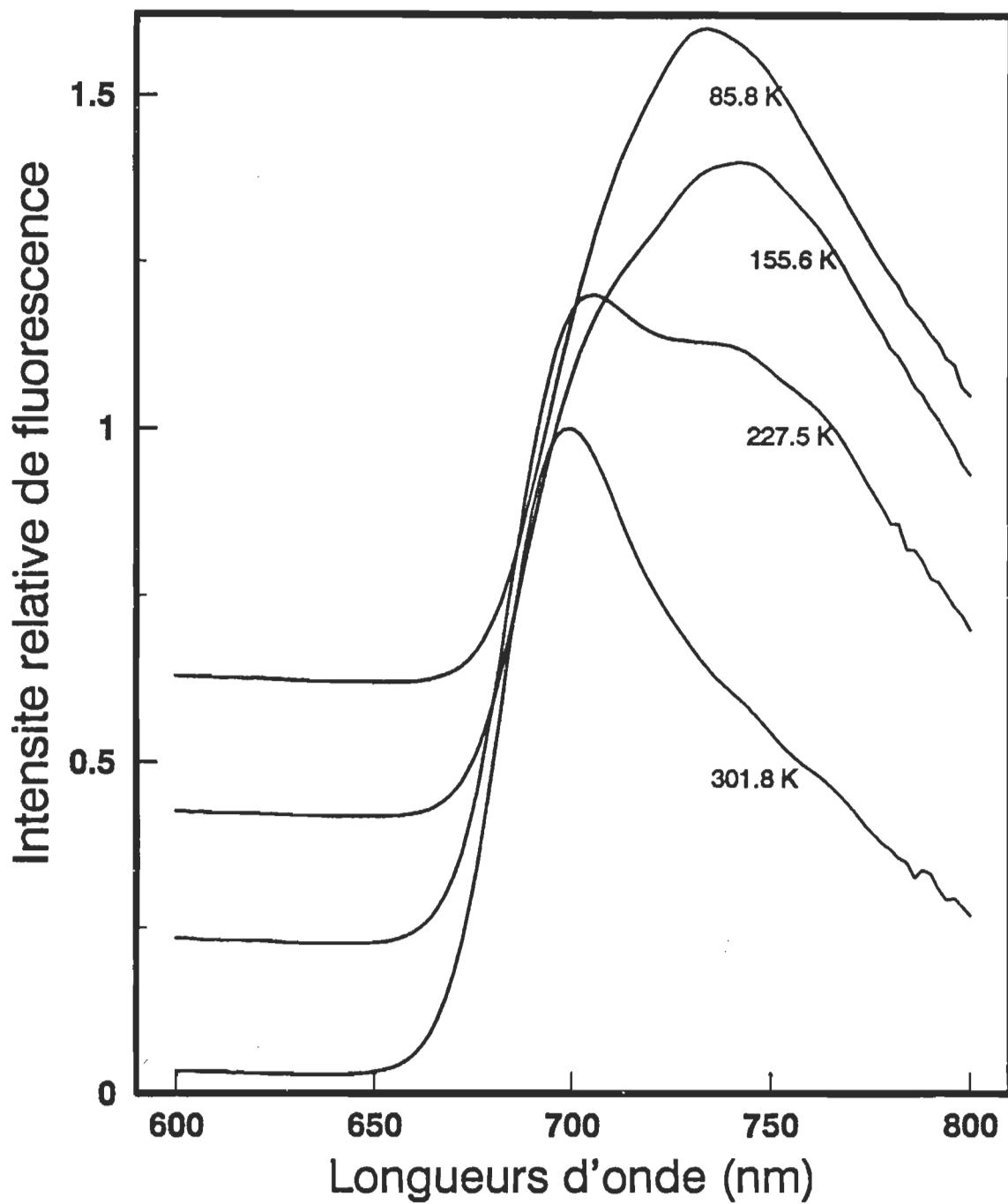


Figure 25. Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'azote humide lors du refroidissement de 300 à 85 K.

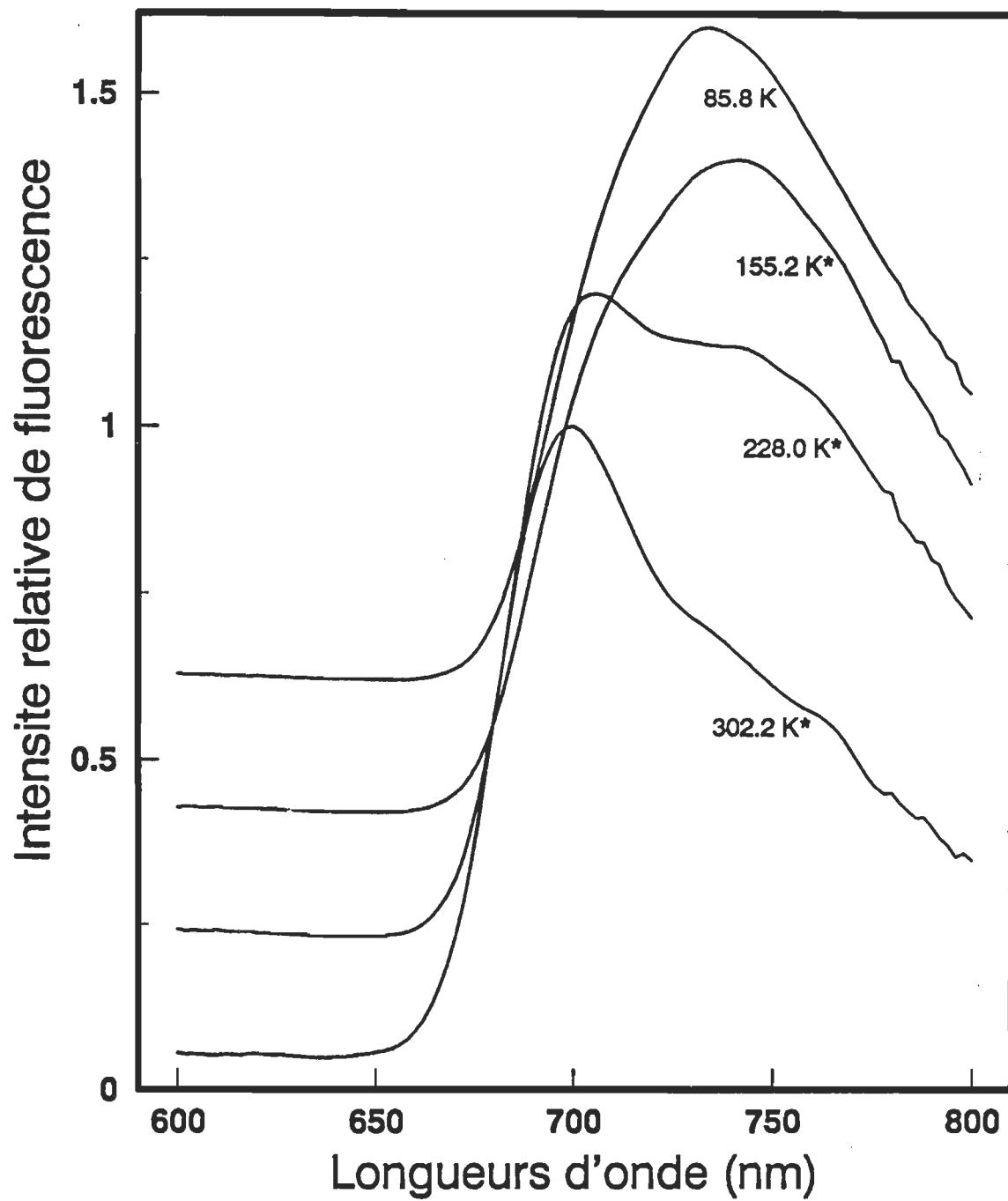


Figure 26. Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'azote humide lors du retour de 85 à 300 K.

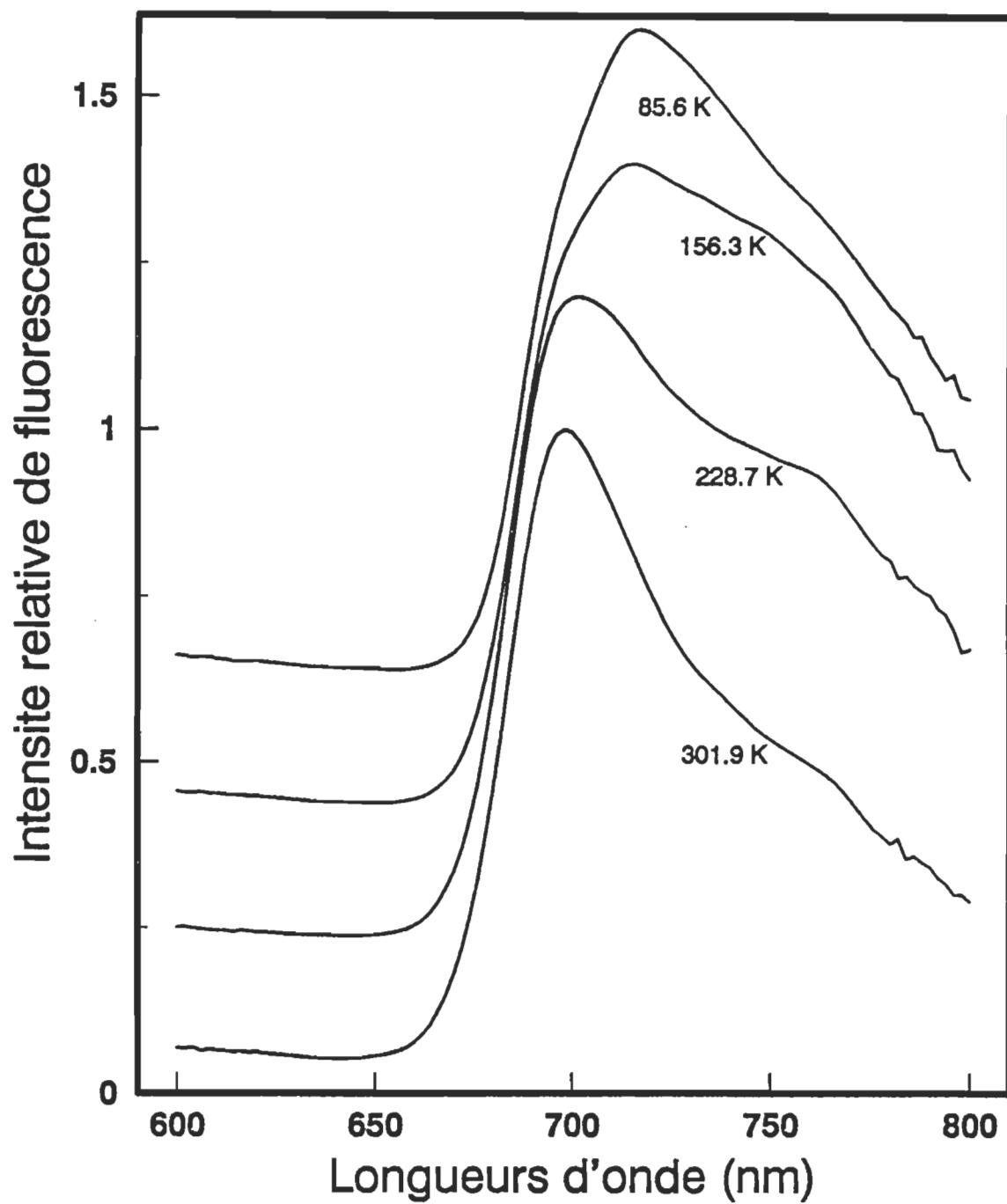


Figure 27. Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'hélium sec lors du refroidissement de 300 à 85 K.

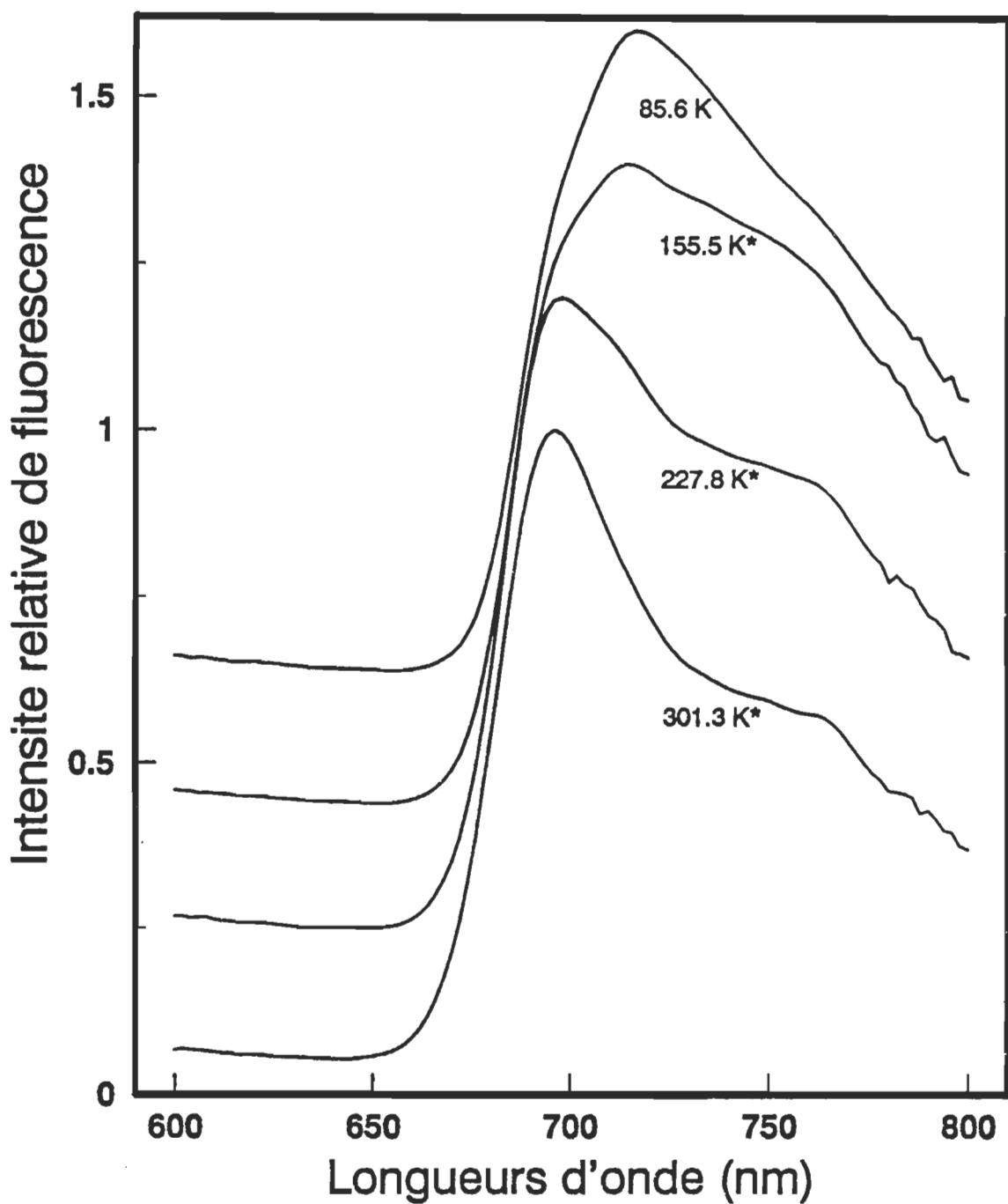


Figure 28. Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'hélium sec lors du retour de 85 à 300 K.

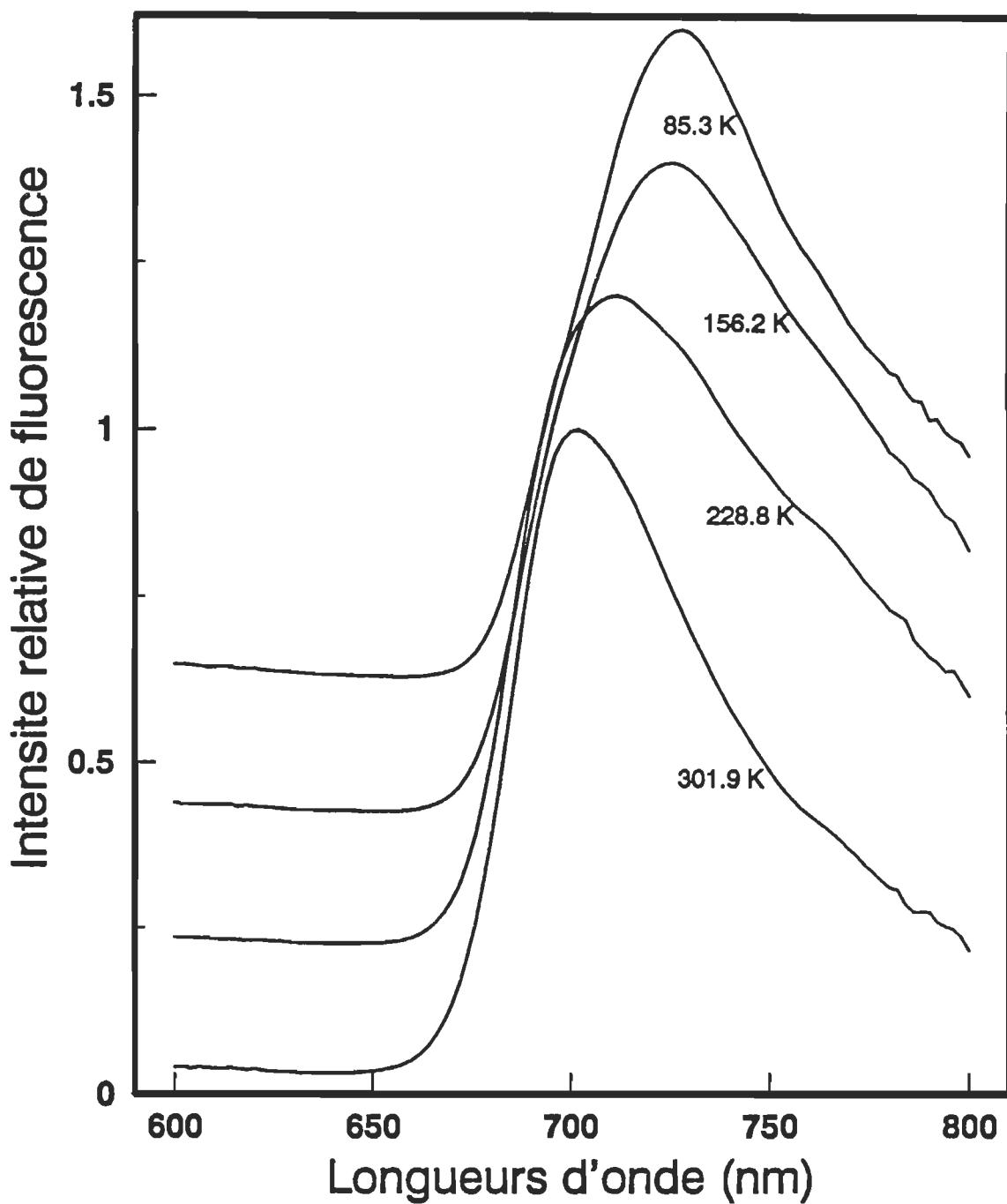


Figure 29. Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'hélium humide lors du refroidissement de 300 à 85 K.

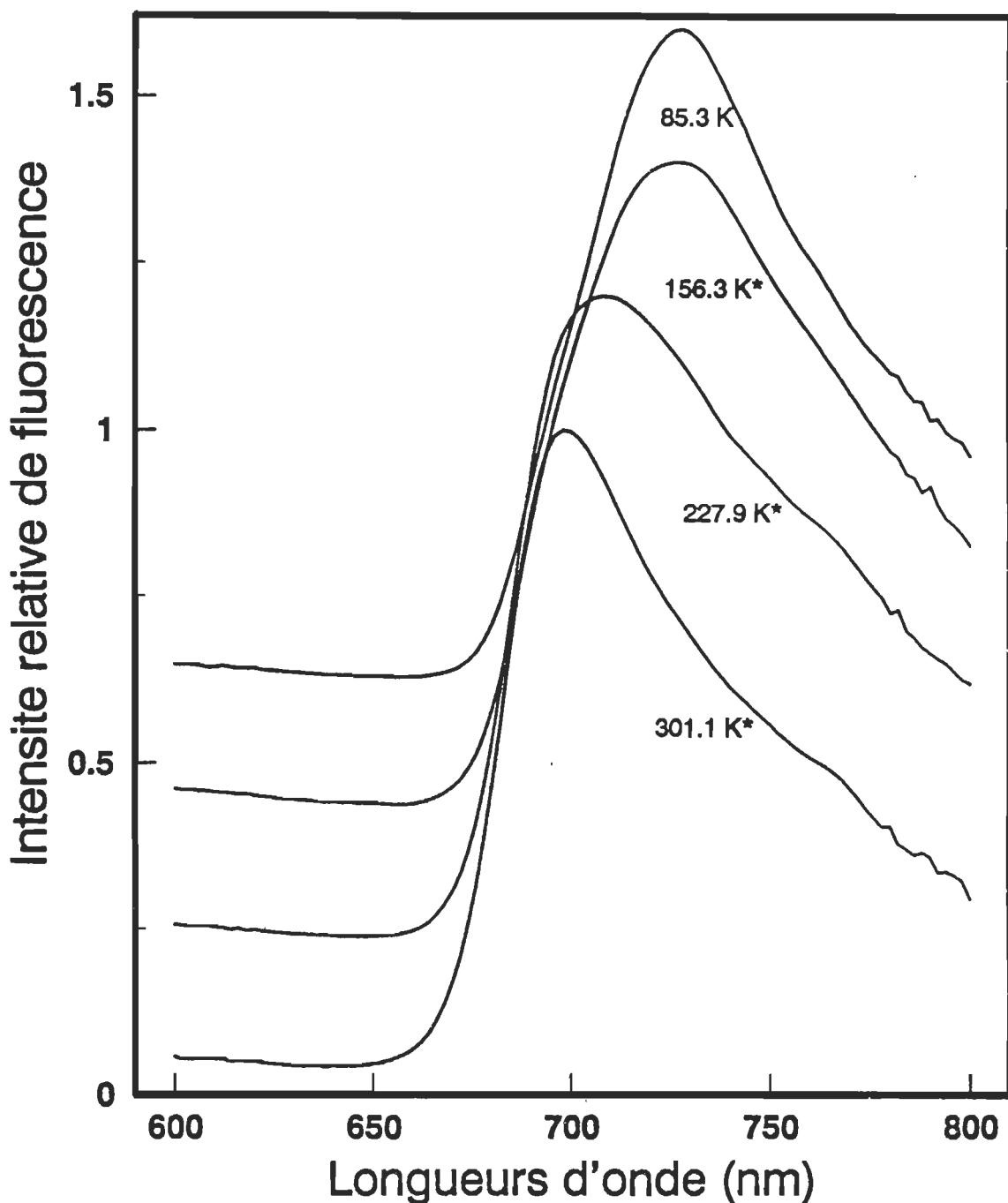


Figure 30. Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'hélium humide lors du retour de 85 à 300 K.

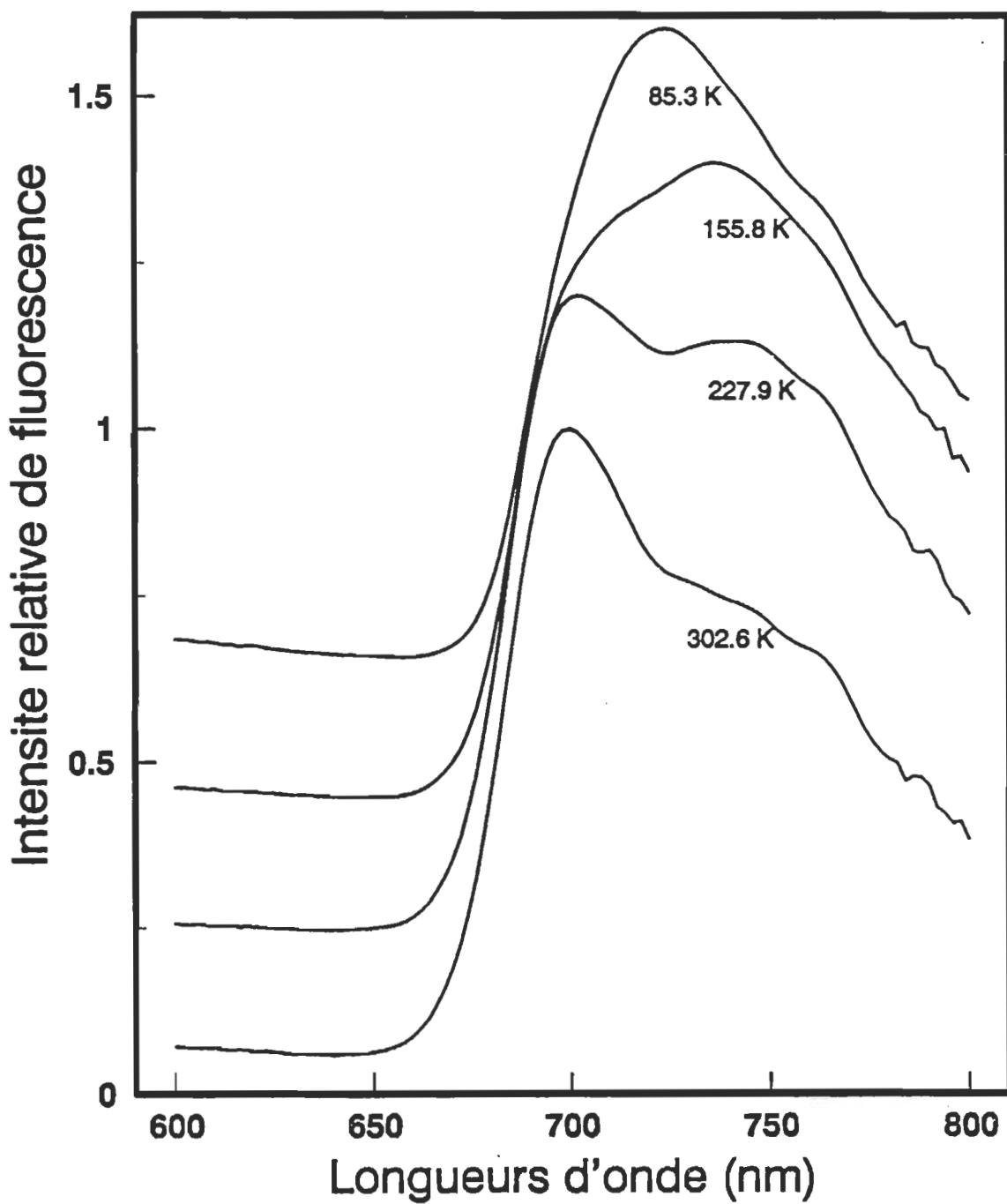


Figure 31. Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'argon sec lors du refroidissement de 300 à 85 K.

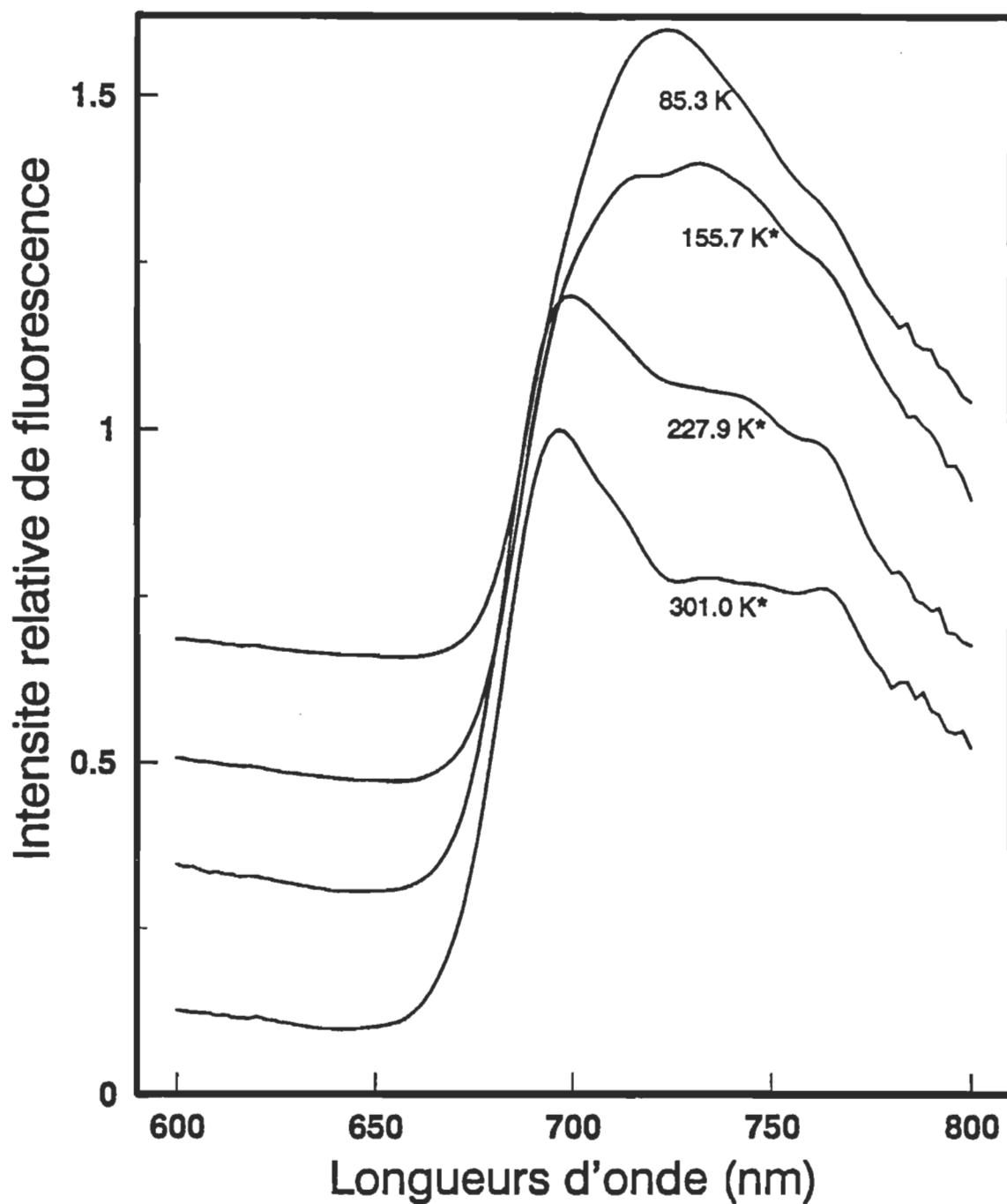


Figure 32. Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'argon sec lors du retour de 85 à 300 K.

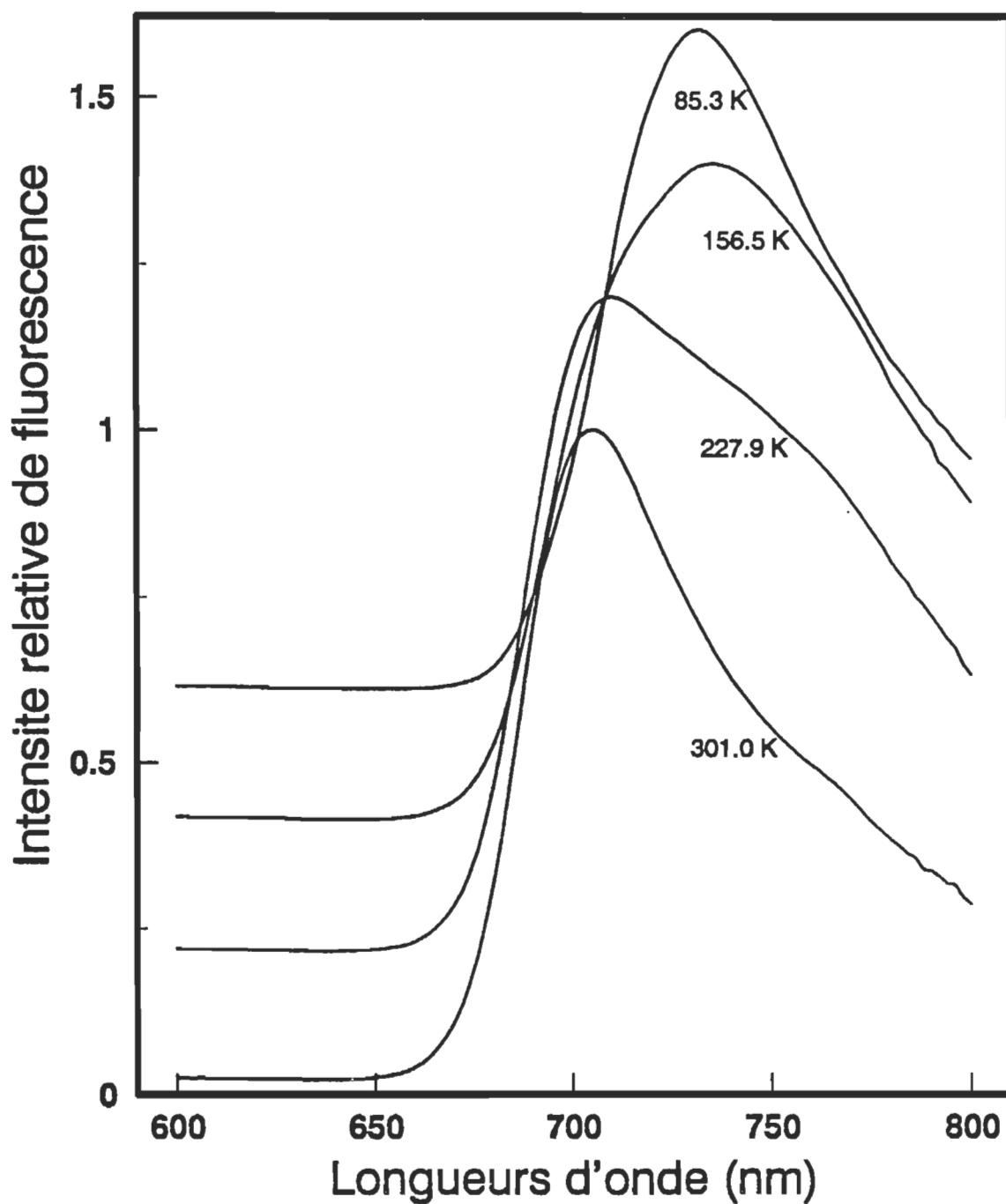


Figure 33. Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chl a (2xMnc) sous atmosphère d'argon humide lors du refroidissement de 300 à 85 K.

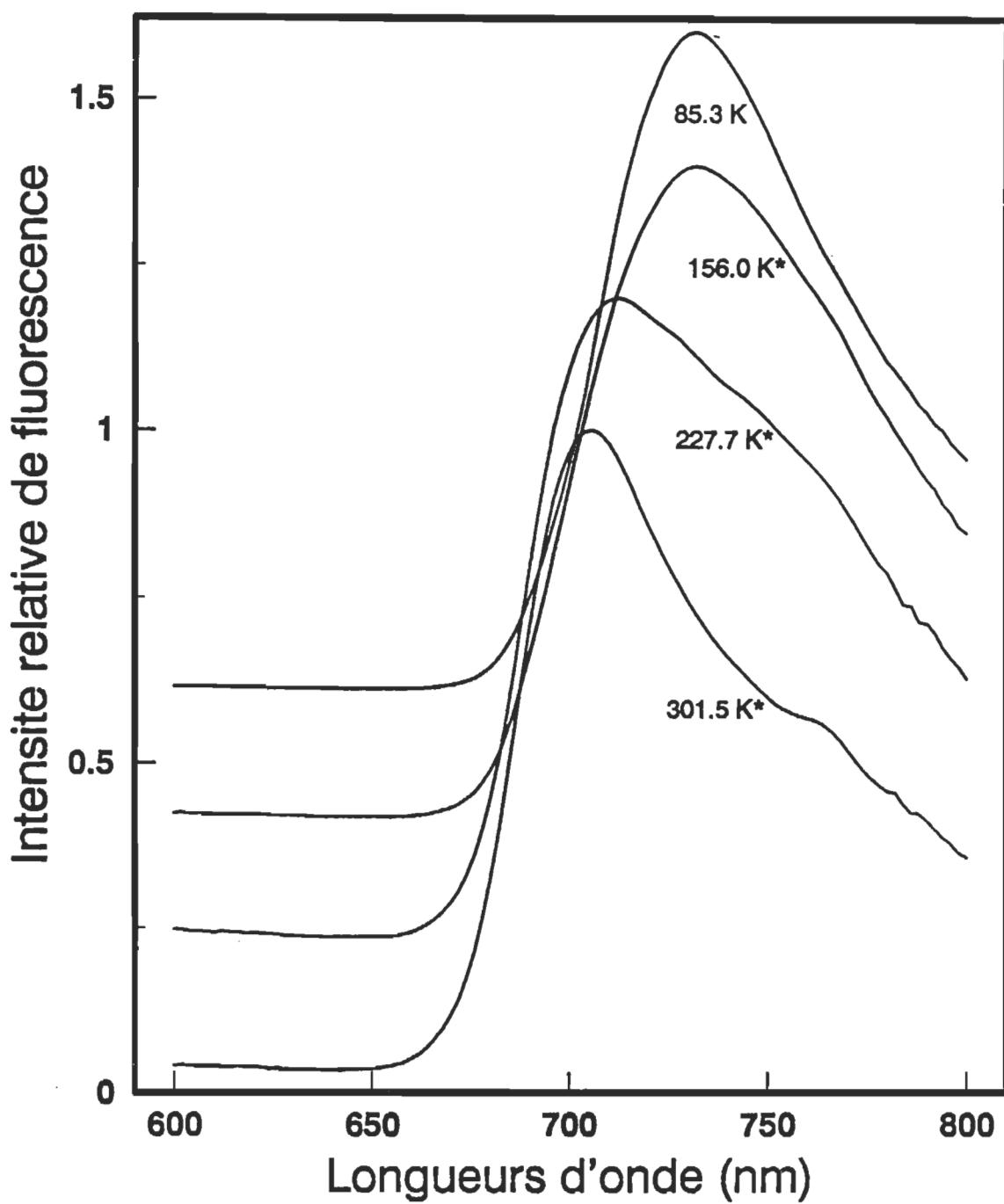


Figure 34. Spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'argon humide lors du retour de 85 à 300 K.

A la température de la pièce, toute monocouche en milieu sec ou humide, est caractérisée par un profil de bande ayant un maximum principal situé entre 696 et 703 nm (tableaux 11 à 16). C'est une bande électronique large, non symétrique, composée de plusieurs bandes vibroniques.

A l'exception des essais sous atmosphère d'hélium et d'argon en milieu humide, toute autre série d'échantillons présente une bande, dite satellite, comprise entre 730 et 760 nm. On utilise le mot satellite pour spécifier que nous ne sommes pas en présence d'un faible épaulement mais plutôt d'une bande d'émission importante, d'intensité inférieure à la bande principale. Par comparaison entre les différents atmosphères gazeux l'intensité de cette bande varie d'une série à l'autre. Cela fait donc varier la largeur de la bande électronique entre les différents milieux gazeux. D'ailleurs les différences entre l'hélium humide et, exemple l'azote humide, réside dans leur largeur de bande (due aux différentes intensités de la bande satellite dans les deux cas). Cette largeur de bande (non calculée car non symétrique) peut être un indice pouvant faire la distinction entre les essais secs et humides d'un gaz donné. A la température de la pièce, un autre indice pouvant les différencier provient du fait qu'un faible déplacement du maximum de fluorescence de 2 ± 1 nm vers le rouge caractérise l'essai humide par rapport à l'essai sec (tableaux 17 à 22 et figure 35).

Alors que les effets mentionnés à la température ambiante sont mineurs, les changements les plus importants se produisent lors du refroidissement des échantillons à basse température. Par comparaison aux propriétés d'absorption résumées plus tôt dans ce travail, l'émission de fluorescence nous révèle des variations majeures lorsque

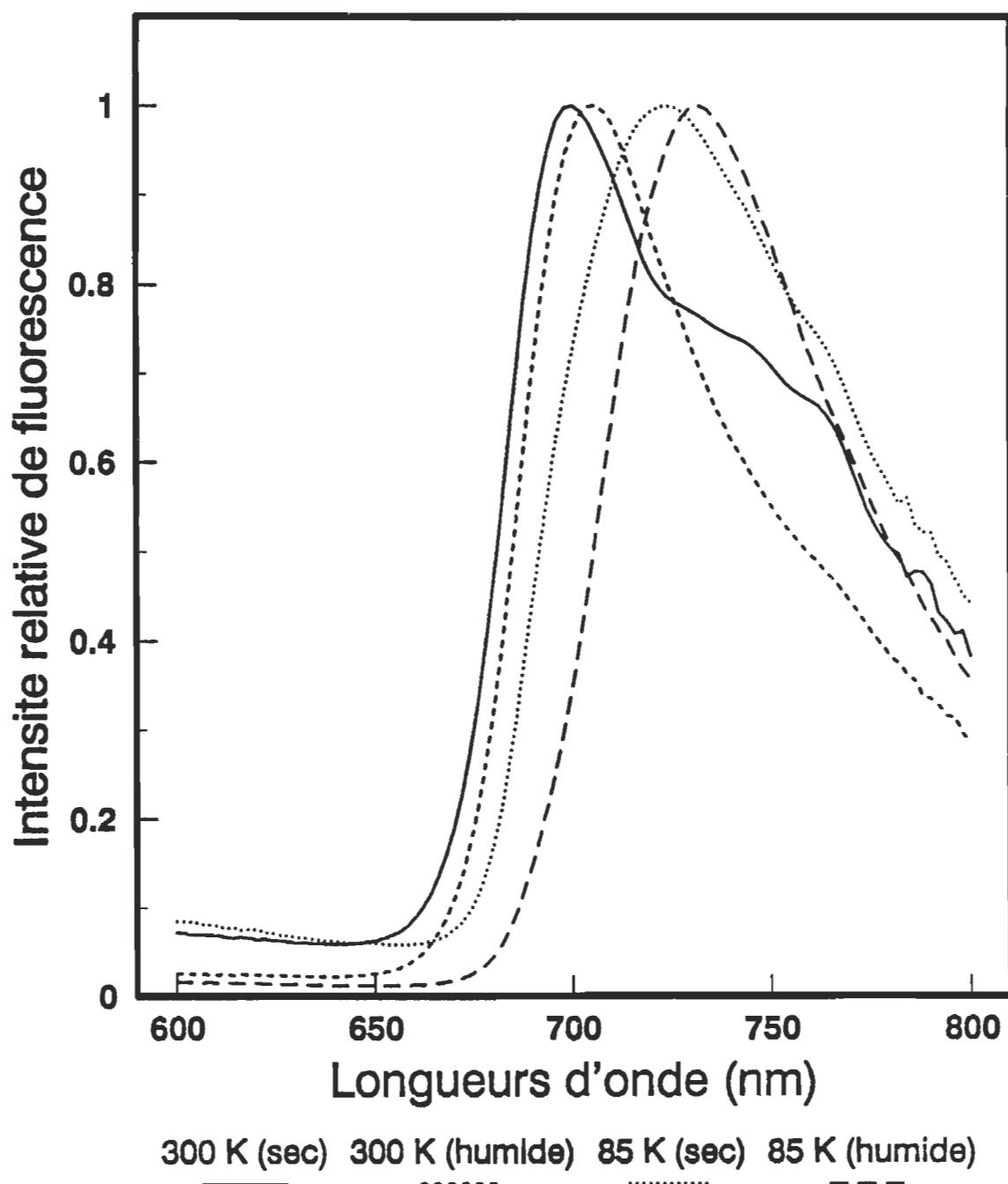


Figure 35. Comparaison des spectres de fluorescence pour des monocouches de Chla (2xMnc) en milieu sec ou humide aux températures de 300 et 85 K. Atmosphère : argon.

Tableau 17

Valeurs moyennes des bandes de fluorescence pour les monocouches de Chl_a (2x1Mnc) sous atmosphère d'azote sec.

Emission de fluorescence

Température (K)	Epaulement (nm)	Principale (nm)	Satellite (nm)
300	-	696.0 ± 1.4	752.8 ± 13.6
228	-	697.6 ± 1.7	746.4 ± 4.3
156	698.4 ± 0.9	744.8 ± 4.6	-
85	698.0 ± 2.0	724.8 ± 8.3	-
300*	-	694.4 ± 0.9	755.2 ± 7.9

Tableau 18

Valeurs moyennes des bandes de fluorescence pour les monocouches de Chl_a (2x1Mnc) sous atmosphère d'azote humide.

Emission de fluorescence

Température (K)	Epaulement (nm)	Principale (nm)	Satellite (nm)
300	-	696.8 ± 3.0	745.3 ± 10.1
228	-	700.8 ± 6.9	752.4 ± 1.67
156	697.6 ± 5.5	738.8 ± 1.8	-
85	705.2 ± 6.1	733.6 ± 1.7	-
300*	-	696.8 ± 3.6	749.5 ± 10.1

(* : retour à la température ambiante)

Tableau 19

Valeurs moyennes des bandes de fluorescence pour les monocouches de Chla (2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium sec.

Emission de fluorescence

Température (K)	Epaulement (nm)	Principale (nm)	Satellite (nm)
300	-	697.2 \pm 1.1	748.4 \pm 5.8
228	-	698.4 \pm 3.0	758.0 \pm 3.2
156	693.6 \pm 0.9	714.5 \pm 1.0	756.4 \pm 3.8
85	694.0	716.0 \pm 2.0	753.5 \pm 2.5
300*	-	694.8 \pm 1.1	755.2 \pm 2.3

Tableau 20

Valeurs moyennes des bandes de fluorescence pour les monocouches de Chla (2x1Mnc) sous atmosphère d'hélium humide.

Emission de fluorescence

Température (K)	Epaulement (nm)	Principale (nm)	Satellite (nm)
300	-	700.4 \pm 3.8	-
228	695.3 \pm 1.2	706.4 \pm 8.9	-
156	694.4 \pm 0.9	722.0 \pm 5.5	-
85	694.0	723.2 \pm 6.7	-
300*	-	697.2 \pm 2.3	753.7 \pm 8.5

(* : retour à la température ambiante)

Tableau 21

Valeurs moyennes des bandes de fluorescence pour les monocouches de Chla (2x1Mnc) sous atmosphère d'argon sec.

Emission de fluorescence

Température (K)	Epaulement (nm)	Principale (nm)	Satellite (nm)
300	-	699.5 \pm 1.0	747.5 \pm 5.0
228	-	703.0 \pm 2.6	746.0 \pm 5.7
156	697.5 \pm 2.5	736.0 \pm 4.3	-
85	697.5 \pm 1.9	724.0 \pm 4.9	-
300*	-	696.0	746.5 \pm 1.0

Tableau 22

Valeurs moyennes des bandes de fluorescence pour les monocouches de Chla (2x1Mnc) sous atmosphère d'argon humide.

Emission de fluorescence

Température (K)	Epaulement (nm)	Principale (nm)	Satellite (nm)
300	-	702.8 \pm 2.3	-
228	-	709.6 \pm 5.9	750.5 \pm 12.5
156	709.6 \pm 3.0	735.6 \pm 6.1	-
85	710.4 \pm 8.2	732.8 \pm 2.3	-
300*	-	701.5 \pm 4.1	[756.0]

(* : retour à la température ambiante)

[] : seule valeur obtenue à cette température

la monocouche est portée à des températures cryogéniques. Tout comme les solutions⁽⁶⁸⁾ on note une augmentation de l'intensité de fluorescence à basse température.

Les tendances spectrales de 300 K à 85 K sont les mêmes pour l'ensemble des échantillons. Si l'on fait référence aux figures 23 à 34 on note que l'abaissement de température s'accompagne par une diminution en intensité du maximum principal (≈ 700 nm) au profit de l'augmentation de la bande satellite (≈ 730 - 760 nm). A la température de 156 K, cette bande satellite devient importante alors qu'il n'existe plus qu'un faible épaulement autour de 696 nm. Lors de l'atteinte de 85 K, il y a un réarrangement spectral vers le bleu et nous obtenons finalement un maximum situé entre 710 et 730 nm, tout dépendant de la monocouche investiguée. C'est une bande large qui est presque symétrique (figure 36).

Les différences concernant les milieux humides et secs indiquent que, de façon général, la largeur de bande à 85 K est plus étroite dans le cas des lames humides que le cas des lames dans un environnement sec (figure 35). Plus spécifiquement, chaque gaz comporte un déplacement de la bande principale de 8.3 ± 0.9 nm vers le rouge en faveur de milieu humide par rapport au milieu sec.

Bien qu'aucune dissemblance entre les différents atmosphères n'était notée en absorption, cela n'est pas le cas en fluorescence. Tel qu'en absorption, les milieux gazeux sous azote sont identiques à ceux d'argon, autant à 300 qu'à 85 K. Pour ce qui est de l'hélium, les maximums de la bande principale sont identiques à ceux de l'azote

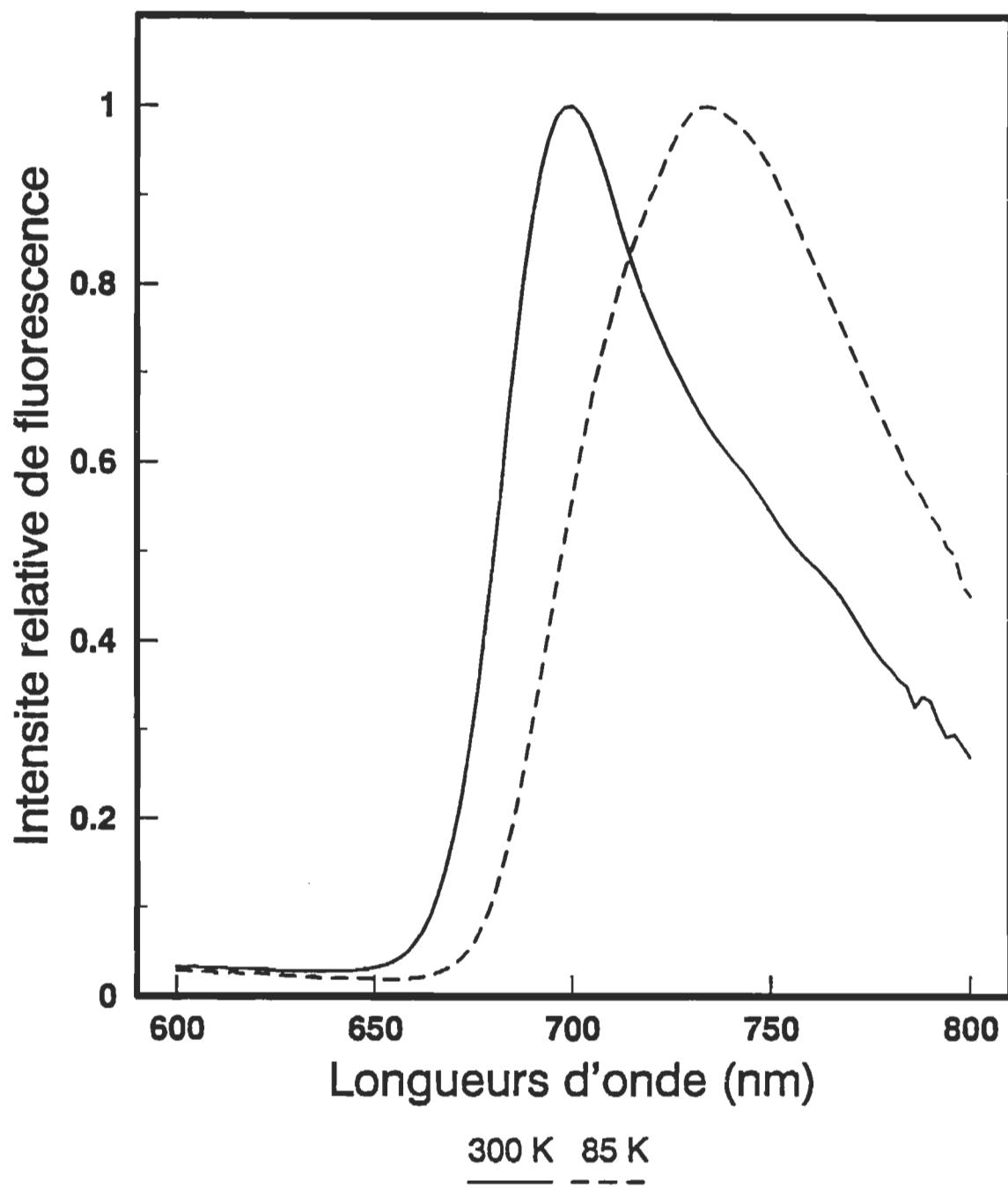


Figure 36. Comparaison des spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) obtenus à la température initiale de départ (300 K) et à basse température (85 K). Atmosphère : azote humide.

et l'argon à 300 K, sauf qu'à cette température, la bande satellite est beaucoup moins importante dans le cas de l'hélium. A 85 K, la situation est différente puisque l'unique maximum de fluorescence est déplacé vers le bleu de ≈ 8 nm (milieu sec) et de 10 nm (milieu humide) pour les monocouches sous hélium par rapport à celles sous azote et argon.

Prenez note que des déplacements du maximum d'émission de fluorescence vers le rouge lors d'une diminution de température furent aussi remarqués lors de l'investigation de multicouches de Chla⁽⁷¹⁾. Par contre, des distinctions plus importantes au niveau des maximums principaux étaient établies entre les essais humides et secs à 300 et 85 K, comparativement aux monocouches de Chla.

Finalement, en ce qui concerne les monocouches de Chla, le retour à la température ambiante s'accompagne de deux effets spectraux rencontrés par tous les échantillons (figure 37). Ce sont les suivants:

- (1) le maximum de la bande principale est déplacé vers le bleu de 2.4 ± 1.0 nm par rapport à la valeur initiale au départ.
- (2) on note une augmentation importante de l'intensité de la bande satellite par rapport à ce qu'on avait comme intensité initiale.

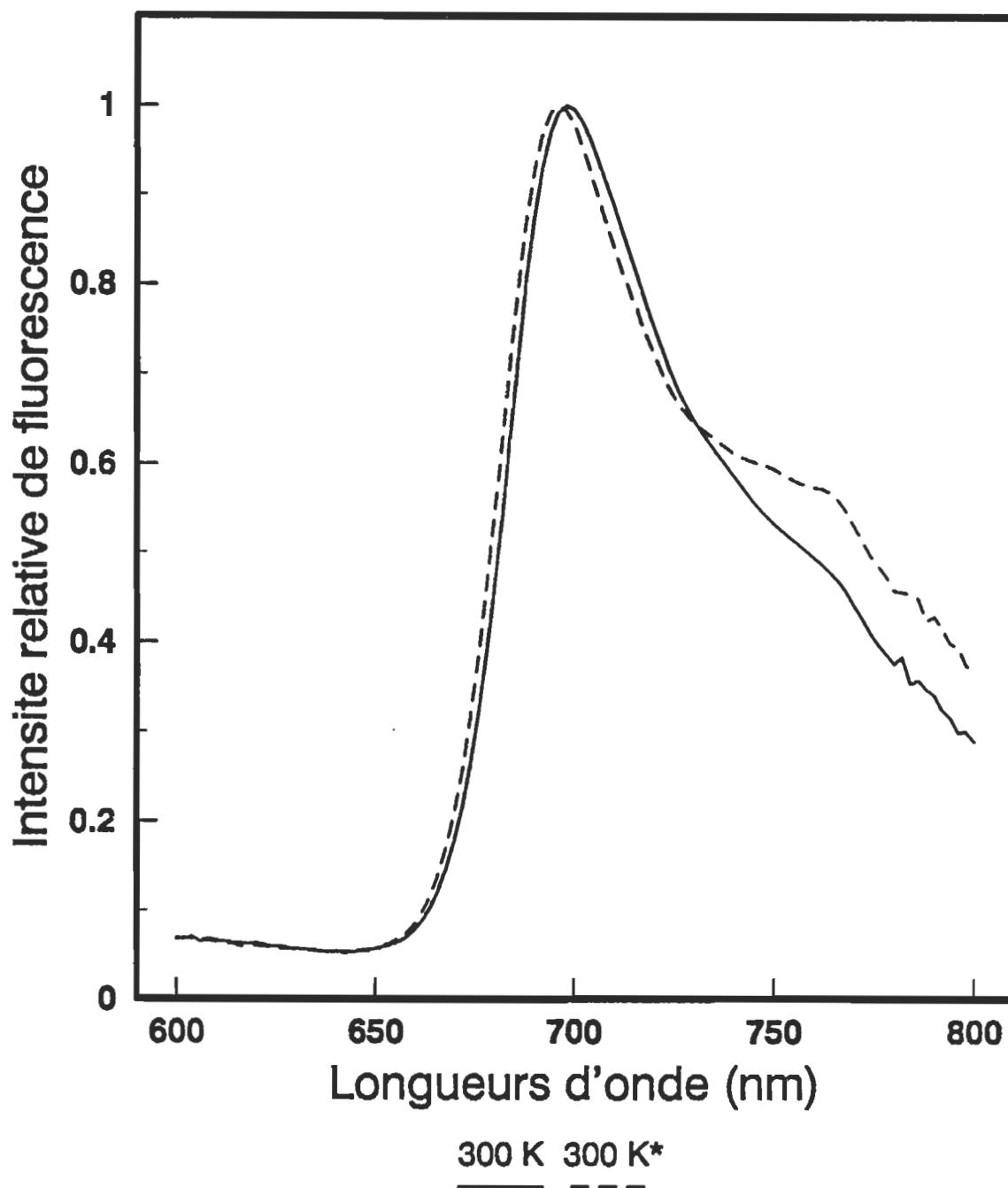


Figure 37. Comparaison des spectres de fluorescence d'une monocouche de Chla (2xMnc) obtenus à la température initiale de départ (300 K) et au retour de température (300 K*). Atmosphère : hélium sec.

4.3_ Evaluation de l'équilibre thermique de l'énergie d'excitation

Par utilisation de différentes longueurs d'onde d'excitation à l'intérieur de la bande de Soret de la Chla nous avons obtenu un spectre d'émission de fluorescence identique, sans changement significatif de l'énergie des photons excités. Cependant, l'excitation dans le rouge menait à un bruit de fond important dû à ces échantillons faiblement fluorescents dans la monocouche de Chla.

L'excitation des molécules de Chla fut donc réalisée dans le bleu. Cela nous a permis d'examiner le processus d'équilibration de l'énergie d'excitation existant entre les phénomènes d'absorption et d'émission de fluorescence grâce à la relation de Kennard-Stepanov⁽⁴⁹⁾. Cette relation a l'avantage additionnel de fournir la température effective de la distribution de l'énergie, paramètre étant relié à la mesure de l'équilibre thermique dans le système.

Les principes soulignant sa dérivation sont donnés en annexe et dans les références^(49,80). Plusieurs études d'équilibre thermique de l'énergie d'excitation de la Chl furent déjà réalisées. Ces études ont été établies en solution^(81,82,83), dans l'antenne Chl-protéine⁽⁸⁴⁾, dans les phycobilisomes⁽⁸⁵⁾ et dans les multicoques de Chla⁽⁷¹⁾. Dans le cas des monocouches, nous appliquons cette relation sous la même forme que celle utilisée dans les phycobilisomes et les multicoques. L'équation est la suivante :

$$\ln[F(\lambda) \cdot \lambda^5 / A(\lambda)] = \text{const.} - hc / \lambda \cdot k \cdot T^* \quad (4)$$

où $F(\lambda)$ représente le nombre de photons émis par unité de longueur d'onde d'intervalle, $A(\lambda)$ est l'absorbance, T^* est la température effective à être estimée à partir du tracé de $\ln[F(\lambda) \cdot \lambda^5 / A(\lambda)]$ en fonction de $1 / \lambda$, où λ est en nombre d'onde.

La dépendance de $F(\lambda)$ sur λ a été analysée et les tracés de l'équation (4) sont représentés par les figures 38 et 39.

En pratique, cette relation est linéaire pour des nombres d'onde intermédiaires. Aux extrémités, la relation s'écroule car les mesures d'absorption (nombre d'onde élevé) ou de fluorescence (faible nombre d'onde) sont faibles. Elles sont sujettes à des perturbations par des contaminants, de la lumière diffuse, etc.⁽⁸⁵⁾

Le même phénomène est rencontré dans les monocouches de Chla. Le résultat des calculs des températures effectives, relatif à la pente de l'équation (4), est donné dans les tableaux 23 à 26. Ces valeurs révèlent des températures effectives entre 307 et 320 K alors que l'expérimentation était réalisée à une température d'environ 302 K. Ces résultats sont d'une précision comparable à ce qui était obtenue dans les multicouches de Chla⁽⁷¹⁾ et dans les solutions de Chl^(81,82).

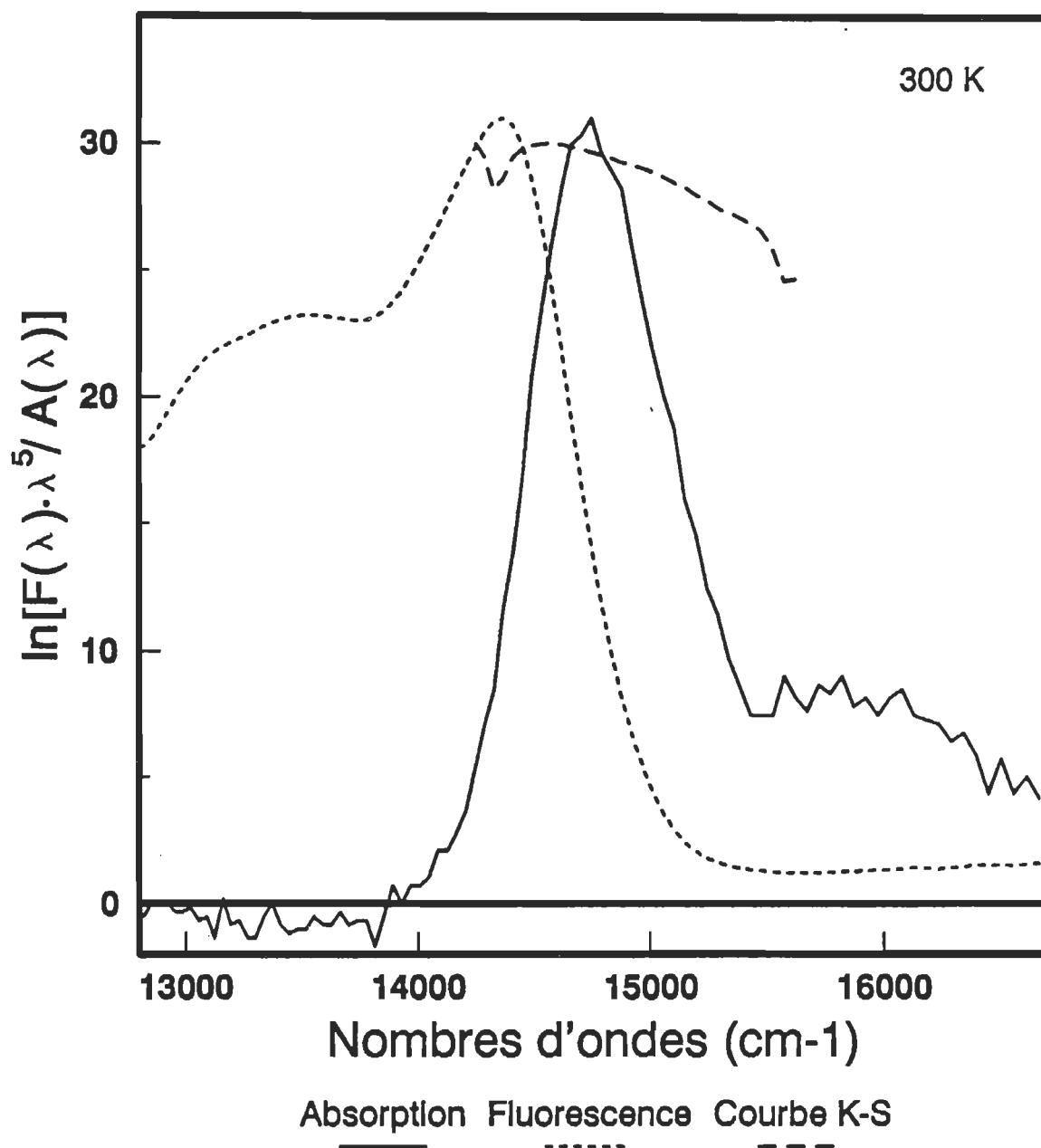


Figure 38. Relation de Kennard-Stepanov pour une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'hélium sec et à la température ambiante.

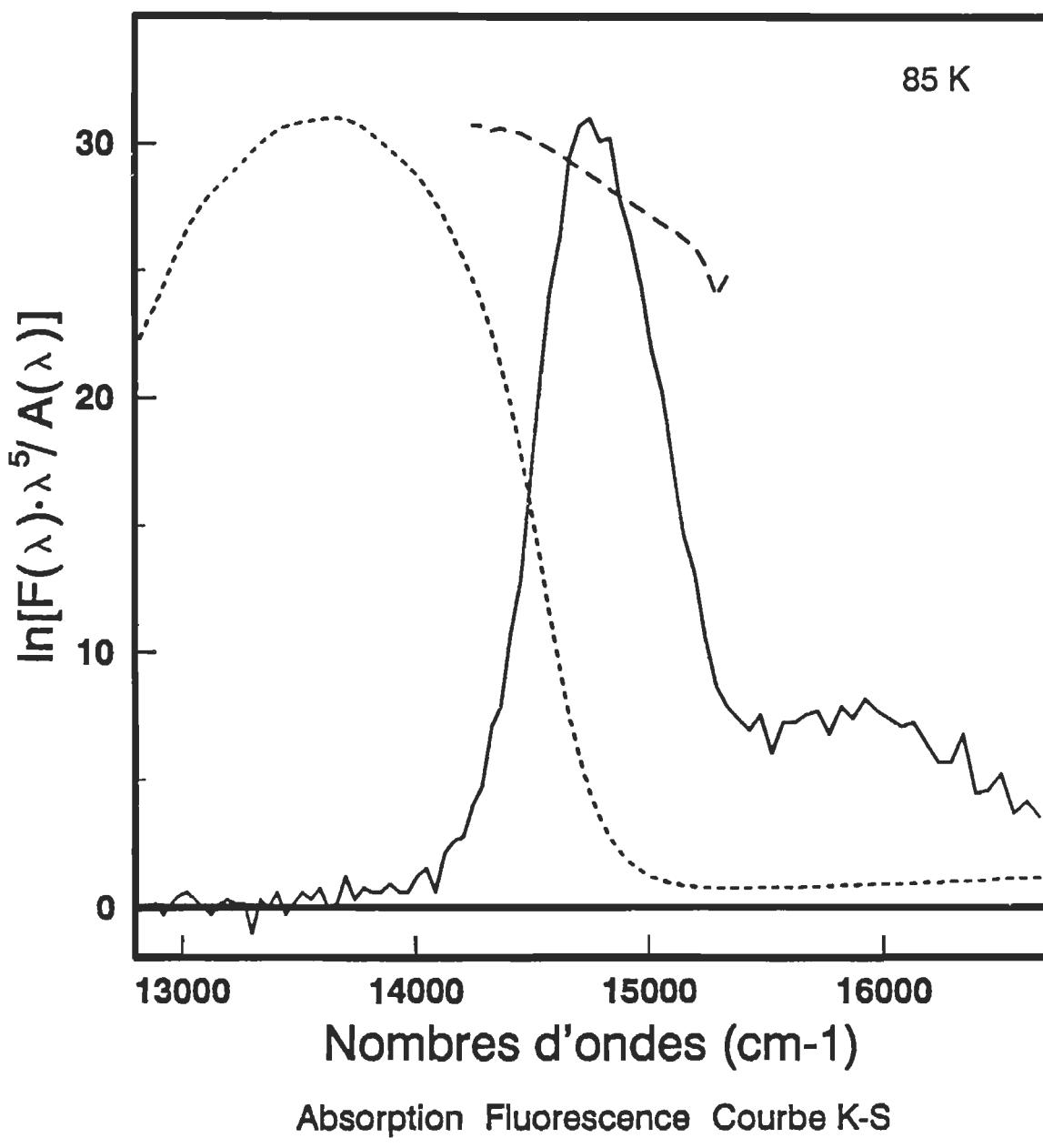


Figure 39. Relation de Kennard-Stepanov pour une monocouche de Chla (2xMnc) sous atmosphère d'hélium sec et à basse température.

Tableau 23

Comparaison des valeurs moyennes des températures expérimentales et effectives (relation Kennard-Stepanov) pour les monocouches de Ch₃A sous atmosphère d'azote sec.

Température expérimentale (K)	Température effective (K)
302.3 ± 0.5	314.1 ± 6.4
85.1 ± 0.3	215.5 ± 5.7
$301.7 \pm 0.4^*$	$314.0 \pm 3.5^*$

Tableau 24

Comparaison des valeurs moyennes des températures expérimentales et effectives (relation Kennard-Stepanov) pour les monocouches de Ch₃A sous atmosphère d'azote humide.

Température expérimentale (K)	Température effective (K)
302.2 ± 0.6	307.6 ± 4.9
85.5 ± 0.3	238.2 ± 17.8
$301.7 \pm 0.4^*$	$307.8 \pm 17.2^*$

(* : retour à la température ambiante)

Tableau 25

Comparaison des valeurs moyennes des températures expérimentales et effectives (relation Kennard-Stepanov) pour les monocouches de Chla sous atmosphère d'hélium sec.

Température expérimentale (K)	Température effective (K)
302.2 ± 0.3	313.7 ± 7.4
85.3 ± 0.3	215.1 ± 4.2
$301.5 \pm 0.3^*$	$319.6 \pm 3.9^*$

Tableau 26

Comparaison des valeurs moyennes des températures expérimentales et effectives (relation Kennard-Stepanov) pour les monocouches de Chla sous atmosphère d'hélium humide.

Température expérimentale (K)	Température effective (K)
302.5 ± 0.7	317.7 ± 9.3
85.3 ± 0.2	230.4 ± 22.9
$301.4 \pm 0.3^*$	$315.4 \pm 6.1^*$

(* : retour à la température ambiante)

Cependant, à basse température la relation de Kennard-Stepanov n'est que très peu satisfaite. Les valeurs calculées se situent entre 215 et 238 K, ce qui est très éloignée de la température expérimentale, 85 K. Le recouvrement des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence est plutôt faible (figure 39).

5- DISCUSSION

La nature détaillée de l'environnement moléculaire local des molécules de Chla dans la membrane photosynthétique est depuis longtemps un sujet à controverse et à spéculation. Bien que l'on suggère que le centre de réaction ainsi que l'antenne de pigment soient composés de complexes chlorophylle-protéine, il n'a toujours pas encore été déterminé si les formes de Chla dans ces sites primaires consistaient en :

- i) Chla monomérique dans un environnement moléculaire distinct,
- ii) Chla dans différents états d'agrégation (dimères ... oligomères) ... complexée à un ligand tel que l'eau,
- iii) transition excitonique due à l'interaction de la densité de transition de molécules de Chla très rapprochées,
- iv) tous les points mentionnés ci-haut.

Il est connu depuis longtemps que les propriétés physiques utilisées pour l'analyse de ce que l'on appelle la structure "fine" des porphyrines, incluant les Chls, concernent l'absorption et l'émission de fluorescence. Ces propriétés sont principalement dues au caractère aromatique contenant les doubles liaisons responsables des transitions électroniques dans la Chl⁽⁸⁷⁾. L'émission de fluorescence *in vivo* a été largement utilisée comme sonde du processus photosynthétique dans les bactéries et les plantes vertes⁽⁸⁸⁾.

Au niveau des systèmes artificiels, la compréhension des propriétés de fluorescence de la Chla in vitro à la température ambiante et spécialement à basse température⁽⁸⁹⁾, est essentielle pour l'assignation des diverses bandes d'émission des systèmes in vivo.

Les études de Katz et al.⁽¹⁹⁾ sur la Chla en solutions ont été développées afin d'établir quels types d'agrégats étaient obtenus par association de cette molécule. Ayant une structure chimique particulière, l'environnement entourant cette molécule a un effet sur le spectre lequel peut être hautement informatif.

Ces études, en solution, ont démontrées que certaines molécules fortement nucléophiles (polaires) telles que l'eau, la pyridine, l'acétone ... ont une très grande tendance à s'associer avec les chlorophylles se liant à la 5^e et 6^e position de coordination (normale au plan de l'anneau porphyrine) du magnésium. Dans les systèmes photosynthétiques, l'eau ayant un rôle d'une très grande importance peut être présente au niveau des photosystèmes sous plus d'une forme, agrégée ou pas.

La présence d'un carbonyle (C=O) aux positions C₉ et C₁₀ de l'anneau V ainsi que le carbonyle de l'ester propionique (position C₇ de l'anneau IV) dans la molécule de Chla favorisent plusieurs associations auto-agrégées possibles entre unités monomériques hydratées. Grâce à de telles études, il existe maintenant une croyance au

fait que le centre de réaction du PSI (P700) soit un dimère de Chla monohydraté ($\text{Chla}\cdot\text{H}_2\text{O}$)₂ et que l'antenne (LHCP) soit l'oligomère ($\text{Chla}\cdot\text{H}_2\text{O}$)_n⁽³⁶⁾.

Les conclusions tirées d'analyses optiques sur des solutions de Chla démontrent que les formes Chls absorbant à haute longueur d'onde requièrent l'interaction de deux ou plusieurs molécules de Chl. Les agrégats de Chla en solution peuvent produire une grande variété d'allures spectrales. Elles sont d'un intérêt particulier puisqu'elles sont reliées aux interactions Chla-Chla et Chla-ligand, dont le ligand peut être l'eau. Par conséquent, la clé du comportement d'agrégation de la Chla provient de sa propriété de donneur-accepteur innée.

Il est cependant important de rappeler que la dispersion des molécules de Chla dans un solvant confère à leurs solutions une répartition moléculaire homogène. Le statut de pigment in vivo est, par contre, beaucoup plus compliqué et très hétérogène.

Au niveau des films Langmuir-Blodgett, les mono- et multicouches de Chapados et al.^(6,7), de Désormeaux et al.⁽⁸⁾ ainsi que plus récemment par Krawczyk et al.⁽⁷¹⁾ ont confirmé l'existence et l'importance de l'eau dans leurs systèmes. La technique des monocouches a prouvée qu'elle était valable dans l'étude des interactions de la Chla puisqu'il est facile de contrôler les interactions spécifiques dans une couche à deux dimensions plutôt qu'un système encombré en trois dimensions. Dans le présent travail, les films monomoléculaires orientés de Chla furent utilisés pour reproduire essentiellement la nature en deux dimensions de la membrane du chloroplaste.

Les études d'interactions spécifiques intermoléculaires en film Langmuir-Blodgett au niveau des mono- et multicouches indiquent la formation d'agrégats de Chla de différentes grosseurs dépendant spécialement du contenu en eau dans leur système. Le spectre d'absorption de la Chla en milieu sec ou humide, dans les films monomoléculaires de la présente étude, exhibe une largeur de bande significative laquelle est l'évidence de formation d'espèces agrégées.

Cependant, les spectres électroniques de nos monocouches de Chla ne nous permettent pas d'établir de distinctions entre les milieux humide et sec, et cela, même à basse température. De plus, le peu de résolution des propriétés électroniques, obtenues de ces espèces Chla faiblement absorbant, rend impossible la caractérisation des différentes espèces agrégées dans la monocouche de Chla.

D'un autre côté, les multicouches de Chla⁽⁷¹⁾ ont démontré une claire distinction entre les films hydratés et les films secs. Tout comme les monocouches, une bande d'absorption située entre 678 et 681 nm, par rapport à la forme monomérique en solution (670 nm), fut enregistrée à la température ambiante. Elle correspond à une forme agrégée. A 85 K, les films hydratés ont démontré l'existence d'une espèce additionnelle absorbant à 705-710 nm^(8,71). Cela n'est pas le cas des monocouches de Chla. L'importance de ce nouvel espèce fut révélée en fluorescence dont le maximum se déplaçait de 740 à 760 nm par refroidissement à 85 K.

Au niveau de l'émission de fluorescence des monocouches de Chla, beaucoup plus sensible au changement spectral, un déplacement de 20 à 30 nm en fonction de la température est perçu autant dans les milieux humides que secs. Tout échantillon exhibe un maximum près de 698 nm à 300 K et autour de 725 nm à 85 K. Similairement aux résultats d'absorption, l'ensemble des données de fluorescence ne nous permettent pas de distinguer avec certitude les essais sous les différents atmosphères et cela même en abaissant la température à 85 K. Nous sommes donc en présence des mêmes espèces tant au niveau de la monocouche humide que dans la monocouche en milieu sec. Seule la proportion de ces diverses espèces varie.

Les différents résultats obtenus entre les monocouches et les multicouches hydratées ne sont pas nouveaux. L'étude de l'interaction Chla-eau, par absorption dans le visible et en infrarouge⁽⁷⁾, a déjà démontrée que l'organisation moléculaire de la Chla dans les monocouches était différente de celle rencontrée par les multicouches.

Les degrés de libertés intramoléculaires et intermoléculaires peuvent affecter significativement le spectre électronique d'agrégats moléculaires. Des agrégats de composition moléculaire similaire peuvent quelquefois être trouvés dans plus d'un arrangement géométrique à partir des molécules initiales constituantes. Chacun de ces arrangements géométriques a son propre spectre électronique caractéristique⁽⁹⁰⁾.

La distinction entre les films mono- et multimoléculaires provient d'un phénomène de surface. La monocouche de Chla relève d'un concept bidimensionnel.

Des études vibrationnelles démontrent que les molécules de la monocouche sont, à la température ambiante, dans une situation dynamique. Ceci veut dire que le milieu diélectrique à la surface varie continuellement, modifiant l'environnement des groupes fonctionnels et par le fait même, leur spectre infrarouge. Dans la monocouche, les liens C=C et C=N supportent le réseau d'électron- π . Toute perturbation dans ce réseau, causé par le mouvement de l'anneau porphyrine ou par un milieu diélectrique variable, modifiera aussi l'allure des bandes électroniques. Il en résultera un élargissement du à la formation de plusieurs composants. Au contraire, dans la multicouche on fait appel au concept en trois dimensions. Cela implique une plus grande stabilité car la proximité de chaque molécule renforce le réseau d'électron- π de sorte que le milieu diélectrique demeure le même pour chaque groupe C=C ou C=N. Ce phénomène favorise donc la localisation de l'absorption dans des domaines de fréquences plus étroits et alors augmente l'intensité des bandes. Ces remarques au niveau de la stabilité des films Langmuir-Blodgett ont été vérifiées par investigation des bandes C-H aromatiques en infrarouge⁽⁹¹⁾.

Par ailleurs, les propriétés spectroscopiques de la Chla diffèrent due à la nature de l'interface⁽³³⁾. La labilité conformationnelle des arrangements ordonnés chromophore-chromophore dans la couche moléculaire de Chla peut aussi causer un déplacement des longueurs d'onde ou un changement important dans l'absorbance. Les divers facteurs pouvant influencer ces phénomènes incluent le temps⁽⁹²⁾, la température⁽⁹³⁾, le niveau de séchage des lamelles⁽⁹⁴⁾ ainsi que différent degré d'illumination^(65,92).

En plus du phénomène de surface, le facteur temps semble être un point important dans la distinction de nos monocouches avec les multicouches. L'étude des multicouches⁽⁷⁾ en milieu sec fut réalisée suite à un séchage prolongé, favorisant une plus grande élimination de l'eau dans le système. Par contre, les spectres de nos monocouches furent obtenus immédiatement après la déposition, sans passer par un séchage sous vide, ou au dessicateur tel que dans le cas des multicouches. Seul un gaz sec pénétrait le compartiment à échantillon durant les mesures. L'effet du vacuum sur la réorganisation des molécules de Chla dans les multicouches est beaucoup plus important et plus complet que le seul fait de laisser les molécules se réarranger par elles-mêmes, tel que dans les monocouches. Au niveau des études en milieu humide, les deux types de systèmes furent analysés à pleine saturation d'eau autour de l'échantillon. Encore une fois, des temps d'exposition de 48 à 90 heures de la lamelle sous un milieu humide sont possiblement plus efficace que les 15 minutes utilisées dans les monocouches. Il faut toutefois réaliser que l'hydratation ou la déhydratation d'un film contenant plusieurs couches de molécules est différente de celle effectuée dans une seule couche moléculaire.

Grâce à cette nette distinction au niveau expérimental entre mono- et multicouches, on peut maintenant expliquer pourquoi si peu de différence fut obtenue entre les essais humides et secs dans le cas de nos monocouches. Un temps trop court de même que l'utilisation de seul un atmosphère gazeux sec furent inefficace dans l'évaluation du phénomène de surface au niveau de la monocouche. Les réarrangements à la surface de la lame demandent un certains temps pour s'accomplir.

D'ailleurs, ce temps peut être analysé de deux façons différentes. Un temps pour permettre l'élimination ou l'adsorption du nucléophile eau dans le système, et un temps alloué, spécifique à l'étude de nos monocouches, concernant le refroidissement du système à une température inférieure. Ce dernier temps peut donc clarifier le phénomène de non réversibilité de nos monocouches lors du retour à la température ambiante (suite au refroidissement). L'intensité supérieure de la bande satellite serait due à un temps trop court accordé pour permettre un réarrangement moléculaire menant aux espèces initiales. Le phénomène de gel-dégel fut trop rapide dans le cas d'un système organisé tel que la monocouche. Un retour à la température initiale s'échelonnant sur une plus grande période de temps aurait pu rendre possible l'atteinte de l'orientation et de la conformation des espèces de départ d'une façon totalement réversible.

En ce qui concerne le phénomène d'élimination de l'eau dans la monocouche il faut se référer au travail soigné de Chapados et Leblanc⁽⁶⁷⁾. Par étude infrarouge sur l'état d'agrégation de la Chla et sur l'interaction Chla-eau dans les mono- et multicouches, ces chercheurs conclurent que la déshydratation des films multimoléculaires causait une réorganisation à partir d'un film compact organisé vers un film désordonné (effondrement de l'organisation). Suite à ces travaux un modèle expérimental fut élaboré et fut récemment confirmé par analyse de l'anisotropie optique en infrarouge de films Langmuir-Blodgett⁽⁴¹⁾.

Le modèle proposé pour la monocouche démontre que les groupes esters, étant les principaux groupes hydrophiliques dans la monocouche, tendent à s'orienter au

maximum afin de favoriser le contact avec la surface de l'eau. Par transfert sur un substrat solide tel qu'une lame hydrophile MIR (infrarouge), la monocouche demeure presque complètement inchangée⁽⁷⁾. A l'interface air-eau, ce modèle consiste en deux dimères d'eau situés de chaque côté de la molécule de Chla laquelle est liée à l'eau de la sous-phase par des liens hydrogènes avec les carbonyles. On fait donc état de trois types de molécules d'eau incorporés dans la monocouche de Chla suite à la déposition des molécules à la surface d'une lamelle de quartz⁽⁸⁾.

Deux des trois types d'eau sont enlevées facilement en milieu sec. Il reste toujours la molécule du second ordre fermement liée, qui requiert l'utilisation de méthodes drastiques pour son élimination.

Dans nos monocouches nous sommes probablement en présence de deux et même trois de ces molécules suite à la formation du film monomoléculaire. La présence d'un milieu humide n'affecte pas davantage l'organisation moléculaire à la surface de la lame. Quant au milieu sec, le système gazeux passant à travers le chlorure de calcium est inefficace dans l'élimination d'une quantité importante de molécules d'eau menant à un réarrangement moléculaire des espèces Chla dans la monocouche. Cela peut être vérifié en regardant les spectres d'absorption. Tel que mentionné précédemment, il n'existe aucun changement perceptible pouvant distinguer les monocouches humides et sèches.

Le phénomène est le même en fluorescence où, si on néglige les détails mineurs,

les formes spectrales représentant les espèces Chla-eau sont identiques d'un échantillon à l'autre, milieu humide ou sec. Ces espèces Chla-eau sont présentes à la température de la pièce ainsi qu'à 85 K. Seule l'intensité de certaines espèces est favorisée par diminution de température au profit de l'espèce prédominante (≈ 700 nm) présente à la température de la pièce.

Par évaluation des mesures d'absorption, de fluorescence et d'infrarouge pour les films Langmuir-Blodgett, ainsi que par inspiration du modèle énoncé précédemment nous en arrivons aux conclusions suivantes. Les différentes espèces Chla-eau présentes dans la monocouche à la température ambiante devraient correspondre aux hypothèses suivantes : la forme spectrale à 700 nm est un dimère hydraté de Chla; l'espèce à 720-740 nm, un trimère hydraté ou agrégat supérieur (polymérique tel que les multicouches); et finalement, la forme à haute longueur d'onde (≈ 760 nm) représentant la Chla microcristalline.

La présence de différentes espèces agrégées dans la monocouche est aussi révélée par les calculs de l'équilibre thermique des états vibrationnels du système. La linéarité des tracés Kennard-Stepanov et les températures effectives calculées (à la température ambiante) indiquent un équilibre presque complet des états excités dans un temps relativement court, inférieur à 0.2 ns.

Parmi les phénomènes pouvant affecter la linéarité de la relation universelle on mentionne le recouvrement inhomogène⁽⁴⁹⁾, la conductivité thermale limitée et le

phénomène de relaxation dans l'environnement des molécules fluorescentes^(81,82,85). Les multicoches de Chl_a⁽⁷¹⁾ ont révélé des propriétés similaires au complexe antenne Chl_a-protéine⁽⁸⁴⁾ puisqu'elles ont été considérées comme étant des molécules géantes dont l'état excité était rapidement équilibré thermiquement sur l'ensemble des niveaux d'énergies. Ces multicoches sont des structures rigides dont le réarrangement moléculaire ne peut s'effectuer que sur de très longue période de temps. Les molécules de Chl_a ne peuvent pas faire de rotation librement, et alors les niveaux rotationnels perdent de leurs significations.

Contrairement à cela, la monocouche de Chl_a est plus fluide; on parle d'un manque d'équilibre configurationnel nécessaire à l'établissement de l'équilibre thermique sur les états excités. A basse température, le recouvrement des spectres est identique au résultat des multicoches. Cependant, la possibilité d'impuretés ou d'imperfections structurales dans la monocouche de même que la présence accrue de certaines espèces Chl_a mènent à une déviation importante de la relation universelle. L'imperfection dans la structure de la monocouche semble plus importante que celle rencontrée dans les multicoches. Du moins, la monocouche est plus sujette aux perturbations car elle est plus fragile à certaines déformations de surface. Le film multimoléculaire masque ces imperfections dû au grand nombre de couches moléculaires qui le forme, le rendant plus stable aux variations à sa surface.

Finalement, en relation avec les propriétés spectroscopiques de la Chl dans les systèmes photosynthétiques, les films Langmuir-Blodgett démontrent une dépendance

à la température similaire quant aux intensités relatives de fluorescence provenant des complexes photosynthétiques isolés. Les multicouches présentent un mécanisme d'équilibration thermique analogue au système naturel⁽⁹⁵⁾. Il est intéressant de noter que les films condensés, ne contenant que de la Chla agrégée à l'eau, exhibent des spectres d'émission de fluorescence semblables aux spectres in vivo. Les multicouches sont de très près reliées à l'antenne de Chl in vivo, alors que les monocouches sont plutôt un mélange de plusieurs formes agrégées représentant possiblement le centre réactionnel ainsi que l'antenne de Chl. Nous pouvons donc affirmer que les complexes Chla-protéine in vivo ne sont pas justifiés lors de l'attribution exclusive des résultats de fluorescence in vivo.

6- CONCLUSION

L'investigation des films Langmuir-Blodgett nous a une fois de plus démontrée toute son importance lors des études des propriétés optiques du pigment Chla. L'étude de nos monocouches de Chla a confirmé la présence d'agrégats Chla-eau dans ces systèmes. Cependant, tout comme les travaux en solution, les mesures d'absorption et d'émission de fluorescence de ces films ne donnent pas toute l'information requise pour un assignement non ambigu de la structure des diverses formes moléculaires observées à basse température. Seules des conclusions qualitatives peuvent être avancées quant à la nature de ces espèces.

La caractérisation structurale requière donc une étude plus approfondie du système condensé. Des études ultérieures sur ces films devront mener à une plus grande connaissance de l'effet d'agrégation de la Chla. L'élaboration d'étude théorique et l'utilisation de techniques tels que l'infrarouge, la résonance magnétique nucléaire, le dichroïsme linéaire ... et même l'ellipsométrie seront nécessaire à l'achèvement de la compréhension de ce système modèle des plus intéressants afin d'éclaircir les résultats nombreux, in vivo, concernant les centres réactionnels photosynthétiques.

REFERENCES

- 1) Carpentier, J.M. In Forces, (Couture, M., ed.), 1988, 81, 41-46.
- 2) Anderson, J.M. Molecular and Cellular Biochemistry, 1982, 46, 161-172.
- 3) Galston, A.W., Davies, P.J. and Satter, R.L. (Eds.). The life of the green Plant, (3nd ed.) Prentice Hall inc., New-Jersey, 1980.
- 4) Ong, C.C. and Rodley, G.A. Chemistry in New Zealand, 1985, 46, 7-10.
- 5) Christoffersen, R.E. Int. J. Quantum Chem., 1979, 16, 573-604.
- 6) Chapados, C., Germain, D. and Leblanc, R.M. Biophys. Chem., 1980, 12, 189-198.
- 7) Chapados, C. and Leblanc, R.M. Biophys. Chem., 1983, 17, 211-244.
- 8) Désormeaux, A. and Leblanc, R.M. Thin Solid Films, 1985, 132, 91-99.

- 9) Salisbury, F.B. and Ross, C.W. (Eds.). Plant Physiology, (2nd ed.), Wadsworth Publishing Company inc., California, 1978.
- 10) Lodish, H., Darnell, J. and Baltimore D. (Eds.). La Cellule, biologie moléculaire, Décarie ed. inc., France, 1988.
- 11) Lehninger, A. (Ed.). Biochemistry, the molecular basis of cell structure and function, Worth publishers inc., USA, 1976.
- 12) Clayton, R.K. (Ed.). Light and living matter: a guide to the study of photobiology, Robert E. Krieger publishing company, New-York, 2, 1977.
- 13) Metzler, D.E. (Ed.). Biochemistry, the chemical reactions of living cell, Academic Press inc., New-York, 1977.
- 14) Renger, G. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1987, 26, 643-660.
- 15) Tapie, P. Physiol. Veg., 1985, 23, 435-447.
- 16) Mauzerall, D. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 1976, 273, 287-294.

- 17) Thornber, J.P. (Ed.). Encycl. Plant Physiol., New Series Photosynthesis III, vol.19, Springer Verlag, New-York, 1986.
- 18) Katz, J.J. and Hindmam, J.C. In Biological events probed by ultrafast laser spectroscopy, (Alfano, R.R., ed.), Academic Press inc., New-York, 1982, 119-155.
- 19) Katz, J.J., Shipman, L.L., Cotton, T.M. and Jonson, T.R. In The Porphyrin Physical Chemistry, Part C, (Dolphin, D., ed.), vol.5, Academic Press inc., New-York, 1978.
- 20) Litvin, F.F. and Sineshchekov, V.A. In Bioenergetics of Photosynthesis, (Govindjee, ed.), Academic Press inc., New-York, 1975, 619.
- 21) Pohl, G.W. Biochim. Biophys. Acta., 1972, 288, 248-253.
- 22) Silver, B.L. (Ed.). The Physical Chemistry of Membranes, The Solomon Press, New-York, 1985.
- 23) Vacek, K., Wong, D. and Govindjee. Photochem. Photobiol., 1977, 26, 269-276.
- 24) Szalay, L., Varkonyi, Z. and Tombacz, E. Biofizika, 1981, 26, 628-630.

- 25) Szalay, L., Tombacz, E., Varkonyi, Z. and Faludi-Daniel, A. Acta Phys. Acad. Sci. Hung., 1982, 53, 225-235.
- 26) Sapozhnikov, D.I., Tolibekov, D. and Giller, Yu. E. Izv. Otd. Biol. Nauk. Akad. Nauk. Tadzh. SSR. 1966, 2, 48-50.
- 27) Subramanian, R., Patterson, L.K. and Levanon, H. Photochem. Photobiol., 1985, 41, 511-517.
- 28) Frackowiak, D., Bauman, D. and Betkowska, I. Photochem. Photobiol., 1981, 33, 779-781.
- 29) Galutva, O.A. and Nekrasov, L.I. Vestn. Mosk. Univ. Ser. 2. Khim., 1980, 21, 81-83.
- 30) Shipman, L.L. Photochem. Photobiol., 1980, 31, 157-167.
- 31) Tanford, C. Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.), 1987, 98, 343-356.
- 32) Trosper, T. and Sauer, K. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 162, 97-105.

- 33) de B. Costa, S.M., Froines, J.R., Harris, J.M., Leblanc, R.M., Orger, B.H. and Porter G. Proc. R. Soc. London Ser. A, 1972, 326, 503-519.
- 34) Aghion, J. and Leblanc, R.M. J. Membr. Biol., 1978, 42, 189.
- 35) Shipman, L.L., Cotton, T.M., Norris, J.R. and Katz J.J. J. Am. Chem. Soc., 1976, 98, 8222-8230.
- 36) Fong, F.K., Koester, V.J. and Galloway, L. J. Am. Chem. Soc., 1977, 99, 2372-2375.
- 37) Fong, F.K., Showell, M.S. and Alfano, A.J. J. Am. Chem. Soc., 1985, 107, 7231-7233.
- 38) Hunt, J.E., Katz, J.J., Svirmickas, A. and Hindman, J.C. J. Am. Chem. Soc., 1984, 106, 2242-2250.
- 39) Kuhn, H. In Techniques of Physical Chemistry, (Weissberger, A. and B.W. Rossiter, Eds.), vol 1, 579, Interscience, New-York, 1972.
- 40) Blodgett, K. J. Am. Chem. Soc., 1935, 57, 1007.

- 41) Bardwell, J.A. and Dignam, M.J. J. Colloid Interface Sci., 1987, 116, 1-7.
- 42) Vernon, L.P. and Seely, G.R. (Eds.). The Chlorophylls, Academic Press inc., New-York, 1966.
- 43) Clayton, K. (Ed.). Photosynthesis, physical mechanisms and chemical patterns, Cambridge University press, Cambridge, 1980.
- 44) Kawabe, K., Naemura, N. and Matsukawa, Y. From Technology Reports of the Osaka University, 1970, 20, 665-672.
- 45) Lichtenthaler, H.K. and Buschmann, C. J. Plant Physiol. 1987, 129, 137-147.
- 46) Ting, I.P. (Ed.). Plant Physiology, Addison-Wesley publishing company, Don Mills, 1982.
- 47) Klochkov, B.P. J. Phys. Chem. USSR., 1955, 29, 1432.
- 48) Picard, G., Munger, G. Leblanc, R.M., Le Sage, R., Sharma, D., Siemarczuk, A. and Bolton, J.R. Chem. Phys. Lett., 1986, 129, 41-47.
- 49) Stepanov, B.I. Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 1957, 112, 839-841.

- 50) Sybesma, C. (Ed.). An Introduction to Biophysics, Academic Press inc., New-York, 1977
- 51) Govindjee and Mohanty, P. Fluorescence News, 1971, 6, 1-4.
- 52) Edelman, M., Hallick, R.B. and Chua, N.H. (Eds). Methods in Chloroplast Molecular Biology, Elsevier / North Holland Biomedical press, Amsterdam, 1982.
- 53) Satoh, K. and Butler, W.L. Plant Physiol., 1978, 61, 373-379.
- 54) Brown, J.S. Photosynth. Res., 1983, 4, 375-383
- 55) Rijgersberg, C.P., Amesz, J., Thielen, A.P.G.M. and Swager, J.A. Biochim. Biophys. Acta, 1979, 545, 437-482.
- 56) Brody, S.S. Science, 1958, 128, 838-839.
- 57) Satoh, K. Plant Cell Physiol., 1979, 20, 499-512.
- 58) Seely, G.R. and Jensen, R.G. Spectrochim. Acta, 1965, 21, 1835-1845.
- 59) Watson, W.F. and Livingston, R. J. Chem. Phys., 1950, 18, 802-809.

- 60) Beddard, G.S. and Porter, G. Nature, 1976, 260, 366-367.
- 61) Bojarski, C. Z. Naturforsch. A, 1982, 37 A, 150-153.
- 62) Kelly, A.R. and Patterson, L.K. Proc. R. Soc. London Ser. A, 1971, 324, 117-126.
- 63) Kooyman, R.P.H., Tjeerd, J., Schaafsma, T.J. and Kleibeuker, J.F. Photochem. Photobiol., 1977, 26, 235-240.
- 64) Alfano, A.J., Lytle, F.E., Showell, M.S. and Fong, F.K. J. Chem. Phys., 1985, 20, 758-764.
- 65) Bellamy, W.D., Gaines jr, G.L. and Tweet , A.G. J. Chem. Phys., 1963, 39, 2528.
- 66) Langmuir, I. and Schaefer, V.J. J. Am. Chem. Soc., 1937, 59, 2075-2076.
- 67) Gonen, O., Levanon, H. and Patterson, L.K. Isr. J. Chem., 1981, 21, 271-276.
- 68) Gaines jr, G.L., Bellamy, W.D. and Tweet, A.G. J. Chem. Phys., 1964, 41, 538-542.

- 69) Aoshima, R., Iriyama, K. and Asai, H. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 406, 362-369.
- 70) Litvin, F.F. and Gulyaev, B.A. Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 1964, 158, 460-463.
- 71) Krawczyk, S., Leblanc, R.M. and Marcotte, L. J. Chim. Phys., 1988, 85, 1073-1078.
- 72) Omata, T. and Murata, N. Plant and Cell. Physiol., 1983, 24, 1093-1100.
- 73) Barraud, A., Ruaudel-Teixier, A. and Rosilio, C. In Séminaires Chim. Etat sol., t.9, (J.P. Suchet. ed.), Masson et Cie S.A., Paris, 1975.
- 74) Ke, B. In The Chlorophylls (L.P. Vernon and G.R. Seely, eds.), Academic Press inc., New-York, 1966.
- 75) Langmuir, I. J. Am. Chem. Soc., 1917, 39, 1848.
- 76) Dole, M. and Swartout, J.A. J. Am. Chem. Soc., 1940, 62, 3039.
- 77) Krawczyk, S. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 640, 628-639.

- 78) Costa, L.F., Mielenz, K.D. and Grum, F. In Optical Radiation Measurements, vol. 3, (K.D. Mielenz, ed.), Academic Press inc., New-York, 1982.
- 79) Szalay, L., Tombacz, E. and Singhal, G.S. Acta Phys. Acad. Sci. Hung., 1974, 35, 29-36.
- 80) Van Metter, R.L. and Knox, R.S. Chem. Phys., 1976, 12, 333-340.
- 81) Hevesi, J. and Singhal, G.S. Spectrochim. Acta, 1969, 25 A, 1751-1758.
- 82) Singhal, G.S. and Hevesi, J. Photochem. Photobiol., 1971, 14, 509-514.
- 83) Szalay, L., Singhal, G.S., Tombacz, E. and Kozma, L. Acta. Phys. Acad. Sci. Hung., 1973, 34, 341-350.
- 84) Knox, R.S. and Van Metter, R.L. In Chlorophyll Organization and Energy Transfer in Photosynthesis, Ciba Found. Symp. 61 (new series), Excerpta Medica, Amsterdam, 1979.
- 85) Bjorn, L.O. and Bjorn, G.S. Photochem. Photobiol., 1986, 44, 535-542.
- 86) Désormeaux, A. Mémoire de Maitrise, 1986.

- 87) Aronoff, S. Chem. Revs., 1950, 47, 175-195.
- 88) Papageorgiou, G. In Bioenergetics of Photosynthesis, (Govindjee, ed.), Academic Press inc., New-York, 1975.
- 89) Amster, R.L. Photochem. Photobiol., 1969, 9, 331-338.
- 90) Shipman, L.L., Norris, J.R. and Katz J.J. J. Phys. Chem., 1976, 80, 877-887.
- 91) Chapados, C. Biophys. Chem., 1985, 21, 227-242.
- 92) de B. Costa, S.M., and Porter, G. Proc. R. Soc. London, Ser. A, 1974, 341, 167.
- 93) Kellner, B.M.J., Muller-Landau, F. and Cadenhead, D.A. J. Colloid Interface Sci., 1978, 66, 597.
- 94) Chapados, C. and Leblanc, R.M. Chem. Phys. Lett., 1977, 49, 180-182.
- 95) Kramer, H.J.M., Amesz, J. and Rijgersberg, C.P. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 637, 272-277.

ANNEXE

La relation entre les spectres d'absorption et de fluorescence de molécules complexes peut donner de l'information quant à la fréquence d'une transition électronique pure, la validité à la symétrie miroir et les facteurs affectant l'allure des bandes.

Il est bien connu que cette relation universelle, basée sur des faits physiques, est l'un des principes les plus importants de la luminescence contemporaine.

Dans les molécules complexes⁽⁴⁹⁾, la puissance en terme de luminescence (W_ν^l) est dépendante de la fréquence (ν) et prend la forme de l'équation suivante :

$$W_\nu^l = h\nu \cdot n^* \int \rho^*(E_{vib}^*) \cdot A(E_{vib}^*, \nu) dE_{vib}^* \quad (1)$$

où n^* est le nombre total de molécule dans l'état électronique excité, $A(E_{vib}^*, \nu)$ est la probabilité d'une transition spontannée à partir des niveaux vibrationnels E_{vib}^* vers les niveaux E_{vib} de l'état électronique le plus bas. On relie les valeurs E_{vib}^* , E_{vib} et la fréquence d'émission (ν) par l'équation :

$$E_{vib}^* + h\nu_{el} = E_{vib} + h\nu \quad (2)$$

où $h\nu_{el}$ est l'énergie de la transition zéro-zéro.

Quant à la fonction de distribution sur les niveaux vibrationnels on la définit par l'expression :

$$\rho^*(E_{vib}^*) = C^*g^*(E_{vib}^*) \cdot e^{-E_{vib}^*/kT} \quad (3)$$

dont $g^*(E_{vib}^*)$ est le poids statistique du niveau E_{vib}^* et T la température du milieu environnant. On doit toutefois noter que les équations (1) et (2) sont toujours valides tandis que l'équation (3) n'est valide que lorsque l'équilibre thermique est établi entre les molécules excitées et le milieu environnant.

Au niveau de l'absorption, la puissance absorbée à la fréquence ν est principalement déterminée par les propriétés des molécules dans l'état fondamental. Elle a généralement deux composantes qui sont les suivantes :

$$W_{\nu}^a = h\nu \cdot n \int \rho(E_{vib}) B(E_{vib}, \nu) U_{\nu} dE_{vib} + h\nu \cdot n \int \rho(E_{vib}) B'(E_{vib}, \nu') U_{\nu} dE_{vib} \quad (4)$$

où le premier terme consiste en l'absorption associée à la transition moléculaire vers un état électronique excité alors que le second terme est l'absorption associée à la (aux) transition(s) entre les niveaux vibrationnels de l'état électronique normal (aucune excitation due à l'absorption). Prenez note que ce second terme est habituellement faible mais devient non négligeable lors d'une fluorescence anti-Stokes. Dans cette équation, n représente le nombre de molécule total. $\rho(E_{vib}) = Cg(E_{vib}) \cdot e^{-E_{vib}/kT}$ est la fonction

de distribution sur les niveaux vibrationnels de l'état électronique le plus bas. $g(E_{vib})$ est le poids statistique du niveau E_{vib} , U_ν est la densité de la radiation incidente, $B(E_{vib}, \nu)U_\nu$ et $B'(E_{vib}, \nu')U_\nu$ sont les probabilités des transitions avec ou sans excitation de l'état électronique supérieur.

Puisque le second terme est presque toujours insatisfait, nous le négligeons dans l'équation (4), de sorte que de l'équation (2) ainsi que de la relation entre les coefficients d'Einstein suivant :

$$\frac{A(E_{vib}, \nu)}{B(E_{vib}, \nu)} = \frac{g(E_{vib}) 8\pi h\nu^3}{g^*(E_{vib}) c^3} \quad (5)$$

nous obtenons :

$$\begin{aligned} \frac{W_\nu^1}{W_\nu^a / U_\nu} &= \frac{n^* \int_{h\nu=h\nu_{el}}^{\infty} C^* g^*(E_{vib}) \cdot e^{-E_{vib}/kT} \cdot A(E_{vib}, \nu) dE_{vib}}{n \int_0^{\infty} C g(E_{vib}) \cdot e^{-E_{vib}/kT} \cdot B(E_{vib}, \nu) dE} \\ &= \frac{n^* C^* \cdot e^{(h\nu_{el}/kT)} \cdot 8\pi h\nu^3 \cdot e^{(-h\nu/kT)}}{n C} \cdot \frac{c^3}{c^3} \\ &= D \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} \cdot e^{(-h\nu/kT)} \quad (6) \end{aligned}$$

Il faut noter que l'intégration en (6) est faite à partir de ν constant. Sous cette condition, U_ν devient une constante et peut être placée devant l'intégrale. Les limites d'intégration de l'équation (6) sont pour $\nu > \nu_{el}$ (i.e. pour une excitation de Stokes). Si $\nu < \nu_{el}$ alors nous devons intégrer au numérateur de $E_{vib}^* = 0$ à $E_{vib}^* = \infty$, et de $E_{vib} = h\nu_{el} - h\nu$ à $E_{vib} = \infty$ au dénominateur.

Comme W_{ν}^a/U_ν est proportionnel au coefficient d'absorption à une fréquence donnée, x_ν , nous pouvons écrire :

$$\frac{W_{\nu}^1}{x_\nu} = D(T) \frac{8\pi h\nu^3 \cdot e^{(-h\nu/kT)}}{c^2} = d(T)\nu^3 \cdot e^{(-h\nu/kT)} \quad (7)$$

L'équation (7) est générale et devrait être satisfaite dans tous les cas lorsqu'une équilibration thermique est atteinte avant l'émission de photons de luminescence. Quelquefois, un changement dans le spectre d'émission survient lorsque la fréquence d'excitation est inférieure à ν_{el} (i.e. lors d'une excitation anti-Stokes). Dans ce cas, l'équation (7) n'est pas satisfaite.

D'un autre côté, la puissance de la luminescence (W_{ν}^1) est le produit du coefficient d'absorption et du rendement de fluorescence⁽⁸⁵⁾. Pour une espèce fluorescente homogène, le rendement de fluorescence est indépendant de la longueur d'onde et donc la relation (7) peut être reformulée comme suit :

$$F(\nu) = b \cdot A(\nu) \nu^3 e^{(-h\nu/kT)} \quad (8)$$

dans laquelle $F(\nu)$ est le nombre de photons de fluorescence par unité d'intervalle de fréquence, b est une constante, $A(\nu)$ est le coefficient d'absorption, ν la fréquence, h la constante de Planck, k la constante de Boltzmann et T la température absolue.

Pour la dérivation sous cette forme, $e^{(h\nu/kT)-1}$ dans la formule de Planck est approximé à $e^{(h\nu/kT)}$, terme qui correspond très bien à la région spectrale d'intérêt. Ceci permet à l'équation (8) d'être ainsi réécrite :

$$F(\lambda) = b \cdot A(\lambda) \cdot \lambda^{-5} \cdot e^{(-hc/\lambda kT)} \quad (9)$$

où $F(\lambda)$ représente la puissance de fluorescence par unité de longueur d'onde d'intervalle, $A(\lambda)$ le coefficient d'absorption, λ la longueur d'onde et c la vitesse de la lumière.

Par réarrangement des termes et en prenant le logarithme naturel des deux membres nous obtenons finalement :

$$\ln [\lambda^5 \cdot F(\lambda) / A(\lambda)] = \ln b - hc/\lambda kT \quad (10)$$

Cette forme permet l'évaluation de l'équilibre thermique de l'énergie d'excitation dans des systèmes tels que les solutions ou des arrangements plus rigides comme par exemple les films Langmuir-Blodgett.

Le traçé de $\ln [\lambda^5 \cdot F(\lambda)/A(\lambda)]$ vs $1/\lambda$ donne la possibilité, à partir de la pente $-hc/kT$, de déterminer la température T absolue. Cependant, dans la majorité des cas la température (T) calculée est d'une valeur différente de la température à laquelle l'expérience a été produite. Cette différence est non négligeable pour la plupart des cas. Ce phénomène provient d'une non linéarité du traçé de Kennard-Stepanov dont les principales causes connues sont les suivantes :

1) perte d'équilibre configurationnel (orientation, translation) entre les molécules investiguées et le milieu environnant,

2) les molécules sous études possèdent un excès d'énergie lequel est de nature vibrationnel plutôt qu'électronique,

3) système non idéal, non uniforme dont la présence d'impuretés agissent comme "quencher" de l'énergie émise.

Tous ces effets produisent des recouvrements spectraux inhomogènes dû à ce que les molécules dans l'état électronique excité ne peuvent atteindre l'équilibre thermique à travers les sous niveaux vibrationnels de l'état excité.