

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE
PRESENTÉ A
L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE ES SCIENCES (ENVIRONNEMENT)

PAR

ANDRE DUFRESNE

B. Sp. Sc. (BIOCHIMIE)

SPECTROSCOPIE DE CHLOROPLASTES EN SUSPENSION

JUIN 1978

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

A Claudette,
mon épouse.

SPECTROSCOPIE DE CHLOROPLASTES EN SUSPENSION

Résumé

Chez les végétaux supérieurs, le chloroplaste est le siège de la photosynthèse. Une vue en coupe d'un chloroplaste révèle un réseau membranaire, les thylakoides, baignant dans un espace d'apparence granuleuse, le stroma. A l'intérieur du système lamellaire, on y retrouve la chlorophylle et les autres pigments photosynthétiques.

Comme les pigments dans les organites photosynthétiques sont fluorescents, on peut se servir de cette propriété pour étudier les processus photophysiques des chloroplastes en suspension.

Les mesures de fluorescence sont faites à l'aide d'un spectrofluorimètre laser, équipé d'une cellule photovoltaïque sensible dans le rouge et le proche infra-rouge.

Les systèmes fluorescents utilisés sont les chloroplastes intacts (classe I) et les chloroplastes cassés (classe II) de feuilles d'épinard. On obtient les deux classes de chloroplastes en les centrifugeant sur gradient de densité.

La microscopie électronique et la réduction du ferricyanure de potassium (réaction de Hill) sont les deux techniques qui nous ont permis de révéler la nature des chloroplastes. Pour mesurer la réaction de Hill

en continu, il a fallu construire un photomètre pouvant mesurer de faibles changements d'absorbance.

A basse température (77 K), il existe une corrélation entre l'état des chloroplastes et leurs paramètres de fluorescence. Ce sont les rapports F 690/F 683 et F 735/F 683 qui nous indiquent que la corrélation existe.

Quelques tentatives ont été faites pour détecter la phosphorescence de la chlorophylle in vivo. Aucune émission de phosphorescence n'a été détectée jusqu'à présent dans le proche infra-rouge.

A. Dufresne
A. DUFRESNE

R.M. Leblanc
R.M. LEBLANC

TABLE DES MATIERES

. REMERCIEMENTS.....	viii
. LISTE DES SCHEMAS.....	ix
. LISTE DES FIGURES.....	xii
. LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
. INTRODUCTION.....	1
. CHAPITRE I : NOTIONS GENERALES SUR LA PHOTOSYNTHÈSE.....	3
I.1 Importance de la photosynthèse.....	4
I.2 Morphologie d'un chloroplaste.....	6
I.3 Séquence des réactions de la photosynthèse.....	6
I.4 Le concept de l'unité photosynthétique.....	11
I.5 Schéma de la réaction claire: deux systèmes de pigments et deux réactions lumineuses.....	12
I.6 Les processus primaires et les processus secondaires de la photosynthèse.....	14
I.7 Les processus primaires qui conduisent à la photosynthèse.....	22
1. L'absorption de la lumière.....	24
2. L'absorption de la lumière par les pigments photosynthétiques.....	29
1. Les chlorophylles.....	29
2. Les caroténoides.....	30
3. Les autres pigments.....	30
3. La formation des états électroniques excités.....	31
4. Le transfert et la migration de l'énergie.....	36

5. Le piégeage de l'énergie à un site particulier connu sous le nom de centre de réaction et les processus photochimiques primaires.....	39
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES.....	43
II.1 Spectrophotomètre d'absorption.....	44
1. Description du spectrophotomètre d'absorption UNICAM SP - 1800.....	44
2. Utilisation de l'UNICAM SP - 1800.....	45
3. Photomètre pour mesurer les faibles changements d'absorbance.....	46
4. Utilisation du photomètre.....	57
II.2 Spectrofluorimètre laser.....	58
1. Description du système uv-visible	58
2. Caractéristiques des éléments du système uv-visible.....	61
3. Description du système pour le visible et le proche infra-rouge.....	63
4. Caractéristiques des éléments du système de détection pour le visible et le proche infra-rouge.....	67
5. Utilisation.....	68
II.3 Spectrofluorimètre Perkin Elmer "MPF - 2A".....	74
1. Description.....	74
2. Utilisation.....	75
II.4 Spectrophosphorimètre.....	75
1. Description.....	75
2. Caractéristiques des éléments du spectrophosphorimètre.....	77
3. Utilisation.....	78
II.5 Extraction des chloroplastes.....	79

II.6	Détermination de la concentration de chlorophylle dans une suspension de chloroplastes.....	81
II.7	Microscopie électronique.....	86
II.8	Séparation des chloroplastes sur gradient continu de saccharose.....	87
1.	Préparation des gradients.....	88
2.	Générateur de gradients.....	88
3.	Fractionnement et profil des gradients continu de saccharose.....	90
4.	Profil de la distribution des chloroplastes.....	96
II.9	Séparation des chloroplastes sur gradient continu de Ludox A.M.....	103
1.	Préparation des gradients continus de Ludox A.M.....	104
2.	Centrifugation isopycnique des chloroplastes.....	105
3.	Fractionnement et profil des gradients continus de Ludox A.M.....	105
4.	Profil de la distribution des chloroplastes.....	109
II.10	Séparation des chloroplastes sur gradient continu de Ludox A.M.....	113
1.	Préparation des gradients discontinus de Ludox A.M.....	113
2.	Fractionnement et profil des gradients discontinus de Ludox A.M.....	114
3.	Profil de la distribution des chloroplastes.....	117
II.11	Mesure de l'intégrité des chloroplastes par la réaction de Hill.....	121
1.	Principe de la méthode.....	125
2.	Procédure.....	126
3.	Précision de la méthode.....	128
4.	Réaction de Hill en fonction de la concentration de chlorophylle.....	131

5.	Réaction de Hill chez les chloroplastes intacts séparés sur gradient discontinu de Ludox AM.....	133
.	CHAPITRE III: SPECTROSCOPIE DE CHLOROPLASTES EN SUSPENSION.....	137
III.1	Spectre d'absorption d'une suspension de chloroplastes.....	138
III.2	Quelques généralités sur la fluorescence.....	144
1.	Définition.....	144
2.	Fluorescence et luminescence.....	146
3.	Fluorescence constante et fluorescence variable.....	149
III.3	Spectre d'excitation d'une suspension de chloroplastes..	153
III.4	Spectre de fluorescence d'une suspension de chloroplastes à la température ambiante.....	153
III.5	Spectre de fluorescence d'une suspension de chloroplastes à 77 K.....	158
1.	Préparation des échantillons.....	159
2.	Spectre de fluorescence à 77 K d'une suspension de chloroplastes bruts.....	160
3.	Spectre de fluorescence à 77 K d'une suspension de chloroplastes séparés sur gradient discontinu de Ludox et sur gradient continu de sucre.....	169
.	CHAPITRE IV : TENTATIVES DE MESURE DE LA PHOSPHORESCENCE DE LA CHLOROPHYLLE <u>IN VIVO</u>	184
IV.1	Présence de l'état triplet dans les processus primaires de la photosynthèse.....	185
IV.2	Détection de l'état triplet.....	187
IV.3	Détection de l'état triplet via l'émission de phosphorescence.....	189
IV.4	Nos essais sur la détection de la phosphorescence de la chlorophylle <u>in vivo</u>	194

IV.5	Les contraintes à la mesure de l'émission de phosphorescence.....	197
. CHAPITRE V :	CONCLUSION.....	205
	BIBLIOGRAPHIE.....	209

REMERCIEMENTS

Je tiens, en premier lieu, à exprimer ma plus sincère reconnaissance au Docteur Roger M. Leblanc qui a dirigé d'une manière compréhensive mon travail de recherche.

J'adresse mes remerciements à M. Alain Tessier, physicien de notre équipe de recherche, pour son intense participation à la construction de nos systèmes de détection.

Je témoigne ma sympathie au Docteur Jacques Boisvert pour ses précieux conseils sur les gradients de densité et sur la microscopie électronique.

Enfin, un grand merci à toutes les personnes, qui de près ou de loin, m'ont accordé leur collaboration.

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Chimie de la photosynthèse.....	5
Schéma 2 : Schéma d'un chloroplaste.....	7
Schéma 3 : Schéma des deux réactions lumineuses.....	15
Schéma 4 : Processus primaires et secondaires de la photosynthèse.....	17
Schéma 5 : Formation des molécules carbonées Cycle de Benson - Bassham - Calvin.....	21
Schéma 6 : Représentation schématique des énergies poten- tielles d'une molécule.....	26
Schéma 7 : Représentation schématique d'une orbitale.....	28
Schéma 8 : Energies de transition associées à l'absorption de la lumière et à la fluorescence de la chloro- phylle.....	32
Schéma 9 : Le destin du premier état excité singulet.....	35
Schéma 10 : Photomètre.....	47
Schéma 11 : Amplificateur différentiel du photomètre.....	50
Schéma 12 : Unicam SP - 1800 couplé à un système d'irra- diation.....	53
Schéma 13 : Support à cellule.....	54
Schéma 14 : Schéma optique du système d'irradiation.....	55
Schéma 15 : Compartiment de détection de l'UNICAM SP-1800.....	56
Schéma 16 : Schéma simplifié du spectrofluorimètre laser. Système de détection pour l'uv et le visible.....	59
Schéma 17 : Schéma simplifié du spectrofluorimètre laser. Système de détection pour le visible et le proche infra-rouge.....	64

Schéma 18 : Lentilles cylindriques.....	65
Schéma 19 : Cryostat pour les mesures à basse température.....	66
Schéma 20 : Schéma simplifié du spectrophosphomètre laser.....	76
Schéma 21 : Schéma résumant la procédure d'extraction des chloroplastes.....	80
Schéma 22 : Générateur de gradient.....	89
Schéma 23 : Fractionneur de gradient.....	91
Schéma 24 : Extraction des chloroplastes pour la réaction de Hill.....	129
Schéma 25 : Les états de l'induction de fluorescence.....	150

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Intensité relative de fluorescence en fonction de la concentration de chlorophylle <u>a</u> (système uv-visible).....	69
Figure 2 : Intensité relative de fluorescence en fonction de la concentration de chlorophylle <u>a</u> (système visible et proche infra-rouge).....	71
Figure 3 : Intensité relative de fluorescence en fonction de la concentration de chlorophylle <u>a</u> (système visible et proche infra-rouge équipé du cryostat).....	72
Figure 4 : Suspension de chloroplastes bruts vus au microscope électronique.....	82
Figure 5 : Graphique de l'indice de réfraction à 25 °C en fonction du numéro de la fraction (gradient continu de saccharose).....	92
Figure 6 : Relation entre l'indice de réfraction et la densité à 25 °C (solutions de saccharose).....	94
Figure 7 : Graphique de la densité à 25 °C en fonction du numéro de la fraction (gradient continu de saccharose)....	95
Figure 8 : Distribution des chloroplastes dans un gradient de saccharose.....	97
Figure 9 : Distribution des chloroplastes dans un gradient de saccharose après fractionnement.....	98
Figure 10 : Variation de pourcentage de chloroplastes intacts dans un gradient de saccharose.....	99
Figure 11 : Distribution des chloroplastes dans un gradient discontinu de saccharose (selon Leech, 1964).....	101
Figure 12 : Distribution des chloroplastes dans un gradient discontinu de saccharose (selon Lyttleton, 1970).....	102
Figure 13 : Graphique de l'indice de réfraction à 23 °C en fonction du numéro de la fraction (gradient continu de Ludox).....	106

Figure 14 : Relation entre l'indice de réfraction et la densité à 23 ⁰ C (solution Ludox).....	107
Figure 15 : Graphique de la densité à 23 ⁰ C en fonction du numéro de la fraction (gradient continu de Ludox).....	108
Figure 16 : Profil de la distribution des chloroplastes dans un gradient continu de Ludox après fractionnement.....	110
Figure 17 : Chloroplastes intacts séparés sur gradient continu de Ludox.....	111
Figure 18 : Chloroplastes cassés séparés sur gradient continu de Ludox.....	112
Figure 19 : Graphique de l'indice de réfraction en fonction du numéro de la fraction (gradient discontinu de Ludox).....	115
Figure 20 : Graphique de la densité à 24 ⁰ C en fonction du numéro de la fraction (gradient discontinu de Ludox).....	116
Figure 21 : Profil de la distribution des chloroplastes dans un gradient discontinu de Ludox.....	118
Figure 22 : Profil de la distribution des chloroplastes dans un gradient de Ludox après fractionnement.....	119
Figure 23 : Profil de la distribution des chloroplastes dans un gradient discontinu de Ludox montrant difficilement la bande à une densité de 1.20-1.21.....	120
Figure 24 : Chloroplastes intacts séparés sur gradient discontinu de Ludox.....	122
Figure 25 : Chloroplastes cassés et intacts séparés sur gradient discontinu de Ludox.....	123
Figure 26 : Graphique de la réaction de Hill avant et après un choc osmotique.....	130
Figure 27 : Spectre d'absorption d'une suspension de chloroplastes (solvant: tampon tricine).....	139
Figure 28 : Spectre d'absorption d'une suspension de chloroplastes (solvant: acétone/eau, 80%).....	141

Figure 29 :	Spectre d'excitation d'une suspension de chloroplastes (solvant: glycérol/tampon tricine, 50%).....	154
Figure 30 :	Spectre de fluorescence d'une suspension de chloroplastes (système uv-visible).....	156
Figure 31 :	Spectre de fluorescence à 298 K d'une suspension de chloroplastes intacts séparés sur gradient discontinu de Ludox (système visible - proche infra-rouge).....	157
Figure 32 :	Spectre de fluorescence d'une suspension de chloroplastes bruts (λ exc.: 632.8nm;T : 77 K).....	161
Figure 33 :	Spectre de fluorescence d'une suspension de chloroplastes bruts (λ exc.: 441.6 nm;T: 77 K).....	162
Figure 34 :	Spectre de fluorescence à 77 K d'une suspension de chloroplastes bruts en présence de 100mM de sodium dithionite.....	167
Figure 35 :	Spectre de fluorescence à 77 K d'une suspension de chloroplastes intacts séparés sur gradient discontinu de Ludox.....	171
Figure 36 :	Spectre de fluorescence à 77 K d'une suspension de chloroplastes intacts séparés sur gradient discontinu de Ludox (fente 8 nm).....	173
Figure 37 :	Spectre de fluorescence à 77 K d'une suspension de chloroplastes mixtes séparés sur gradient discontinu de Ludox.....	174
Figure 38 :	Spectre de fluorescence à 77 K d'une suspension de chloroplastes intacts séparés sur gradient de saccharose.....	177
Figure 39 :	Spectre de fluorescence à 77 K d'une suspension de chloroplastes cassés, séparés sur gradient continu de saccharose.....	179
Figure 40 :	Spectre d'émission à 298 K d'une suspension dégazée de chloroplastes bruts.....	196
Figure 41 :	Spectre d'émission à 77 K d'une suspension dégazée de chloroplastes bruts.....	198
Figure 42 :	Spectre d'émission à 77 K dans le proche infrarouge d'une suspension dégazée de chloroplastes bruts.....	199
Figure 43 :	Spectre d'émission à 77 K d'une suspension dégazée de chloroplastes bruts (100 mM de dithionite de sodium).....	200

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Réaction de Hill dans une suspension de chloroplastes bruts.....	128
Tableau 2 : Réaction de Hill dans une suspension de chloroplastes bruts, Influence de la concentration de chlorophylle.....	132
Tableau 3 : Réaction de Hill chez les chloroplastes intacts.....	134
Tableau 4 : Paramètres de fluorescence d'une suspension de chloroplastes bruts.....	165
Tableau 5 : Paramètres de fluorescence d'une suspension de chloroplastes bruts avec dithionite de sodium.....	168
Tableau 6 : Paramètres de fluorescence d'une suspension de chloroplastes intacts et mixtes séparés sur gradient discontinu de Ludox.....	175
Tableau 7 : Paramètres de fluorescence d'une suspension de chloroplastes intacts et cassés séparés sur gradient continu de saccharose.....	178
Tableau 8 : Résumé des paramètres de fluorescence.....	182
Tableau 9 : Résumé des paramètres de phosphorescence des chlorophylles et de leurs dérivés.....	190

INTRODUCTION

Dans le processus primaire de la photosynthèse, la chlorophylle (chl) sert à deux fonctions principales:

- i) absorber la lumière et transférer l'énergie absorbée au centre réactionnel,
- ii) induire les réactions photochimiques primaires au centre réactionnel.

Après l'absorption d'un quantum de lumière, la chlorophylle qui était à l'état fondamental passe à l'état singulet excité.

C'est principalement dans cet état énergétique que peut s'opérer le transfert de l'énergie ou l'induction des réactions photochimiques primaires.

Cet état énergétique (ou plus précisément le premier état singulet excité) subit la compétition des autres processus de dissipation énergétique, en l'occurrence la fluorescence, la conversion interne, la conversion intersystème vers la formation de l'état triplet et le quenching.

Parmi les processus de dissipation de l'énergie d'excitation, la fluorescence est le processus compétiteur le plus connu. La spectroscopie de fluorescence est une excellente technique pour connaître l'état physique d'un système fluorescent.

Le processus de désactivation le plus méconnu et souvent le plus controversé est la formation de l'état triplet; sa participation dans les processus primaires devient de plus en plus considérée.

Le processus de désactivation associé à l'état triplet, soit la phosphorescence, devient donc le traceur idéal qui prouvera inévitablement la présence de l'état triplet.

Le but de ce projet est de préciser les paramètres de fluorescence (à 77 K) de chloroplastes intacts et de chloroplastes cassés séparés sur gradient de densité.

Nous voulons également essayer de démontrer la phosphorescence dans le proche infra-rouge de la chl a in vivo.

CHAPITRE I

NOTIONS GENERALES SUR LA PHOTOSYNTHESE

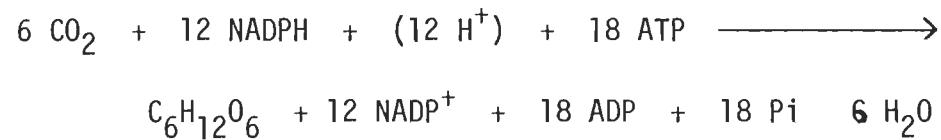
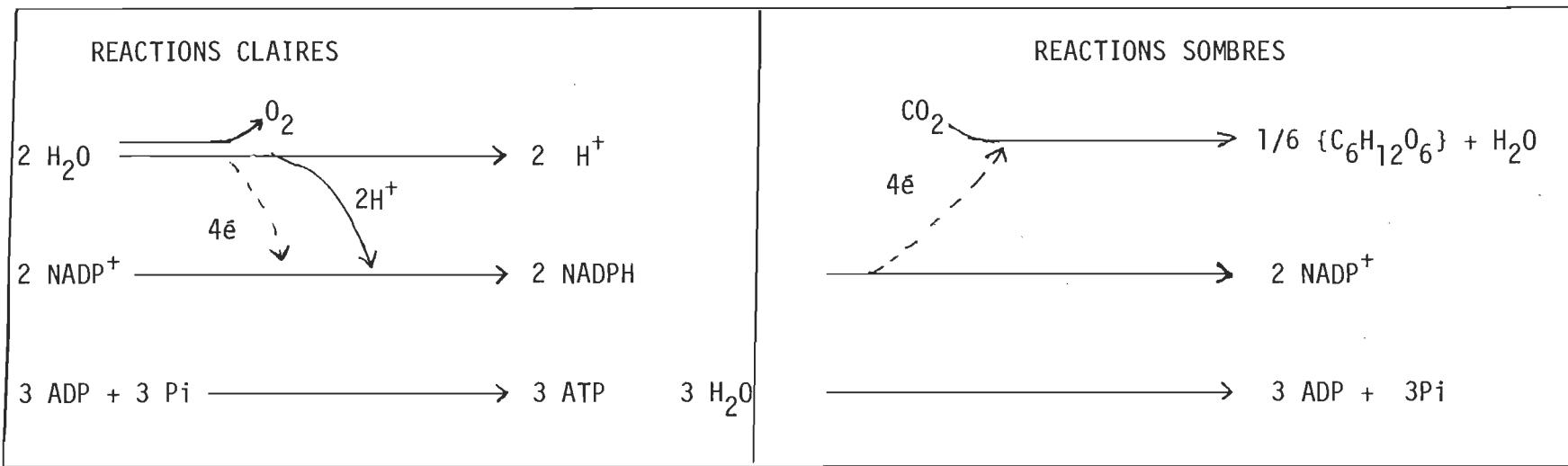
I.1 Importance de la photosynthèse

La photosynthèse est le processus qu'a trouvé la nature pour transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique utilisable par les êtres vivants.

Depuis que le philosophe anglais J. Priestley a découvert en 1772 (Disch 1977) que les plantes vertes émettaient de l'oxygène et que Lavoisier, quelques années plus tard, eut démontré que les êtres vivants exhalait du gaz carbonique à la suite de la combustion d'oxygène de l'air, on a pu évaluer toute l'importance de la photosynthèse dans la nature.

En effet, grâce aux molécules de chlorophylle contenues dans leurs cellules, les plantes vertes transforment l'énergie lumineuse du soleil pour produire les sucres nécessaires à leur subsistance à partir de l'eau disponible dans la nature et du gaz carbonique disponible dans l'atmosphère environnante. Ce processus n'aurait en lui-même rien d'extraordinaire s'il n'était accompagné en même temps de production d'oxygène.

Ainsi donc, les plantes captent le CO₂ résultant de la respiration de tous les êtres du règne animal, brisent les molécules d'eau pour fabriquer sucres et amidon (hydrates de carbone) dont se nourrissent les êtres vivants et réémettent dans l'atmosphère l'oxygène indispensable à la respiration (schéma 1). C'est dire l'importance fondamentale de ce processus dans la nature.



SCHEMA 1 : CHIMIE DE LA PHOTOSYNTHESE

1.2 Morphologie d'un chloroplaste

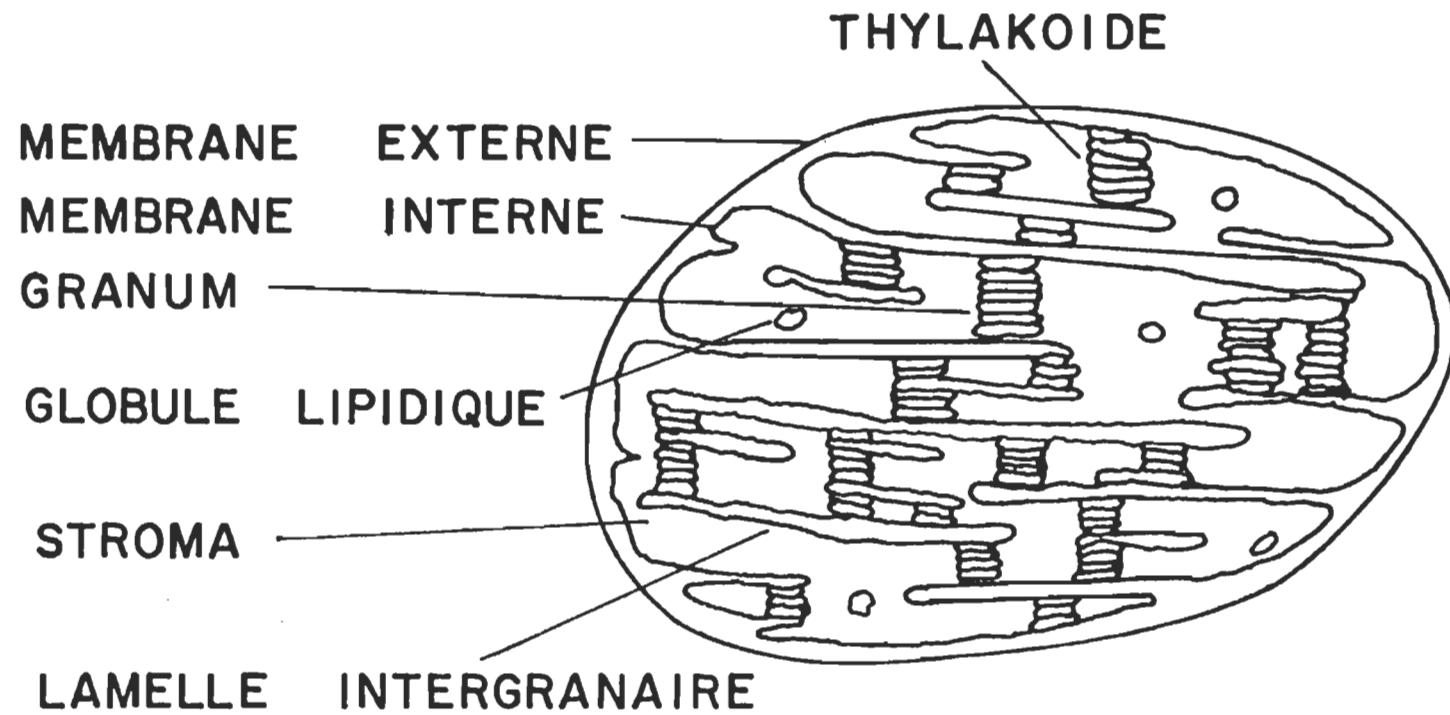
Chez les végétaux supérieurs, le processus de la conversion de l'énergie solaire en énergie chimique ne pourrait se produire sans l'organite particulier, siège de la photosynthèse, le chloroplaste.

Le contenu d'un chloroplaste est retenu par une enveloppe qui se compose de deux membranes dans un espace renfermé. Une vue en coupe d'un chloroplaste (schéma 2) révèle un réseau membranaire, les thylakoïdes, baignant dans un espace d'apparence granuleuse, le stroma. A l'intérieur ou sur le système lamellaire on retrouve la chlorophylle et les autres pigments.

Dépendamment du type de chloroplastes, on trouve les pigments distribués également sur les disques lamellaires ou concentrés dans une région spécifique du disque. Si ces régions spécifiques s'empilent les unes par dessus les autres, l'empilement complet est appelé granum. La matrice ou le stroma du chloroplaste est trouvé à l'intérieur et dans l'environnement du système lamellaire. En plus du système lamellaire, on trouve en particulier dans la matrice, des granules, des globules lipidiques et des fibres d'amidon.

1.3 Séquence des réactions de la photosynthèse

La synthèse des hydrates de carbone, le dégagement d'oxygène et la fixation du CO₂ se produisent dans le chloroplaste grâce à une longue



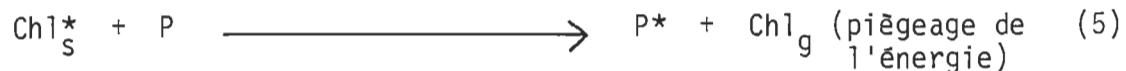
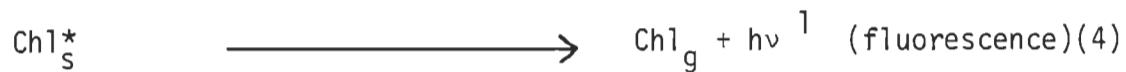
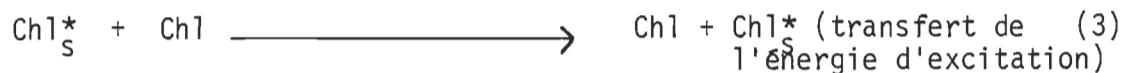
SCHEMA 2 : SCHEMA D'UN CHLOROPLASTE
(Gallinier 1974)

séquence de réactions. Nous allons maintenant reprendre certains aspects concernant les processus primaires et secondaires de la photosynthèse.

L'absorption de la lumière est le premier acte de la photosynthèse; la vitesse d'absorption d'un quantum d'énergie est de 10^{-15} seconde. La formation des glucides est la dernière étape de la photosynthèse; cette synthèse résulte des réactions enzymatiques qui peuvent prendre plusieurs secondes.

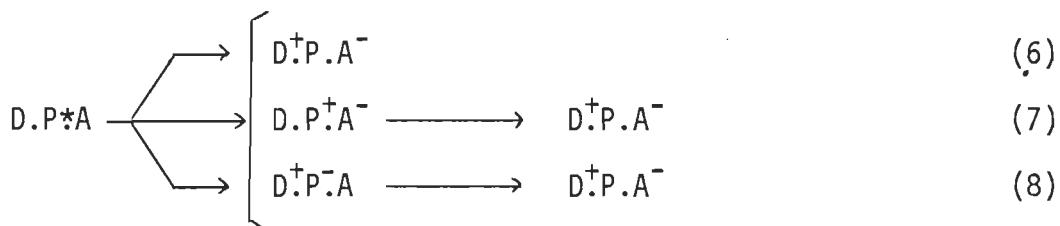
La période de temps entre l'absorption d'un photon et la synthèse d'un glucide peut être divisée arbitrairement en trois grandes étapes (Kamen 1963):

1. L'étape des radiations physiques: elle dure de 10^{-15} à 10^{-6} s; c'est la période de temps pendant laquelle se produit le processus d'excitation, la migration physique et le piégeage de l'énergie d'excitation. La séquence de ces événements est la suivante:



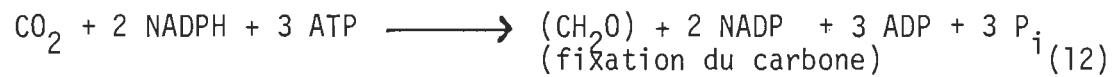
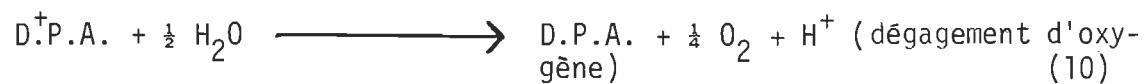
où Chl_g - la chlorophylle à l'état fondamental
 Chl_s - la chlorophylle à l'état excité singulet
 Chl_t - la chlorophylle à l'état triplet
et P - piège énergétique

2. L'étape de la photochimie: elle dure de 10^{-10} à 10^{-3} sec.; c'est la période de temps pendant laquelle quelques unes des réactions ci-haut mentionnées se complètent; la séparation de charges ou les réactions d'oxydo-réduction primaires sont aussi mises en jeux. Trois voies possibles peuvent exprimer les réactions d'oxydo-réduction primaires:



où D - le donneur primaire d'électron
 D^+ - le donneur primaire d'électron sous sa forme oxydée
A - l'accepteur primaire d'électron
 A^- - l'accepteur primaire d'électron sous sa forme réduite
et P - le piège énergétique

3. L'étape de la biochimie: elle dure de 10^{-4} à 10^{-2} sec.; c'est la période de temps pendant laquelle les transporteurs d'électrons et les enzymes sont mis en jeux; le résultat final est le dégagement d'oxygène et la fixation du CO_2 . Cette étape peut se résumer comme suit:



où NADP - nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate

NADPH - dihydronicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate

ADP - adénosine-diphosphate

ATP - adénosine-triphosphate

I.4 Le concept de l'unité photosynthétique

Emerson et Arnold (1932) établirent qu'un groupe d'environ 2400 molécules de chlorophylle a agisse en coopération d'une manière ou d'une autre lors du dégagement d'une molécule d'oxygène. Puisque quatre atomes d'hydrogène (ou électron) doivent être transférés de l'eau vers le bioxyde de carbone pour accomplir ce processus, environ 600 molécules de chlorophylle doivent coopérer dans le transfert d'un électron.

Dans le modèle de deux réactions lumineuses de la photosynthèse, chaque électron doit être transféré en deux étapes, de telle sorte que le groupe de 600 molécules de chlorophylle doit être divisé en deux sous-groupes, probablement de 300 molécules chacun. Ce sous-groupe de 300 molécules est appelé unité photosynthétique (PSU) parce qu'il est la plus petite quantité de chlorophylles qui sert au transfert d'un électron vers le piège énergétique.

Le concept de l'unité photosynthétique fut également appuyé par d'autres auteurs (Arnold et Kohn, 1934; Gaffron et Wohl, 1936 a, b; Thomas et Coll, 1953).

I.5 Schéma de la réaction claire; deux systèmes de pigments et deux réactions lumineuses.

Pour expliquer les processus de la photosynthèse il faut un modèle qui doit satisfaire les données expérimentales suivantes:

Emerson et Lewis (1943) montrent qu'une courbe du rendement quantique de la photosynthèse OPS en fonction de la longueur d'onde de la lumière ne demeure pas constante sur tout le spectre. Ils découvrent que le rendement de la photosynthèse était plus grand lorsque la lumière rouge ($\lambda < 700 \text{ nm}$ absorbée par la chl b) et la lumière rouge lointaine ($\lambda > 700 \text{ nm}$ absorbée par chl a) sont appliquées simultanément que lorsqu'elles sont utilisées séparément.

Puis, Emerson et Coll (1957) découvrent qu'on peut éviter le "red drop". On augmente ainsi le rendement quantique dans cette région si la lumière est absorbée par les pigments accessoires. Nous avons donc un ajout au processus d'absorption de la lumière rouge lointaine par la chl a.

Emerson (1958) suggère aussi que l'excitation simultanée de la chl a et des pigments accessoires est nécessaire pour obtenir des rendements quantiques élevés et que la chl a seul est inefficace dans la photosynthèse.

Les études sur la fluorescence de la chl a accomplies par Duysen (1952) étaient en conflit avec les idées d'Emerson car Duysen avait montré que la

chl a était l'entité photochimique primaire et que les pigments accessoires avaient un rôle indirect dans la collecte de l'énergie et son transfert à la chl a.

Emerson et Rabinowitch (1960) rejetèrent l'idée que la chl b est l'entité primaire d'une réaction lumineuse. Comme alternative, ils suggérèrent que deux formes différentes de chl a sont les entités de deux réactions lumineuses différentes.

Les spectres d'excitation (French et coll. 1960; Govindjee et Rabinowitch 1960) vinrent confirmer cette hypothèse.

L'effet de Blinks (1957) et les cinétiques de fluorescence de la chlorophylle a de Kautsky et coll. (1960) confirmèrent l'hypothèse des deux réactions lumineuses.

Ainsi le concept de l'effet d'Emerson et les autres effets ajoutés au schéma suggéré de Hill et Bendall (1960) donnèrent naissance au fameux schéma en forme de Z du transfert d'électron photosynthétique qui postule deux réactions lumineuses opérant en série (voir schéma 3).

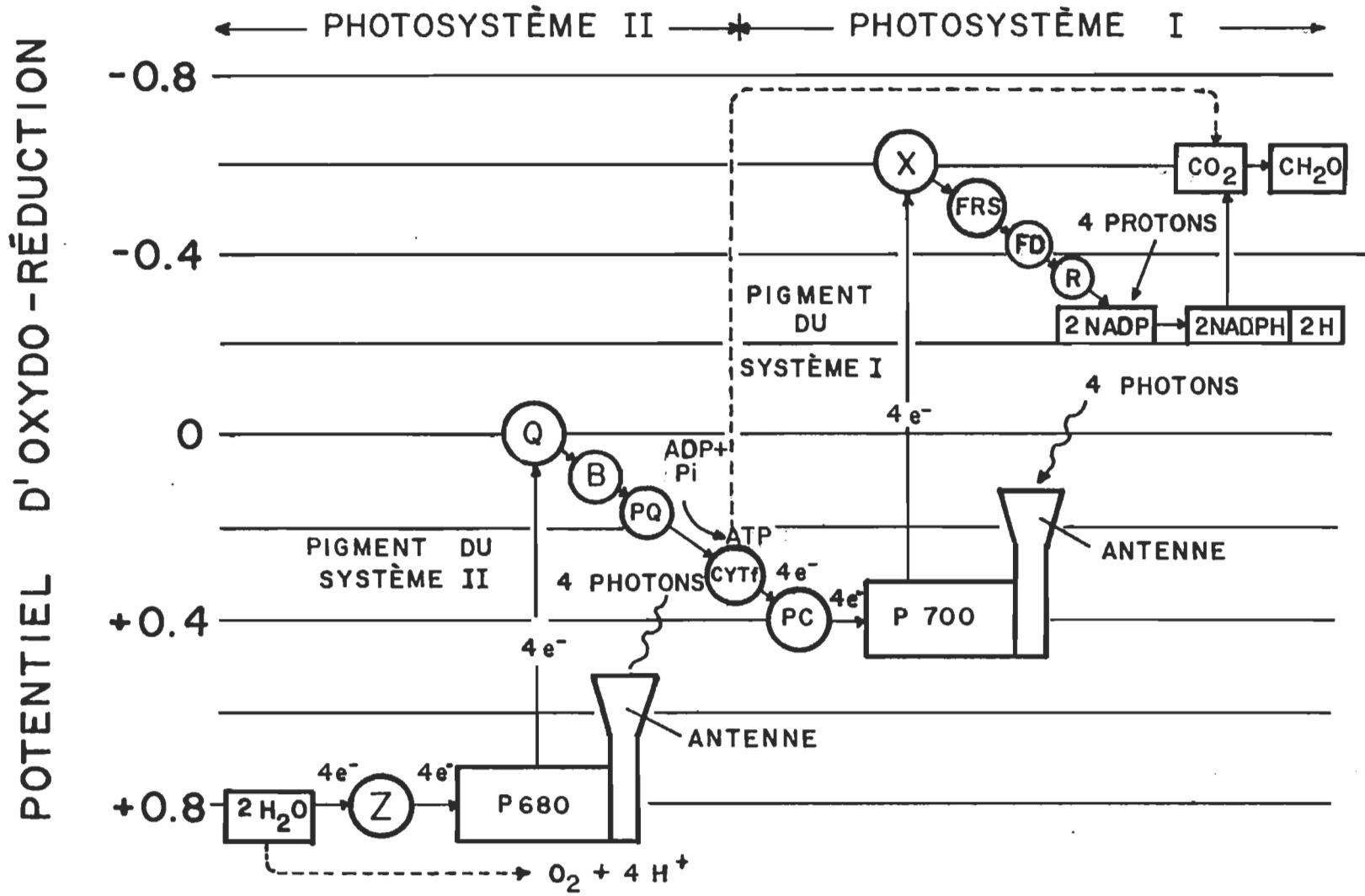
1.6 Les processus primaires et les processus secondaires de la photosynthèse

D'une autre manière, il convient de diviser la photosynthèse en processus primaires et en processus secondaires (Barber 1976).

Les processus primaires sont les réactions lumineuses qui incluent l'absorption des quanta et leur utilisation pour conduire les électrons provenant des molécules d'eau au NADP^+ . Ces processus qui s'accomplissent à l'intérieur des membranes du chloroplaste (thylakoides) nécessitent une série de réactions d'oxydo-réduction et produisent aussi une synthèse nette d'ATP.

Selon le schéma 3, pour transférer chaque électron provenant de l'eau au NADP^+ , deux photoréactions agissent en série, soit le photosystème II (PS II) et le photosystème I (PS I). Chaque photosystème possède son propre complexe de pigments (antennes) collectant la lumière et transférant efficacement le photon absorbé à son centre de réaction.

Dans le centre de réaction du PS II, l'acte primaire produit un oxydant fort Z^+ et un réducteur faible Q^- alors que dans le PS I un oxydant faible P^+ est formé avec un réducteur fort X^- . L'oxydant fort Z^+ est capable d'arracher les électrons de l'eau alors que X^- est suffisamment réduit pour donner les électrons au NADP^+ .



SCHEMA 3 : SCHEMA DES DEUX REACTIONS LUMINEUSES
(Govindjee et Govindjee 1974)

Une chaîne transporteuse d'électrons relie le PS II au PS I. On retrouve dans cette chaîne transporteuse d'électrons les composantes suivantes.

B - cytochrome b 559

PQ - plastoquinone

Cyt_f - cytochrome f

PC - plastocyanine

Au niveau du PS I, les électrons sont transférés du réducteur fort X⁻ au NADP⁺ via les composantes suivantes.

FRS - substance réduisant la ferrédoxine

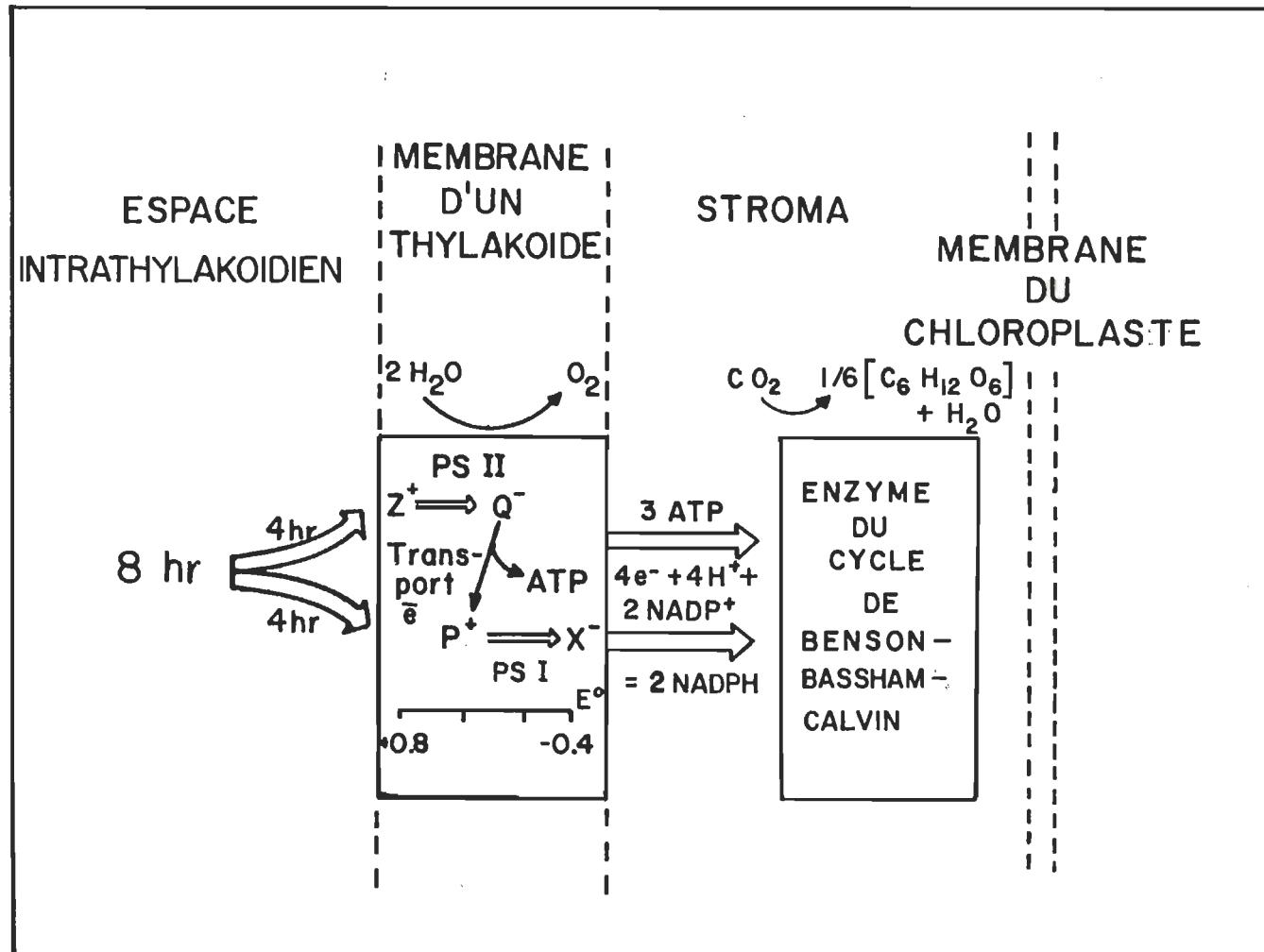
FD - ferrédoxine

R - réductase de la ferrédoxine - NADP⁺

Le schéma 4 est une présentation macroscopique des événements ci-haut mentionnés. On remarque dans ce schéma que les deux photosystèmes sont liés entre eux par l'interaction de Q⁻ et P⁺; l'énergie libre libérée dans ce processus est utilisée pour la synthèse de l'ATP (réaction 11, p. 10).

L'ATP et le NADPH serviront ultérieurement à réduire le CO₂ en glucide (réaction 12, p. 10). L'intégration du CO₂ atmosphérique s'effectue dans le stroma au cours d'une série de réactions que schématise le cycle de Benson Bassham et Calvin.

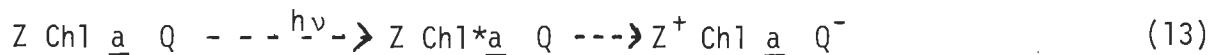
Le centre de réaction du photosystème II serait composé d'un photorécepteur chromatophore (P680) associé au couple donneur-accepteur d'électrons (Z, Q).



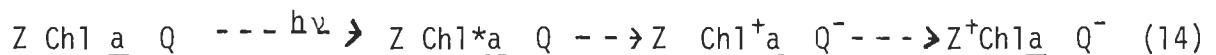
SCHEMA 4 : PROCESSUS PRIMAIRES ET SECONDAIRES DE LA PHOTOSYNTHESE
(Barber 1976)

Deux mécanismes expliquant le fonctionnement du centre de réaction PS II ont été suggérés.

Celui de Doring et coll. (1969) où le photorécepteur excité est l'entité qui facilite un échange direct d'électron entre Z et Q.



Dans le second mécanisme (Butler 1972), la molécule de Chl a photoréceptrice est elle-même oxydée.



Cette forme de Chl a qui serait le piège énergétique du PS II fut désigné P 680 (Floyd et coll. 1971).

L'espèce Z serait le donneur primaire d'électron; on lui associe des interactions avec l'enzyme S "enzyme impliqué dans le bris de la molécule d'eau" et l'accepteur primaire d'électron.

L'entité Q serait l'accepteur primaire d'électron. Comme la photoréduction de Q est accompagnée d'un changement d'absorbance à 550 nm, on le désigne aussi par C 550.

Le centre de réaction du PS I serait le P 700, une paire de molécules de chlorophylle a (Chlsp), dans un environnement spécialisé.

La Chlsp, qui possède une bande d'absorption près de 700 nm, fut découverte par Kok (1956) en observant la disparition des bandes d'absorption près de 430 et 700 nm. Quelques modèles de sa structure ont été proposés, en particulier celui de Fong et de Shipman et coll.

Dans le modèle de Fong (1976), deux molécules de chlorophylle a sont retenues ensemble par deux molécules d'eau; le dimère participerait à l'équilibre $2 \text{ chl } \underline{\text{a}} \cdot \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons (\text{chl } \underline{\text{a}} \cdot \text{H}_2\text{O})_2$. Chaque molécule d'eau serait liée au magnésium d'une molécule de chlorophylle a; elle serait de plus liée par un pont hydrogène au carbométhoxy ($\text{C} = \text{O}$) de l'autre molécule de chlorophylle a.

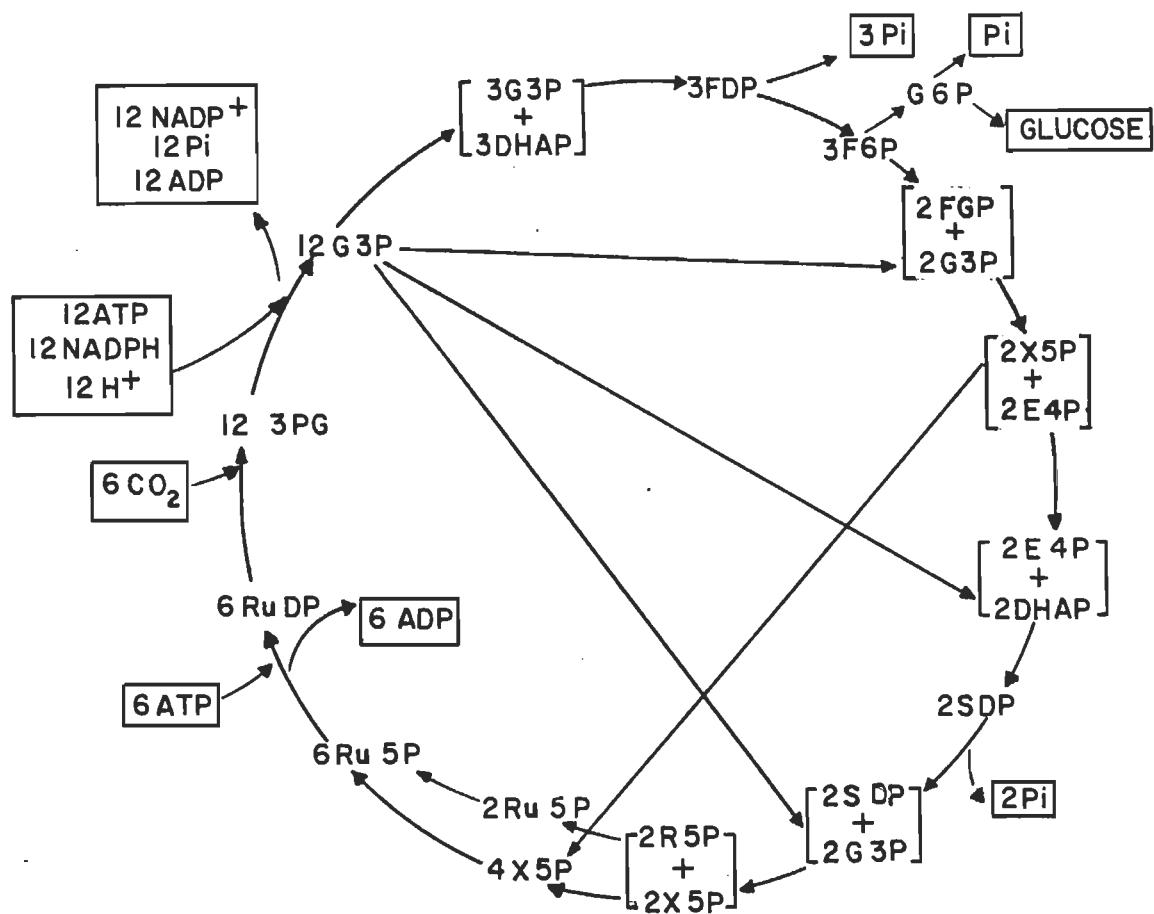
Quant au modèle de Shipman et coll. (1976) sa représentation schématique est la suivante: $2 \text{ chl } \underline{\text{a}} \cdot \text{R}^1-\text{O}-\text{H}$, où R^1 peut être un hydrogène, un groupement éthyl ou une protéine. Dans ce modèle, deux molécules de chlorophylle a sont retenues ensemble par des ponts hydrogène; cette interaction se fait entre le H de $\text{R}^1-\text{O}-\text{H}$ et un cycle qui contient un C = O dans le macrocycle de la chlorophylle (cycle V). L'oxygène de $\text{R}^1-\text{O}-\text{H}$ est lié au Mg du macrocycle. Les deux molécules de chlorophylle a sont également retenues par des interactions du type $\pi - \pi$ de van der Walls; suite à l'empilement de deux macrocycles de chl a l'interaction se produit au niveau des cycles de chaque macrocycle.

Les processus secondaires sont une série de réactions biochimiques connues sous le nom de cycle Benson-Bassham-Calvin qui utilise le NADPH et l'ATP "photoproduit" pour réduire le CO₂ en glucide. Une représentation schématique de ce cycle est donnée au schéma 5.

Dans une première étape, un sucre en C₅, le ribulose 1,5-diphosphate est dismuté en deux molécules d'acide 3-phosphoglycérique (ou glycérate 3-phosphate). Cette réaction est capitale: c'est à son niveau que s'effectue l'intégration du gaz carbonique de l'air.

Au cours d'une deuxième étape, l'acide 3-phosphoglycérique est réduit en glyceraldéhyde 3-phosphate. Cette étape consomme le NADPH et une partie de l'ATP photoproduits.

Puis, préalablement à la régénération des molécules de ribulose 1,5-diphosphate, il apparaît des oses phosphorylés en C₆ (fructose) en C₄ (érythrose) en C₇ (sédoheptulose) et finalement en C₅ (ribulose, ribose et xylulose).



SCHEMA 5 : CYCLE DE BENSON - BASSHAM ET CALVIN

Abréviations :

- | | | |
|------|---|-------------------------------|
| RuDP | : | ribulose 1,5-diphosphate |
| 3PG | : | acide 3-phosphoglycérique |
| G3P | : | glycéraldéhyde 3-phosphate |
| DHAP | : | dihydroxyacétone phosphate |
| FDP | : | fructose 1,6-diphosphate |
| F6P | : | fructose 6-phosphate |
| G6P | : | glucose 6-phosphate |
| E4P | : | érythrose 4-phosphate |
| X5P | : | xylulose 5-phosphate |
| SDP | : | sédoheptulose 1,7-diphosphate |
| R5P | : | ribose 5-phosphate |
| Ru5P | : | ribulose 5-phosphate |

1.7 Les processus primaires qui conduisent à la photosynthèse

Le concept fondamental qui explique les phénomènes photophysiques et photochimiques de la photosynthèse est celui de l'unité photosynthétique.

On sait que ce concept exprime le fonctionnement coopératif de la chlorophylle in vivo d'abord comme antenne collectrice des photons, puis comme milieu de circulation des excitons et finalement comme centre réactionnel d'où s'opère la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique.

Soit un photon, absorbé par les chlorophylles collectrices et migrant vers le centre de réaction, on assume immédiatement que l'énergie d'excitation servira à la photosynthèse. On dira que tous les processus engendrés entre le moment où le photon est absorbé et le moment où il est piégé conduisent directement à la photosynthèse. Par opposition, les autres processus (par exemple, la fluorescence) qui ne conduisent pas à la photosynthèse seront les compétiteurs de la photosynthèse.

Les événements primaires qui conduisent à la photosynthèse peuvent être divisés en trois étapes:

- 1) L'absorption de la lumière et la formation d'états électroniques excités de molécules pigmentaires.

- 2) Le transfert de l'excitation électronique d'une molécule à une autre de l'appareil pigmentaire.
- 3) Le piégeage de l'excitation à un site particulier connu sous le nom de centre de réaction et l'initiation de transferts d'électron des donneurs aux accepteurs.

Nous allons maintenant reprendre en détail ses grandes étapes de la photosynthèse.

I.7.1 L'absorption de la lumière

La présente section a pour but de rappeler les notions fondamentales sur l'absorption de la lumière et les transitions électroniques. Les textes de références sont essentiellement ceux de Hercules (1967) et Mousseron-Canet et Mani (1969).

Une réaction photochimique est due à l'absorption d'une radiation électromagnétique. Selon la théorie quantique de Planck, cette absorption d'énergie se fait par étape, chaque étape ou transition correspond à l'absorption d'un "quantum" d'énergie (photon). L'énergie de ce quantum, E , est donnée par l'équation de Planck:

$$E = h\nu \quad (I)$$

où h est la constante de Planck et ν la fréquence de la radiation absorbée. L'équation de Planck peut s'écrire sous la forme

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (II)$$

où c est la vitesse de la lumière et λ est la longueur de la radiation.

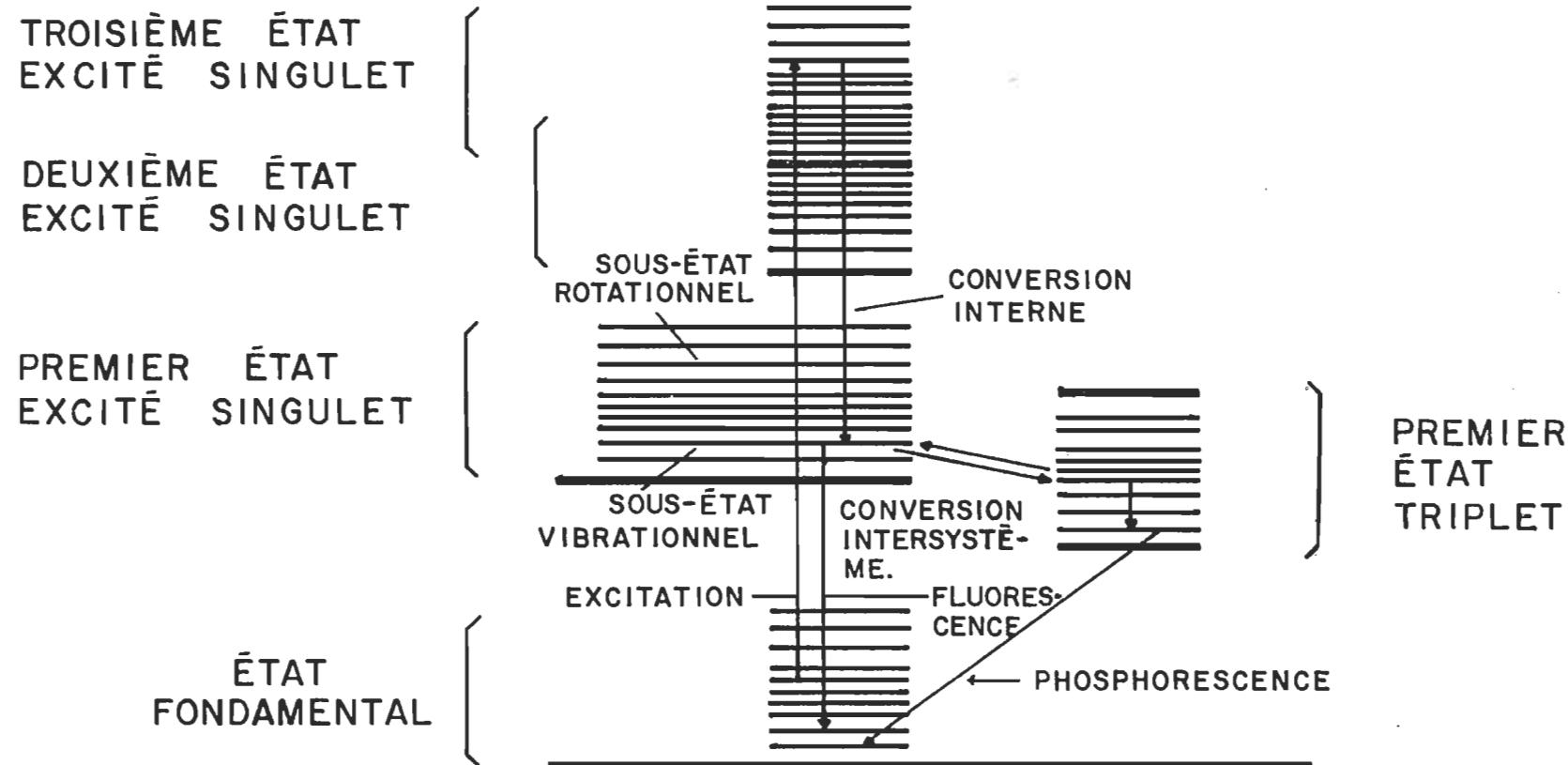
On appelle transition électronique le passage d'un électron d'une orbitale électronique à une autre orbitale électronique. L'état fondamental d'une molécule est son état normal et correspond à une énergie minimum. Il y a pour chaque molécule un seul état fondamental.

L'absorption d'énergie par une molécule se traduit par trois types de transition:

- 1) transition électronique
- 2) transition vibrationnelle
- 3) transition rotationnelle

Comme les transitions électroniques, les mouvements de rotation et de vibration des molécules sont quantifiés. Les énergies correspondantes aux transitions électroniques sont comprises entre 40 et 250 kcal/mole tandis que les transitions vibrationnelles et rotationnelles sont beaucoup plus faibles (1 à 10 kcal/mole et 0.1 kcal/mole respectivement). Il en résulte que, pour chaque niveau électronique d'une molécule, on aura des sous-niveaux vibrationnels et pour chaque sous-niveau vibrationnel des sous-niveaux rotationnels.

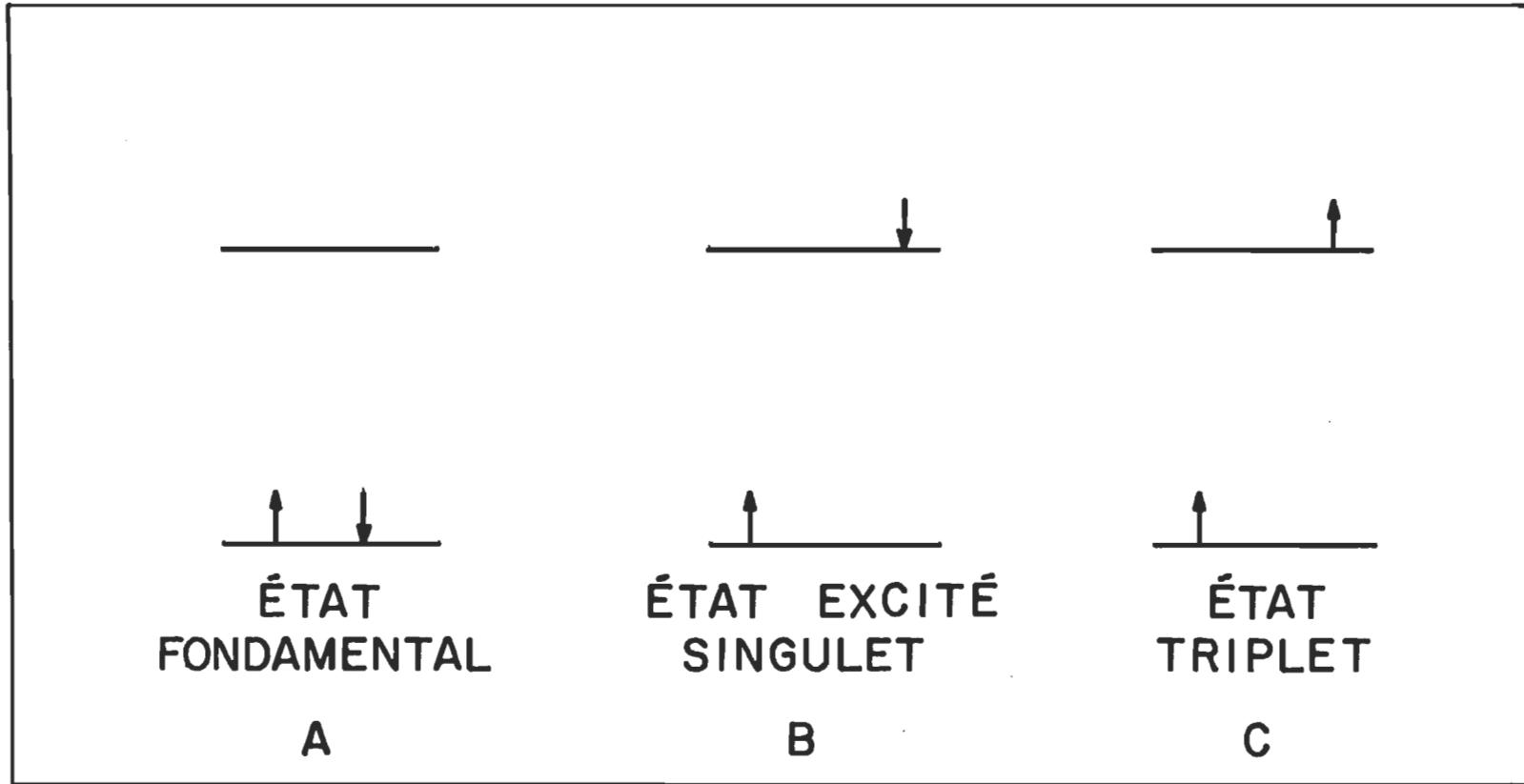
On appelle état électroniquement excité d'une molécule, un état résultant d'une transition électronique. Le schéma 6 représente schématiquement les énergies potentielles d'une molécule.



SCHEMA 6 : REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DES ENERGIES POTENTIELLES D'UNE MOLECULE
(Govindjee et Govindjee 1974)

Pour la plupart des molécules organiques dans leur état fondamental, tous les électrons ont leurs spins appariés. Un tel état est appelé "état singulet". Une orbitale moléculaire est représentée dans le schéma 7; à l'état fondamental elle est accompagnée par deux électrons appariés (7 A), tandis que l'orbitale de plus haute énergie est libre. Au cours de la transition, un des électrons va passer dans cette orbitale inoccupée. La règle de conservation du spin de Wigner nécessite une conservation du moment résultant de spin du système ce qui indique que l'électron doit conserver son spin au cours de la transition. L'état excité sera donc un état singulet (7 B). Cependant, la règle de Wigner peut être violée par une interaction spin-orbite, l'électron peut renverser son spin au cours de la transition. On obtient un état triplet (7 C).

Les termes de "singulet" et de "triplet" proviennent de la multiplicité des raies correspondantes en spectroscopie; un singulet possède un moment résultant de spin nul ($S = \left| \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \right| = 0$), sa multiplicité est $(2S + 1) = 1$; un triplet a un moment résultant de spin unitaire ($S = \left| \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \right| = 1$), sa multiplicité est donc de $(2S + 1) = 3$.



SCHEMA 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE ORBITALE

I.7.2 L'absorption de la lumière par les pigments photosynthétiques

Les différents pigments photosynthétiques peuvent être classifiés en trois groupes principaux: les chlorophylles, les caroténoides et les phycobilines. La fonction de ces pigments est de fournir aux plantes un système efficace pour absorber la lumière sur tout le spectre du visible (Rabinowitch et Govindjee 1969). Cette énergie est alors transférée aux centres réactionnels où elle est utilisée pour les réactions photochimiques.

I.7.2.1 - Les chlorophylles

Il y a deux sortes de chlorophylles chez les plantes supérieures et chez les algues vertes: la chl a et la chl b. Ces dernières sont solubles dans les solvants organiques. La chl a est le pigment majeur et elle est présente chez tous les organismes photosynthétiques qui émettent l'oxygène. Plusieurs formes de chlorophylles ont été postulées: chl a 660, chl a 670, chl a 680, chl a 685, chl a 690 et la chl a 700-720, le nombre indiquant leur maximum respectif dans le spectre d'absorption (French 1971).

Les formes de chl a qui absorbent aux plus courtes longueurs d'onde sont fluorescentes et sont prédominantes dans le PS II. Les formes chl a qui absorbent aux plus grandes longueurs d'onde sont faiblement fluorescentes et sont prédominantes dans le PS I.

La chl b présente chez toutes les plantes supérieures et chez les algues vertes possède son maximum d'absorption à 650 nm. La majorité proportion de la chl b est présente dans le PS II.

I.7.2.2 - Les caroténoïdes

Ce sont les pigments jaunes et oranges trouvés dans presque tous les organismes photosynthétiques. Ils sont solubles dans les solvants organiques. Il y a deux sortes de caroténoïdes:

- 1) Les carotènes, parmi lesquels le B-carotène est le plus commun, sont des hydrocarbures.
- 2) Les caroténols sont des alcools; leur nom commun est celui de xanthophylle.

On accepte généralement que la plupart des carotènes sont présents dans le PS I et les xanthophylles dans le PS II.

Les caroténoïdes absorbent la lumière dans la région spectrale située entre 400 et 500 nm.

I.7.2.3 - Les autres pigments

Les autres pigments photosynthétiques connus sont les phycobilines présents surtout chez les algues bleu-vertes et rouges. Il y a deux sortes de phycobilines:

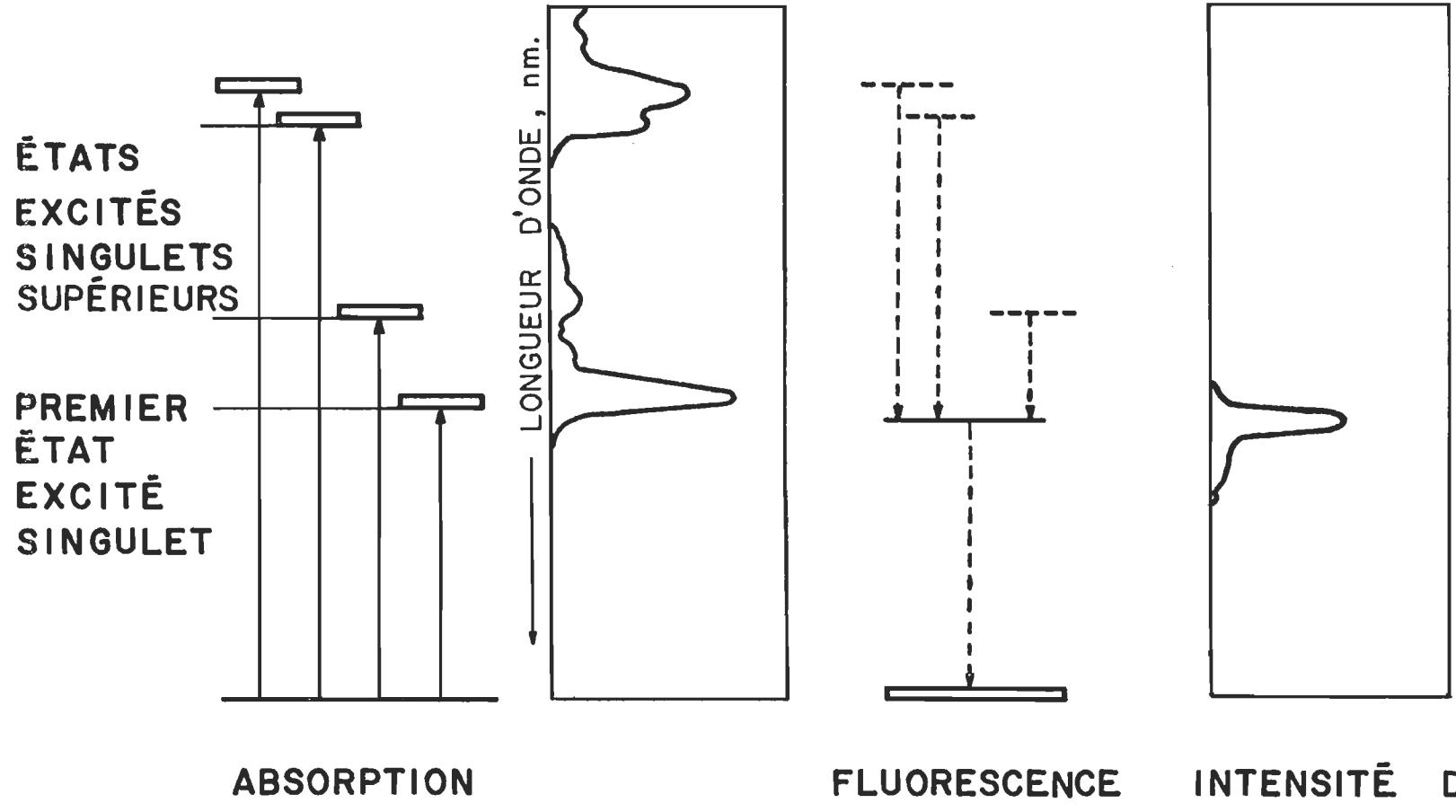
- 1) Les phycocyanines présentes chez les algues bleu-vertes et dont le maximum d'absorption est approximativement à 630 nm.
- 2) Les phycoérythrines présentes chez les algues rouges et dont le maximum d'absorption se situe à ~540 nm.

Mentionnons aussi la bactériochlorophylle (B-chl), le pigment majeur des bactéries photosynthétiques. La B-chl est une tétrahydroporphyrine. In vivo, la bactérie pourpre Chromatium présente des bandes d'absorption à 800, 850 et 870 nm: ces bandes seraient dues à la bactériochlorophylle a.

I.7.3 La formation des états électroniques excités

Lorsqu'un photon d'énergie appropriée frappe une molécule de chlorophylle a, le pigment se trouve dans un état excité en moins de 10^{-15} seconde.

Il y a deux principaux états excités permis à la chlorophylle a. L'absorption de la lumière rouge (longueur d'onde d'environ 680 nm) élève la molécule au niveau excité le plus bas et le plus important, appelé le premier état excité singulet, S_1 (Schéma 8). La lumière bleue (longueur d'onde d'environ 440 nm) élève la molécule à un état excité singulet supérieur à S_1 .



SCHEMA 8 : ENERGIES DE TRANSITION ASSOCIEES A L'ABSORPTION DE LA LUMIERE ET A LA FLUORESCENCE DE LA CHLOROPHYLLE

(Govindjee 1975)

La transition du niveau fondamental vers un niveau excité singulet peut avoir lieu à n'importe lequel des sous-niveaux vibrationnels et rotationnels de l'état fondamental et se terminer à n'importe lequel des sous-niveaux de l'état excité (Schéma 6).

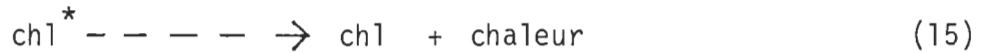
Considérons une molécule de chlorophylle passant, par absorption d'un photon, à l'état excité singulet S_3 ou plus exactement à un niveau vibrationnel N de l'état S_3 . Les molécules élevées à ces états excités retournent au premier état excité singulet dans un temps de l'ordre de 10^{-13} à 10^{-14} s.

Le retour au premier état excité singulet est accompli à travers les transitions séparant les sous-niveaux vibrationnels et rotationnels. Chacune de ces transitions est si faible en énergie que les longueurs d'onde correspondantes ne sont pas perçues comme radiation, mais seulement comme chaleur. Ce processus est appelé conversion interne (Schéma 6); l'énergie est dégradée sous forme de chaleur. Il contribue seulement au mouvement cinétique des molécules, et non à la photochimie.

Le passage de la chl a de l'état fondamental au premier état excité singulet est une étape primordiale dans le processus de la photosynthèse.

A ce niveau d'énergie, plusieurs voies sont ouvertes à la chlorophylle (Schéma 9).

Elle peut dissiper son énergie d'excitation sous forme de chaleur par conversion interne;



elle peut passer dans un autre état excité à caractère différent, appelé l'état triplet (réaction 2, p. 8);

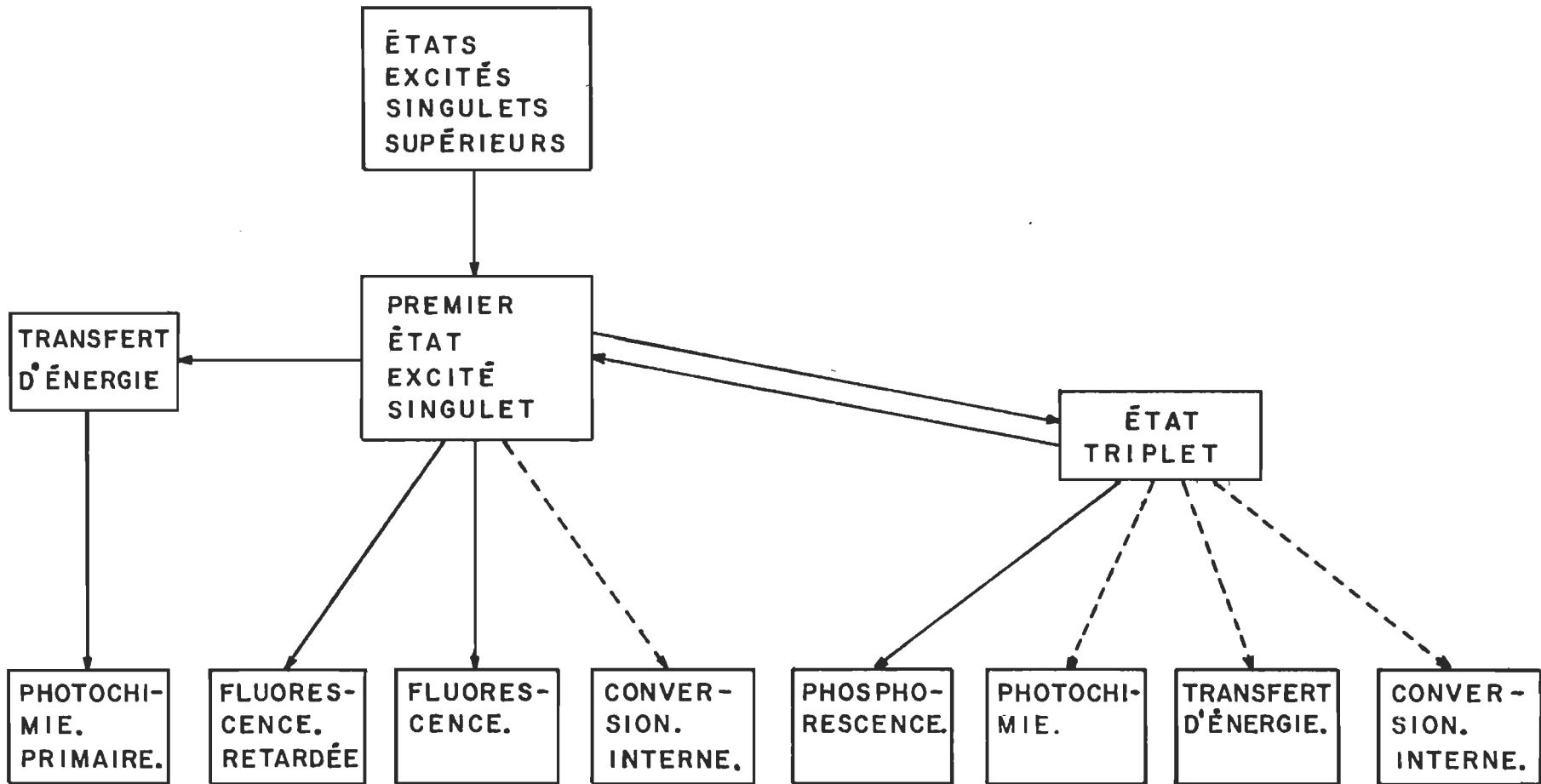
elle peut retourner à l'état fondamental en émettant un quantum de lumière, quantum de fluorescence et/ou phosphorescence (réaction 4, p. 8);

elle peut transférer son énergie à une molécule voisine appropriée (réaction 3, p. 8);

ou elle peut entrer dans une réaction chimique qui est caractéristique des pigments du PS I et du PS II. Ce dernier processus est le plus important mais cela ne signifie pas qu'il soit le seul processus à se produire.

Nous faisons remarquer à propos du schéma 9 que les flèches continues indiquent que le processus de dissipation a déjà été démontré expérimentalement tandis que les flèches pointillées indiquent que le processus n'a jamais été démontré.

La dissipation de l'énergie à partir de l'état triplet ou encore le rôle de l'état triplet dans la photosynthèse sera discuté au chapitre IV de ce mémoire.



SCHEMA 9 : LE DESTIN DU PREMIER ETAT EXCITE SINGULET

I.7.4 Le transfert et la migration de l'énergie

L'existence des unités photosynthétiques permet une utilisation plus efficace de l'énergie absorbée. Ces unités engagent la migration de l'énergie d'excitation à travers le labyrinthe des centaines de molécules de chlorophylle a, jusqu'à ce que l'énergie atteigne finalement le centre de réaction où elle est convertie en énergie chimique.

Le processus de la migration de l'énergie d'excitation à travers le même type de molécules engage des transferts d'énergie homogènes.

De plus, l'énergie absorbée par des pigments autres que la chl a dans n'importe lequel photosystème est aussi transférée à la chl a. Cette sorte de transfert d'énergie entre les différents types de pigment est appelé transfert d'énergie hétérogène.

La preuve de l'existence des transferts d'énergie hétérogène a été démontrée par les mesures de fluorescence. Les bandes de fluorescence de la chl a sont observées, même si la chl a est excitée dans une région spectrale où elle possède une faible absorption et où les autres pigments absorbent fortement.

Duysens (1952) ainsi que Cho et Govindjee (1970 a) ont calculé que la probabilité de transfert d'énergie de la chl b à la chl a est pratiquement unitaire.

Par contre, la probabilité de transfert d'énergie des caroténoides à la chl a est relativement faible; elle est de 10 à 50 % dépendamment de l'organisme, excepté pour le fucoxanthol où elle est approximativement de 70 % (Dutton et coll. (1943), Duysens (1952), Goedheer (1972)).

L'évidence du transfert d'énergie homogène a été démontrée par les études de fluorescence en utilisant la lumière d'excitation polarisée. Comme le temps de vie de l'état singulet excité de la chlorophylle est court, l'émission de fluorescence de la chl excitée par de la lumière polarisée serait grandement polarisée si elle venait de la molécule qui a absorbé la lumière. Des mesures expérimentales ont montré cependant que la fluorescence était presque complètement dépolarisée in vivo (Mar and Govindjee 1972). Ceci indique qu'il existe entre le phénomène d'absorption et celui d'émission, un transfert d'énergie entre plusieurs molécules, chacune ayant une orientation particulière et le résultat est la dé-polarisation de la fluorescence.

Le transfert de l'excitation semble se produire via deux mécanismes distincts: i) la délocalisation d'un exciton par l'intermédiaire de molécules de chlorophylle très proches les unes des autres dans le complexes protéino-chlorophylle, ii) le transfert de résonnance entre les complexes protéino-chlorophylle.

Le premier mécanisme serait valable pour les grandes énergies d'interaction tandis que le second serait approprié pour les faibles énergies d'interaction.

Selon Colbow et Danyluk (1976), le mécanisme véritable du transfert d'énergie d'excitation serait un intermédiaire entre le mécanisme de l'exciton et le mécanisme de Förster.

Outre l'échange d'énergie homogène et hétérogène entre les pigments de la photosynthèse, il semble que le PS I et le PS II soient en contact l'un avec l'autre.

Du moins, deux hypothèses ont été proposées au sujet de l'interaction entre les deux systèmes de pigments:

- 1) dans le modèle "paquet séparé"(separate package)", le PS I et le PS II sont physiquement éloignés l'un de l'autre et il n'y a aucun échange d'énergie d'excitation entre eux.
- 2) chez le modèle renversé (spillover), l'énergie lumineuse absorbée par le PS II (et non utilisée par ce dernier) se verse dans le PS I, mais non vice versa.

La démonstration du modèle "spillover". lorsque les centres de réaction du PS II sont fermés a été faite par Satoh et coll. (1976).

Il existe aussi deux modèles qui ont été proposés pour expliquer la possibilité de transfert d'énergie parmi les unités d'un même photosystème.

Dans le modèle "lake", on imagine que les centres de réaction sont répartis au hasard (il existe une probabilité de trouver un centre réactionnel) dans un immense "lac" de pigments collecteurs. Lorsqu'un photon est capté par les pigments collecteurs, il est acheminé vers un centre de réaction . Si ce centre de réaction est fermé, l'énergie peut migrer vers un autre centre de réaction (Govindjee et Govindjee 1975). Dans le modèle "puddle", chaque unité est isolée; il n'y a pas d'échange d'énergie entre les différentes unités.

I.7.5 Le piégeage de l'énergie à un site particulier connu sous le nom de centre de réaction et les processus photochimiques primaires.

Quel que soit le mécanisme qui permet à l'énergie électromagnétique de se rendre au centre de réaction, à ce niveau, elle est convertie en énergie chimique en produisant un équivalent oxydant et un équivalent réduit.

La preuve expérimentale suggère que le premier événement conséquent au piégeage de l'excitation électronique soit une réaction d'oxydo-réduction (Sauer 1975).

L'événement détectable le plus court semble être le transfert d'électron d'une chl dans le complexe du centre de réaction vers un accepteur primaire (A) selon la réaction



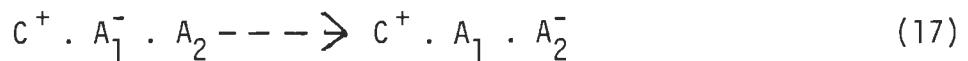
Ce processus est très rapide (20 ns) et procède avec un rendement quantique de l'ordre de l'unité. Il est indépendant de la température et se produit même à 1 K (Sauer 1975).

La réaction 16 défavorise les autres mécanismes de relaxation de l'état singulet excité.

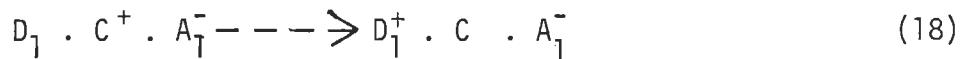
Comme conséquence, les centres de réactions photosynthétiquement actif comparés à la chl en solution présentent un faible rendement de fluorescence, des temps courts de fluorescence et un faible rendement de formation d'état triplet.

Après l'événement primaire, plusieurs processus secondaires peuvent se produire soit séparément soit simultanément.

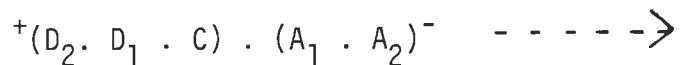
1) L'accepteur primaire peut passer son électron à un ou plusieurs accepteurs secondaires

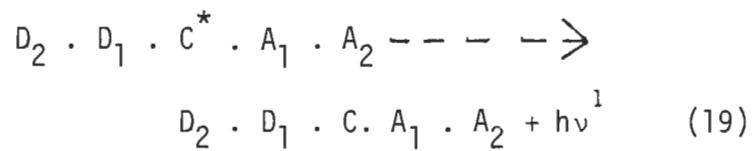


2) Un électron peut être transféré à un donneur (D_1) associé au complexe du centre de réaction

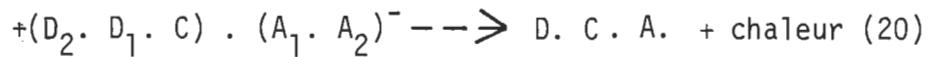


3) Le processus peut être renversé de façon à régénérer l'état excité du pigment, ce qui produirait la fluorescence retardée





4) Les espèces réduites et oxydées peuvent être couplées via une voie de flux d'électron (cyclique)



Les processus représentés par les mécanismes 16 et 17 sont prolongés par d'autres composants de la chaîne de transport d'électrons non-cyclique. Le donneur d'électron ultime chez les plantes supérieures est l'eau et l'accepteur d'électrons est le CO_2 via la ferredoxine (Fd) et NADP^+ . Le processus de la réaction 19 peut aussi résulter dans la production du potentiel chimique emmagasiné via une étape de phosphorylation.

Aux événements ci-haut mentionnés, des étapes intermédiaires ont été proposées tel l'état triplet de la chl a (Robinson 1963, 1967; Franck et Rosenberg 1964).

En résumé:

- 1) Chez les végétaux supérieurs le siège de la photosynthèse est le chloroplaste.
- 2) Le concept fondamental qui explique les phénomènes photophysiques et photochimiques de la photosynthèse est celui de l'unité photosynthétique.

3) On peut diviser la photosynthèse en processus primaires et en processus secondaires.

4) L'absorption de la lumière (formation des états électroniques excités), le transfert de l'excitation électronique, le piégeage de l'excitation ainsi que l'initiation de la chimie via le transfert d'électrons des donneurs aux accepteurs primaires sont les processus primaires qui conduisent directement à la photosynthèse.

5) La conversion interne, la fluorescence et la phosphorescence sont des processus primaires compétiteurs de la photosynthèse.

Nous nous proposons d'utiliser la propriété de fluorescence afin d'observer le comportement des chloroplastes (à basse température) séparés sur un gradient de densité. Le matériel utilisé ainsi que les méthodes expérimentales sont discutés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES

II.1 Spectrophotomètre d'absorption

L'étude des propriétés photophysiques et des propriétés photochimiques des suspensions de chloroplastes va nous amener à utiliser les types d'appareils suivants:

- Spectrophotomètre d'absorption
"Unicam SP-1800"
- Photomètre équipé pour les mesures des petites variations d'absorbance.
- Spectrofluorimètre i) Perkin Elmer
ii) lasers
- Spectrophosphorimètre.

II.1.1 Description du spectrophotomètre d'absorption UNICAM SP-1800

"Unicam SP 1800 Spectrophotometer"

Pye Unicam Ltd. Cambridge, England.

Il s'agit d'un spectrophotomètre d'absorption à double faisceaux.

Quelques-unes de ses caractéristiques sont les suivantes:

- Source de tension: tension 110-120/200-250 volts
Fréquence: 50 ou 60 hertz
- Source lumineuse: Arc au deutérium
Lampe à filament de tungstène.
- Balayage: Manuel ou automatique entre 190 et 850 nm.

- Fentes: Largeurs variables entre 0.01 mm et 0.1 mm.
Fente couramment utilisée: 0.25 mm correspondant à une largeur de bande: 0.8 nm.
- Monochromateur: Type "F/10 Ebert grating" distance focale 25.4 cm, limite de résolution pour les fentes les plus minces: 0.1 nm.
- Photomultiplicateur: Type EMI 9558 QB
Echelle d'absorbance: 0-2; 0-1; 0-0.5; 0-0.2.
- Précision photométrique: $\pm 1\%$ à n'importe quelle échelle utilisée.
- Précision sur la longueur d'onde: ± 0.5 nm
- Lumière diffusée: 1% à 200 nm
- Enregistreur: "Unicam AR 25":
2 échelles de vitesse du papier: s/cm
min/cm
- Cellules utilisées: Quartz Hellma (Toronto, Ont.)

II.1.2 Utilisation de l'Unicam SP-1800

L'Unicam SP-1800 est utilisé 1) pour déterminer les spectres d'absorption de suspension de chloroplastes 2) pour déterminer la concentration de chlorophylle dans une suspension de chloroplastes 3) pour suivre la distribution de la chlorophylle dans les différents gradients de densité.

II.1.3 Photomètre pour mesurer les faibles changements d'absorbance.

La vitesse de la réduction du ferricyanure de potassium (potassium hexocyanoferrate III) par une suspension de chloroplastes est mesurée à l'aide d'un photomètre que nous avons mis au point. L'appareil permet d'enregistrer continuellement la différence de voltage (schéma 10) produit par un photocourant qui est générée dans un photomultiplicateur (K) par un faisceau d'analyse (B). La longueur d'onde à 410 nm est obtenue par un filtre interférentiel (E) placé devant le support de la cellule (F).

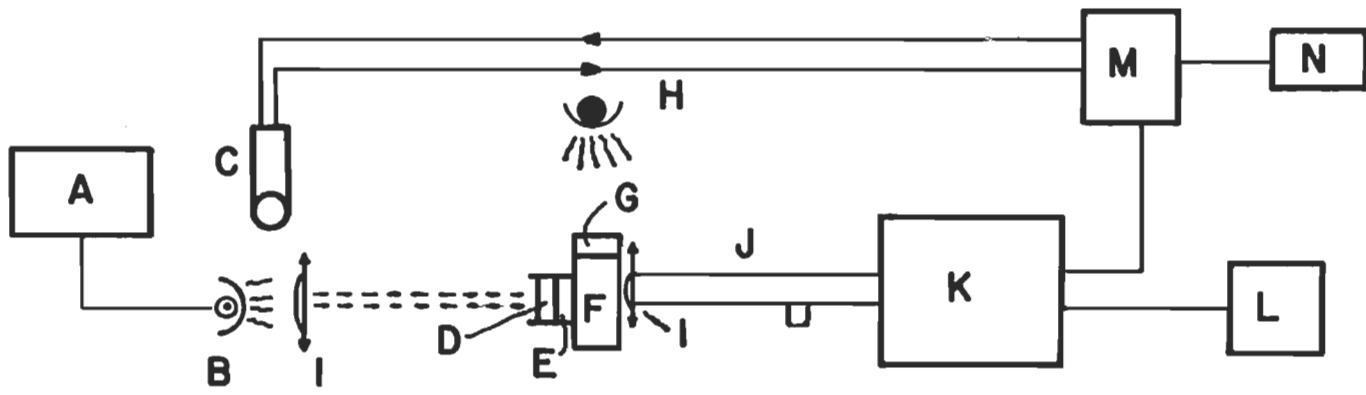
Un filtre de densité neutre (D) dont la transmittance est de 10 % est aussi accolé au filtre interférentiel. Ce filtre permet de diminuer l'intensité du faisceau d'analyse qui pourrait avoir une influence sur la réaction photochimique.

A la sortie du porte cellule, un monochromateur (J) filtre la lumière à 410 nm avant qu'elle ne passe dans le photomultiplicateur.

Une lampe (H) à filament de tungstène (20 watts) suivie d'un filtre rouge (G) dont le "coupe bande" (cutt-off) est à 630 nm sert de source d'irradiation pour l'analyse.

Caractéristiques des éléments du dispositif:

- Source de tension de la source lumineuse d'analyse (A)
Modèle TR 32-12



- A • Source de tension.
- B • Lampe au tungstène.
- C • Phototube.
- D • Filtre de densité neutre.
- E • Filtre interférentiel.
- F • Porte-cellule.
- G • Filtre coupe bande.
- H • Lampe d'irradiation.
- I • Lentille convergente.
- J • Monochromateur.
- K • Photomultiplicateur.(PMT)
- L • Source de tension du PMT
- M • Source de tension du phototube et amplificateur différentiel.
- N • Enregistreur.

SCHEMA 10 : PHOTOMETRE

Tension: 6 V

Courant: 5 A

- Source lumineuse d'analyse (B): Lampe à filament de tungstène
P M I, California

Puissance: 30 W

- Lentilles convergentes (I): distance focale 3 pouces
Oriel Corp., Connecticut

- Filtre interférentiel (E): bande passante à 410 nm
Ditric Optics, California

- Filtre coupe bande (G): R G 630
Rolyn Optics, California

- Filtre de densité neutre (D): 10% de transmission
Laser Energy inc., New York

- Source d'irradiation (H): Modèle 365 C
American Optical Corp., New York
≈ 20 watts

- Phototubes (C): Type RCA 935
RCA, Pensylvania

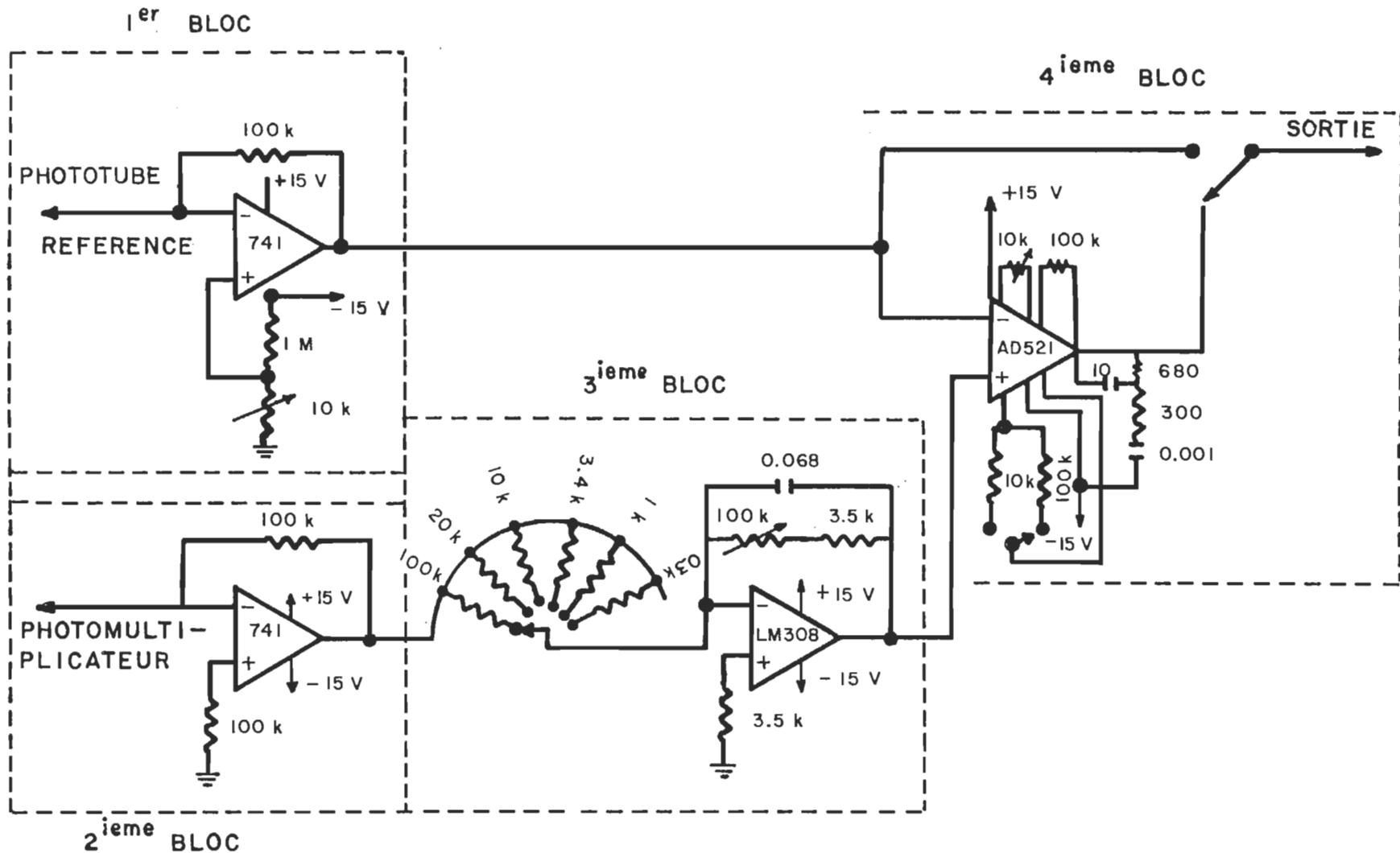
- Photomultiplicateur (K): Type EMI 96590 B
EMI, New York
- Source de tension du phototube (M): Modèle 904
Analog Devices Inc. Massachussett
- Source de tension du photomultiplicateur (L): Modèle 203 a
Pacific Photometric instruments, California
Tension produite de 500 à 2000 V; ajustable manuellement, utilisée à 900 V.
- Enregistreur (N): Modèle 7015 A, X-Y recorder
Hewlett Packard, Ontario
Time base: Modèle 17108 A
5 échelles de vitesse du papier: 0.5, 1, 5, 10 et 50 s/pouce.
- Monochromateur (J): Modèle H
Jobin Yvon, New Jersey
utilisé à 410 nm.

Amplificateur différentiel (M):

Il est composé de quatre blocs majeurs (schéma 11)

1) Le préamplificateur du phototube (1er bloc):

Il s'agit d'un amplificateur opérationnel monté pour convertir le courant en voltage. Le facteur de conversion est de 10^5 V/A.



SCHEMA 11 : AMPLIFICATEUR DIFFERENTIEL DU PHOTOMETRE

2) Le préamplificateur du photomultiplicateur (PMT, 2ième bloc)

Il est identique au préamplificateur du phototube.

3) Gain variable sur le PMT (3ième bloc)

Il s'agit d'un amplificateur opérationnel monté pour amplifier le voltage avec un gain variable; l'ajustement grossier sur le gain se fait par un commutateur rotatif. La gamme du gain s'étend de 0.1 à 30 avec une séquence de 1,3 et 10.

L'ajustement fin se fait avec un potentiomètre. Cet ajustement nous permet d'obtenir n'importe quelle valeur du gain entre les positions sélectionnées par le commutateur.

Ce gain variable sert à ajuster le zéro lorsque la solution est mise dans le parcours optique.

4) Amplificateur différentiel (4ième bloc)

Le terme signifie que l'amplificateur est insensible à la valeur du signal à l'entrée. L'amplificateur est sensible seulement à la différence entre les signaux sur la borne positive et négative de l'entrée.

Cet amplificateur sert à nous donner la différence entre les signaux provenant du phototube et du photomultiplicateur. On balance les deux entrées avec le gain variable pour obtenir le zéro à la sortie.

Le changement de voltage du faisceau d'analyse apparaît à la sortie, indépendamment des variations de la source de lumière.

Les résistances sont exprimées en ohms et les condensateurs en farads.

Mentionnons que nous avons tenté d'introduire un faisceau d'irradiation dans le spectrophotomètre Unicam SP-1800. La disposition des composantes de ce système d'irradiation est montrée au schéma 12.

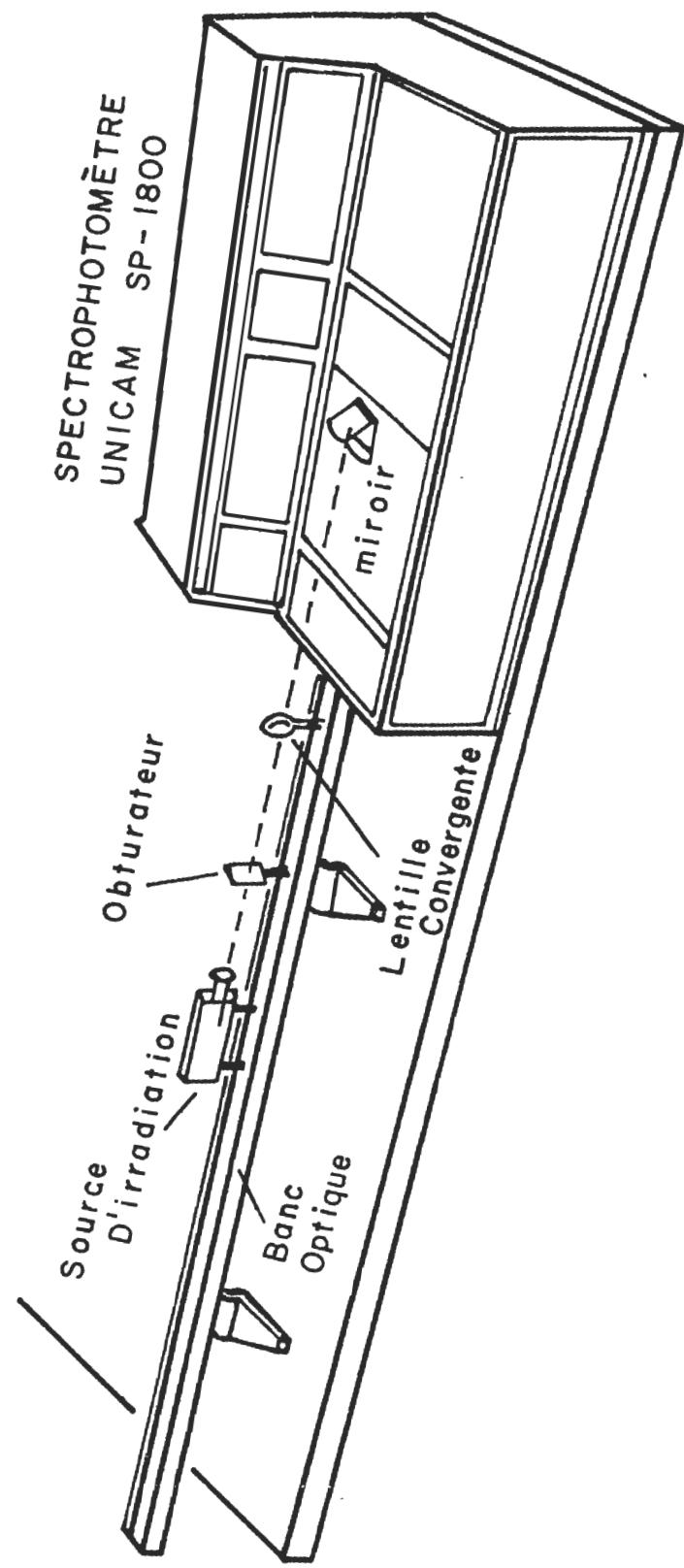
Ce spectrophotomètre offre un sélecteur d'échelle d'absorbance adéquat pour mesurer les faibles changements d'absorbance; il aurait donc permis de mesurer en continu la réaction de Hill.

Nous avons construit un support à cellules (schéma 13) qui peut s'insérer adéquatement dans le spectrophotomètre. Un prisme est accolé sur une vis micrométrique, elle-même fixée à la base du support.

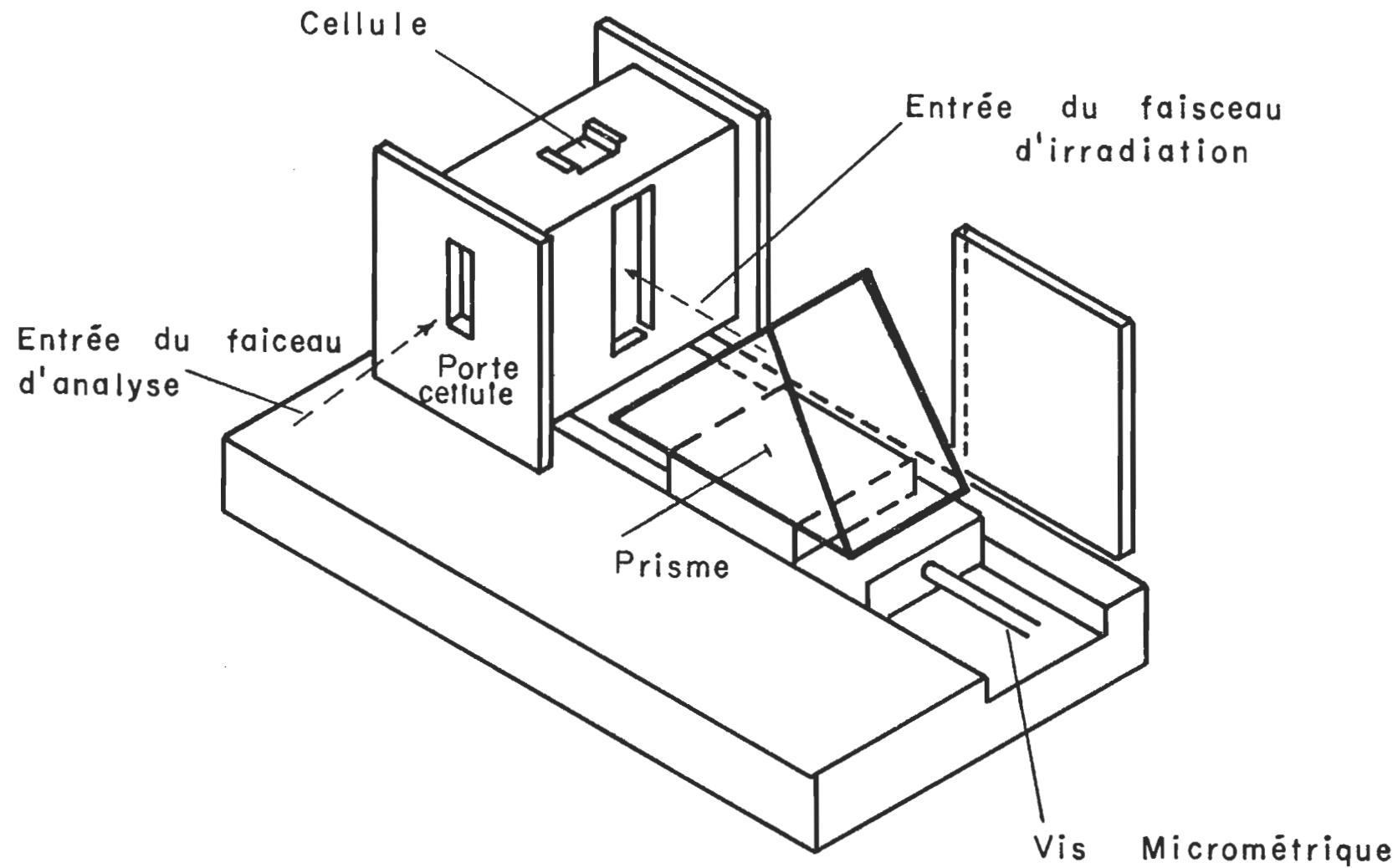
Le faisceau provenant de la lampe d'irradiation (schéma 12) est dévié dans la chambre de détection du spectrophotomètre par un miroir incliné à 45°.

Un schéma plus détaillé de l'optique de ce système est montré au schéma 14. La lumière provenant de la source d'irradiation est convergée sur un miroir incliné à 45°. Avant d'entrer dans le compartiment de détection du spectrophotomètre la lumière passe à travers un filtre dont le "cutt-off" est à 630 nm. Puis le faisceau atteint le prisme. Le prisme dévie la lumière d'irradiation sur la cellule (schéma 15) déposée dans le compartiment de détection du spectrophotomètre.

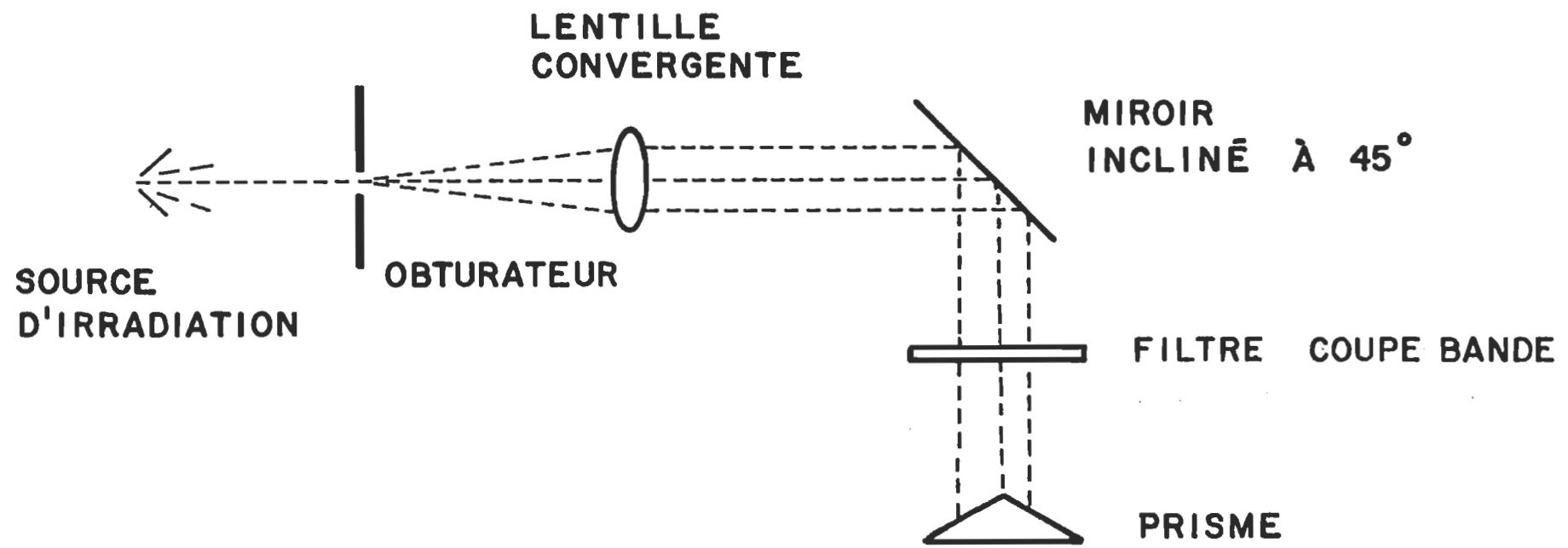
Nous allons discuter de l'utilisation de ces systèmes à la section suivante.



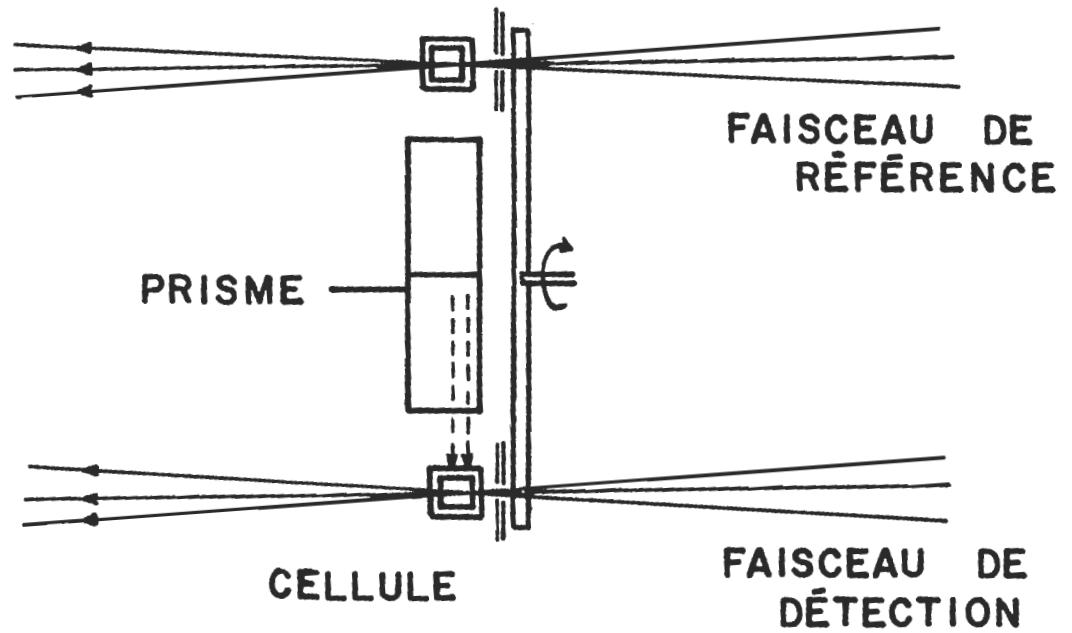
SCHEMA 12 : UNICAM SP - 1800 COUPLE A UN SYSTEME D'IRRADIATION



SCHEMA 13 : SUPPORT A CELLULE



SCHEMA 14 : SCHEMA OPTIQUE DU SYSTEME D'IRRADIATION



SCHEMA 15 : COMPARTIMENT DE DETECTION DE L'UNICAM SP-1800

II.1.4 Utilisation du photomètre

Nous n'avons pas pu tirer profit du système Unicam SP-1800 couplé à un système d'irradiation. La lumière rouge d'irradiation était trop diffusée et la perception de cette lumière par le détecteur du spectrophotomètre faisait osciller ce dernier. Comme résultat le bruit de fond se confondait avec le signal de détection.

Si un filtre interférentiel à 410 nm était disposé devant le détecteur, probablement que le montage s'avérerait satisfaisant pour mesurer en continu la réaction de Hill.

Le photomètre par contre, est beaucoup plus efficace que le dernier système décrit. Il permet même de mesurer des changements d'absorbance de l'ordre de 0.002.

Il est utilisé pour évaluer le pourcentage de chloroplastes intacts dans une suspension. Le principe de la méthode est expliqué à la section II.11.1. (page 124)

•

Nous faisons remarquer au sujet de la lumière d'irradiation qu'elle doit être suffisamment intense pour saturer la solution. On devrait prévoir, si ce système était de nouveau utilisé, d'augmenter la puissance de la source d'irradiation ou même de se servir de deux sources qui éclaireraient la cellule sur deux faces.

II.2 Spectrofluorimètre laser

Description des systèmes

Il s'agit de trois systèmes et chacun possède un détecteur de fluorescence ayant un monochromateur comme élément dispersif de la lumière excitatrice émise par un laser.

Chaque système a ses caractéristiques particulières d'application à l'étude de la luminescence selon le détecteur utilisé ou selon la température à laquelle un spectre est enregistré.

Mentionnons immédiatement que la source d'excitation est constituée de trois lasers:

- 1'un à l'Hélium/Néon (He/Ne)
- deux autres à l'Hélium/Cadmium (He/Cd)

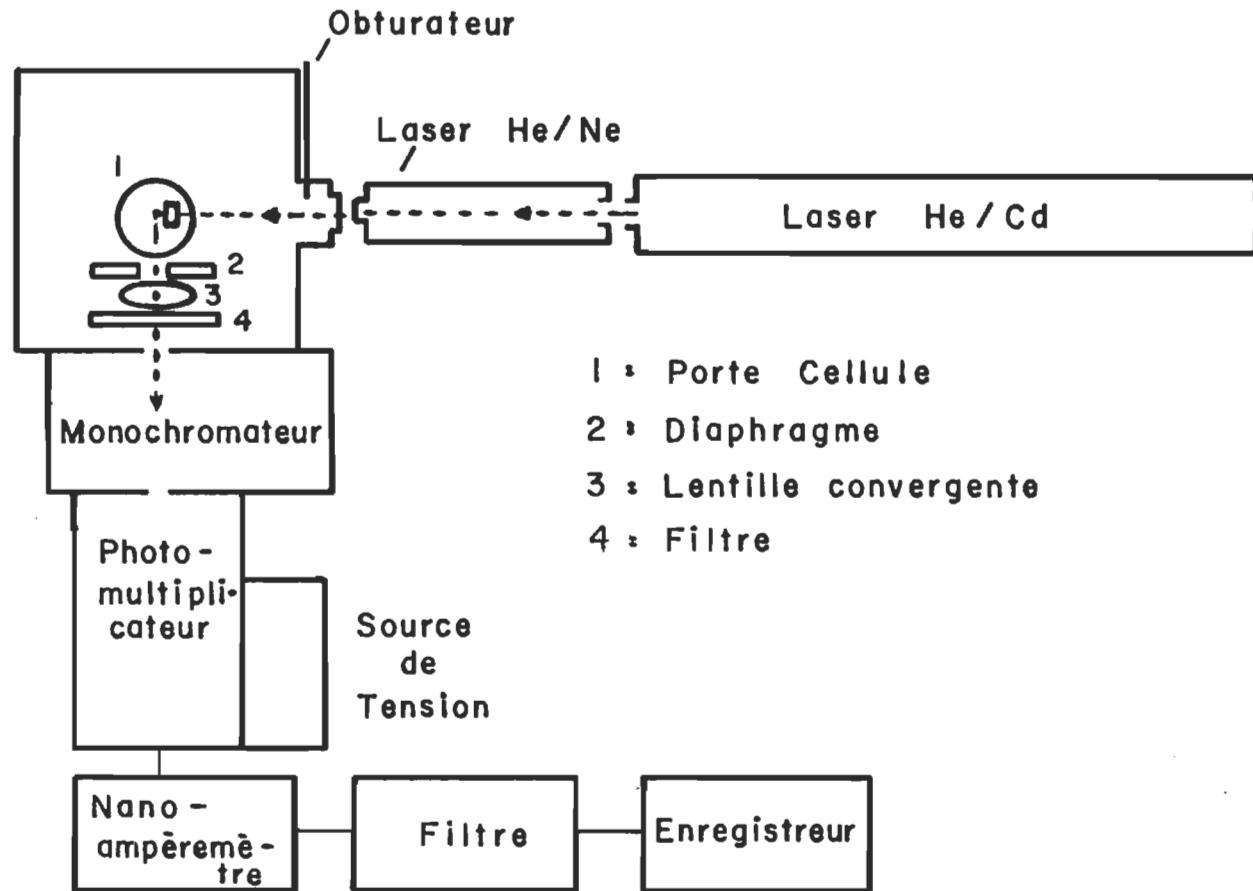
Le laser He/Ne émet à 632.8 nm.

Les lasers He/Cd émettent soit à 441.6 nm soit à 325 nm.

Nous allons maintenant décrire le premier système dont le détecteur permet d'effectuer des mesures d'émission de fluorescence dans le visible.

II.2.1 Description du système uv-visible.

Le schéma du système de détection uv-visible (schéma 16) nous indique que le faisceau de la lumière émise par un laser pénètre dans une chambre noire hermétique pour aller frapper un échantillon.



SCHEMA 16 : SCHEMA SIMPLIFIE DU SPECTROFLUORIMETRE LASER.
SYSTEME DE DETECTION POUR L' UV ET LE VISIBLE.

Le rôle essentiel du diaphragme (2) est de laisser passer les seuls faisceaux de lumière émise non-dispersante ou diffusée.

La lentille de verre (3) accolée au diaphragme concentre les rayons qu'elle reçoit exactement dans la fente d'un monochromateur fixé à la chambre noire.

Sur le trajet du faisceau convergent, un filtre (4) a été placé afin d'éliminer toute lumière dispersante et toute lumière ayant une longueur d'onde inférieure à 640 nm. La caractéristique principale est la suivante: "Sharp cut-off filter", 640 nm.

La lumière passe ensuite dans le monochromateur et atteint le photomultiplicateur dans une chambre refroidie à la glace sèche.

Comme l'amplification assurée par le photomultiplicateur est proportionnelle à la tension appliquée à ses bornes, une source de tension variable et très stable pouvant atteindre facilement plus de 3 000 V a été raccordée à l'appareil.

Avant d'être enregistré, le photocourant est mesuré à l'aide d'un nanoampèremètre. Un filtre électronique atténue le bruit de fond ce qui permet indirectement de lire des signaux très faibles.

Les caractéristiques des éléments du système uv-visible sont décrites à la section suivante.

II.2.2 Caractéristiques des éléments du système uv-visible

- Laser Hélium-Cadmium (Laser He/Cd)

Modèle 185/285 - Puissance 75 mW

Spectra Physics - California

Source continue de lumière cohérente émettant à 441.6 nm

Diamètre du faisceau: 1.5 mm

Source de tension: Voltage: 115V/230V

Fréquence: 50/60 Hz

Puissance: 1200 VA

- Laser Hélium-Cadmium (Laser He/Cd)

Modèle LD 2186 A - Puissance 20 mW

RCA - Pennsylvania

Source continue de lumière cohérente émettant à 441.6 nm

Diamètre du faisceau: 0.8 mm

Source de tension: Voltage: 115 V

Fréquence: 50-60 Hz

Puissance: 250 VA

- Laser Hélium-Néon (Laser He/Ne)

Modèle 120 - Puissance 5 mW

Spectra Physics - California

Source continue de lumière cohérente émettant à 632.8 nm

Diamètre du faisceau: 0.65 mm

Source de tension: Voltage: 115/120 V

Fréquence: 50-60 Hz

Puissance: 50 VA

- Monochromateur

Modèle Ebert 0.25 meter .82-410

Jarrell-Ash division; Fisher Scientific Company, Mass

Fente: 150 um

- Photomultiplicateur

Modèle EMI RC 50 M. Gencom Division Varian

EMI - New York

Tube à cathode sensible rouge - type 9558 XOB

- Source de tension

Modèle Power Supply Nimpac 105

Velonex - California

Tension produite de 0 à 3000 V: ajustable manuellement,
utilisée à 1040 V.

- Nanoampèremètre

Modèle EMI, type 911, Gencom division Varian

EMI - New York

Courant mesurable 100 µA - 1 nA

- Enregistreur

Modèle YEW 3043

Yokagawa Electric Works Ltd, Musashino, Japon

II.2.3 Descriptions du système pour le visible et le proche infrarouge

Le schéma du système de détection pour le visible et le proche infra-rouge (schéma 17) nous indique que la lumière émise par le laser est modulée par un modulateur de fréquence avant d'atteindre la cellule dans la chambre de détection.

Une photodiode de référence nous permet de suivre les fluctuations des sources d'irradiation.

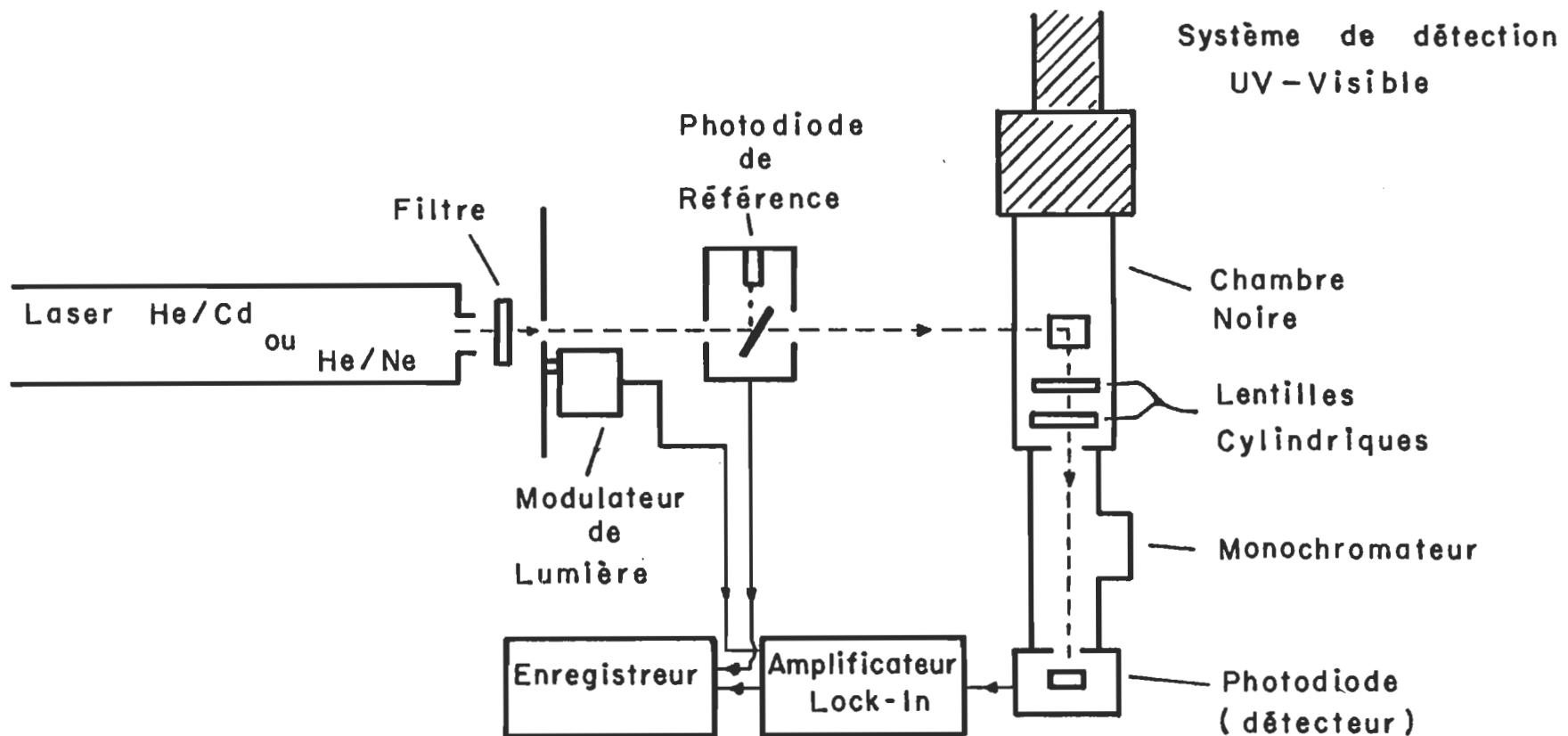
La lumière émise par la substance est focalisée à l'aide de deux lentilles cylindriques (schéma 18) dans la fente du monochromateur fixé à la chambre noire.

La lumière passe ensuite dans le monochromateur et atteint une photodiode.

L'amplification est assurée par un amplificateur "Lock in".

Pour les mesures à basse température, la chambre de détection est remplacée par un cryostat montré au schéma 19.

De nouveau, la lumière modulée du laser atteint une première fibre optique qui conduit la lumière d'excitation jusqu'à la cellule.



SCHEMA 17 : SCHEMA SIMPLIFIE DU SPECTROFLUORIMETRE LASER.
SYSTEME DE DETECTION POUR LE VISIBLE ET LE PROCHE INFRA-ROUGE

LENTEILLES
CYLINDRIQUES

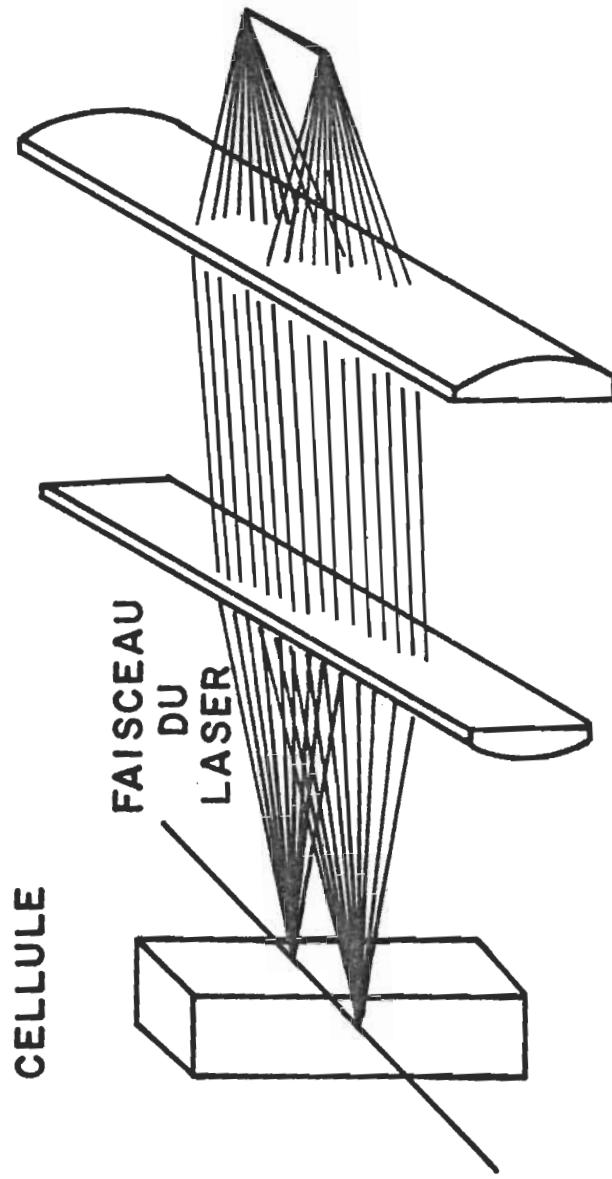
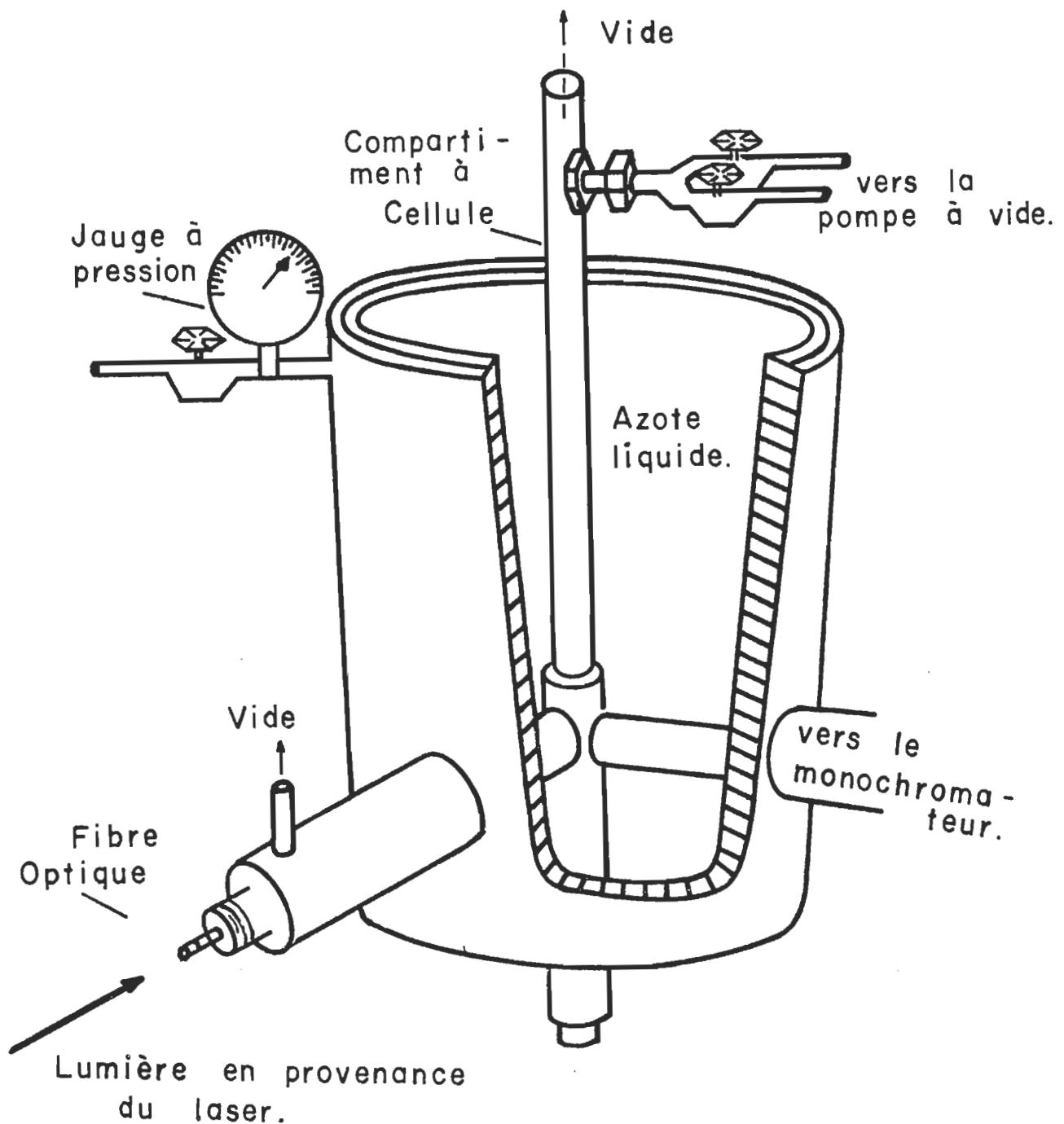


SCHÉMA 18 : LENTEILLES CYLINDRIQUES



SCHEMA 19 : CRYOSTAT POUR LES MESURES A BASSE TEMPERATURE

La lumière émise par la substance est amenée dans la fente du monochromateur à l'aide d'une seconde fibre optique.

Le signal est finalement amplifié à l'aide de l'amplificateur "Lock in".

Les caractéristiques des éléments du système pour le visible et le proche infra-rouge sont décrites à la section suivante.

II.2.4 Caractéristiques des éléments du système de détection pour le visible et le proche infra-rouge

- Modulateur de fréquence (Chopper)

Modèle 125 A

Princeton Applied Research, New-Jersey

- Amplificateur "Lock in"

Modèle 186 A

Princeton Applied Research, New-Jersey

Sensibilité: de 500 mV - 100 nV

- Photodiode

Modèle HUV - 4 000

E G & G, Massachusett

- Monochromateur

Modèle H-201 R

Jobin Yvon, New-Jersey
utilisable entre 400 et 1500 nm.

- Lentilles cylindriques

Optikon, Ontario

Distance focale 40 mm et 60 mm

- Cellules

Tube de pyrex rectangulaire (diamètre interne 2mm x 6mm)

Wilmad Glass Co, New-Jersey

Les caractéristiques des lasers et de l'enregistreur ont été données lors de la description du système de détection uv-visible (voir section II.2.2, page 61).

II.2.5 Utilisation

Leblanc et coll.(1974) ont déjà évalué la sensibilité du système uv-visible (voir section II.2.1, page 58) en comparant ce spectrofluorimètre à un spectrofluorimètre commercial: (e.g. spectrofluorimètre Perkin-Elmer MPF - 2A), ils ont démontré que le système laser était beaucoup plus précis que le spectrofluorimètre conventionnel puisqu'il répondait "qualitativement" à des concentrations dix mille fois plus faibles.

Le système uv-visible nous a permis d'obtenir la relation (figure 1) entre l'intensité relative de fluorescence en fonction de la concentration de la chl a (Sigma, Mo).

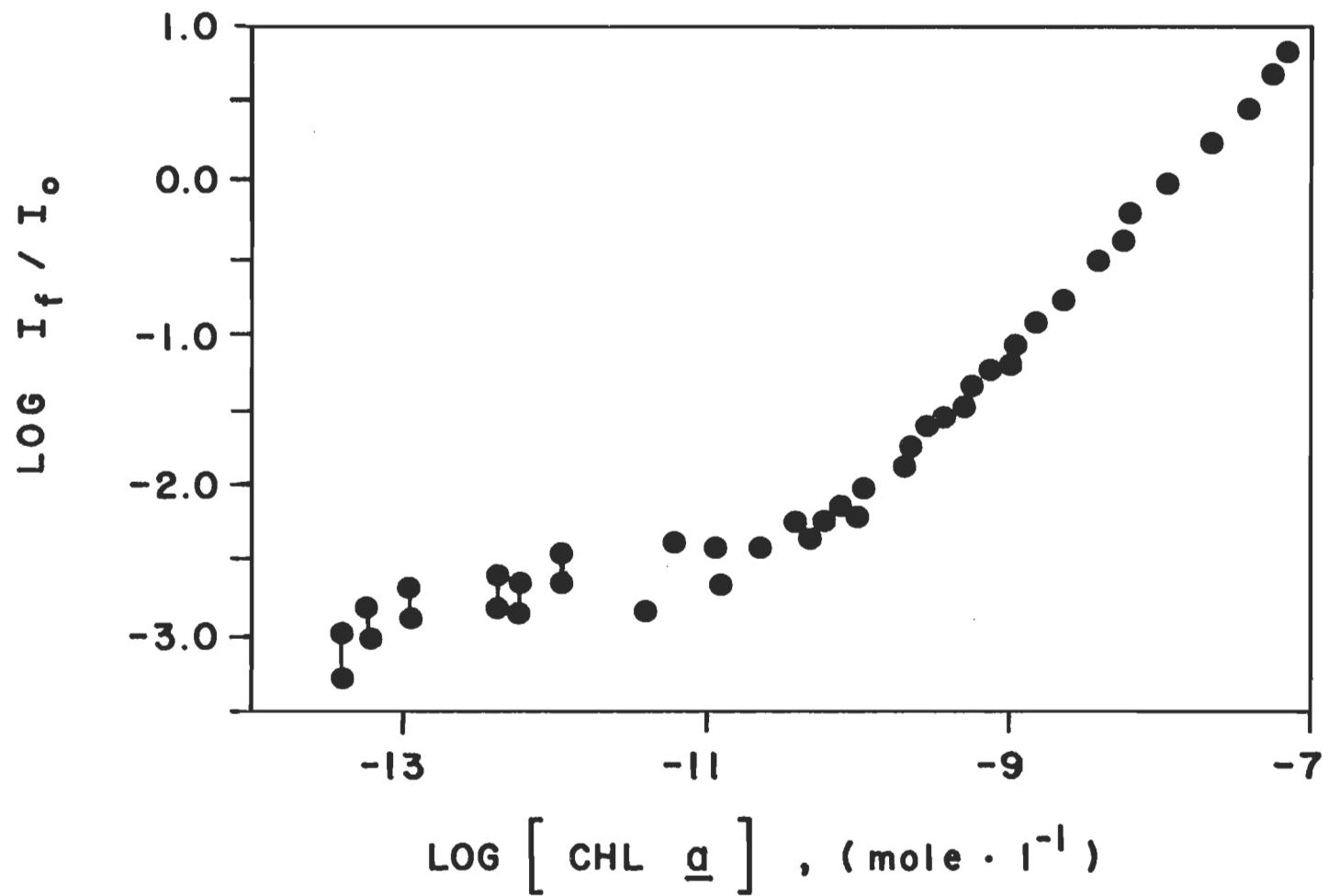


FIGURE 1 : INTENSITE RELATIVE DE FLUORESCENCE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE CHLOROPHYLLE a
(SYSTEME UV-VISIBLE)

On voit que le système répond "qualitativement" à de très faibles concentrations de chl a. Jusqu'à la concentration de 10^{-11} M la relation intensité de fluorescence en fonction de la concentration de chl a demeure parfaitement linéaire. Puis on observe le changement de pente de 10^{-11} M jusqu'à 10^{-13} M qui est la limite de détection.

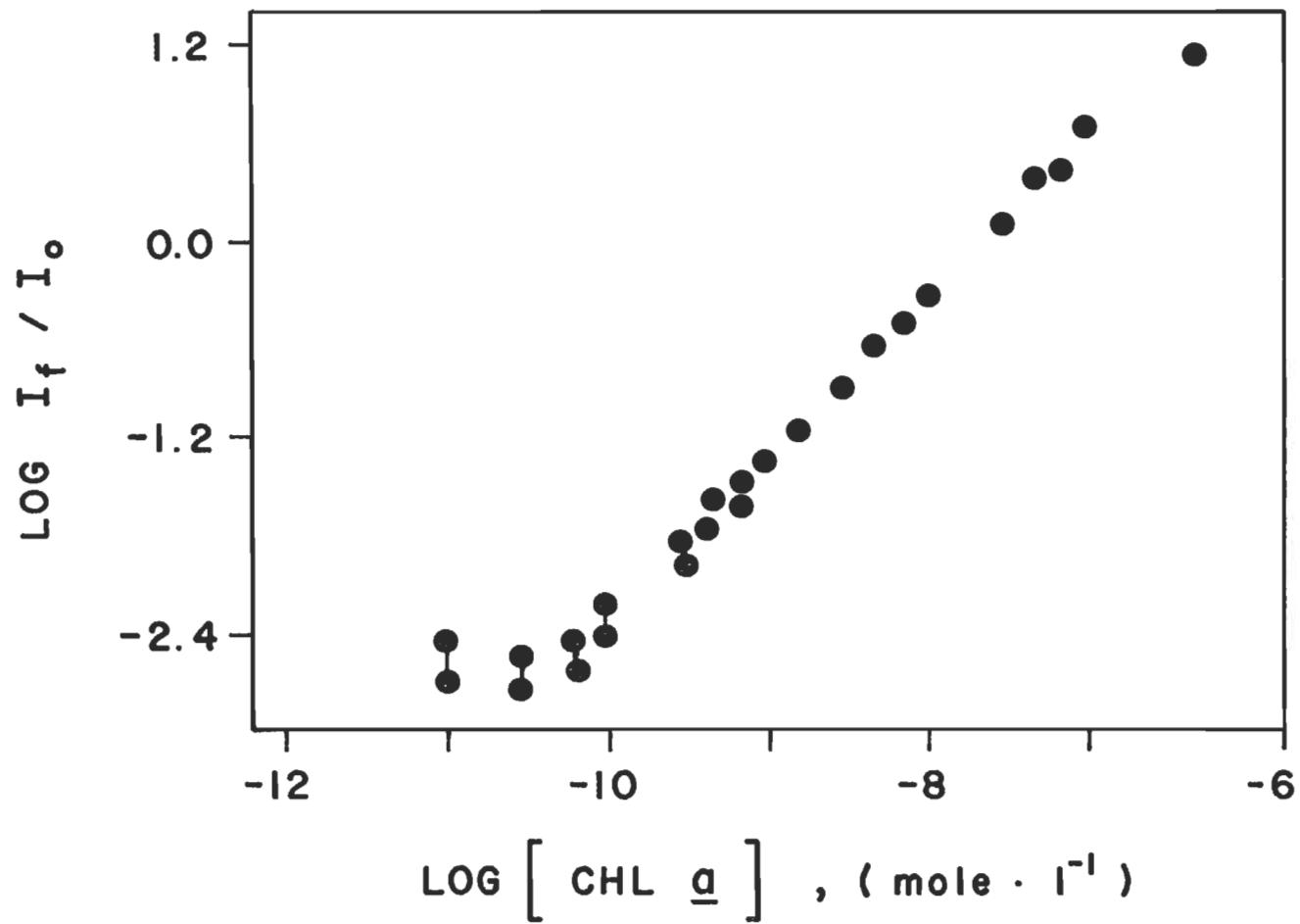
Nous nous proposons dans un avenir immédiat d'expliquer la cause de ce changement de pente.

La relation entre l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration de la chl a telle que montrée à la figure 2 a été obtenue par le système visible et proche infra-rouge (voir section II.2.3, page 63); l'optique utilisée était les lentilles cylindriques. Les mesures ont été effectuées à la température ambiante.

On remarque sur cette figure que la relation intensité de fluorescence en fonction de la concentration de chl a demeure linéaire jusque vers 10^{-10} M. De plus, la limite de détection se situe vers 10^{-11} M.

Bien que le pouvoir de détection ait diminué par un facteur de 100 comparativement au système uv-visible, le travail accompli par la photodiode et l'optique cylindrique est supérieur à un spectrofluorimètre conventionnel.

La figure 3 est une relation obtenue par le système visible et proche infra-rouge mais cette fois-ci la chambre de détection est le cryostat avec les fibres optiques (voir section II.2.3, page 63). Les mesures de fluorescence ont été effectuées à la température ambiante.



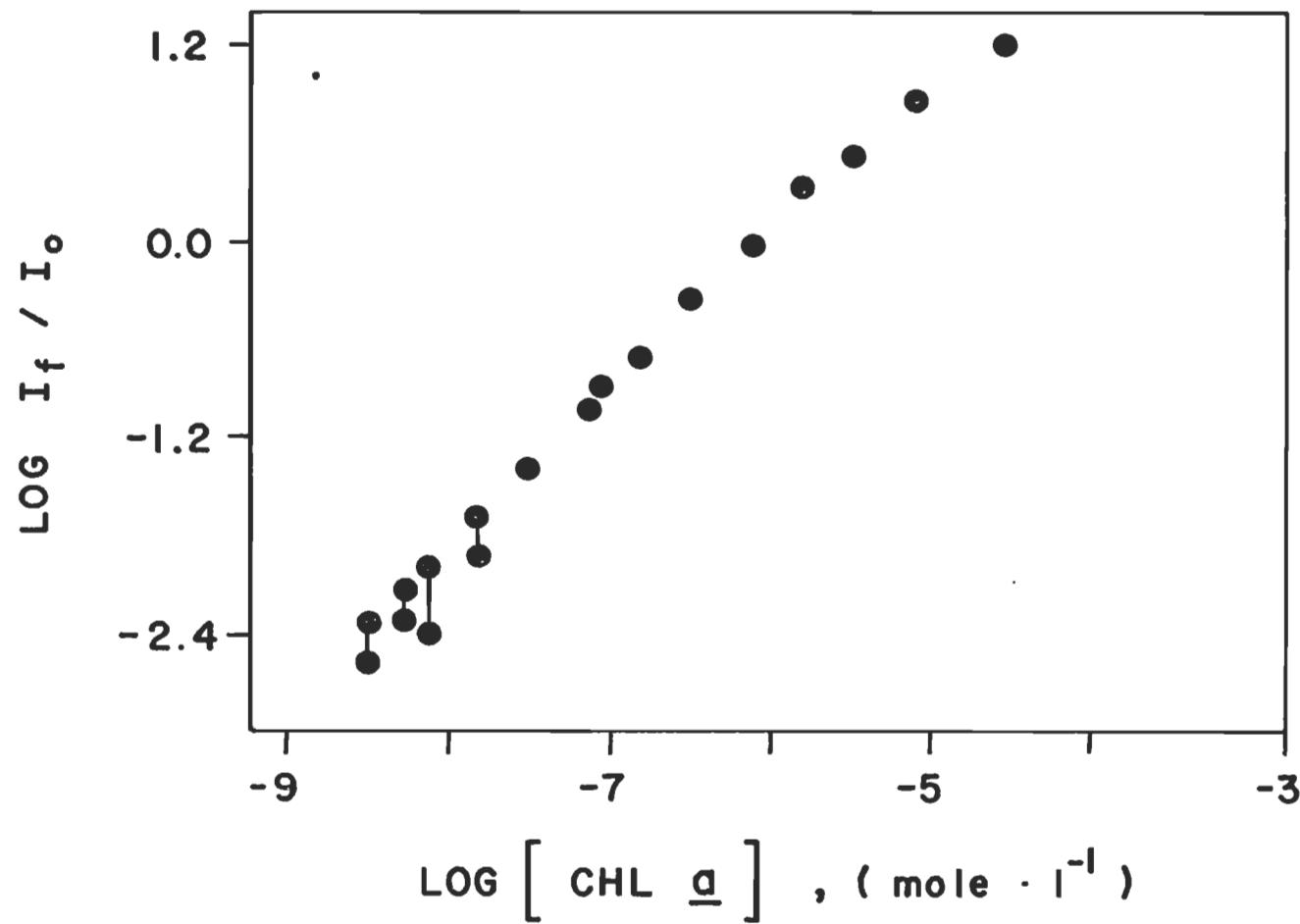


FIGURE 3 : INTENSITE RELATIVE DE FLUORESCENCE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE CHLOROPHYLLE a (SYSTEME VISIBLE ET PROCHE INFRA-ROUGE EQUIPE DU CRYOSTAT).

Cette fois-ci la relation entre l'intensité de fluorescence versus la concentration est linéaire jusque vers 10^{-9} M; cette concentration est de plus la limite de détection pour ce système.

La relation nous indique donc que le système visible et proche infra-rouge (couplé au cryostat) est beaucoup moins sensible que le système uv-visible. En effet, sur le plan de la limite de détection, il y a un facteur 1000 entre ce dernier et le système visible et proche infra-rouge; il est de 10 000 avec le système uv-visible.

D'un autre côté, le système visible et proche infra-rouge sera légèrement compensé par l'effet de la basse température car à 77 K le rendement quantique de fluorescence de la chl a *in vivo* est considérablement augmenté car le quenching interne et photochimique sont ralentis à cette température (Govindjee et coll.1973).

Le système pour le visible et le proche infra-rouge assemblé avec le cryostat sera utilisé pour les mesures de fluorescence des suspensions de chloroplastes à basse température (77 K).

II.3 Spectrofluorimètre Perkin Elmer "MPF - 2A"

II.3.1 Description

Cet appareil permet d'obtenir des spectres d'excitation et d'émission de la fluorescence de divers échantillons. La brève description suivante donnera une idée de ses différentes parties.

- Spectrophotomètre avec deux monochromateurs (excitation et émission) 1) l'un servant à irradier la substance avec la lumière monochromatique entre 200 et 700 nm
2) l'autre qui détermine l'intensité de la lumière émise entre 220 et 800 nm.
- Deux photomultiplicateurs portant l'identification RCA 136 R
- Source continue de la lumière fournie par une lampe au Xénon de 150 W, alimentée par une tension de 150 V (Fréquence: 50-60 Hz).
- Amplificateur avec 6 positions différentes pour la sensibilité.
- Enregistreur; modèle QPD-33, Perkin Elmer à deux vitesses de papier (50 mm/min; 100 mm/min.).

II.3.2. Utilisation

Le spectrofluorimètre est uniquement utilisé pour les mesures des spectres d'excitation de suspension de chloroplastes.

II.4. Spectrophosphorimètre

II.4.1. Description

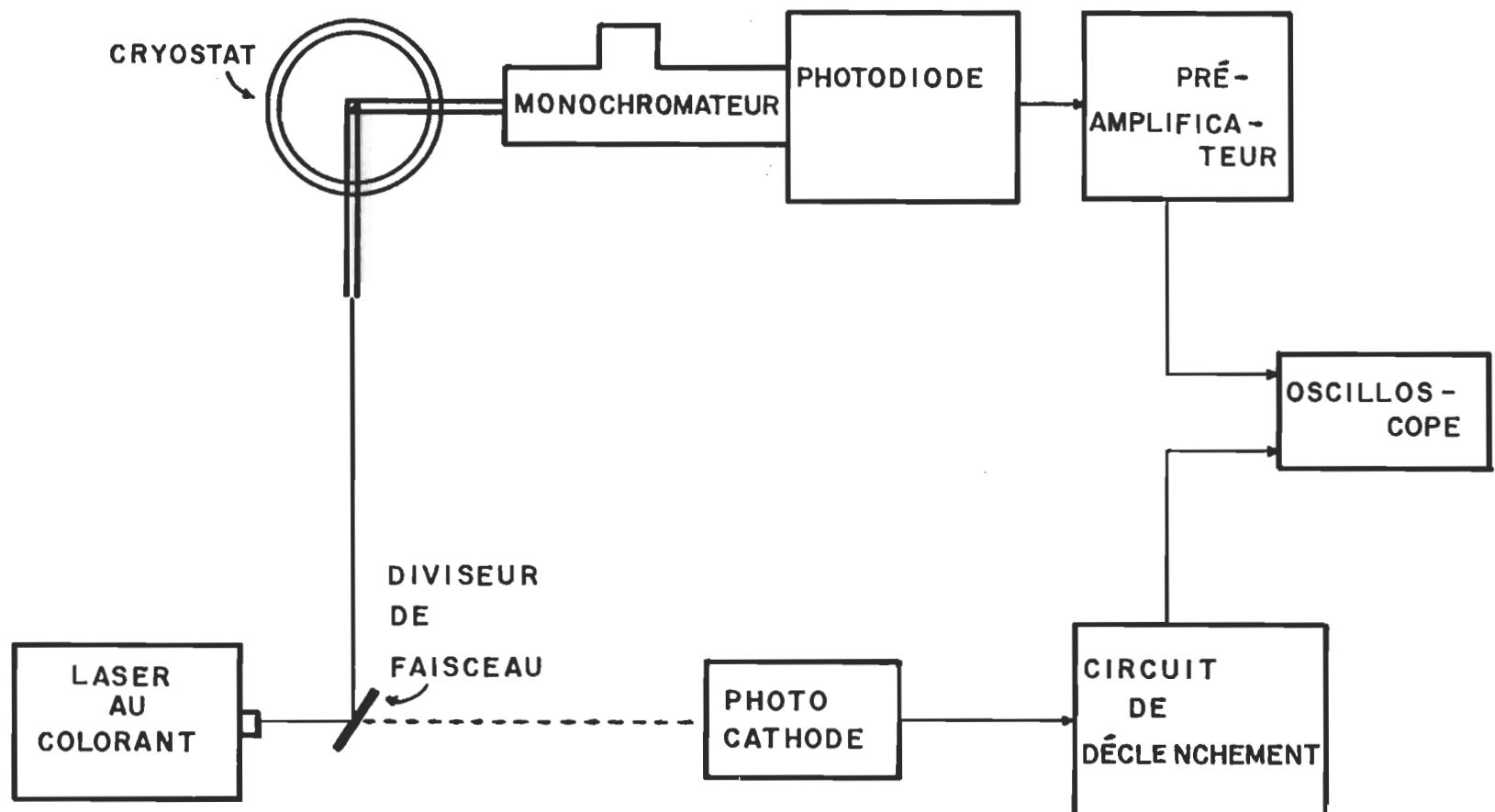
Le schéma du spectrophosphorimètre (schéma 20) nous indique que la source d'excitation est un laser au colorant émettant des pulses de lumière de l'ordre de la microseconde (1.0×10^{-6} s).

Un diviseur de faisceau réfléchit la majorité de la lumière (99%) sur l'entrée de la fibre optique; cette dernière transmet la lumière vers l'échantillon.

La luminescence provenant de l'échantillon est captée par la deuxième fibre optique et traverse le monochromateur pour être détectée par une photodiode.

Le courant produit est amplifié puis enregistré et mis en mémoire dans l'oscilloscope.

Nous avons mentionné un peu plus haut que le diviseur de faisceau réfléchissait environ 99 % de la lumière émise par le laser au colorant; le reste de la lumière transmise (1%) sert par l'entremise de la photocathode à faire déclencher l'oscilloscope; ce processus s'accomplit à l'aide du circuit de déclenchement.



SCHEMA 20 : SCHEMA SIMPLIFIE DU SPECTROPHOSPHORIMETRE LASER

Le déclenchement de l'oscilloscope est coordonné avec le signal provenant du détecteur. A l'instant où parvient le signal à l'oscilloscope il balaye l'écran et enregistre dans sa mémoire le signal.

Le processus de fonctionnement du spectrophosphorimètre est décrit de façon très succincte. Pour avoir de plus amples informations sur le sujet, il faudrait consulter Lesage 1978.

II.4.2 Caractéristiques des éléments du spectrophosphorimètre

- Laser au colorant

Modèle: Chromabeam 1050

Synergetics Research Inc.

Voltage d'utilisation: 24 kV

Pression du Spark Gap: 16 psi

Colorant: rhodamine B

Longueur d'onde d'émission: spectre complet de la rhodamine B

Note: Nous ne nous sommes pas servi du réseau pour choisir une longueur d'onde d'émission particulière.

- Nous avons positionné le réseau pour qu'il agisse en tant que miroir. Ceci nous donne à l'émission le spectre complet de la rhodamine B.

- Photocathode

Modèle S - 6 (no. phototube : 935)

RCA

- Préamplificateur

Modèle: 181

Princeton Applied Research

Sensibilité: 10^{-9} A/V à 10^{-4} A/V

Fréquence de réponse: open loop 10 MHz

Voltage d'alimentation: entre 15 V et 25 V

- Oscilloscope

Modèle E514

Tektronik

- Le détecteur (photodiode) a déjà été décrit à la section II.2.4. (page 67)

II.4.3 Utilisation

Le spectrophosphorimètre sert à mesurer des temps de vie de phosphorescence.

II.5 Extraction des chloroplastes

L'extraction des chloroplastes est systématiquement réalisée à partir de 30 g de feuilles d'épinard obtenues d'un super marché local. Ces dernières sont auparavant soigneusement triées, lavées rapidement à l'eau du robinet puis rincées à l'eau distillée. Les nervures principales sont éliminées; le parenchyme foliaire est haché dans 175 ml de milieu d'extraction, préalablement refroidi à la température de la glace fondante et dont la composition est la suivante (Den Haan et coll. 1973; Amesz et coll. 1973): saccharose, 0.4 M (Fisher, P.Q.) KCl, 0.01 M (Fisher, P.Q.) MgCl₂, 0.002 M (Fisher, P.Q.) et tricine, 0.05 M (Sigma, M0) ajustée au pH 7.8 avec NaOH.

L'ouverture des cellules est réalisée à l'aide d'un broyeur à hélice (Osteorizer, P.Q.) fonctionnant à vitesse moyenne pendant 5 s. Le broyat est filtré sur deux épaisseurs de gaze puis de nouveau sur six épaisseurs de gaze. Le filtrat obtenu est centrifugé (Sorval RC3, rotor HG-4, volume des tubes: 50 ml) pendant 1 min à 600 g. Puis le surnageant est décanté et il est centrifugé pendant 3 min à 2 500 g.

Les culots obtenus sont repris avec 2 ml du milieu d'extraction et la concentration de chlorophylle (voir section II.6, page 81) est déterminée.

Le schéma 21 résume les étapes de l'extraction des chloroplastes.

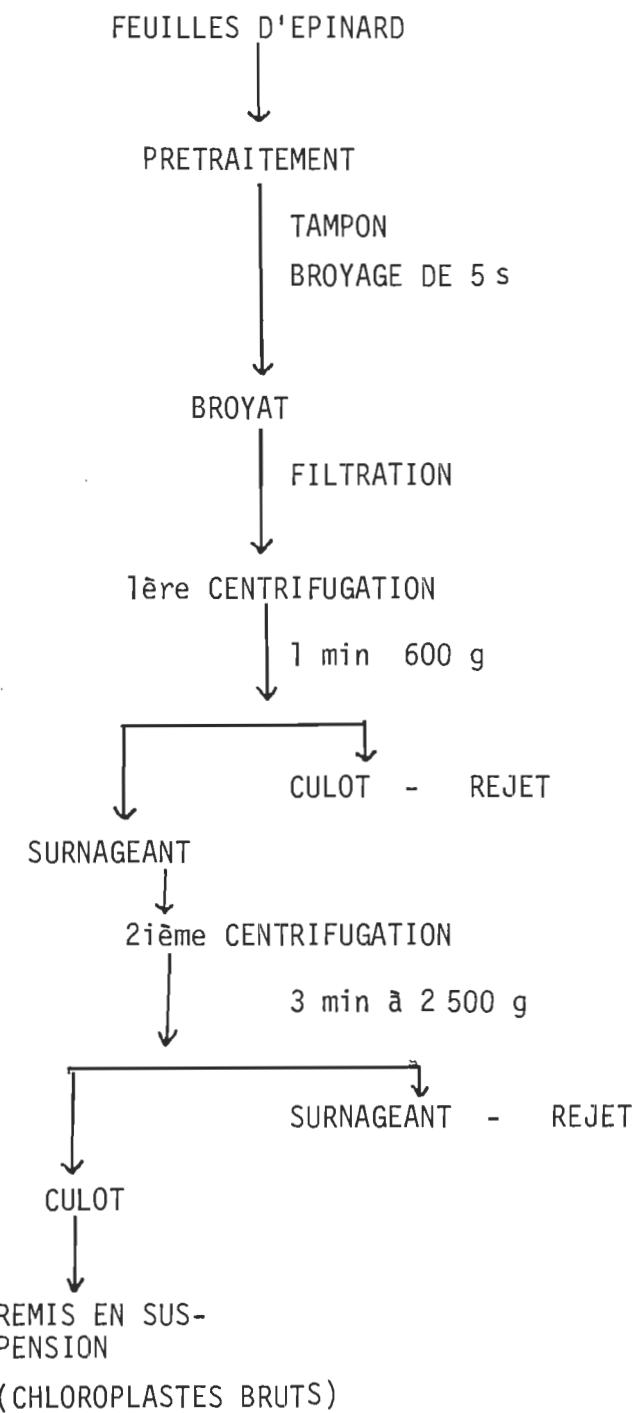


Schéma 21

Schéma résumant la procédure d'extraction des chloroplastes

Au microscope électronique (voir section II.7, page 86) les culots remis en suspension démontrent la présence de chloroplastes intacts (classe I dans la nomenclature de Hall; Hall 1972) et des chloroplastes cassés (classe II). Selon la figure 4, les chloroplastes intacts apparaissent sombres; leur membrane externe retient le stroma. Les chloroplastes cassés apparaissent clairs; ils sont libérés de leur stroma.

Il est à noter que les nombreux détails sur les principes fondamentaux de l'extraction des chloroplastes sont revus par Walker (1971).

Pour ralentir le vieillissement des chloroplastes, on peut les conserver dans les mélanges tampon-glycérol à -20⁰C (Asada et Takahashi 1971; Fragata 1975). Ce mélange semble également efficace pour prévenir la dénaturation thermique (Vermaglio et Mathis 1973).

II.6 Détermination de la concentration de chlorophylle dans une suspension de chloroplastes

La procédure utilisée pour déterminer la concentration de chlorophylle dans une suspension de chloroplastes est celle qui fut mise au point par Arnon (1949) (Voir aussi Gorham (1956), Vishniac (1957), Bruinsma (1961), Kirk (1968)) dont le principe est basé sur l'absorption de la lumière par la chlorophylle extraite dans un mélange acétone-eau (80-20). La concentration de chlorophylle a et b est déterminée en mesurant dans une cellule de 10 mm de parcours optique, la densité optique de la chlorophylle extraite dans un mélange acétone-eau (80-20) à l'aide d'un spectrophotomètre à 663, 645 et 652 nm. En utilisant les équations de Arnon (1949) et les

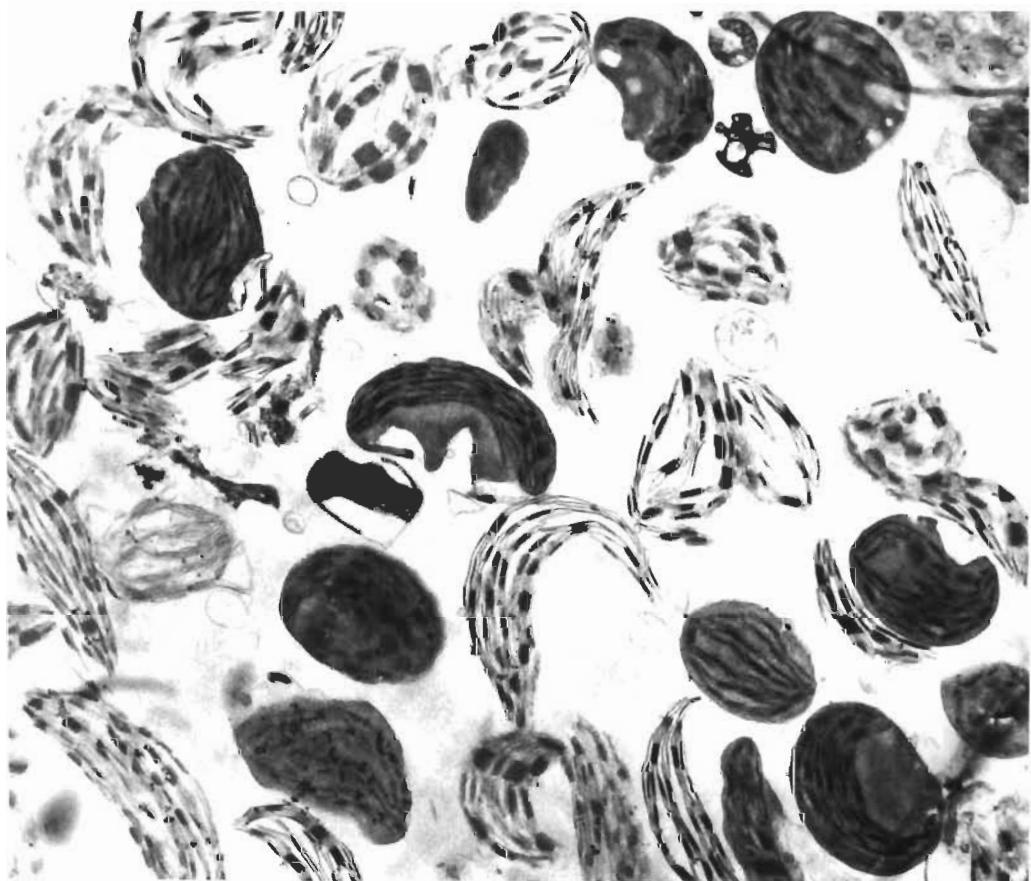


Figure 4

Suspension de chloroplastes bruts vue au microscope électronique (5360 X).

coefficients d'absorption de Mackinney (1941) on a que:

$$1) A_{663} = 82.04 \text{ Ca} + 9.27 \text{ Cb}$$

$$2) A_{645} = 16.75 \text{ Ca} + 45.6 \text{ Cb}$$

où Ca et Cb sont des quantités en grammes par litre de chlorophylle a et b respectivement et A les valeurs d'absorbance obtenues aux longueurs d'onde respectives au spectrophotomètre. De l'équation (2),

$$3) \text{ Ca} = \frac{A_{645} - 45.6 \text{ Cb}}{16.75}$$

si on substitue dans (1) et si on résout pour Cb on obtient

$$4) \text{ Cb} = 0.0229 A_{645} - 0.00468 A_{663}$$

substituant cette expression pour Cb dans (2) et résolvant pour Ca:

$$5) \text{ Ca} = 0.0127 A_{663} - 0.00269 A_{645}$$

Alors la concentration (C) totale de chlorophylle en grammes par litre,

$$6) \text{ C} = \text{Ca} + \text{Cb} = 0.0202 A_{645} + 0.00802 A_{663}$$

ou si on exprime la concentration totale de chlorophylle (C) en milligrammes par litre.

$$7) \text{ C} = 20.2 A_{645} + 8.02 A_{663}$$

Afin d'obtenir une approximation de la concentration totale en chlorophylle, Arnon (1949) dressa un graphique de l'absorption de la lumière par les chlorophylles a et b à partir des données de Mackinney (1941) et il trouva que les courbes s'interceptaient à $\lambda=652$ nm. Par extrapolation, la valeur du coefficient d'absorption spécifique pour cette longueur d'onde fut trouvée comme étant de 34.5. Arnon (1949) proposa alors une autre équation pour déterminer la concentration totale de chlorophylles dans une suspension de chloroplastes.

$$8) A_{652} = 34.5 C_a + 34.5 C_b = 34.5 (C_a + C_b)$$

alors

$$9) C = C_a + C_b = \frac{A_{652}}{34.5}$$

ou exprimé en milligramme par litre

$$10) C = \frac{A_{652} \times 1000}{34.5}$$

Comme il existait une différence systématique de 5% entre les résultats des deux équations, Bruinsma (1961) réexamina la valeur du coefficient d'absorption spécifique à 652 nm et détermina comme valeur de coefficient 36.0 au lieu de 34.5. Il proposa donc l'équation suivante pour déterminer la concentration totale de chlorophylle.

$$11) C = 20.2 A_{645} + 8.02 A_{663} = \frac{1000 \times A_{652}}{36.0}$$

L'exemple suivant illustre la procédure utilisée pour les déterminations de concentrations de chlorophylle: 0.5 ml de la suspension de chloroplastes est brassée vigoureusement dans un tube à centrifuger de verre et fermé contenant déjà 9.5 ml d'acétone (80%). Le tube est ensuite centrifugé dans une centrifugeuse clinique (modèle IEC) à 4500 g et les valeurs de densité optique aux longueurs d'onde respectives sont ensuite déterminées contre un témoin contenant le mélange eau-acéto-ne (80%) seulement.

Soit les valeurs de densité optique suivantes obtenues à l'aide du spectrophotomètre;

$$A_{645} = 0.187$$

$$A_{663} = 0.506$$

$$A_{652} = 0.275$$

Substituant les deux premières valeurs dans l'équation (7) et multipliant par le facteur de dilution

$$C = (20.2 \times 0.187 + 8.02 \times 0.506) \times \frac{10}{1000 \times 0.5} = .155 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

De façon similaire, en substituant A_{652} dans l'équation (11)

$$C = \frac{0.275 \times 1000}{36.0} \times \frac{10}{1000 \times 0.5} = .152 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

La grandeur de l'aliquot utilisé pour la détermination de la concentration de chlorophylle dépend du contenu en chlorophylle. Généralement 0.5 ml de la suspension de chloroplastes est convenable.

II.7 Microscope électronique

Les culots de chloroplastes bruts ou les fractions de chloroplastes séparés sur gradients de densité sont fixés pendant 4 heures à 0°C dans une solution de glutaraldéhyde 3.0 % (Soquelec, P.Q.). Cette solution est maintenue au pH 7.3 à l'aide d'un tampon phosphate 0.1 M; elle contient de plus, une trace (0.01 %) de chlorure de calcium (CaCl_2).

Mentionnons immédiatement qu'après la fixation au glutaraldéhyde et après chaque changement de solution (soit pour laver les organites ou soit pour les déshydrater) les fractions sont centrifugées (centrifuge clinique, IEC, environ 3000 g), le surnageant est retiré et les fractions sont remises en suspension dans la solution suivante.

Après la fixation au glutaraldéhyde, les fractions sont lavées quatre fois dans le tampon phosphate pH 7.3 (sucrose 5%, CaCl_2 0.01 %) pendant 30 minutes.

Puis elles sont post-fixées pendant 2 heures à 0°C dans une solution de téraoxyde d'osmium 2% (Soquelec, P.Q.); cette solution est aussi tamponnée à pH 7.3 avec un tampon phosphate 0.1 M.

Les fractions sont rinçées dans l'eau distillée puis déshydratées successivement dans 5 bains d'éthanol de 30 %, 50 %, 70 %, 90 % et 100 % pendant 5 minutes; elles sont ensuite passées dans 2 bains d'oxyde de

propylène (Fisher, P.Q.) pendant 50 min.

Elles sont alors enrobées d'Epon (Ladd, Ver) dans des capsules Beem (Ladd, Ver.) et polymérisées à 60⁰C pendant 36 heures.

Les sections d'argent à or coupées avec un couteau de verre sur un ultra-microtome (Sorval MT-1 Con.) sont colorées avec du citrate de plomb (Fisher, P.Q.) à 3% et de l'acétate d'uranyle (Soquelec, P.Q.) à 2% dans le méthanol.

Les coupes sont examinées au microscope électronique (Philipps EM- 201 c), qui est sous une tension de 60 kv et les images électroniques sont enregistrées sur un film Kodak 35mm.

II.8 Séparation des chloroplastes sur gradient continu de saccharose

Une procédure commune pour isoler les chloroplastes des feuilles d'épinard est la centrifugation sur gradient de densité de solution de saccharose (Leech 1964).

Le saccharose n'est pas normalement considéré comme étant toxique pour la survie des chloroplastes. Il est au contraire fréquemment utilisé comme agent satisfaisant pour produire des conditions osmotiques qui préviennent la rupture des chloroplastes. Mais dans un gradient de densité il a le désavantage d'avoir une grande viscosité et de causer le rétrécissement des chloroplastes et comme conséquence de produire un changement dans leur densité effective (Lyttleton 1970).

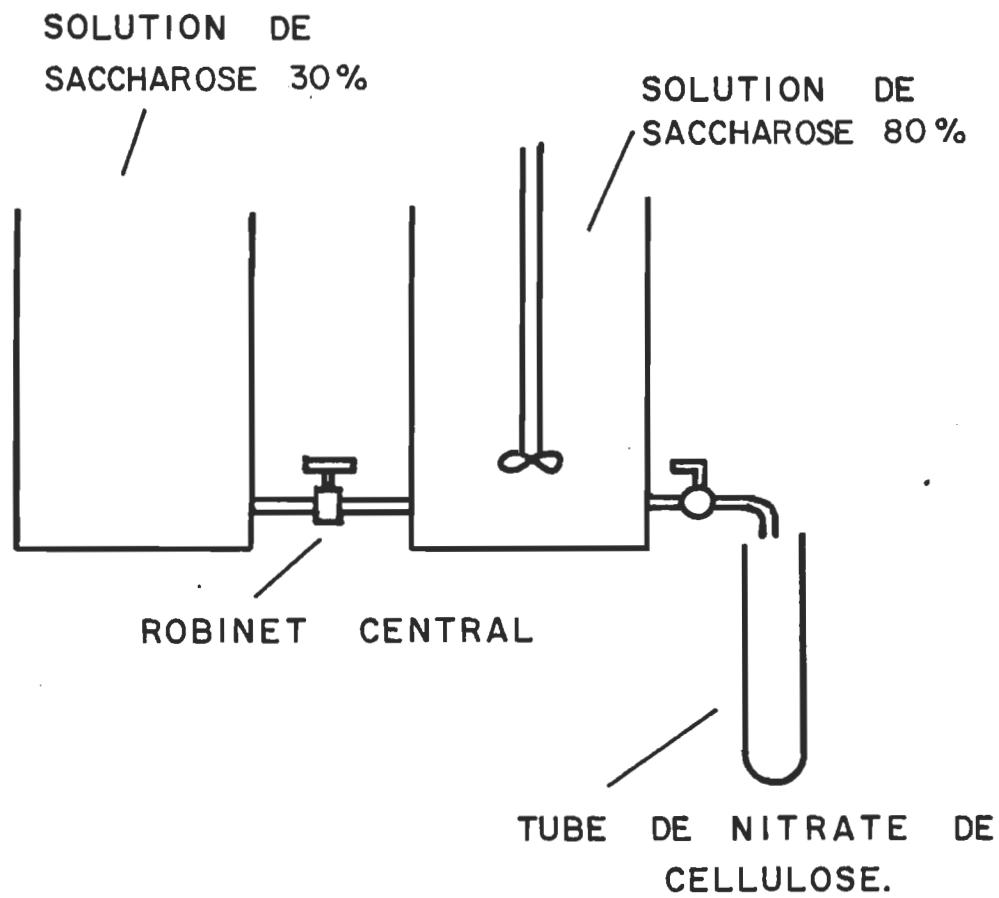
Tout de même nous avons tenté les premières séparations de chloroplastes sur gradient de saccharose car il semble que la technique soit relativement facile pour s'initier à la centrifugation sur gradient de densité.

II.8.1 Préparation des gradients

La solution de départ de saccharose (Fisher, P.Q.) est fabriquée à partir de 30 g de saccharose dilué dans 100 ml d'eau distillée et la solution est tamponnée au pH 7.8 avec 50 mM de tricine. La solution finale contient du saccharose 80% P/V et elle est également tamponnée comme la solution de départ.

II.8.2 Générateur de gradient

Les gradients de saccharose sont générés par le simple appareillage (Oster 1965) montré au schéma 22. Le liquide le plus dense (5.5 ml saccharose 80% P/V) est introduit dans le tube de droite et le moins dense (5.5 ml saccharose 30% P/V) dans le tube de gauche. Auparavant il faut s'assurer que les robinets sont bien fermés. Une fois les solutions déposées dans les différentes chambres, on actionne l'agitateur placé dans le tube de droite et on ouvre le robinet central. Le second robinet, entre le tube de droite et le tube de nitrate de cellulose (Beckman, P.Q.) où est généré un gradient de 11 ml, est ouvert de telle sorte que le débit soit suffisamment lent pour que le temps de formation du gradient soit de 25 à 30 minutes.



SCHEMA 22 : GENERATEUR DE GRADIENT

II.8.3 Fractionnement et profil des gradients continus de sucre

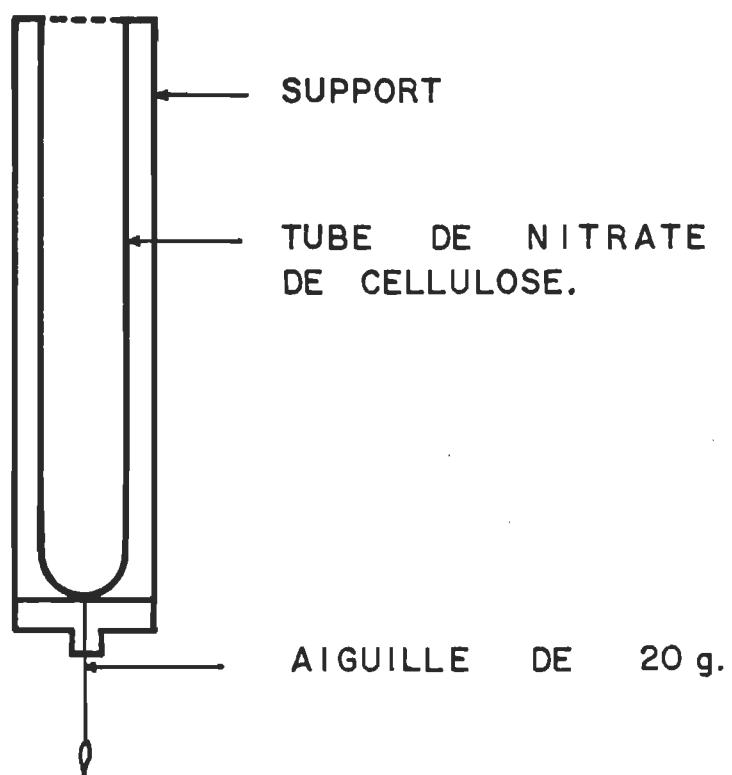
On dépose 0.5 ml d'eau distillée sur le lit des gradients de saccharose et les tubes sont centrifugés (I.E.C. Modèle B 50) à 21000 rpm pendant 18 minutes dans un rotor à angle de tube variable (I.E.C. Modèle B 230).

Le tube est ensuite déposé dans un support (schéma 23) et il est percé par le dessous à l'aide d'une aiguille de 20 g. Des fractions de 50 gouttes (0.6 ml) sont collectées et nous prenons l'indice de réfraction de chaque fraction à l'aide d'un réfractomètre d'Abbé.

Le profil des gradients de saccharose est montré dans la figure 5 où l'ordonnée représente l'indice de réfraction et l'abscisse le numéro de la fraction.

L'indice de réfraction peut nous donner une bonne idée sur le type de gradient obtenu, mais il est plutôt intéressant de savoir comment se distribue la densité de la solution sur les 11 ml générés par l'appareil déjà décrit par Oster (1965).

Nous avons donc établi une relation entre l'indice de réfraction et la densité à 25°C pour différentes solutions de saccharose. Il s'agit à partir d'une solution de sucre de 80% P/V de lire sa densité (balance de Westphall) et de faire correspondre l'indice de réfraction (réfractomètre d'Abbé) pour une même solution de saccharose. La solution est diluée et de nouveau on mesure la densité et l'indice de réfraction et ainsi de



SCHEMA 23 : FRACTIONNEUR DE GRADIENT

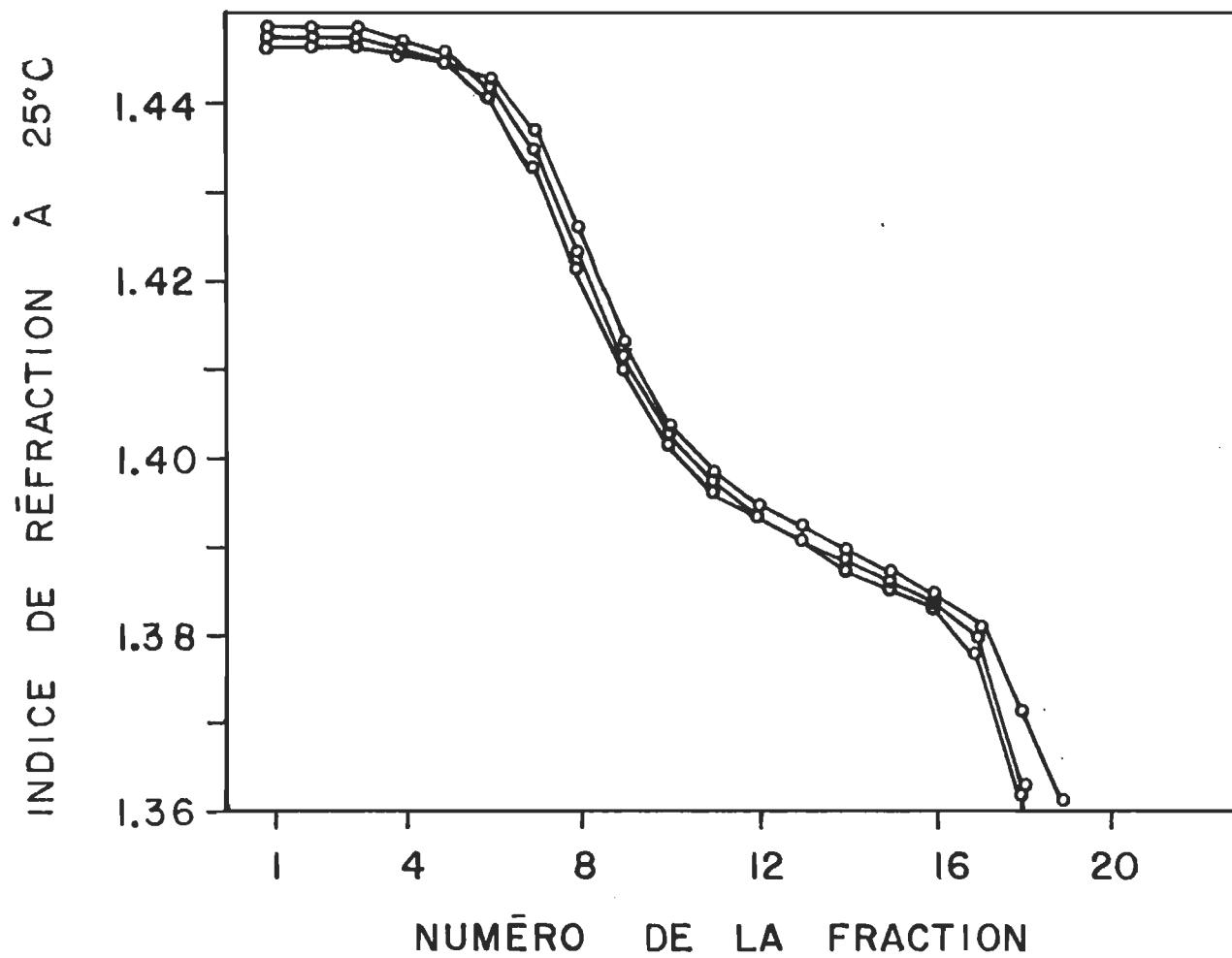


FIGURE 5 : GRAPHIQUE DE L'INDICE DE REFRACTION A 25°C EN FONCTION DU NUMERO DE LA FRACTION , 3 ESSAIS (GRADIENT CONTINU DE SACCHAROSE).

suite jusqu'à l'obtention d'une courbe standard suffisamment étendue.

La relation obtenue est montrée dans la figure 6. Une relation linéaire peut désormais nous permettre de convertir l'indice de réfraction d'une fraction donnée en densité (g/ml).

Si nous convertissons les valeurs de la figure 6 nous obtenons la courbe de la figure 7. Elle est rigoureusement du même type que la figure 5 mais cette fois pour chaque fraction nous avons la densité du milieu.

Nous remarquons que pour les fractions de 1 à 5, la densité demeure la même, soit environ 1.30. Puis la densité diminue de façon linéaire de la fraction 5 à 10 et elle demeure toujours linéaire de la fraction 10 à 16 mais avec une pente moins prononcée comparativement aux fractions 5 à 10.

Cette irrégularité dans la linéarité du gradient de saccharose dépend probablement de la vitesse du débit de formation du gradient.

Pour les premières fractions, il est difficile à la solution la moins dense de diluer la solution de 80% P/V de saccharose ou encore il est probable qu'une petite quantité de la solution la plus dense dans le réservoir de droite glisse sous la solution la moins dense dans le réservoir de gauche lorsque les robinets sont ouverts.

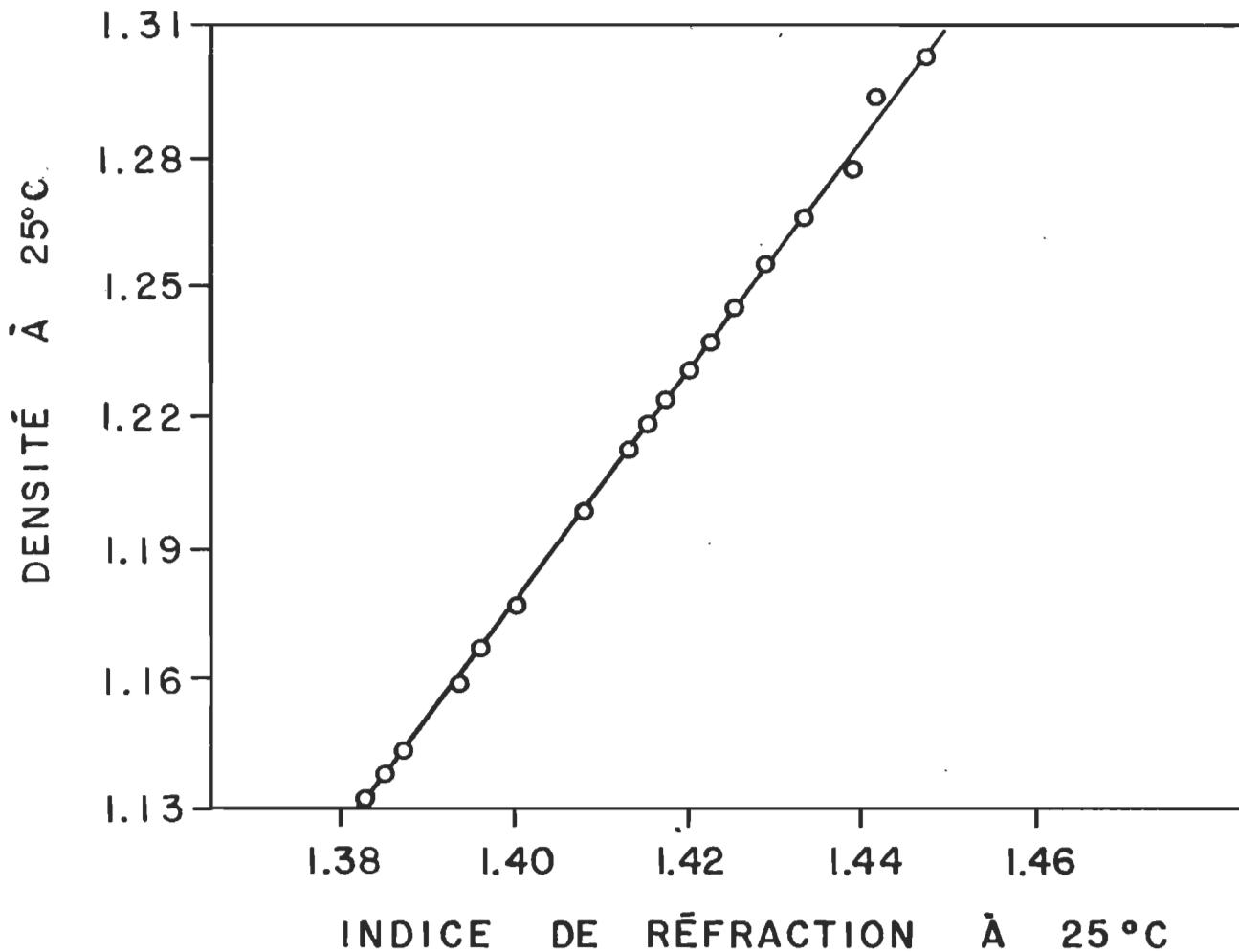


FIGURE 6 : RELATION ENTRE L'INDICE DE REFRACTION ET LA DENSITE A 25°C (SOLUTIONS DE SACCHAROSE)

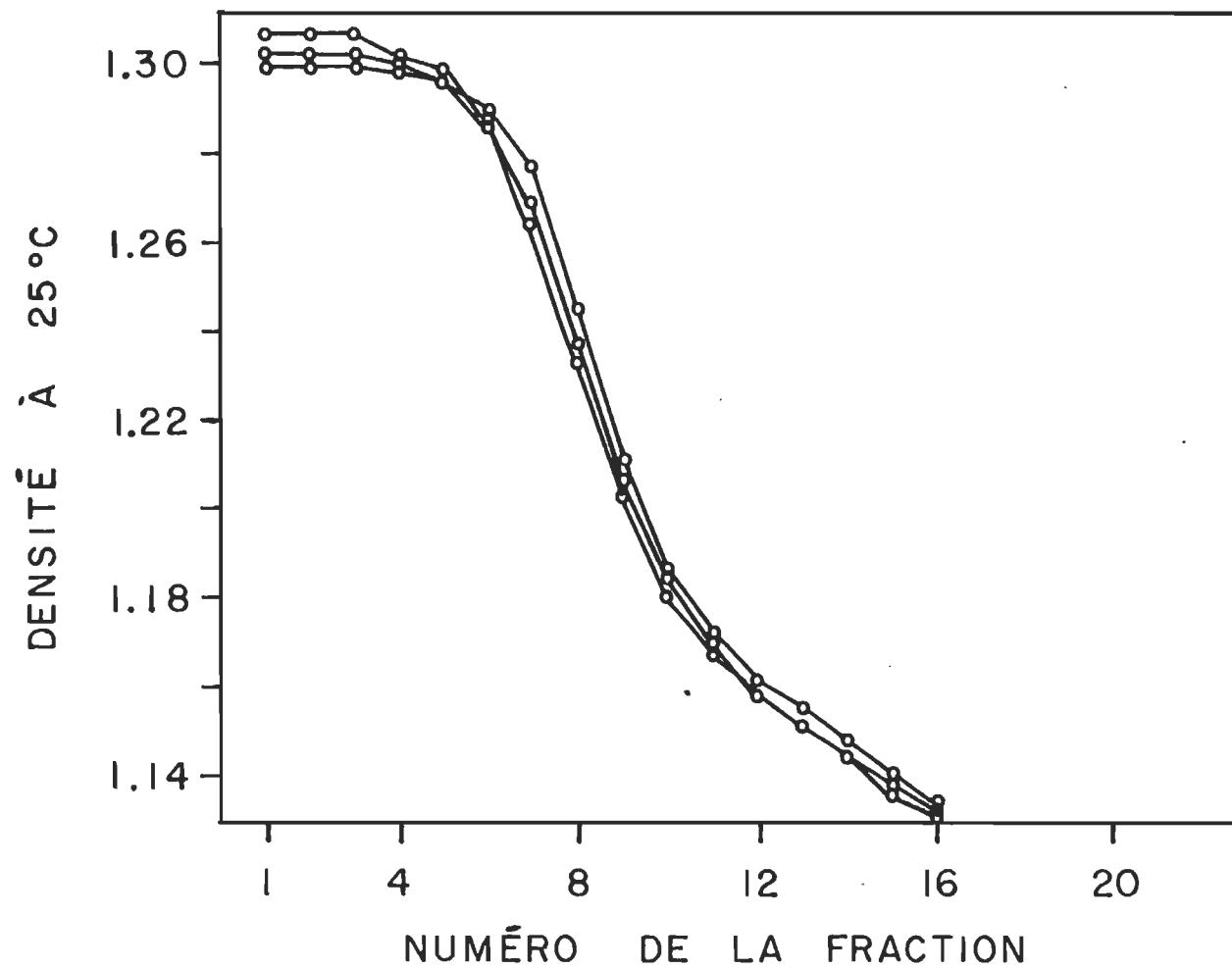


FIGURE 7 : GRAPHIQUE DE LA DENSITÉ À 25°C EN FONCTION DU NUMÉRO DE LA FRACTION, 3 ESSAIS
(GRADIENT CONTINU DE SACCHAROSE)

II.8.4 Profil de la distribution des chloroplastes

Pour savoir comment se distribuent les chloroplastes sur un tel gradient de saccharose 0.5 ml d'une suspension de chloroplastes (200-500 $\mu\text{g/ml}$) est déposée sur le gradient et les tubes sont centrifugés (IEC Modèle B 50) dans un rotor à angle de tube variable (IEC Modèle B 230) à 21 000 rpm pendant 18 minutes.

De nouveau, les tubes sont fractionnés à l'aide d'une aiguille de 20 g en fraction de 25 gouttes (0.3 ml). Chaque fraction est ensuite diluée avec 1 ml de tampon tricine.

L'absorption de la chlorophylle est lue à 680 nm dans une cellule de 1 mm de passage optique à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les chloroplastes déposés sur un tel gradient de saccharose se distribuent dans le milieu selon la figure 8.

Les chloroplastes se séparent en deux bandes majeures; la plus grande correspond à des chloroplastes cassés qui ont une densité de 1.17-1.15 (figure 9).

Le pourcentage de chloroplastes intacts dont la densité est de 1.20-1.22 g/ml (bande la plus petite) peut varier d'une extraction à l'autre (figure 10).

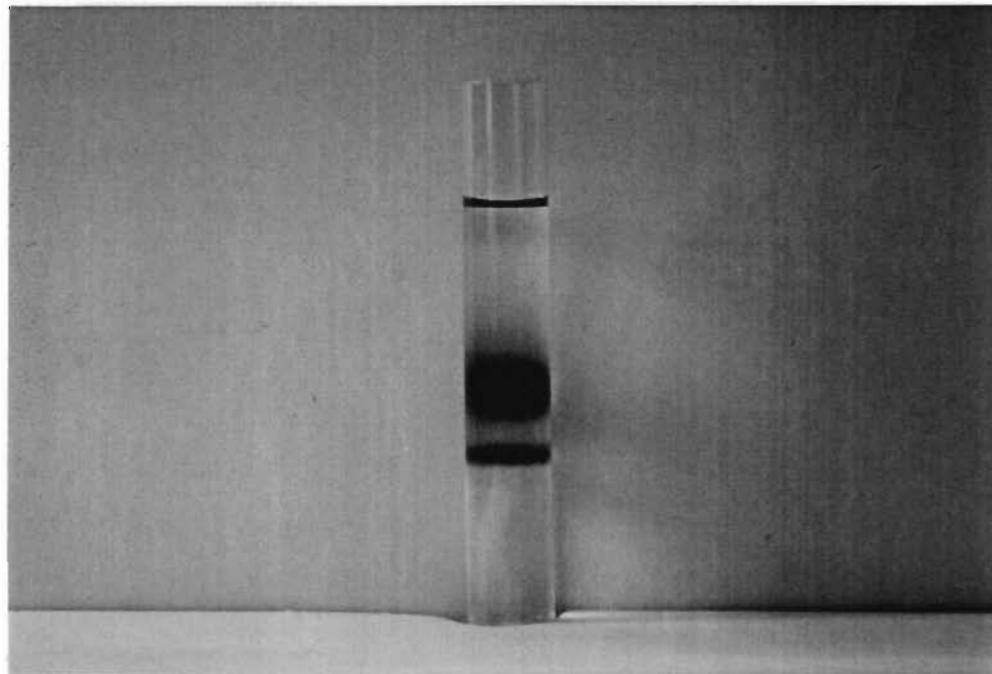


Figure 8

Distribution des chloroplastes dans un gradient de saccharose

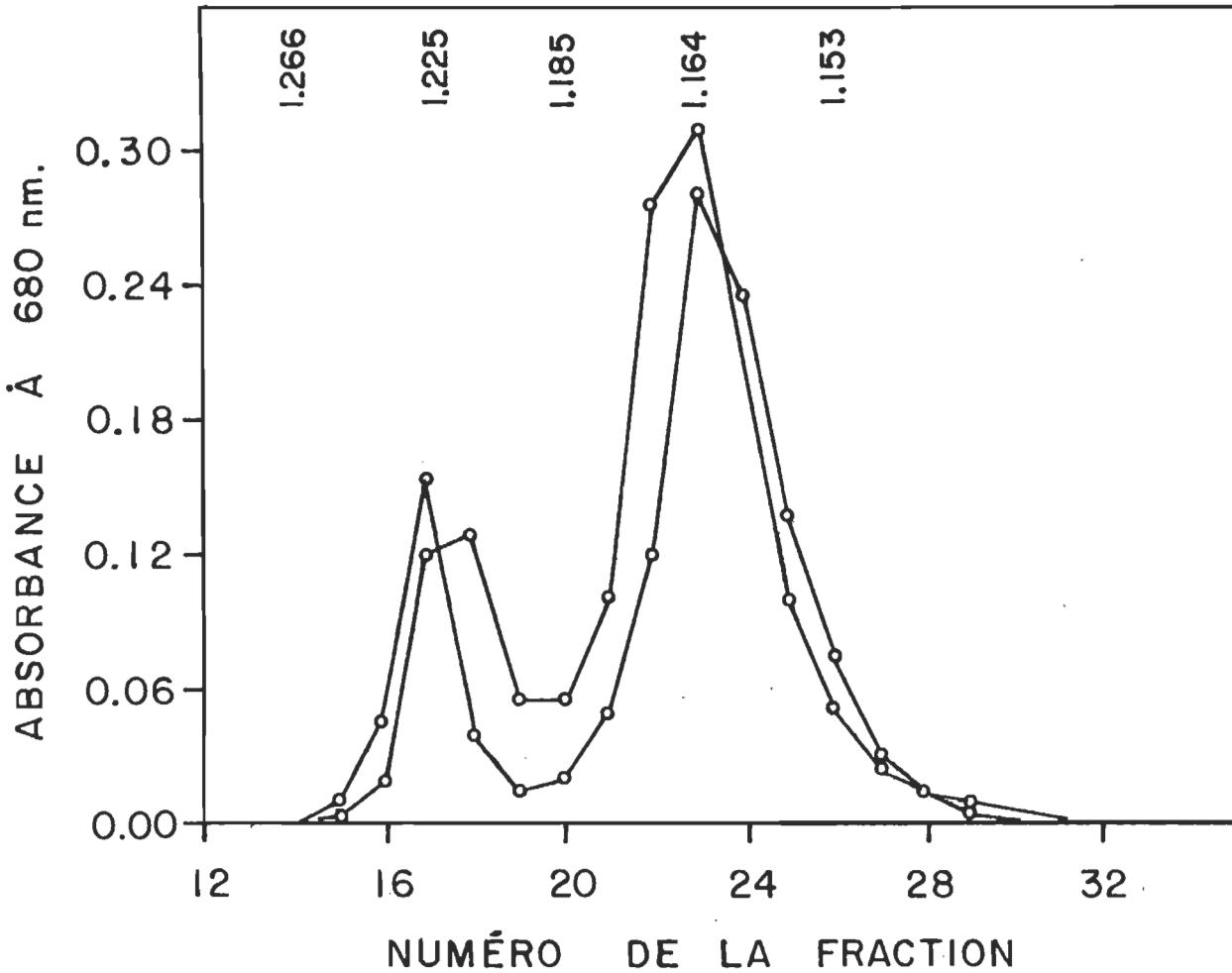


FIGURE 9 : DISTRIBUTION DES CHLOROPLASTES DANS UN GRADIENT DE SACCHAROSE APRES FRACTIONNEMENT
(2 ESSAIS)

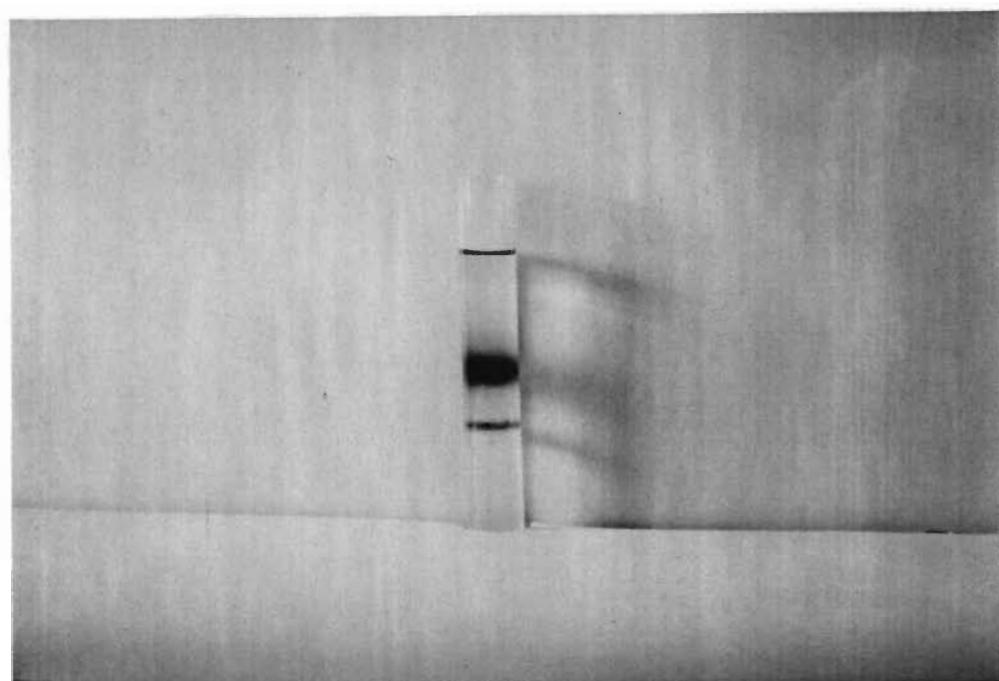


Figure 10

Variation du pourcentage de chloroplastes intacts dans un gradient de saccharose (Cette figure peut être comparée avec la figure 8).

Il semble que ce phénomène dépend principalement de la qualité des feuilles d'épinard. De plus, un broyeur du type polytron et le milieu d'extraction utilisé par Walker (1971) devrait augmenter le rendement des chloroplastes intacts.

Nous n'avons aucune preuve du type de chloroplastes (Classe I où classe II dans la nomenclature de Hall 1972) présents dans chaque bande mais si on se rapporte à des expériences antérieures, on peut comparer les résultats expérimentaux avec d'autres chercheurs.

Leech (1964) sur un gradient discontinu de saccharose dont la composition est montrée dans la figure 11 démontre que les chloroplastes intacts ont une densité de 1.229 et les chloroplastes cassés ont une densité de 1.20.

Lyttleton (1970) également sur un gradient discontinu de saccharose (figure 12) montre que les chloroplastes cassés s'arrêtent à l'interface 1.13-1.17 et que les chloroplastes intacts se situent à l'interface 1.17-1.22.

Rocha et Ting (1970) démontrent que sur un gradient linéaire de saccharose 40-80% (P/V) que les chloroplastes situés dans la fraction dont la densité est 1.17 sont cassés et que ceux situés dans la fraction dont la densité est 1.21 sont intacts.

Bien que les organites photosynthétiques intacts soient séparés des chloroplastes cassés, ils peuvent être contaminés par des mitochondries et d'autres organites.

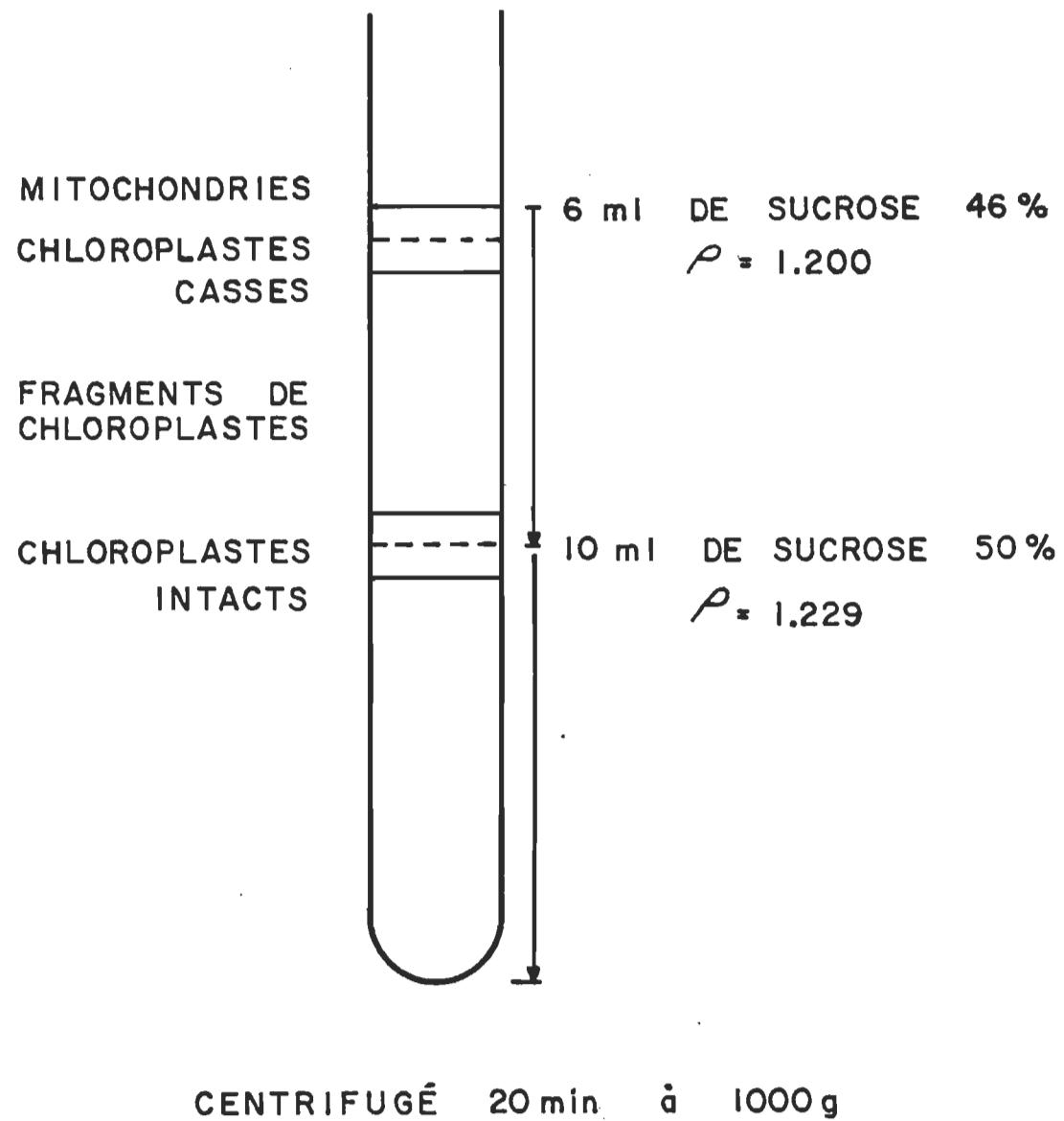


FIGURE 11 : DISTRIBUTION DES CHLOROPLASTES DANS UN GRADIENT DISCONTINU DE SACCHAROSE (SELON LEECH 1964).

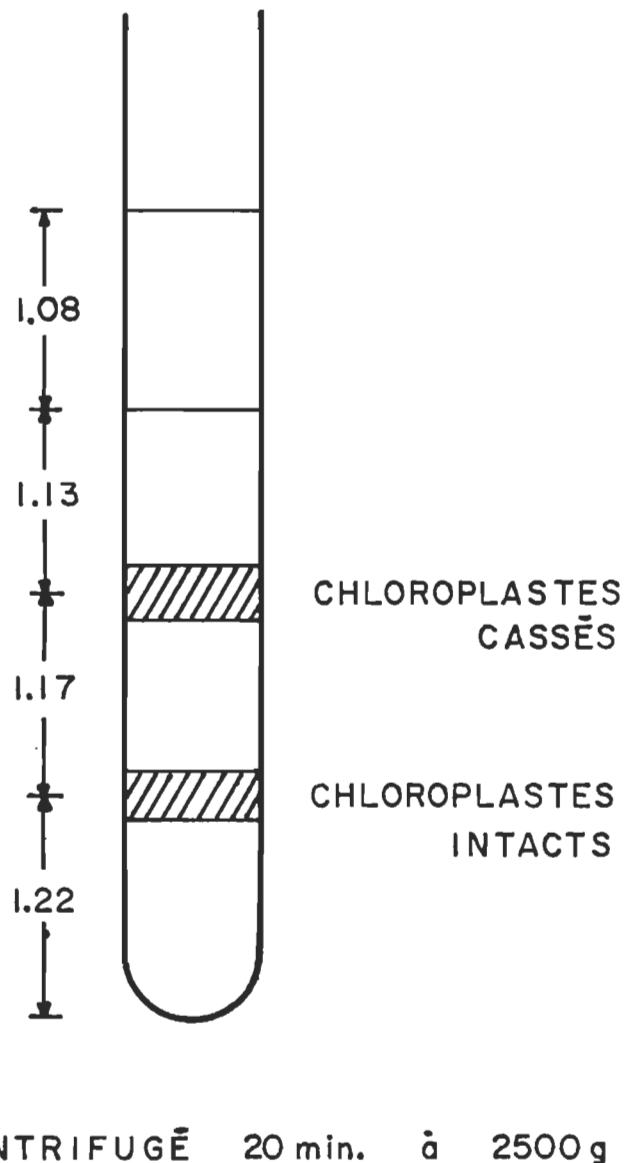


FIGURE 12 : DISTRIBUTION DES CHLOROPLASTES DANS UN GRADIENT DISCONTINU DE SACCHAROSE. (SELON LYTTLETON 1970)

Milfin et Beever (1974) semblent avoir résolu ce problème en utilisant simultanément des portions de gradient de sucre continu et discontinu.

Mais cette opération est très ardue, et nous ne la considérons pas essentielle à l'heure actuelle.

Notre intérêt est d'obtenir des chloroplastes de classe I (Hall 1972) qui démontrent une assez grande activité photosynthétique, et c'est ce qui nous a amené d'ailleurs à utiliser les gradients de "silica sol".

II.9 Séparation des chloroplastes sur gradient continu de Ludox AM

La séparation des chloroplastes par centrifugation sur des gradients de densité aqueux a été démontrée par plusieurs chercheurs (Leech 1964, Still et Price 1967, Lyttleton 1970, Rocha et Ting 1970, Milfin et Beevers 1974) et plusieurs degrés d'intégrité et de pureté ont été obtenus. Bien que plusieurs de ces préparations apparaissent intactes au microscope électronique et bien qu'elles présentent certaines activités enzymatiques, seulement les préparations de Morgenthaler et coll. (1974 et 1975) sur gradient de densité de Ludox AM montrent une activité photosynthétique pleine, i.e. l'émission d'oxygène sous l'action de la lumière lorsque le CO_2 est l'oxydant unique.

Bien que la séparation des chloroplastes sur gradient de sucre semblait satisfaisante, nous nous sommes orientés vers les gradients continus

de Ludox AM principalement pour la raison ci-haut mentionnée.

II.9.1 Préparation des gradients continus de Ludox AM

Le Ludox AM est acheté (E.I. Dupont de Nemours, P.Q.) sous forme de sol avec 40 % (P/V) de SiO₂ et purifié selon la procédure suivante (Morgenthaler 1974): le pH du sol est ajusté à 6.8 par addition lente de la forme hydrogénée d'une résine échangeuse de cation (Biorad A G 50w XB, 100-200 mesh); lorsque la résine eut été enlevée par filtration à travers de la gaze, 25 g/l de charbon activé est ajouté et le mélange est brassé toute la nuit. Le charbon est ensuite enlevé par des filtrations successives sur de la gaze, puis sur un bain humide de "terre diatomée" (Sigma grade I), préparé sur la surface d'un filtre de fibre de verre (Gelman Type E) qui lui est déposé sur un verre fritté grossier; finalement le sol est filtré sur un papier filtre (Whatman no 5) dans un entonnoir Buckner.

Gradients linéaires de Ludox

Quatre gradients standards soit 1.05g de polyéthylèneglycol (PEG 6000, Canlab, P.Q.), 0.35 g de serum albumine bovine (BSA Sigma, Mo) et 0.35 g de Ficoll (Pharmacia, P.Q.) sont mélangés dans 35 ml de Ludox AM purifié. La densité de la solution finale est de 1.22 g/ml à 23° C. Les solutions de départ et finale des gradients contiennent 0.5 et 4.5 ml respectivement du mélange Ludox/PEG/BSA/Ficoll dans un volume global de 5.5 ml. Les solutions de départ et finale contiennent de plus, les mêmes solutés que le milieu de resuspension et 1 mg de GSH/35 ml. La concentration des ingrédients du milieu de resuspension est donc constante sur toute la longueur du

tube à centrifuger mais il y a un gradient en Ludox/PEG, BSA/Ficoll. Des gradients linéaires de 11 ml chacun sont générés dans des tubes à centrifuger de nitrate de cellulose de 13 x 95 mm (Beckman, P.Q.) à l'aide d'un appareil déjà décrit par Oster (1964).

II.9.2 Centrifugation isopycnique des chloroplastes

Un aliquot de 0.5 ml de chloroplastes bruts est déposé sur le lit du gradient de Ludox et centrifugé (IEC Modèle B 50) dans un rotor à angle de tube variable (IEC Modèle B 230) à 7 000 rpm pendant 15 min. L'accélération maximum de centrifugation est 8,000 g.

II.9.3 Fractionnement et profil des gradients continus de Ludox AM

Pour enregistrer le profil des gradients de 11 ml, les tubes sont percés avec une aiguille de 20 g et des fractions de 50 gouttes sont collectées (0.6 ml). La courbe du profil du gradient nous est donnée en suivant l'indice de réfraction (à l'aide d'un réfractomètre d'Abbé) à 23°C (Fig.13). La densité (figure 15) de chaque fraction nous est donnée en convertissant les valeurs de l'indice de réfraction par une courbe standard (Figure 14). Cette courbe est une relation entre l'indice de réfraction et la densité à 23°C pour diverses solutions de Ludox/PEG/BSA/Ficoll.

La figure 15 nous montre que le profil du gradient est linéaire.

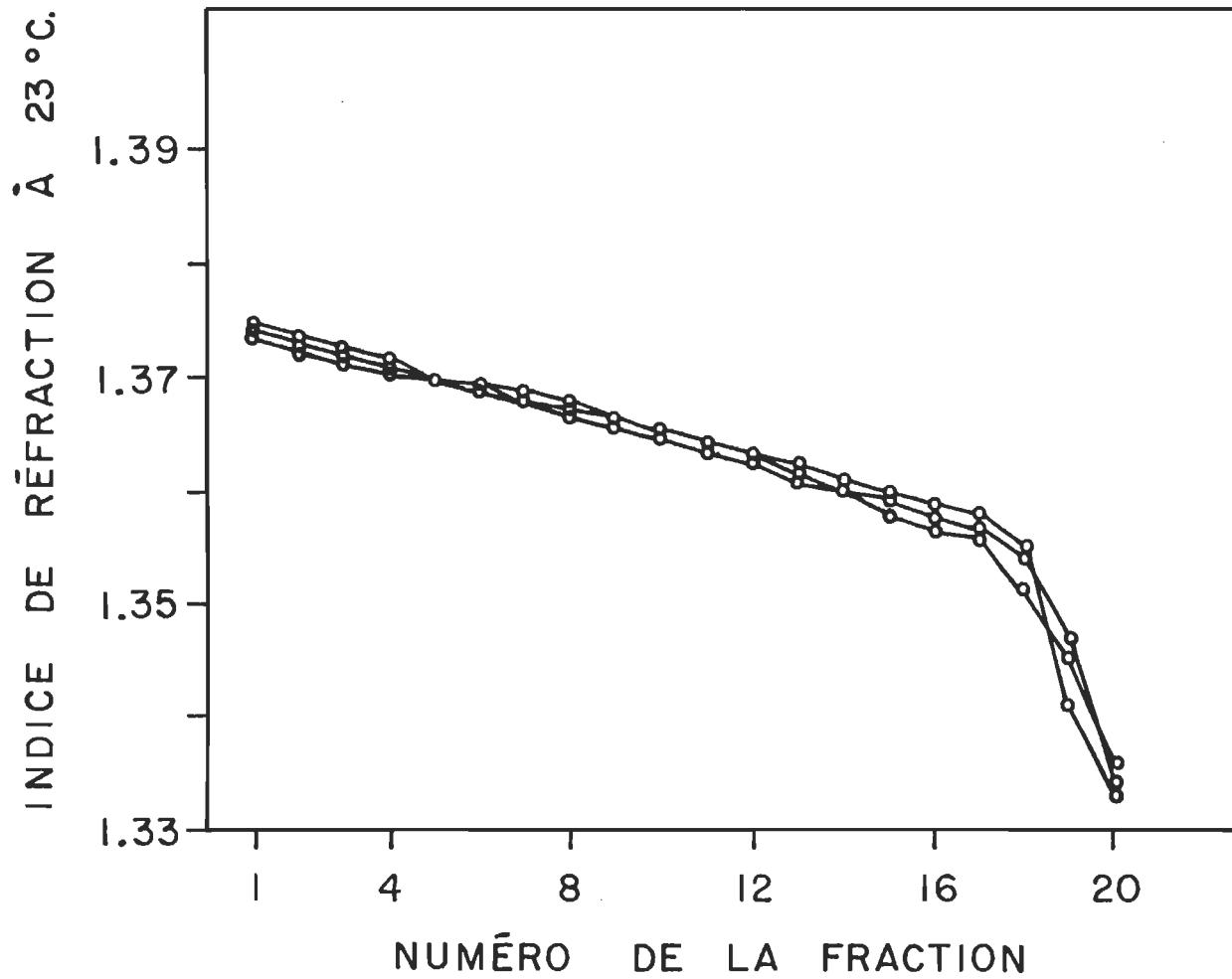


FIGURE 13 : GRAPHIQUE DE L'INDICE DE REFRACTION A 23°C EN FONCTION DU NUMERO DE LA FRACTION, 3 ESSAIS (GRADIENT CONTINU DE LUDOX)

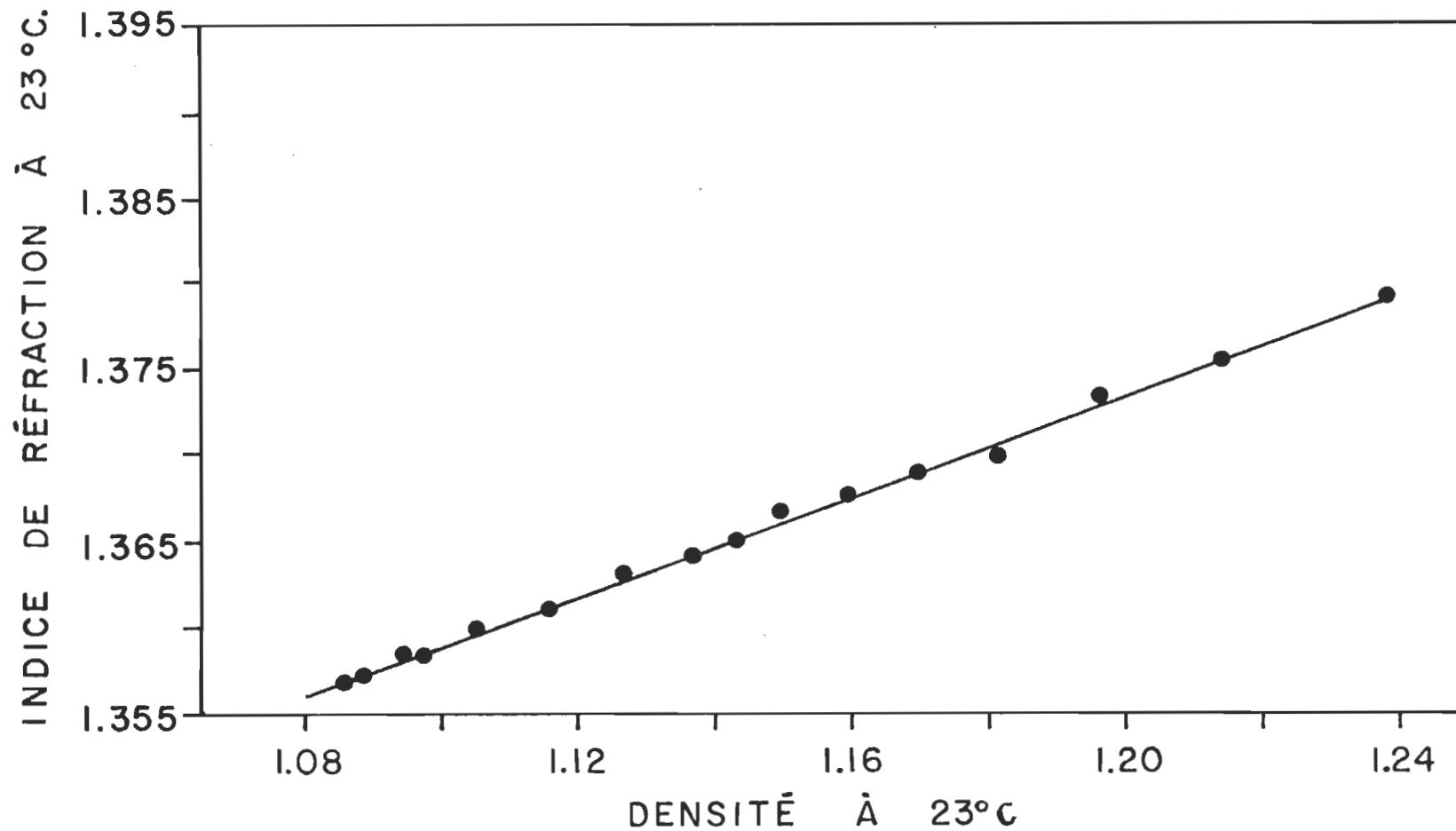


FIGURE 14 : RELATION ENTRE L'INDICE DE REFRACTION ET LA DENSITÉ À 23°C
(SOLUTION LUDOX)

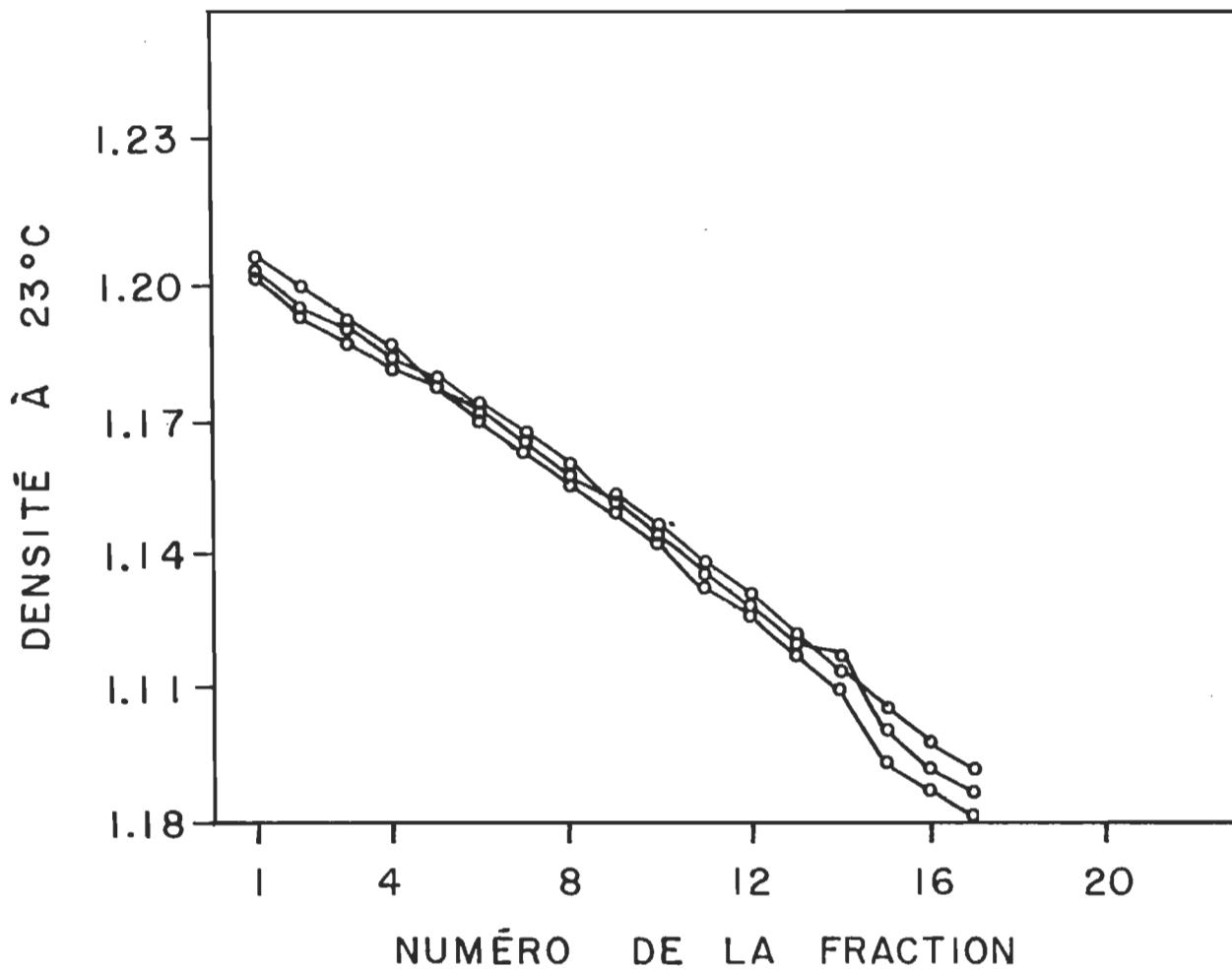


FIGURE 15 : GRAPHIQUE DE LA DENSITE A 23°C EN FONCTION DU NUMERO DE LA FRACTION, 3 ESSAIS (GRADIENT CONTINU DE LUDOX)

II.9.4 Profil de la distribution des chloroplastes

Pour enregistrer le profil de la distribution des chloroplastes de nouveau les tubes sont percés avec une aiguille de 20 g et des fractions de 25 gouttes (0.3 ml) sont collectées. Elles sont ensuite diluées avec 1 ml de tampon de resuspension. La courbe de la distribution des chloroplastes nous est donnée en suivant l'absorbance à 680 nm dans une cellule dont le trajet est de 1 mm (figure 16).

La figure 16 nous indique en ordonnée l'absorbance de la chlorophylle à 680 nm en fonction du numéro de la fraction. A première vue deux classes de chloroplastes sont séparées sur le gradient: une première dont la densité des chloroplastes est de 1.15 et une seconde dont la densité est de 1.12.

Par microscopie électronique, les chloroplastes dont la densité est de 1.15 correspondent à des chloroplastes intacts (figure 17) c'est-à-dire, des chloroplastes qui ont conservé leur membrane et leur stroma (classe I) et ceux dont la densité est de 1.12 correspondent à des chloroplastes cassés (figure 18).

Ce type de gradient nous occasionne un sérieux problème, soit la reproductibilité des résultats. Régulièrement il est impossible de séparer le chloroplastes en deux bandes parfaitement distinctes. Il nous est possible de déterminer la ou les causes de cette irrégularité.

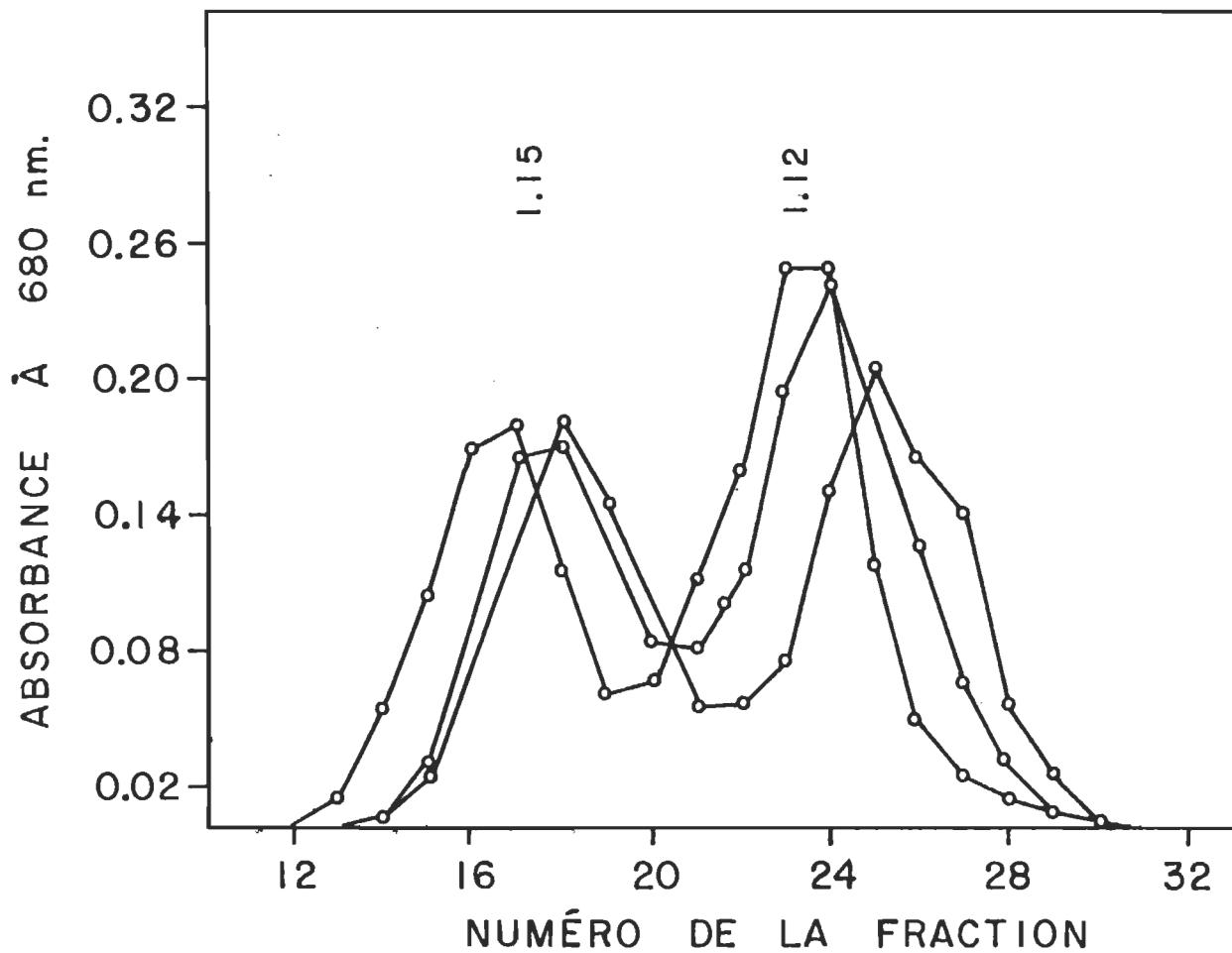


FIGURE 16 : PROFIL DE LA DISTRIBUTION DES CHLOROPLASTES DANS UN GRADIENT CONTINU DE LUDOX APRES FRACTIONNEMENT (3 ESSAIS)

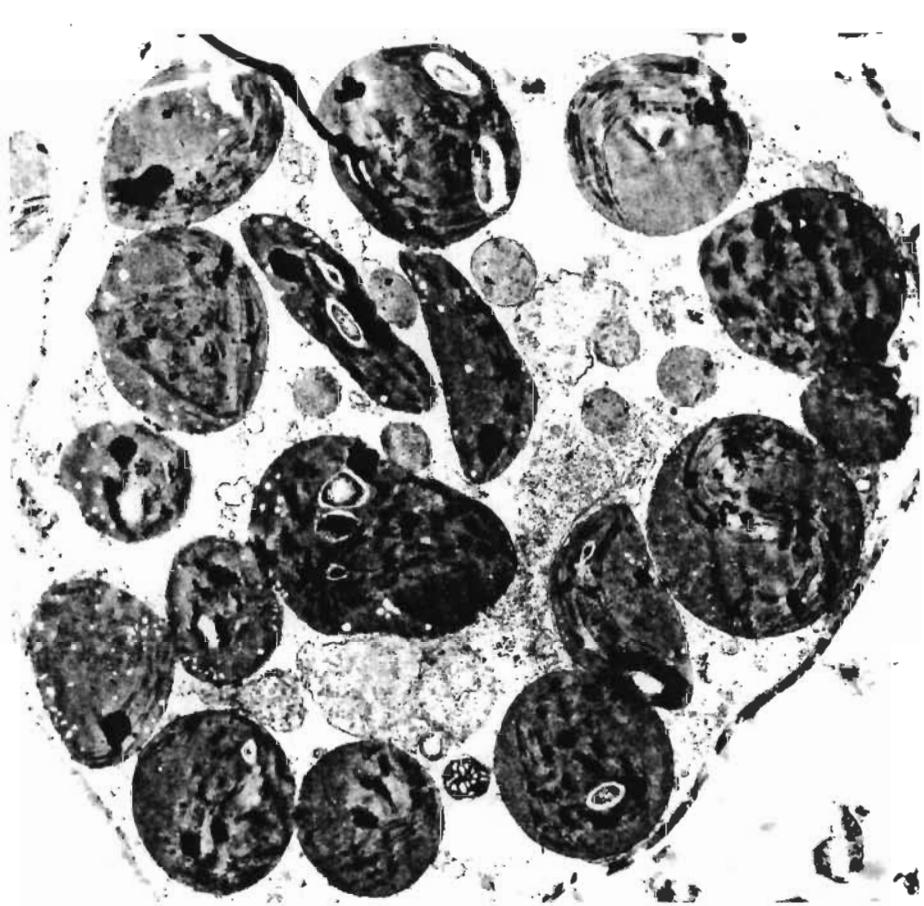


Figure 17

Chloroplastes intacts séparés sur gradient continu de Ludox
($d = 1.15$; 6825 X).

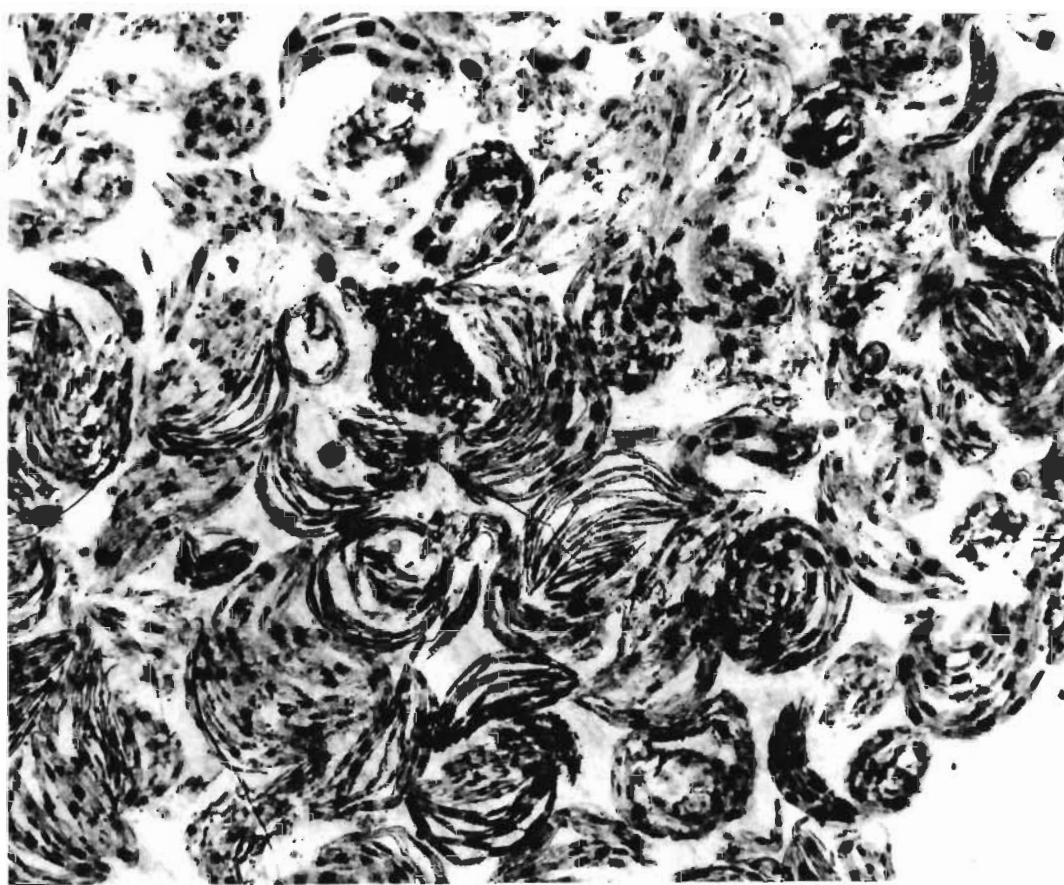


Figure 18

Chloroplastes cassés séparés sur gradient continu de Ludox
($d = 1.12$; 4220 X).

Comme nous avions besoin d'une séparation plus efficace, nous avons délaissé cette méthode pour tenter d'obtenir de meilleurs résultats avec des gradients discontinus de Ludox.

II.10 Séparation des chloroplastes sur gradient continu de Ludox AM

L'utilisation de la silice colloïdale pour la fabrication de gradients discontinus connut du succès avec Lyttleton (1970).

Les chloroplastes séparés sur ce type de gradient n'avaient pas leur pleine activité photosynthétique. Mais la purification de Ludox, l'utilisation de la BSA et du PEG ont amélioré la situation.

Ainsi nous pensons que l'utilisation des quatre substances, soit le Ludox, PEG, BSA et Ficoll sur gradient continu devrait assurer la pleine activité photosynthétique aux chloroplastes.

D'autre part Lyttleton (1970) avoue qu'il avait de meilleurs rendements de séparation sur gradient continu de Ludox que sur gradient continu.

II.10.1 Préparation des gradients discontinus de Ludox AM

De nouveaux, les 4 standards pour gradients sont utilisés dans les proportions suivantes: 1.05 g PEG, 0.35 g Ficoll et 0.35 g BSA sont dissous dans 35 ml de Ludox AM purifié. Puis 4 solutions de différentes

densités sont préparées en ajoutant différentes portions de tampon de resuspension.

Les couches de densités différentes sont déposées successivement à l'aide d'une pipette Pasteur.

II.10.2 Fractionnement et profil des gradients discontinus de Ludox AM

Pour analyser le profil de ce type de gradient, 0.5 ml d'eau distillée est déposée sur le lit du gradient et le tube est centrifugé à 7 000 rpm pendant 12 min.

Puis le tube est percé à l'aide d'une aiguille de 20 g et séparé en fraction de 50 gouttes (0.6 ml) et on prend les mesures de l'indice de réfraction à l'aide d'un réfractomètre d'Abbé.

Le profil d'un gradient continu de Ludox est montré dans la figure 19 où l'indice de réfraction à 24°C est représenté en ordonnée et le numéro de la fraction en abscisse.

• Les valeurs d'indice de réfraction sont converties en densité à l'aide de la figure 14.

La figure 20 nous donne la densité correspondante de chaque fraction.

On observe qu'il est très facile de reproduire le gradient d'un essai à l'autre, bien que les couches de différentes densités se mêlent

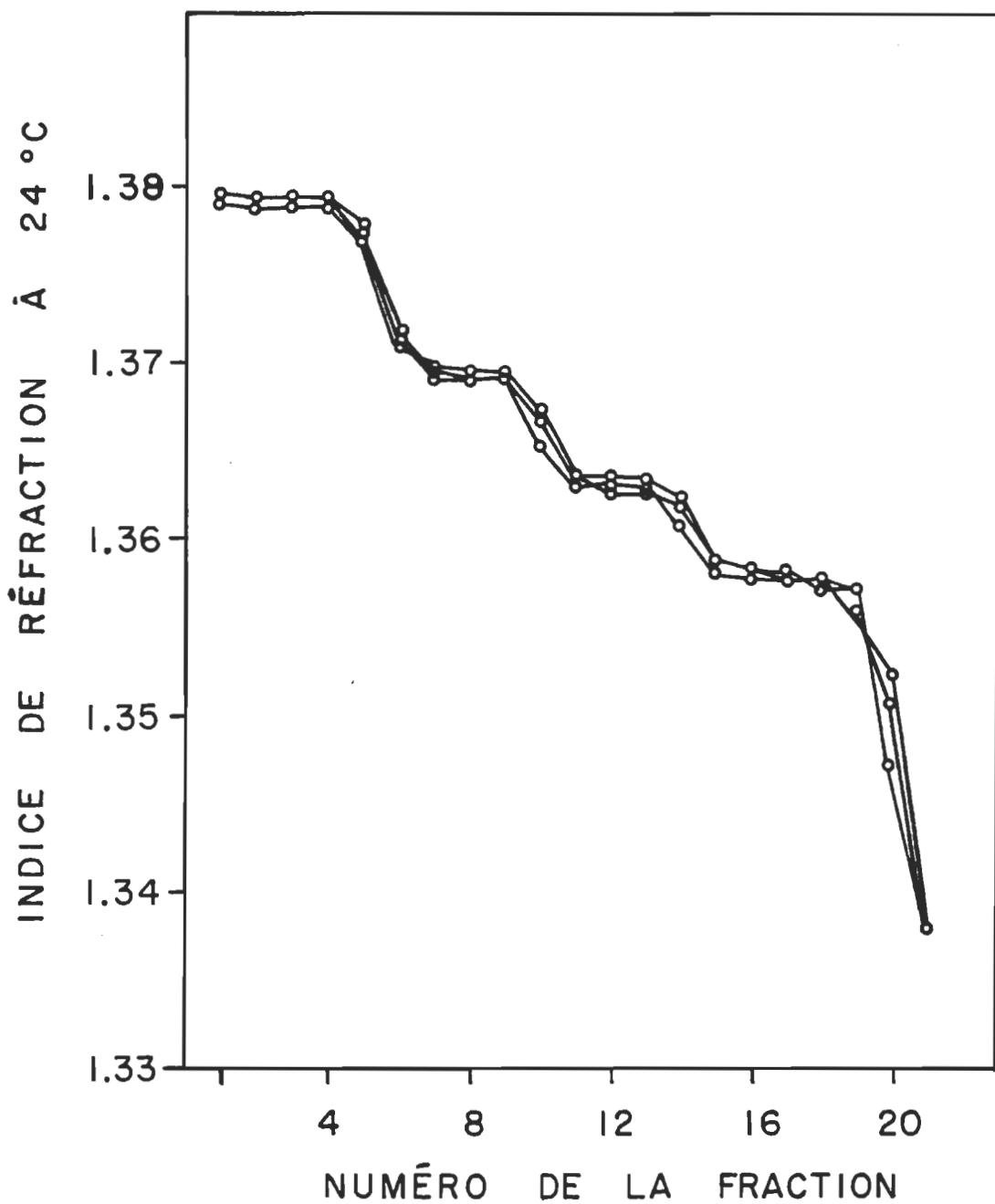


FIGURE 19 : GRAPHIQUE DE L'INDICE DE REFRACTION EN FONCTION DU NUMERO DE LA FRACTION, 3 ESSAIS (GRADIENT DISCONTINU DE LUDOX)

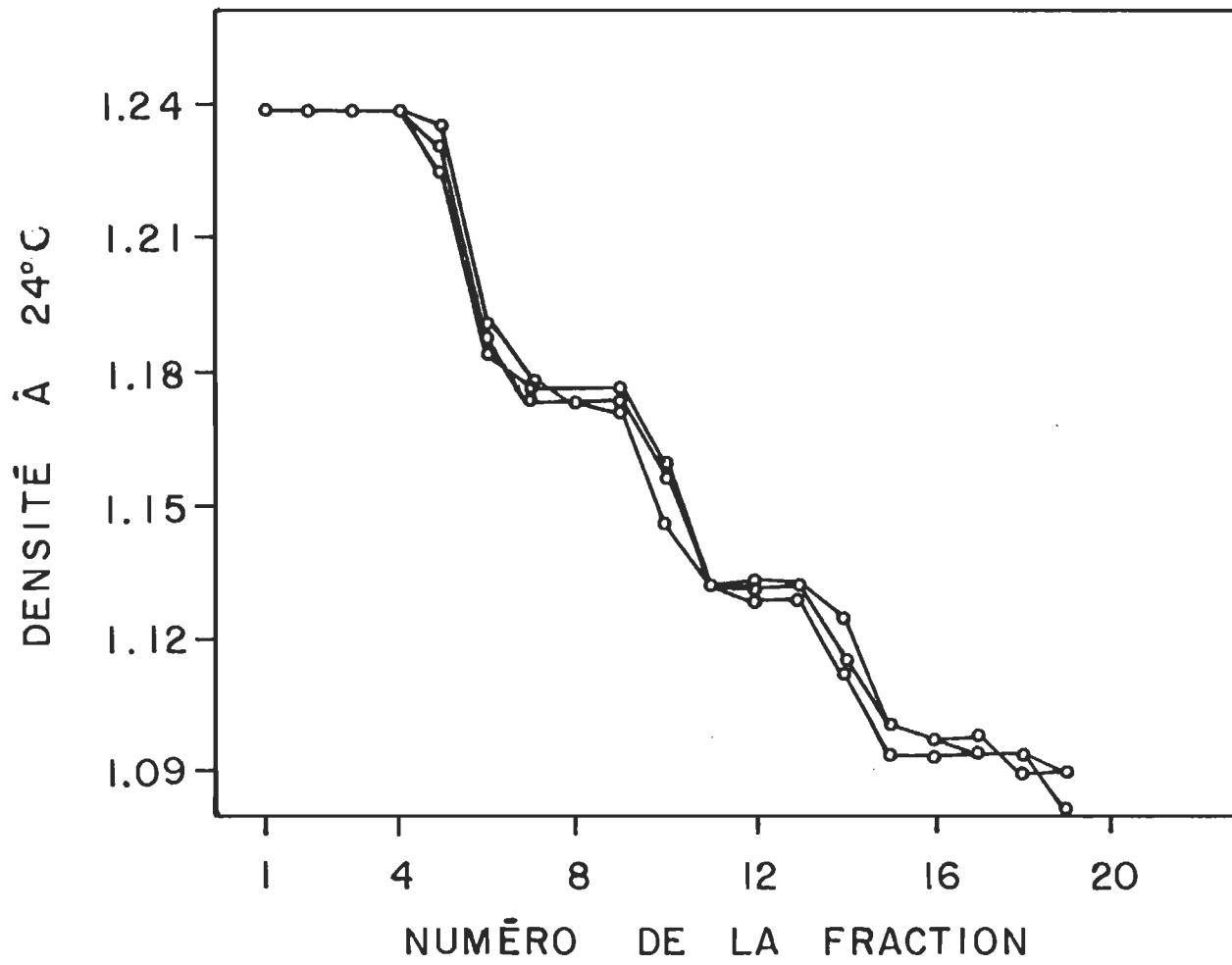


FIGURE 20 : GRAPHIQUE DE LA DENSITE A 24°C EN FONCTION DU NUMERO DE LA FRACTION , 3 ESSAIS
(GRADIENT DISCONTINU DE LUDOX)

un peu lors de leur déposition successive.

II.10.3 Profil de la distribution des chloroplastes

Les quantités de chlorophylle déposées, la centrifugation des gradients et le fractionnement des gradients sont effectués comme aux paragraphes II.9.2 et II.9.4 (page 105 et 109 respectivement).

Les chloroplastes déposés sur gradient discontinu de Ludox se distribuent dans le milieu tel que présenté à la figure 21.

Ils se séparent en deux bandes majeures; la bande inférieure correspond à des chloroplastes qui ont une densité de 1.15 et la bande supérieure à des chloroplastes qui ont une densité de 1.12 (figure 22). Une très petite bande apparaît également à une densité de 1.09. Nous en avons ignoré son contenu.

Le pourcentage de chloroplastes dont la densité est de 1.15 peut varier considérablement d'une extraction à l'autre comme le montre la figure 21; le tube de gauche correspond à une extraction qui avait été faite le matin. Le tube de droite à une extraction qui avait été faite l'après-midi. De plus le lot d'épinard utilisé n'est pas le même dans les deux cas.

Une bande de très faible intensité (figure 23) localisée à une densité de 1.20-1.21 g/ml. apparaît quelque fois dans le gradient. Nous n'avons pas insisté davantage sur le contenu de cette bande.

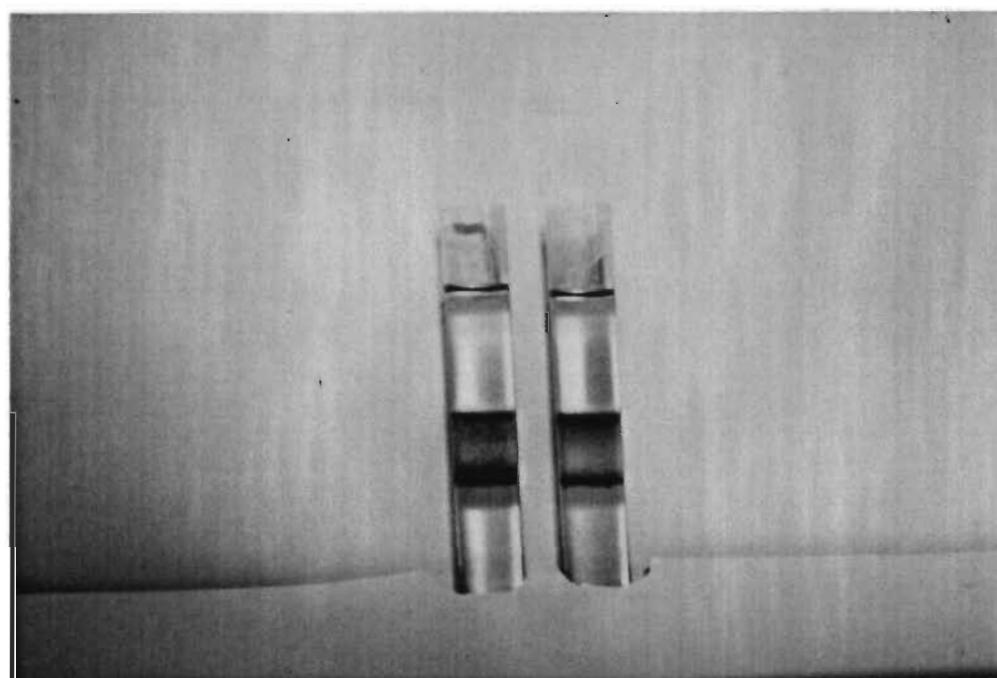


Figure 21

Profil de la distribution des chloroplastes dans un gradient discontinu de Ludox

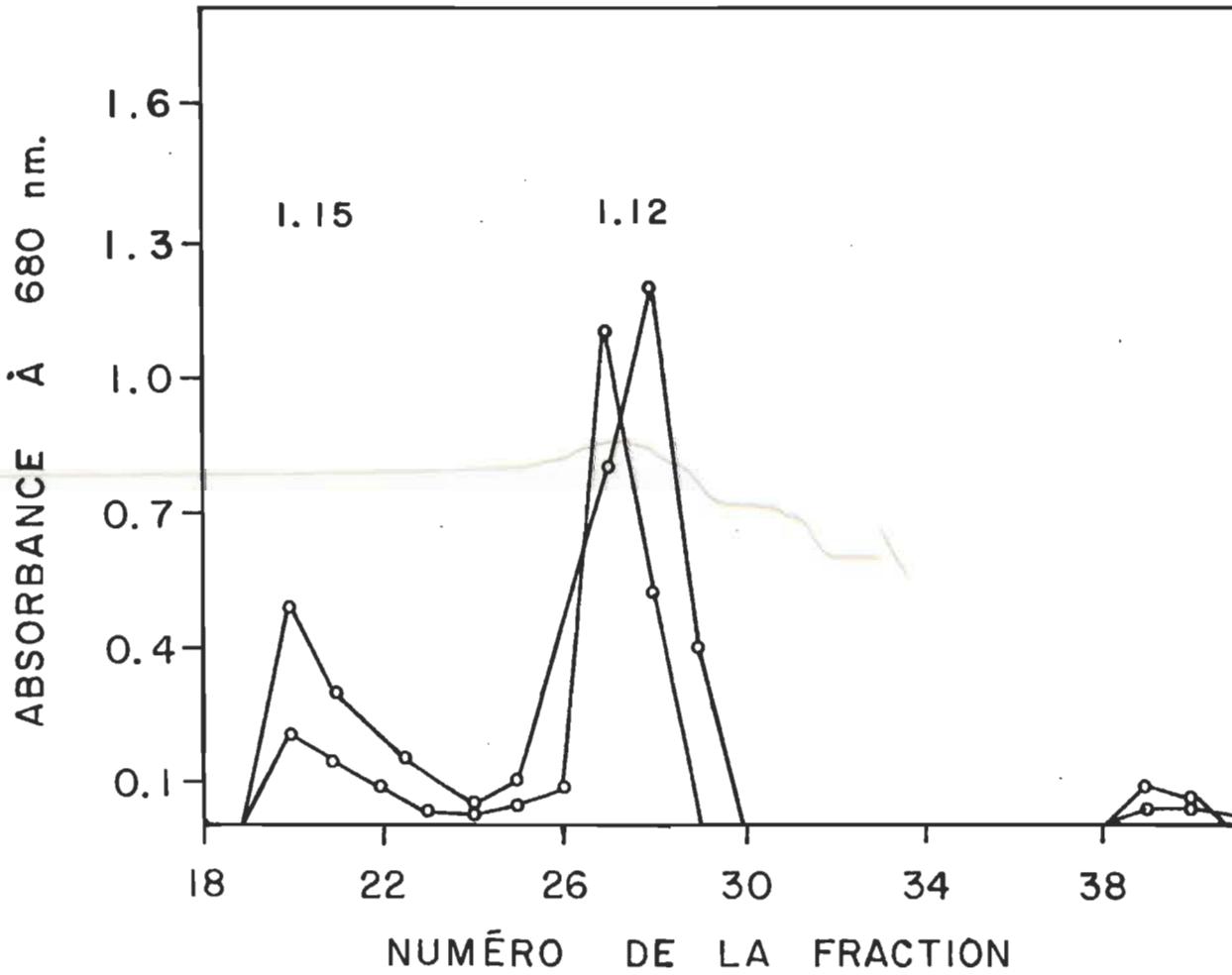


FIGURE 22 : PROFIL DE LA DISTRIBUTION DES CHLOROPLASTES DANS UN GRADIENT DE LUDOX APRES FRACTIONNEMENT (2 ESSAIS)

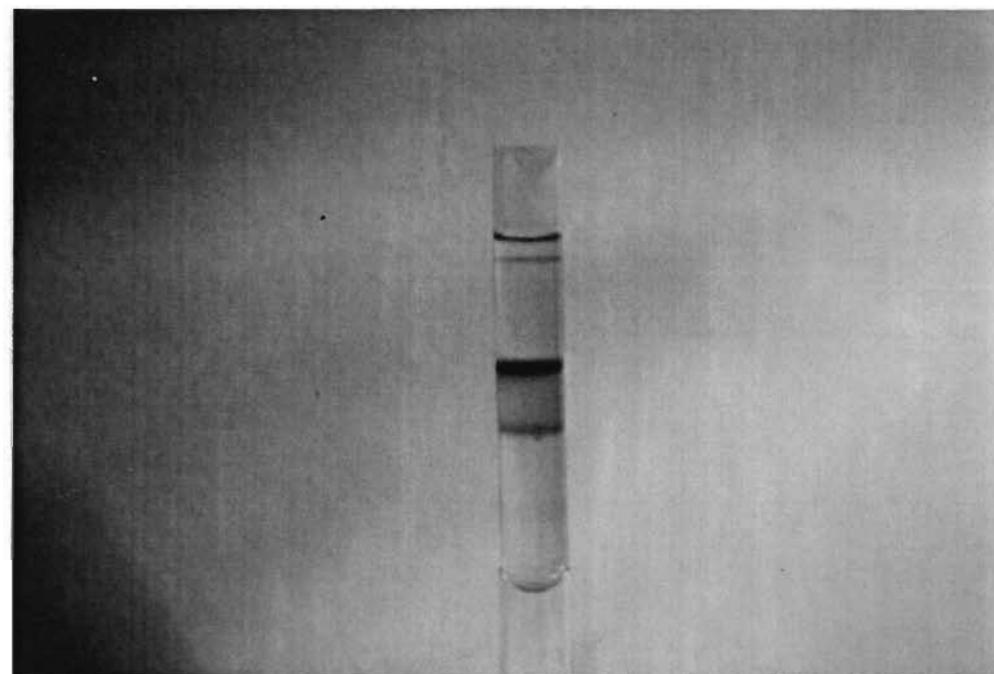


Figure 23

Profil de la distribution des chloroplastes dans un gradient discontinu de Ludox montrant difficilement la bande à une densité de 1.20-1.21

Au microscope électronique, les chloroplastes dont la densité est de 1.15 apparaissent intacts en plus grande majorité (Figure 24).

La bande dont la densité est 1.12 est une population mixte de chloroplastes i.e., des chloroplastes cassés et des chloroplastes intacts (Figure 25).

Les techniques de séparation des chloroplastes sur gradient de densité ne permettent pas d'obtenir régulièrement un rendement d'intégrité de l'ordre de 90% et plus.

Tout récemment par contre, Nakatani et Barber (1977) auraient mis au point une méthode très simple qui permettrait d'obtenir des rendements de chloroplastes intacts de l'ordre de 100%.

Le système intact est d'une grande importance si on veut relier les phénomènes observés aux thylakoides et au stroma.

II.11 Mesure de l'intégrité des chloroplastes par la réaction de Hill

La microscopie électronique est une excellente méthode pour évaluer le pourcentage de chloroplastes intacts dans une suspension, mais cette technique est longue et pénible.

La réaction de Hill est une méthode assez simple qui peut nous permettre d'évaluer le pourcentage de chloroplastes intacts dans une suspension avec un bon degré de précision.

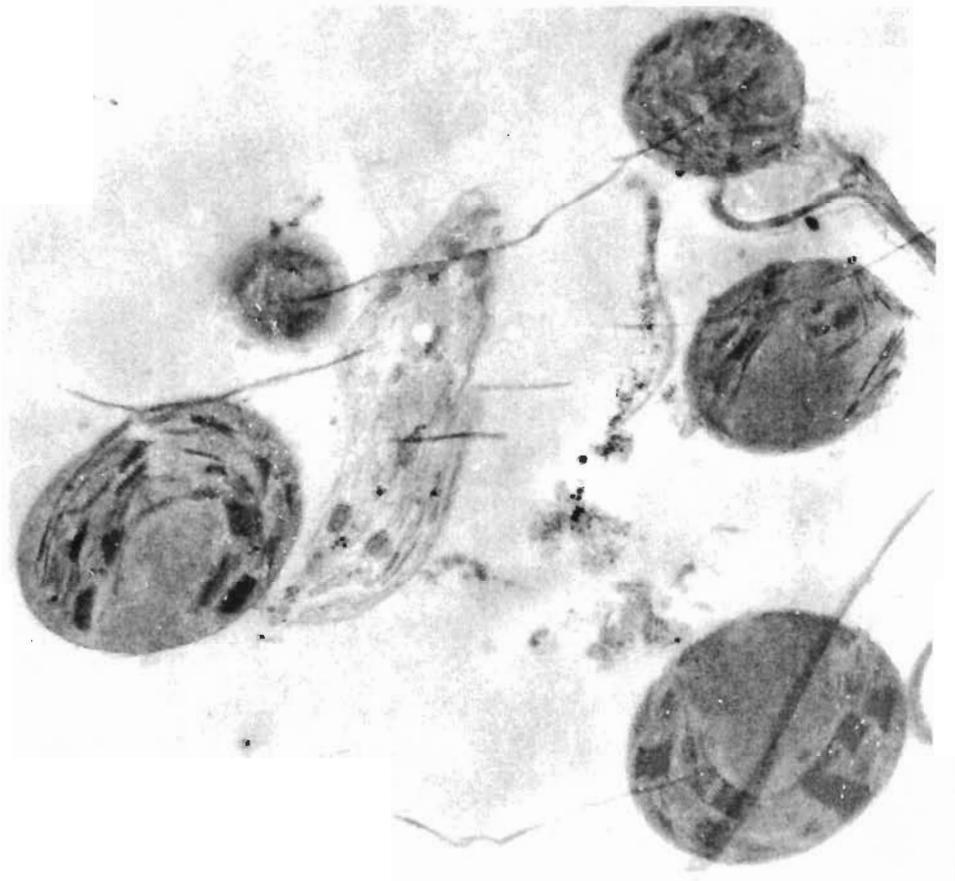


Figure 24

Chloroplastes intacts séparés sur gradient discontinu de Ludox (9750 X).

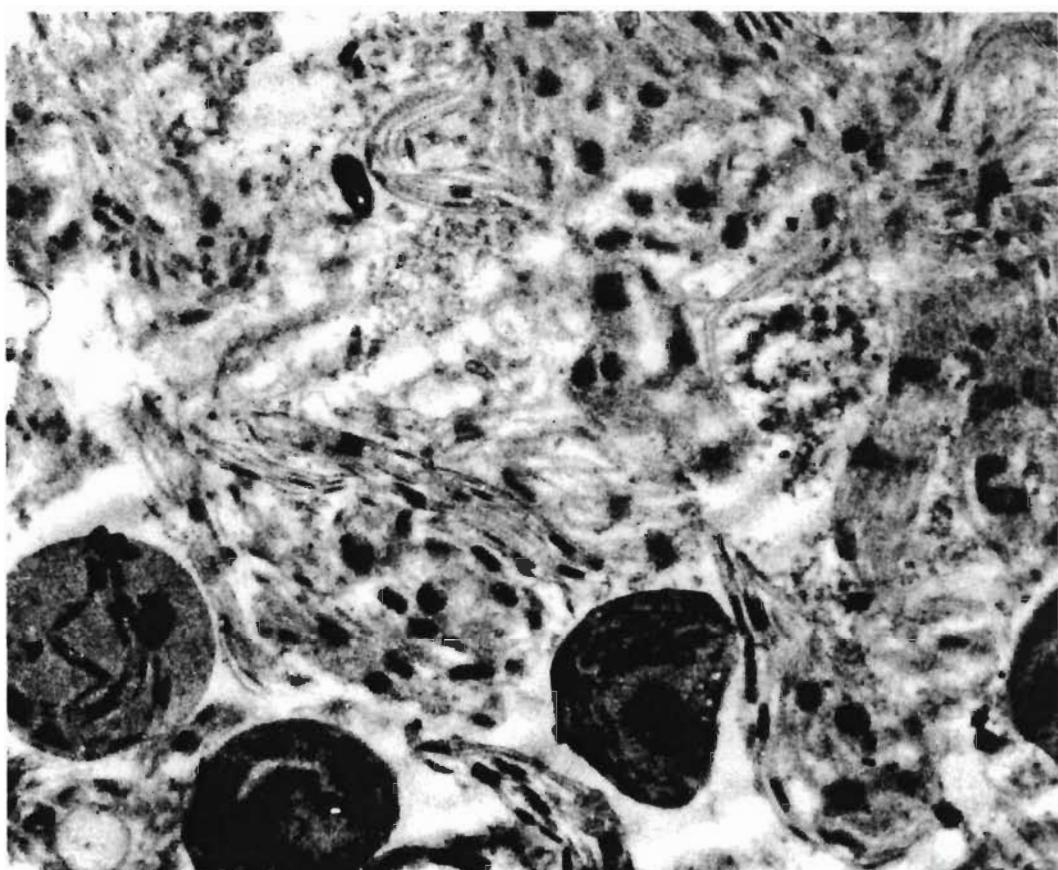


Figure 25

Chloroplastes cassés et intacts séparés sur gradient discontinu de Ludox (8225 X).

II.11.1 Principe de la réaction

L'estimation de la proportion de chloroplastes intacts est liée à la vitesse d'une réaction avant et après un choc osmotique (Heber et Santarius 1970) qui sera suffisant pour briser tous les chloroplastes intacts déjà présents dans la préparation. L'essai sur l'intégrité du chloroplaste peut être basé sur les réactions où un composé ne traverse pas rapidement la membrane du chloroplaste. Parmi ces composés que l'on croit réagir seulement avec les chloroplastes brisés il faut inclure le NADP, une nucléotide adénylique (Herber 1974) et l'oxydant de Hill soit le ferricyanure (Cockburn et Coll 1967, Mcc. Lilley et Coll 1975).

La réaction de Hill est mesurée en enregistrant la variation de voltage (c'est-à-dire le changement d'absorbance) engendrée lors de la réduction du ferricyanure par le chloroplaste.

Le calcul du pourcentage de chloroplastes non cassés peut s'effectuer de la façon suivante:

$$\frac{\frac{\Delta'mV_1}{t_1} - \frac{\Delta'mV_0}{t_0}}{\frac{\Delta''mV_1}{t_1} - \frac{\Delta''mV_0}{t_0}} \times 100$$

où $\Delta'mV_0$, est la variation de voltage lorsque la lumière rouge est éteinte et avant le choc osmotique. Cette valeur est zéro.

$\Delta'mV_1$, est la variation du voltage lorsque la lumière rouge est allumée, avant le choc osmotique.

$\Delta''mV_0$ est la variation de voltage lorsque la lumière rouge est éteinte après un choc osmotique. Cette valeur est zéro.

$\Delta' \text{mV}$, est la variation de voltage lorsque la lumière rouge est allumée après un choc osmotique.

t_0 est le temps lorsque $t = 0$

t_1 est le temps lorsque $t = \text{à min. ou à sec.}$

Si on donne des valeurs à $\Delta' \text{mV}_1$ et $\Delta' \text{mV}_2$, l'activité de Hill sera donc

$$\text{Activité} = \frac{\frac{29}{5} - \frac{0}{0}}{\frac{39}{5} - \frac{0}{0}} \times 100 = 74.4 \%$$

et le pourcentage de chloroplastes intacts sera

$$\% \text{ d'intégrité} = 100 - 74.4 = 25.6 \%$$

II.11.2 Procédure

Un certain volume d'une suspension de chloroplastes bruts ou un certain volume de chloroplastes obtenus sur gradient de densité est déposé avec précaution dans le fond d'une cuvette spectrophotométrique (10 mm de parcours optique).

Les chloroplastes séparés sur gradient discontinu et dont la densité est de 1.15 ont été préalablement centrifugés (Sorval RC-3, Rotor Hg-4) à 1 000 g puis remis en suspension dans le tampon de resuspension.

Aux chloroplastes déposés dans la cuvette, on ajoute 3 ml d'une solution ayant la composition suivante: il s'agit du milieu de base qui a servi à l'extraction des chloroplastes (voir page 79) dans lequel on dissout

l'oxydant de Hill soit 15 mM de $K_3 Fe(CN)_6$, ensuite 10 mM de D,L-glycéraldéhyde et 5 μ mole/mol de NH_4Cl . Ce milieu est brassé avec une grande précaution et la réduction du $Fe (Cn)_6^{-3}$ est suivie à 410 nm avec le système déjà décrit (voir section II.1.3, page 46). Un tracé de base, lorsque la source d'irradiation est éteinte, est accompli; si le tracé est linéaire la source d'irradiation est allumée pendant quelques minutes et la réaction de Hill débute. Puis la source est éteinte et nous recommandons la réaction avec une suspension de chloroplastes ayant subis un choc osmotique.

De nouveau, le même volume de chloroplastes que pour la réaction de Hill sans choc osmotique est déposé dans le fond de la cuvette, 1.5 ml du milieu d'éclatement sont ajoutés aux chloroplastes. Le milieu d'éclatement a la composition suivante (Joyard et Douce 1976): de l'eau fraîchement distillée auquelle on ajoute 10 mM de tricine pH 7.5 et 4 mM de $Mg Cl_2$. L'osmolarité obtenue étant très faible, l'eau pénètre massivement par osmose dans le chloroplaste. L'enveloppe ne pouvant supporter l'augmentation de la pression qui en résulte, éclate et les protéines du stroma se répandent dans le milieu.

Après avoir baigné environ une minute dans le milieu d'éclatement, la pression osmotique est réajustée avec 1.5 ml du réactif de Hill dont la composition des réactifs est la même que déjà mentionnée (à l'exception du D,L-glycéraldéhyde qui n'est pas ajouté) mais dont la concentration

des réactifs est doublée.

De nouveau la réaction de Hill est suivie en continu pendant quelques minutes.

II.11.3 Précision de la méthode

Le système tel que décrit précédemment semble démontrer assez de précision dans la mesure de l'intégrité des chloroplastes. Les résultats résumés dans le tableau 1 sont les valeurs obtenues de la réaction de Hill pour un même culot de chloroplastes bruts dont la méthode de préparation a été résumée dans le schéma 24 puisqu'elle est légèrement différente de celle décrite à la section II.5. (page 79).

Trois essais ont été effectués sur la même suspension de chloroplastes (culot no 1) et le temps de la réaction fut le même dans les trois cas (4 min). On remarque que le pourcentage de chloroplastes intact (tableau 1) est relativement le même dans les trois essais, soit autour de la valeur moyenne de 39.5 %.

Un graphique typique de la réaction de Hill est montré à la figure 26. Il faut assumer que le bruit de fond est de ± 0.5 mV lorsque la concentration de chlorophylle est de 10 à 15 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Ces résultats nous permettent donc de conclure que la précision du système est suffisante pour suivre la réduction du ferricyanure de potassium.

TABLEAU 1: Réaction de Hill chez les suspensions de chloroplastes bruts

No de culot	No de l'essai	Temps de la réaction (min)	Réaction de Hill avant un choc osmotique (mV)	Réaction de Hill après un choc osmotique (mV)	Pourcentage de chloroplastes intacts
1	1	4	20	35	42.9
	2	4	23	36	36.1
	3	4	20	33	39.4
2	1	5	29	39	25.6
	2	5	29	40	27.5
3	1	5	35	45	22.2
	2	5	33	45	26.7

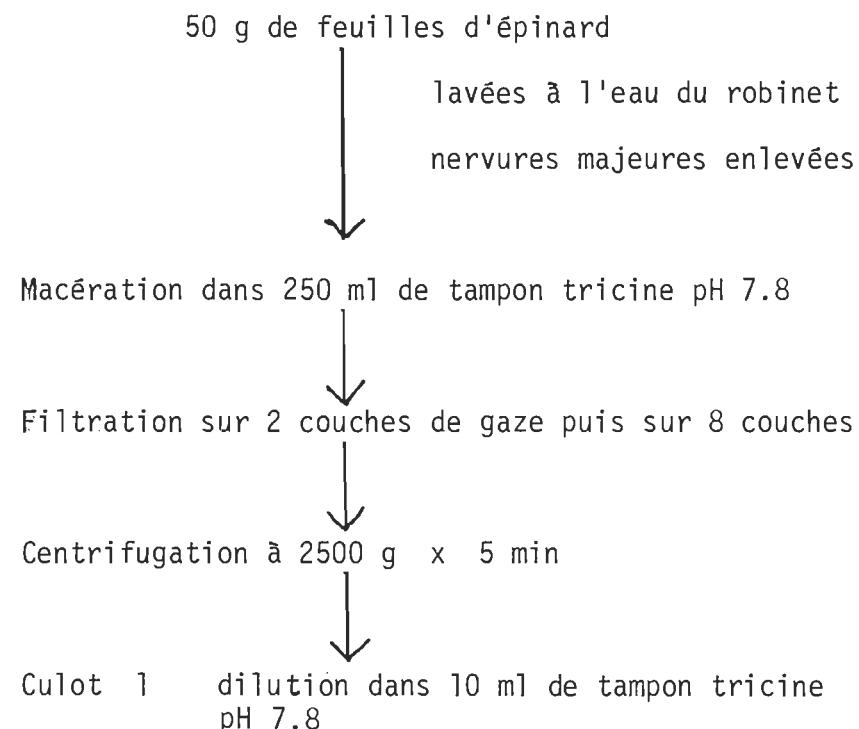


Schéma 24

Extraction des chloroplastes pour la réaction de Hill.

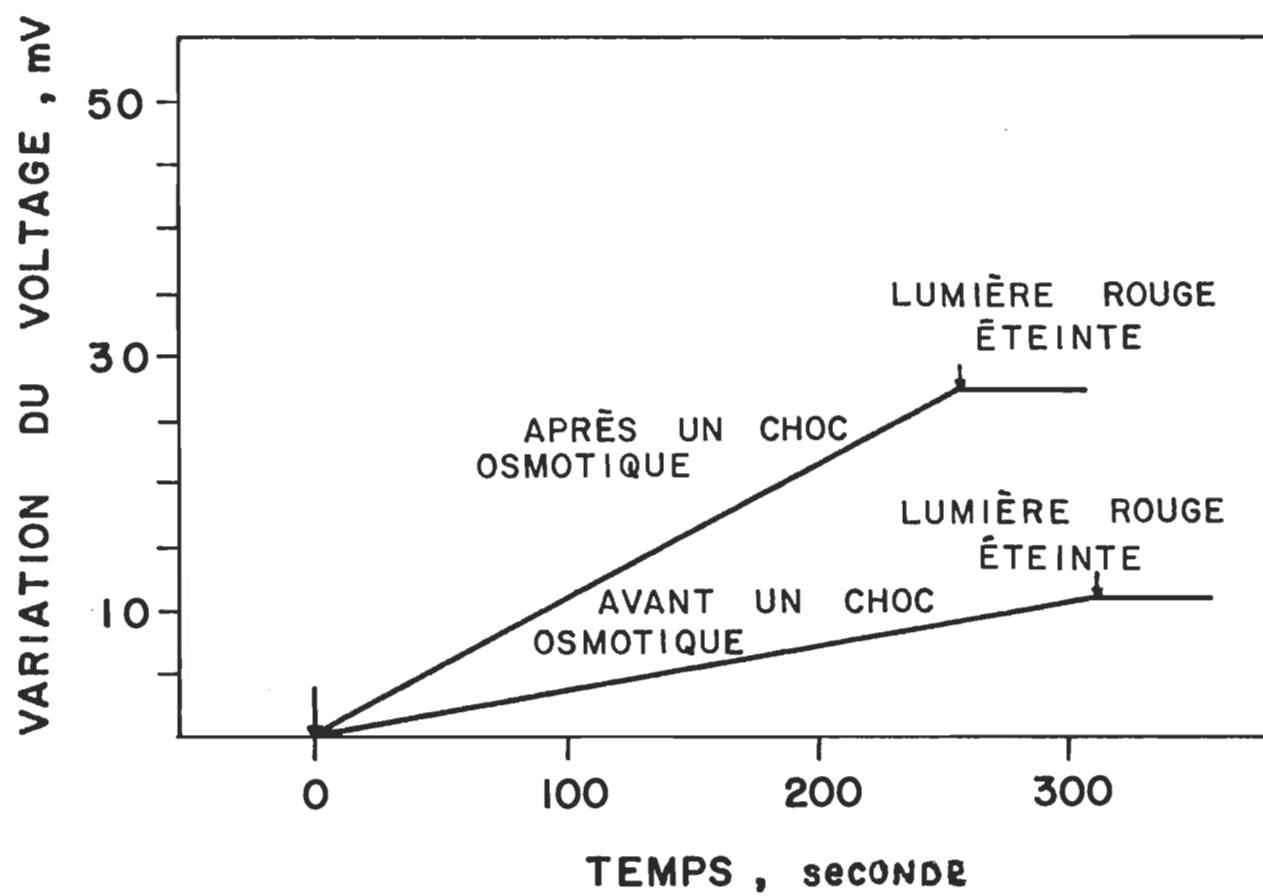


FIGURE 26 : GRAPHIQUE DE LA REACTION DE HILL AVANT ET APRES UN CHOC OSMOTIQUE

Les essais effectués sur les culots no 2 et 3 ont été faits de la même manière que pour le culot no 1. Ces culots proviennent d'exactions différentes qui ont été accomplies à des journées différentes et de la même manière, comme cela est montré dans le schéma 24.

II.11.4 Réaction de Hill en fonction de la concentration de chlorophylle

La variation dans la concentration en chlorophylle ne semble pas modifier la réponse du système si on demeure dans le domaine de détection du photomultiplicateur utilisé (tension maximum 900 V).

Le tableau 2 résume les valeurs de la réaction de Hill lorsque la concentration de la chlorophylle est augmentée par multiple de deux et de trois.

La concentration en chlorophylle est évaluée dans le culot de base. Après les dilutions subséquentes, les nouvelles concentrations sont établies par calcul numérique. Les résultats du tableau 2 nous montrent que la variation de la concentration de chlorophylle ne modifie pas le pourcentage de chloroplastes intacts dans une suspension donnée.

La limite supérieure de détection (grandes concentrations de chlorophylle) dépend de la tension appliquée au photomultiplicateur. Il existe une concentration de Chl où la lumière d'excitation ne se rend plus au photomultiplicateur parce que la solution est trop dense. Si nous appliquons une tension de 1000 volts il y aurait des risques d'endommager le photomultiplicateur. Pour augmenter le signal nous pourrions néanmoins augmenter

TABLEAU 2: Réaction de Hill dans une suspension de chloroplastes bruts. Influence de la concentration de chlorophylle

No de culot	No de l'essai	Conc	Temps de réaction (min)	Réaction de Hill avant choc osmotique (mV)	Réaction de Hill après choc osmotique (mV)	Pourcentage de chloroplastes intacts
1	1	0.1 X	1.40	6	11	45 %
1	1	0.2 X	1.40	13	22	41 %
2	2	0.2 X	1.40	12	22	41 %
3	3	0.2 X	1.40	12	22	41 %
1	1	0.3 X	1.40	20	37	46 %

X = 70 ug/ml

NOTE: chloroplastes extraits selon la méthode présentée à la section II.5 (page 79).

la transmission du filtre de densité neutre devant la source de détection.

II.11.5 Réaction de Hill chez les chloroplastes intacts séparés sur gradient discontinu de Ludox AM

La réaction de Hill chez les chloroplastes intacts séparés sur gradient discontinu de Ludox AM démontre généralement moins d'activité avant le choc osmotique que tout autre type de suspension de chloroplastes.

Le tableau 3 est un résumé du pourcentage de chloroplastes intacts trouvés lors de leur séparation sur gradient discontinu de Ludox.

D'une extraction à l'autre il est pratiquement impossible d'obtenir un pourcentage de chloroplastes variant autour de la même valeur.

Cette observation peut s'expliquer de la façon suivante:

La procédure avant de faire une mesure de l'activité de Hill est suffisamment longue pour qu'à chaque manipulation il y ait un risque d'endommager les chloroplastes intacts. Mais le bris des chloroplastes causé par la manipulation doit être minimum.

L'étape cruciale est la remise en suspension des chloroplastes après la recentrifugation à 1000 x g. Le milieu doit être suffisamment homogénéisé et cette opération doit se faire avec précaution. Par contre, si trop de précautions sont prises la population de chloroplastes ne sera pas homogène dans la suspension. Ceci se reflétera sur la variation du voltage avant et après le choc osmotique.

TABLEAU 3: Réaction de Hill chez les chloroplastes intacts

No de l'essai	Temps de réaction (s)	R ⁿ de Hill avant un choc osmotique (mV)	R ⁿ de Hill après un choc osmotique (mV)	Pourcentage de chloroplastes intacts
1	300	0	10	100 %
2	250	9	23	61 %
3	250	9	27	67 %
4	125	2	17	88 %
5	250	0	28	100 %
6	125	26	28	7 %
7	200	5	20	75 %
8	200	6	16	62 %

Un meilleur tampon de resuspension tel que suggéré par Walker (1971) où le sorbitol est utilisé à la place du sucre devrait améliorer la condition osmotique des chloroplastes. Cette hypothèse serait à vérifier.

Tout de même, la séparation des chloroplastes sur gradient discontinu de sucre nous donne un rendement d'intégrité variant autour de 75-80 % si on exclut l'essai no 6.

L'essai no 6 est mentionné pour indiquer qu'il arrive parfois que des chloroplastes considérés comme étant intacts ($D = 1.15$) répondent au réactif de Hill avec la même intensité avant et après un choc osmotique.

La dernière hypothèse serait que les chloroplastes intacts entraînent avec eux des thylakoides isolés lors de la centrifugation isopycnique. Cette quantité de thylakoides mêlés aux chloroplastes intacts pourrait accomplir la réduction du ferricyanure sous l'action de la lumière.

En résumé:

Ce chapitre recouvre le matériel et les méthodes expérimentales utilisés qui nous permettront de faire l'étude des propriétés photophysiques des chloroplastes en suspension.

Dans la partie expérimental, nous avons fait la description d'un spectrophotomètre commercial et d'un photomètre construit dans nos ateliers; nous avons également fait la description de spectrofluorimètres lasers et d'un spectrophosphorimètre.

Les mesures d'absorption, de fluorescence et/ou de phosphorescence seront faites sur des chloroplastes bruts et sur des chloroplastes intacts ou cassés, séparés sur différent type de gradient. Nous avons évalué la nature des chloroplastes par la microscopie électronique et par la réaction de Hill.

CHAPITRE III

SPECTROSCOPIE DE CHLOROPLASTES EN SUSPENSION

Dans ce chapitre nous couvrirons l'aspect spectroscopique des suspensions de chloroplastes bruts ou des suspensions de chloroplastes séparés sur gradient de densité. Nous présenterons des résultats expérimentaux provenant de la spectroscopie d'absorption, de la spectroscopie d'excitation et de la spectroscopie de fluorescence à la température ambiante et à la température de l'azote liquide. Il est à remarquer cependant, que ce dernier type de spectroscopie, soit la spectroscopie de fluorescence, couvre la majeure partie de ce chapitre.

III.1 Spectre d'absorption d'une suspension de chloroplastes

On a mentionné au chapitre I que l'acte primaire de la photosynthèse était l'absorption d'un photon.

On peut s'imaginer les niveaux énergétiques permis aux pigments contenus dans un chloroplaste grâce à la figure 27. Cette figure est le spectre d'absorption électronique d'une suspension de chloroplastes baignant dans un tampon tricine.

Le spectre présente les caractéristiques suivantes: deux bandes dont le maximum d'absorption se situe à 680 nm et 440 nm; il s'agit aussi de deux épaulements vers 650 nm et 630 nm et de deux autres épaulements vers 490 nm et 420 nm.

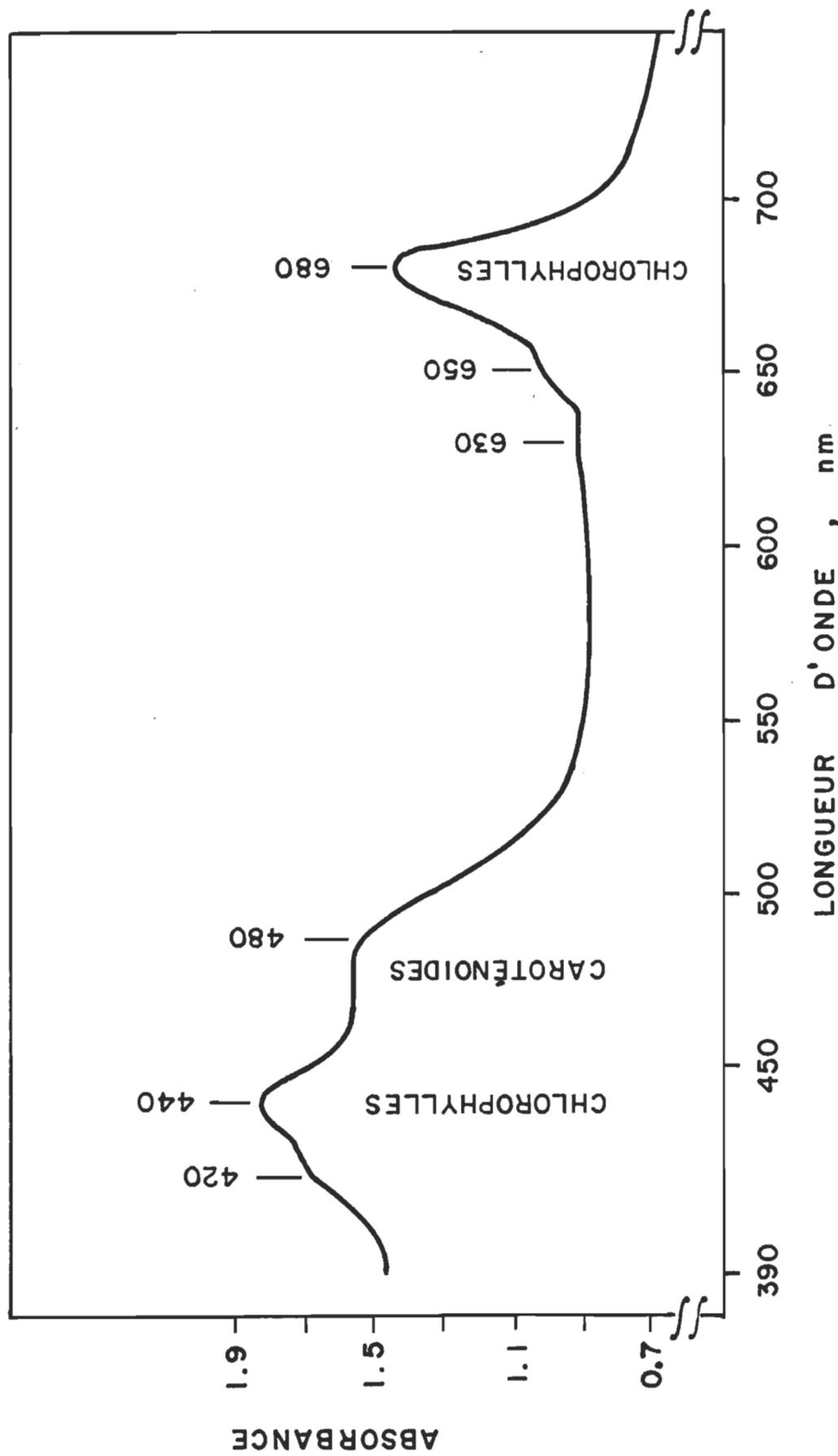


FIGURE 27 : SPECTRE D'ABSORPTION D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES (solvant: tampon tricine)

Les bandes d'absorption dans le rouge sont indicatrices de la présence des chlorophylles a et b, quant aux bandes d'absorption dans le bleu elles sont indicatrices des chlorophylles a et b de même que des pigments accessoires qui sont dans le cas des chloroplastes d'épinard, les caroténoides.

Par ailleurs, le spectre électronique d'une suspension de chloroplastes déposée dans un solvant organique (eau-acétone 20/80 %) a grossièrement les mêmes caractéristiques spectrales (figure 28) qu'une suspension de chloroplastes dans un tampon tricine.

Cette fois-ci, il s'agit de deux bandes dont le maximum d'absorption est déplacé vers 665 nm et 435 nm et les quatres épaulements sont également visibles vers 620 nm et 580 nm, 460 nm et 410 nm. De plus, les bandes sont mieux définies comparativement au spectre précédent (figure 27) car dans ce cas, il y a absence de diffusion de lumière dans la solution.

La figure 27 se compare assez bien avec tout autre spectre déjà présenté dans la littérature. Mentionnons pour ne citer que deux exemples, que la figure s'identifie au spectre de l'algue Chlorella (Latimer et Rabnowitch 1956; Emerson et Lewis 1940); la différence majeure entre notre spectre et celui des auteurs ci-haut mentionnés est que dans notre cas, la vraie valeur de l'absorbance ne peut pas être déterminée (le spectre est déphasé de 0 à 0.7 en valeur d'absorbance). Nous attribuons ce phénomène à la diffusion de la lumière par la solution.

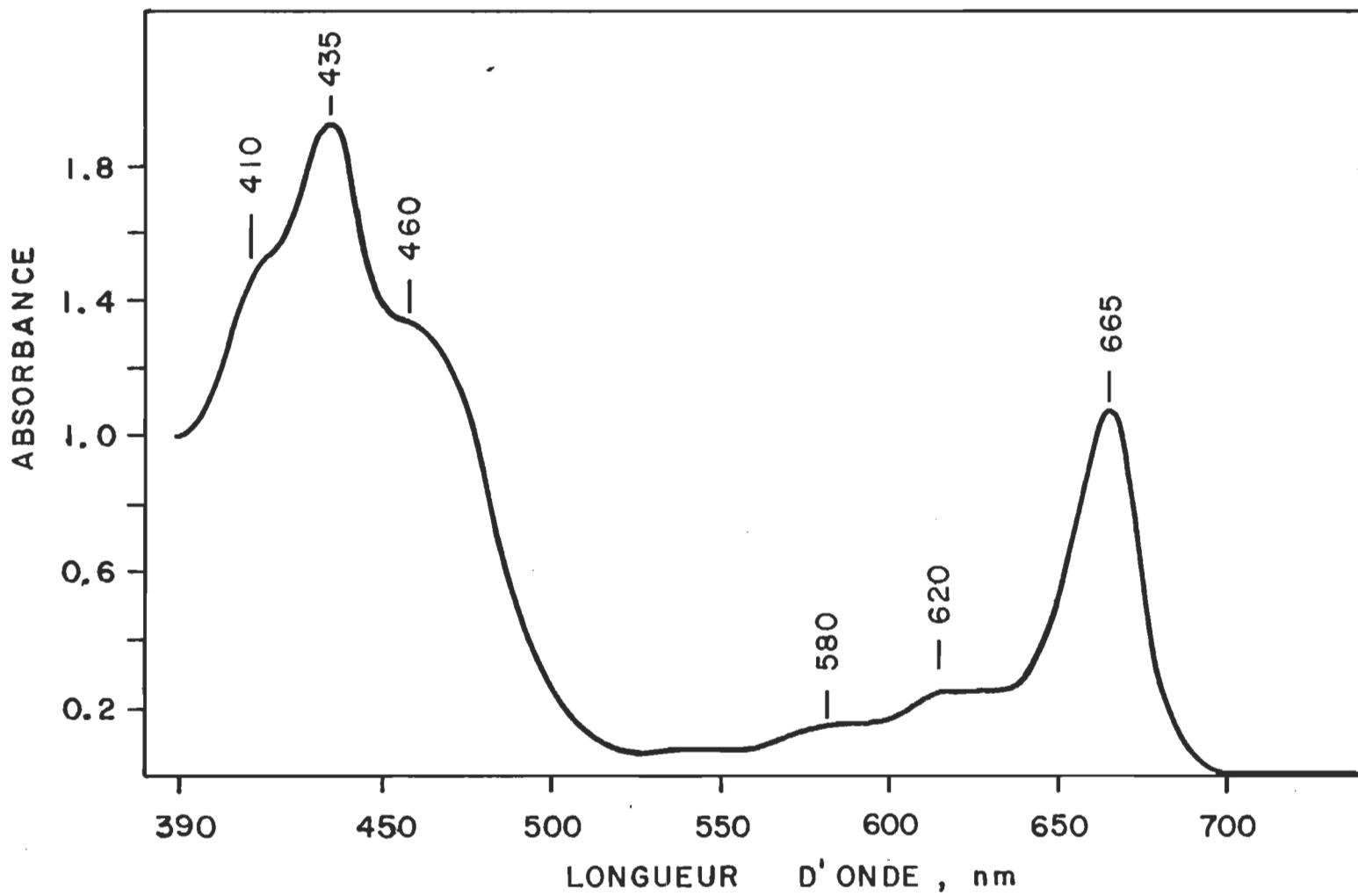


FIGURE 28 : SPECTRE D'ABSORPTION D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES (solvant: acétone/eau, 80%)

En effet, bien que ce soit normalement facile d'effectuer un spectre d'absorption électronique, le cas n'est pas si simple lorsqu'il s'agit de mesurer le spectre d'absorption de la chlorophylle a in vivo.

Nous avons relevé dans la littérature deux cas qui peuvent modifier un spectre d'absorption d'une suspension de chloroplastes:

- i) Latimer (1956, 1958 et 1959) nous informe que dans le cas d'une suspension de chloroplastes, la lumière du faisceau de détection est fortement diffusée (diffusion de Rayleigh) et ce phénomène peut augmenter l'absorption si elle est mesurée par un spectrophotomètre conventionnel; le spectre d'absorption peut aussi être distortionné.
- ii) Le même auteur ajoute aussi que la fluorescence contribue également à la lumière transmise particulièrement lorsque l'absorption est grande.

Il y va de soi que ce problème a été contourné par l'auteur en utilisant des filtres qui éliminent la lumière parasite.

Nous avons passé outre cette recommandation car pour nous, il s'agissait de reconnaître, à l'aide d'un spectre d'absorption, les pigments photosynthétiques qui composent le chloroplaste d'épinard. La résolution des figures 27 et 28 est adéquate et correspond suffisamment à nos aspirations.

Pour terminer avec l'absorption d'une suspension de chloroplastes nous donnons à titre d'information que la bande d'absorption (dans le rouge) de la chl a in vivo est large (30 nm de largeur de bande à la demi-

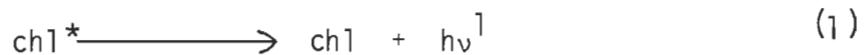
hauteur) comparativement à la même bande de chl a dans un solvant organique (18 nm de largeur de bande à la demi-hauteur). Ces données ont été puisées chez Govindjee et coll. (1967); les auteurs suggèrent, d'après ces résultats, que la chl a in vivo est composée de plus d'une espèce moléculaire.

III.2 Quelques généralités sur la fluorescence

Les mesures de fluorescence sont exploitées à fond dans l'étude de la photosynthèse car ce processus se produit approximativement au moment des premières étapes de la conversion d'énergie. Il est donc important de comprendre quelle est l'origine de la fluorescence au niveau de la photosynthèse et la manière avec laquelle toutes modifications de l'environnement peuvent changer ses caractéristiques. Les trois parties qui suivent présentent les généralités sur la fluorescence des chloroplastes avant d'entreprendre la partie sur nos mesures expérimentales.

III.2.1 Définition

Lorsqu'une molécule de chlorophylle se trouve au niveau vibrationnel le plus bas d'un état singulet excité et qu'elle dissipe cette énergie pour revenir à l'état fondamental en émettant un photon, on dit qu'il y a fluorescence. Ce processus peut s'écrire selon le mécanisme,



D'après l'équation de Planck, la longueur d'onde du photon émis est donnée par la relation,

$$\lambda = \frac{h c}{E_1 - E_0^1} \quad (I)$$

où E_1 est l'énergie du niveau vibrationnel le plus bas de l'état singulet excité et E_0^1 celle du niveau vibrationnel de l'état fondamental atteint par la transition.

Si E_0^1 est l'énergie de l'état vibrationnel le plus bas de l'état fondamental, on aura toujours

$$E_0^1 > E_0 ; \text{ donc } E_1 - E_0^1 < E_1 - E_0$$

Le mécanisme (1) et l'équation (I) sont les représentations les plus simples pour décrire la fluorescence provenant d'un monomère de chlorophylle, c'est-à-dire dans le cas où nous sommes en présence d'une solution de chlorophylle suffisamment diluée.

Dans le cas d'agrégat de chlorophylle, comme c'est le cas chez le chloroplaste, les propriétés de fluorescence de la chlorophylle sont modifiées. Il peut y avoir, par exemple, un très fort quenching de la fluorescence de la chlorophylle a. En fait dans un système aussi complexe on parle plutôt d'exciton de fluorescence migrant à travers les collecteurs des photosystèmes.

Il conviendrait peut-être avant d'aborder les résultats expérimentaux de faire une mise au point sur toute la terminologie utilisée dans le cas de la fluorescence de chloroplastes.

Tous les néophytes remarqueront que dans ce domaine de la photosynthèse, une assez grande quantité de termes sont utilisés tels, par exemple, luminescence, fluorescence constante, fluorescence variable, fluorescence rapide, etc. Nous allons tenter dans les deux sous-sections suivantes de définir l'entité propre de quelques-uns de ces termes.

III.2.2 Fluorescence et luminescence

Parmi les processus primaires de la photosynthèse, les termes fluorescence et luminescence sont deux entités distinctes. Selon la terminologie de Lavorel (1975), la luminescence et la fluorescence ont une nature identique, c'est-à-dire qu'elles sont le résultat de la désactivation d'excitons à l'état singulet excité mais les deux processus ont une origine différente. Il les distingue par les termes exciton de fluorescence (E_F) et exciton de luminescence (E_L); le terme exciton a le sens de quantum d'excitation électronique migrant à travers les collecteurs du PS II.

Les excitons de fluorescence ont une durée de vie courte; elle est de l'ordre de 10^{-9} sec. L'origine de cette fluorescence sont les chlorophylles collectrices du PS II ou même le piège d'énergie lui-même.

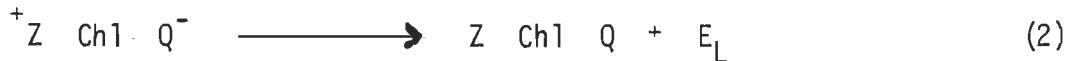
La luminescence est caractérisée comme une fluorescence différée de la chlorophylle avec une durée de vie moyenne (déclin polyphasique) considérablement plus longue et une intensité beaucoup plus faible que celle de la fluorescence rapide (Lavorel 1973).

La découverte de ce phénomène date de 1951 (Strehler et Arnold (1951)). On caractérise la luminescence par les termes fluorescence retardée, lumière retardée ou "afterglow".

La fluorescence retardée semble être liée aux processus primaires de la conversion photochimique de l'énergie dans l'appareil photosynthétique (Arnold et Thompson 1956).

et son existence nécessite l'intégrité fonctionnelle de l'unité photosynthétique (Strehler et Arnold 1951).

On pense que le mécanisme élémentaire de la luminescence est la recombinaison des charges primaires, c'est-à-dire l'inverse de la conversion photochimique (Lavorel 1968).



où E_L est un exciton de luminescence.

L'intensité de fluorescence, F , peut être exprimée par la simple relation (Lavorel et Joliot 1972):

$$F = \Phi I \quad (\text{II})$$

où Φ , le rendement quantique, est le facteur de proportionnalité entre F et I , I est l'intensité de la lumière absorbée.

De la même manière, L , l'intensité de luminescence est définie par (Lavorel et Joliot 1972):

$$L = (\Phi) J \quad (\text{III})$$

et cette équation dit qu'un flux J de E_L est injecté dans les collecteurs du PSU et il est subséquemment exprimé en tant que flux lumineux, L , avec un rendement quantique (Φ).

Cependant lorsqu'on applique la relation F (équation II) et la relation L (équation III) aux deux modèles d'unités photosynthétiques (modèle séparé et connecté) les rendements quantiques Φ et (Φ) sont dépendants des

autres variables ; le sujet a été traité en profondeur par Lavorel (1975).

L'émission de lumière retardée a pris une expansion considérable depuis qu'on la sait associée aux processus primaires et secondaires de la photosynthèse (voir chapitre 1).

Une pluie de publications traite le sujet et citons entre autres les travaux de Bertsch et coll.(1967), Jursinic et Govindjee (1971), Wright et Crofts (1971), Newman et coll.(1973), Hipkins et Barber (1974 a, 1974 b), Velthuys et Amesz (1975).

La fluorescence chez les organismes photosynthétiques représente une perte de l'énergie lumineuse. Cette perte est cependant très faible puisque le rendement de fluorescence de la chl a chez les cellules vivantes est seulement d'environ 3 %.

Presque tous les pigments photosynthétiques (à l'exception des caroténoides) fluorescent en solution. In vivo, cependant, la fluorescence de la chl a est dominante parce que le reste des pigments transfèrent leur énergie absorbée à la chl a avec une efficacité relativement grande.

La portion de chl a excitée qui est réémise sous forme de fluorescence varie avec le rythme de la photosynthèse; en général une faible émission de fluorescence de la chl a peut être typique d'activité photosynthétique vigoureuse alors qu'une fluorescence intense est le reflet d'activité photosynthétique inhibée ou faible.

Cependant, ce n'est pas toute la portion de chlorophylle qui émet sous forme de fluorescence qui subit l'influence du transport d'électrons.

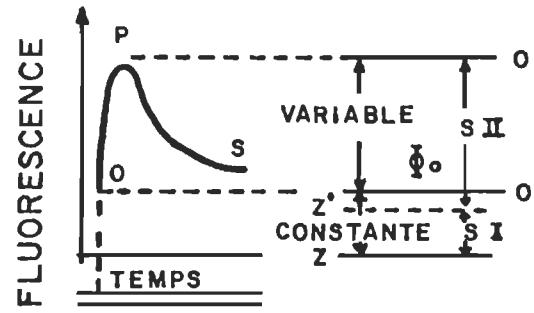
La courbe cinétique de la fluorescence de la chl a d'organismes photosynthétiques, adaptés à la noirceur et soumis à une période continue d'illumination, a révélé (Lavorel 1959 ; Clayton 1969) la distinction entre la fluorescence à rendement variable et la fluorescence à rendement constant.

III.2.3 Fluorescence constante et fluorescence variable

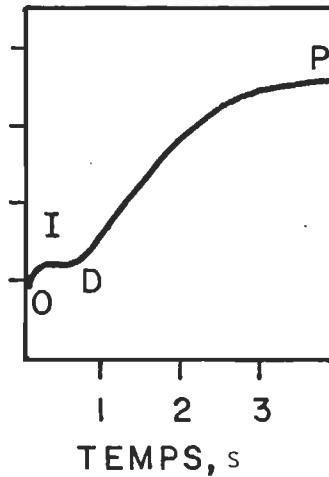
La propriété de fluorescence du PS II est utilisée intensivement pour étudier les réactions associées à ce photosystème. Il est reconnu (Lavorel 1962) que ce photosystème subit différentes étapes de transition sous l'action de la lumière.

En effet sous l'action de la lumière, la fluorescence de la chlorophylle a de ce photosystème subit des changements momentanés avec le temps. Ces événements sont connus sous le nom de phénomène d'induction ou l'effet Kautsky.

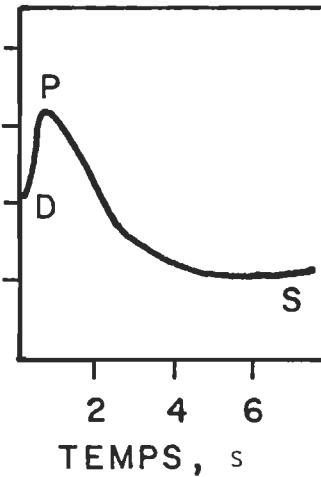
L'induction de fluorescence peut être caractérisée par 3 états consécutifs (Lavorel et Joliot 1973): 0, P et S (Schéma 25a). Elle démontre une partie constante, le niveau 0, et une partie variable d'amplitude maximum 0 - P. Le niveau hypothétique zéro de la fluorescence du PS II est z¹.



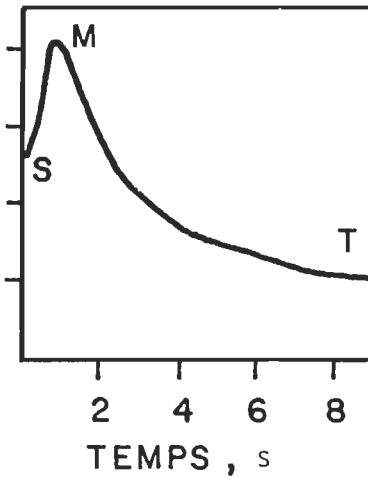
A



B



C



D

SCHEMA 25 : LES ETATS DE L'INDUCTION DE FLUORESCENCE
(A, Lavorel et Joliot 1973; B, C et D, Papageorgiou 1975).

Les changements momentanés de fluorescence avec le temps ont été divisés en deux types: les changements rapides qui durent quelques secondes et les changements lents qui durent plusieurs minutes (Govindjee et Govindjee, 1974).

Le changement rapide de fluorescence dans le cas des chloroplastes de végétaux supérieurs (classe II) est une élévation rapide biphasique (schéma 25 b) de niveau initial 0 au plateau P.

Le niveau 0 représente la fluorescence à l'état physiologique dans lequel tous les intermédiaires intersystèmes sont oxydés.

Au niveau P, un état stationnaire est atteint et à ce niveau les électrons sont donnés au pool intermédiaire par le PS II et dérobés par le PS I à des vitesses équivalentes.

Chez les algues, chez les feuilles intactes et chez les chloroplastes intacts des végétaux supérieurs qui ont retenu leur membrane extérieure (Classe I), l'élévation OP est suivie d'une décroissance plus lente vers un niveau plus bas S (schéma 25 c).

L'élévation de fluorescence OI (schéma 25 b) est presque toujours synchronisée avec l'augmentation de la vitesse de l'émission d'oxygène. Le déclin ID a été attribué à l'oxydation de Q par le PS I.

L'augmentation de fluorescence de D à P est un processus synchronisé avec la diminution de l'émission d'oxygène. Elle est également

responsable de la fluorescence variable.

L'élévation rapide de fluorescence le long de OP semble s'expliquer par la réduction de l'accepteur primaire d'électron, Q. A mesure que Q^- s'accumule les quanta de lumière arrivant au centre de réaction ne peuvent plus servir à la photosynthèse et ils sont réémis sous forme de fluorescence.

L'exciton peut également revenir à l'état fondamental par un processus non radiatif; il peut être transféré à un autre piège énergétique; il peut être retourné aux pigments collecteurs et se désactiver sous forme de fluorescence ou par un processus non radiatif.

La fluorescence variable est donc une combinaison provenant de l'émission de la chl a 678 et du P 680.

Le déclin plus lent du maximum P au niveau S coincide avec l'augmentation de la vitesse de l'émission d'oxygène (Bannister et Rice, 1968). Le déclin PS semble donc indiquer qu'il y a une augmentation de l'utilisation de l'énergie pour la photosynthèse aux dépens de la fraction émise par fluorescence.

La première vague de fluorescence rapide (OPS) est succédée par un second changement (plus lent) pendant lequel le rendement de fluorescence de la chlorophylle a s'élève à un maximum M et décline lentement au niveau terminal T (schéma 25 d).

A la fin de ce changement la vitesse de l'émission d'oxygène et le rendement quantique de fluorescence de la chl a ont atteint des valeurs d'états stationnaires. Le changement lent de fluorescence serait dû en partie aux processus qui contrôlent la distribution de l'énergie.

III.3 Spectre d'excitation d'une suspension de chloroplastes

Avant d'entrer dans le cœur même de la fluorescence nous présentons la figure 29, qui est un spectre d'excitation d'une suspension de chloroplastes bruts. Nous rappelons qu'un spectre d'excitation nous indique pour quelles valeurs de longueur d'onde la fluorescence d'une solution sera maximum. On voit d'après la figure 29 que la fluorescence d'une suspension de chloroplastes sera maximum si la lumière d'excitation utilisée est d'environ 470 nm.

On a déjà établi au chapitre II que les sources d'excitation utilisées était un laser He/Cd ($\lambda_{exc} = 441.6$) et un laser He/Ne ($\lambda_{exc} = 632.8$). D'après le spectre d'excitation montré à la figure 29, on voit que le laser He/Cd utilisé comme source d'excitation permettra d'obtenir des intensités de fluorescence proche du maximum. Par contre le laser He/Ne devrait permettre une moins grande intensité de fluorescence.

III.4 Spectre de fluorescence d'une suspension de chloroplastes à la température ambiante

Maintenant que nous avons clarifié la terminologie sur le plan émission de fluorescence provenant de chloroplastes nous entreprenons d'élaborer

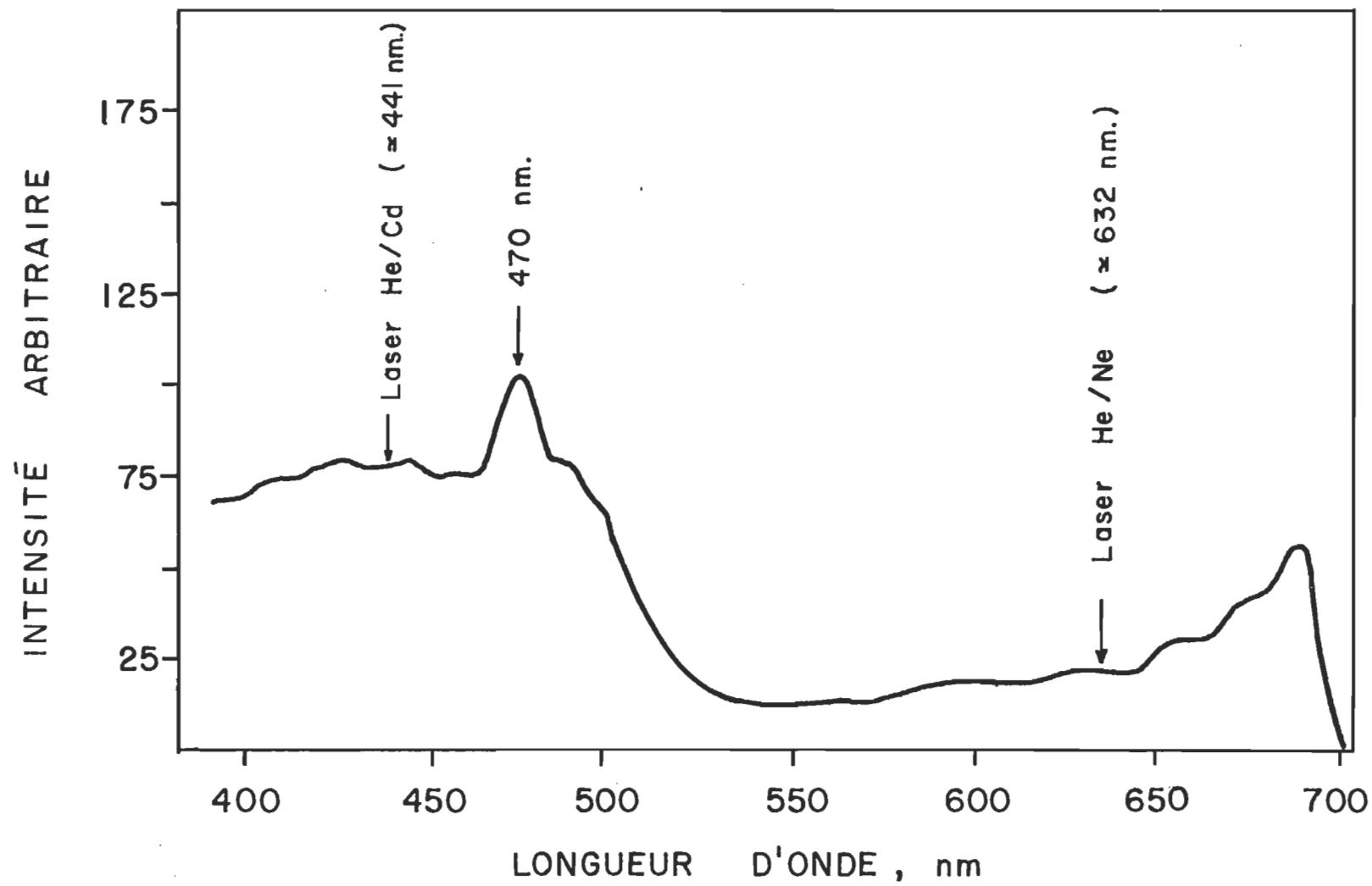


FIGURE 29 : SPECTRE D'EXCITATION D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES (solvant: glycérol/tampon tricine, 50%)

nos résultats expérimentaux du côté de la spectroscopie de fluorescence. Nous ouvrons cette sous-section par des mesures de fluorescence à la température ambiante; d'abord parce que cela nous permettra de présenter deux de nos spectrofluorimètres; en second lieu, comme l'accent dans la section suivante sera porté sur la fluorescence à basse température, il est bon de bien identifier d'abord la nature du spectre de fluorescence à la température ambiante.

Ajoutons pour renforcer le contexte de la terminologie que nous avons explicité précédemment que les spectres qui seront présentés résultent de la fluorescence rapide provenant de la chlorophylle.

Un spectre de fluorescence (à la température ambiante) d'une suspension de chloroplastes bruts et mesuré à l'aide du système uv-visible est montré à la figure 30. Il s'agit d'une seule bande dont le maximum d'émission se situe à 680 ± 1 nm. Le spectre d'émission est de plus asymétrique par rapport à son maximum.

Un spectre d'émission d'une suspension de chloroplastes intacts, séparés sur gradient discontinu de Ludox, et mesuré par le système de détection pour le visible et le proche infra-rouge est montré à la figure 31.

Le spectre mesuré à la température ambiante, présente une bande principale à 683 ± 2 nm et une bande satellite vibrationnelle aux environs de 735 nm.

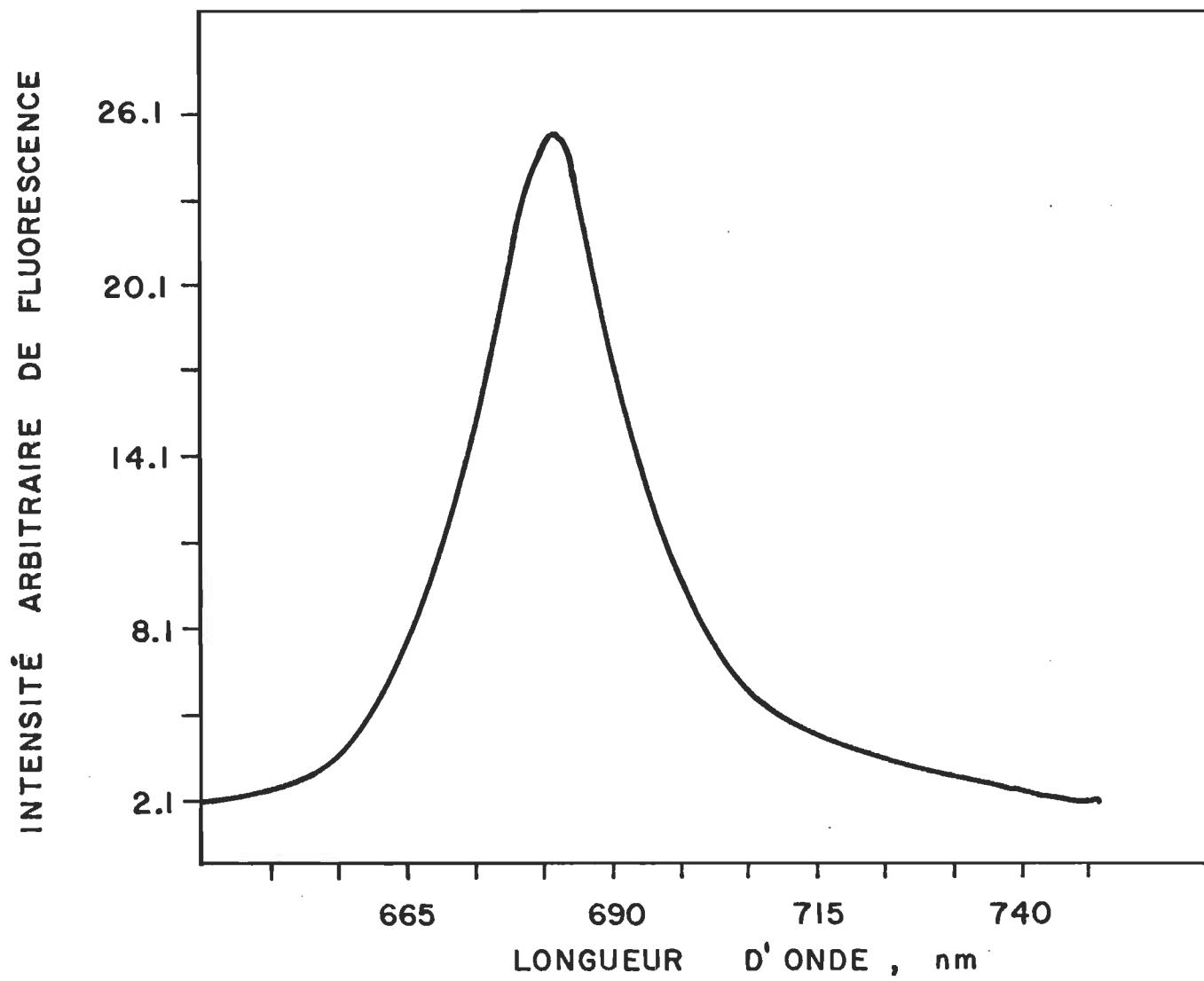


FIGURE 30 : SPECTRE DE FLUORESCENCE D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES (système uv-visible)

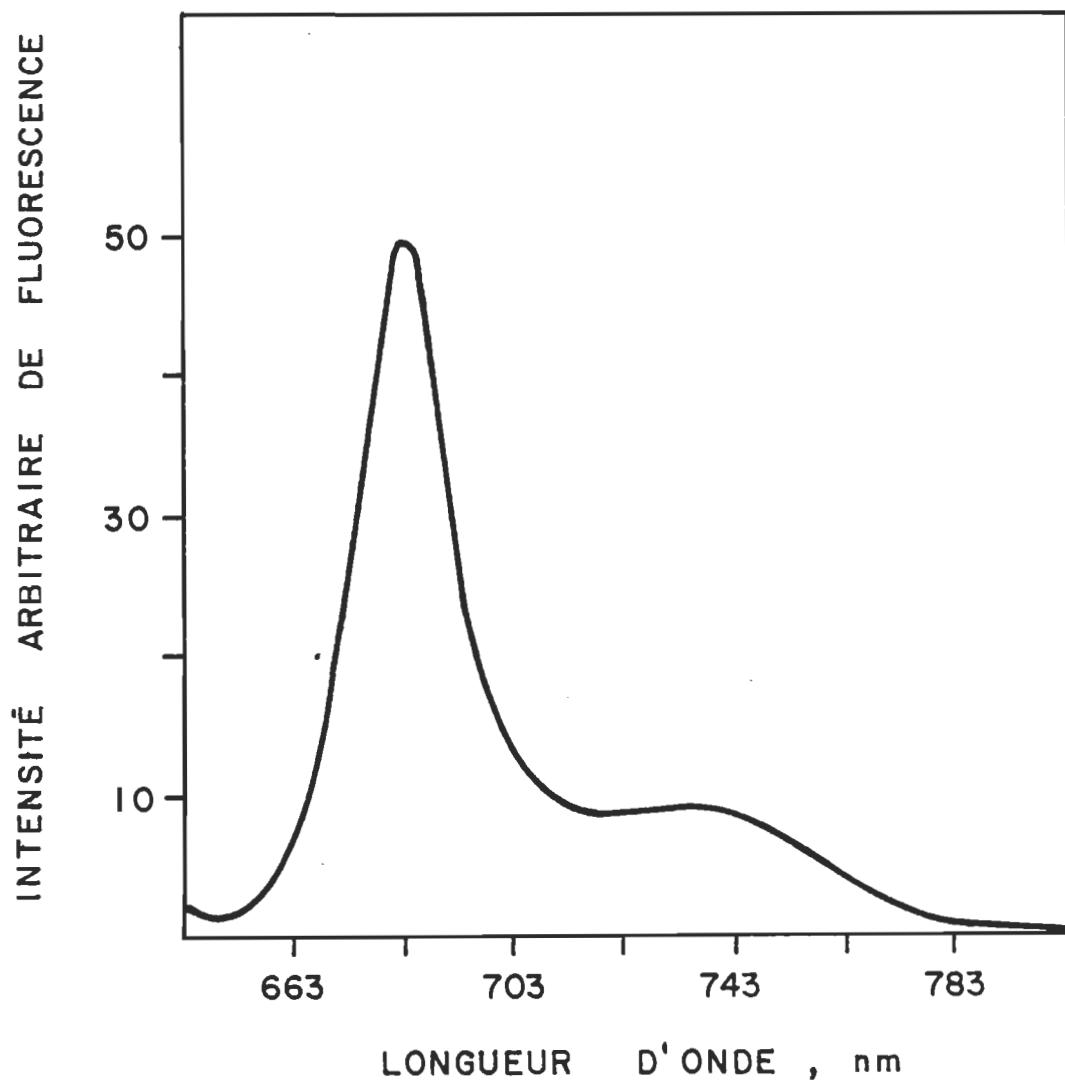


FIGURE 31 : SPECTRE DE FLUORESCENCE A 298 K D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES INTACTS SEPARES SUR GRADIENT DISCONTINU DE LUDOX
(système visible - proche infra-rouge)

La figure 31 est le type courant de spectre que l'on retrouve dans la littérature, caractérisant la fluorescence à la température ambiante d'une suspension de chloroplaste.

Précisons que, qu'il s'agisse de chloroplastes intacts ou de chloroplastes bruts, le spectre de chacun de ces types de chloroplastes a la même allure à la température ambiante.

Nous présentons la figure 30 et la figure 31 dans le seul but de comparer le système uv-visible et le système visible et proche infra-rouge. Nous constatons que le système visible et proche infra-rouge a un pouvoir de résolution supérieur dans le domaine spectral du rouge et du proche infra-rouge.

Pour en terminer avec les spectres de fluorescence à la température ambiante, mentionnons que ces bandes sont à l'origine d'une transition ($\pi^*-\pi$) vers l'état fondamental (Govindjee et coll. 1967). On attribue la fluorescence à 683 nm (F_{685}) à la chl a 678 du PS II (Papageorgiou 1975).

III.5 Spectre de fluorescence des suspensions de chloroplaste à 77 K

Pour faire des mesures de fluorescence à 77 K, il est préférable d'apporter une attention particulière aux échantillons qui seront analysés. Avant d'analyser les spectres de différentes classes de chloroplastes nous explicitons immédiatement la méthode de préparation de nos échantillons.

III.5.1 Préparation des échantillons

Les échantillons de chloroplastes bruts servant aux mesures de fluorescence à 77 K sont préparés de la façon suivante: un certain volume (≈ 1.5 ml) des culots de chloroplastes qui ont été remis en suspension dans le tampon tricine est dilué dans un mélange glycérol / H_2O (60 / 40 % V/V). Ils sont conservés dans ce milieu pendant 36 heures à 0°C.

La concentration de chlorophylle nous est donnée en mesurant l'absorbance du milieu à 680 nm dans une cellule dont le parcours optique est de 1 mm (la référence est l'air).

Avant d'être utilisé pour diluer les chloroplastes, le mélange glycérol / H_2O est porté au point d'ébullition puis il est refroidi à la température ambiante.

Lorsqu'on fait l'addition du dithionite de sodium à une suspension, elle se fait d'abord dans le mélange glycérol / H_2O puis les chloroplastes sont immédiatement mis en suspension.

Les chloroplastes séparés sur gradient discontinu de Ludox ou les chloroplastes séparés sur gradient de sucre sont séparés selon leur bande respective. Chaque classe est conservée temporairement dans le Ludox ou le sucre (à 0 - 4°C). Puis une portion de chaque classe de chloroplastes est mise en suspension dans le mélange glycérol / H_2O , 60%. Le milieu est homogénéisé en douceur à l'aide d'un policeman. L'absorbance de cette solution est mesurée à 680 nm. Une cellule de fluorescence est remplie puis déposée dans le cryostat.

Lorsque nous abaissons la température à 77 K, le volume d'azote liquide versé dans le cryostat est tel qu'il ne fait pas plus de 1/3 du cryostat. De cette façon la cellule gèle en douceur; ce procédé semble favoriser la formation des verres "translucides" quoique, il faut l'avouer, le verre formé ne soit jamais parfaitement translucide.

Les spectres de fluorescence ne sont pas corrigés pour l'efficacité de transmission du monochromateur et l'efficacité spectrale de la cellule photovoltaïque.

La température est mesurée à l'aide d'un thermocouple de cuivre et constantin (Omega, Con.).

III.5.2 Spectre de fluorescence à 77 K d'une suspension de chloroplastes bruts

Un spectre de fluorescence à 77 K d'une suspension de chloroplastes bruts est montré à la figure 32. Il s'agit de deux bandes majeures à 682 et $735 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$, et d'un épaulement vers 690-695 nm. L'épaulement est un peu mieux résolu si nous utilisons des fentes de 2 nm (figure 32, à droite) comparativement dans le cas où des fentes de 4 nm sont utilisées.

De même l'épaulement est moins bien résolu si la longueur d'onde d'excitation est 441 nm (figure 33) au lieu de 632 nm (figure 32).

A la température de l'azote liquide, il est plutôt difficile d'obtenir des résultats constants sur les spectres de fluorescence in vivo.

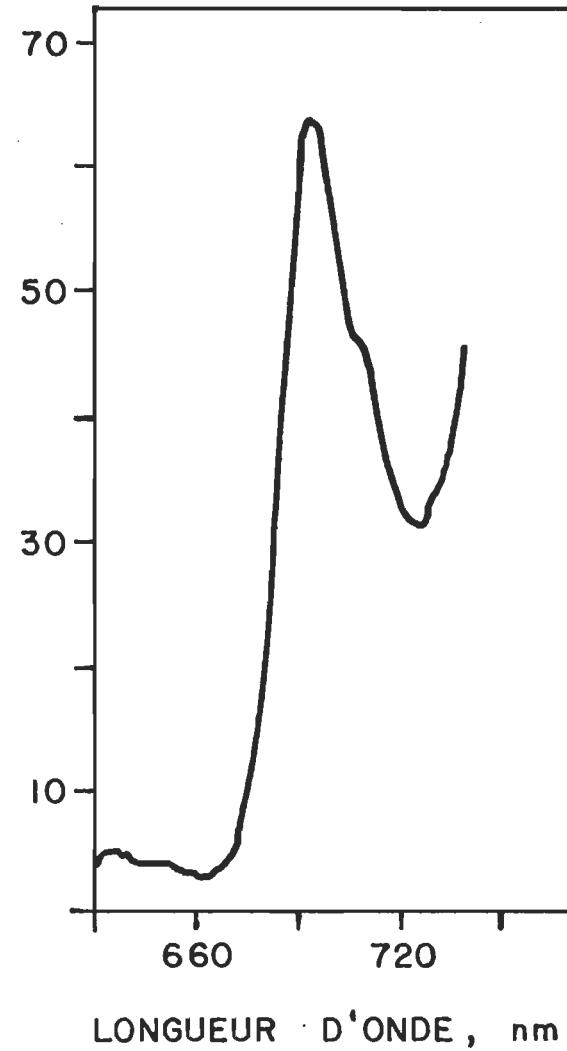
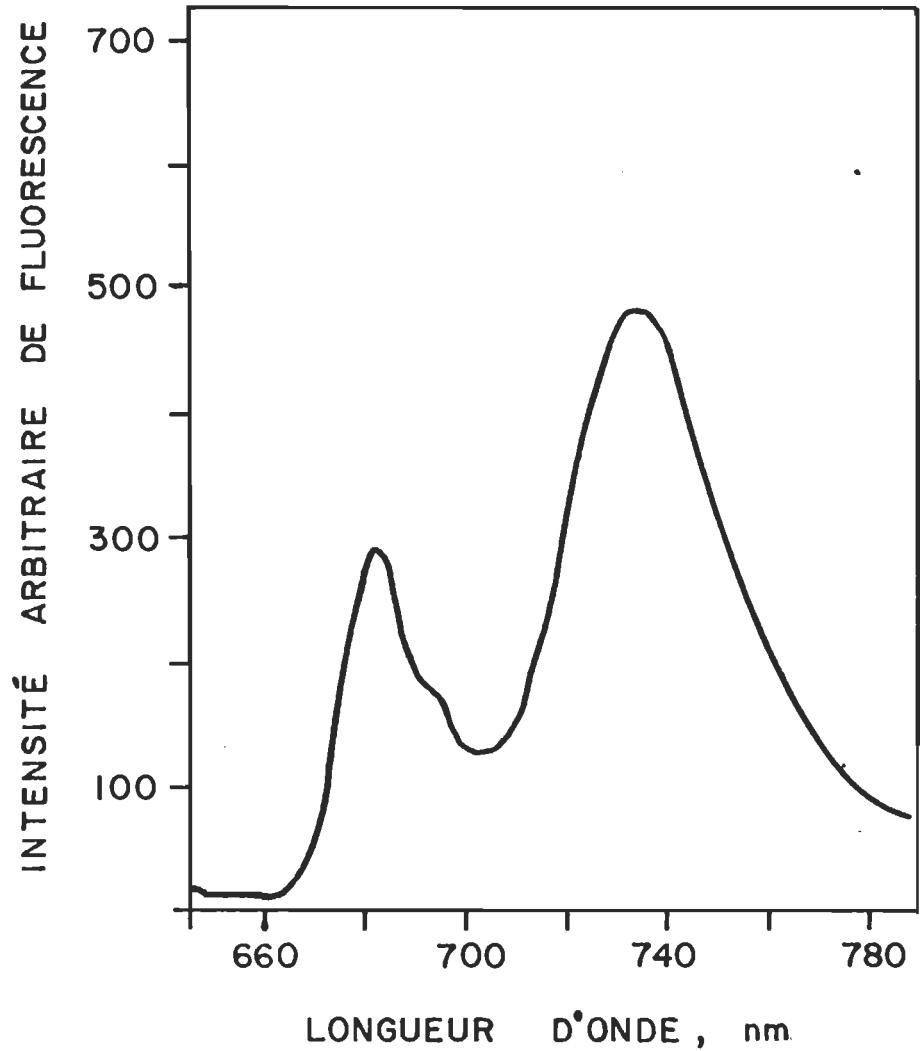


FIGURE 32 : SPECTRE DE FLUORESCENCE D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES BRUTS (λ exc.: 632.8 nm; T:77 K)

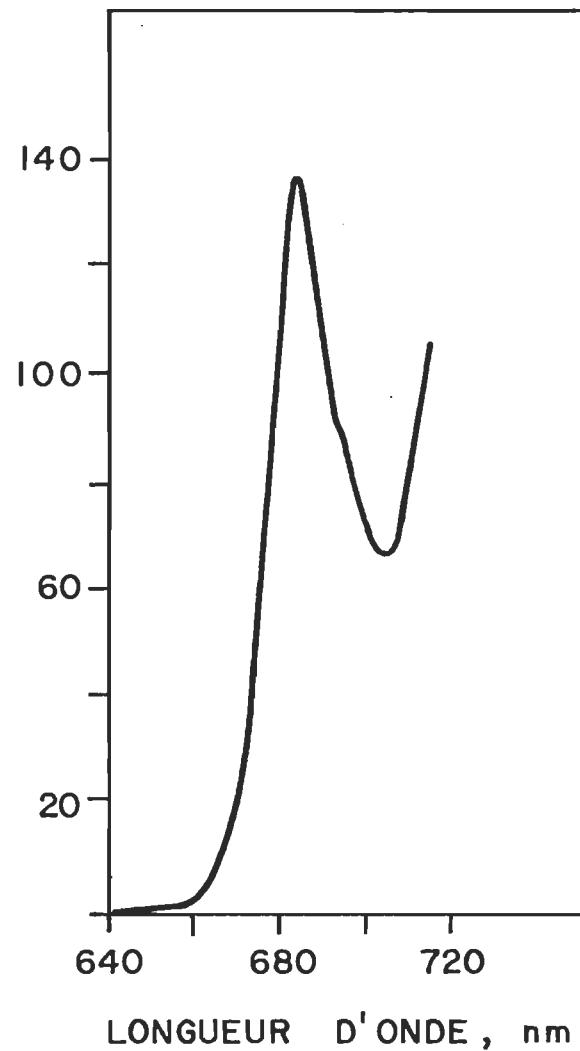
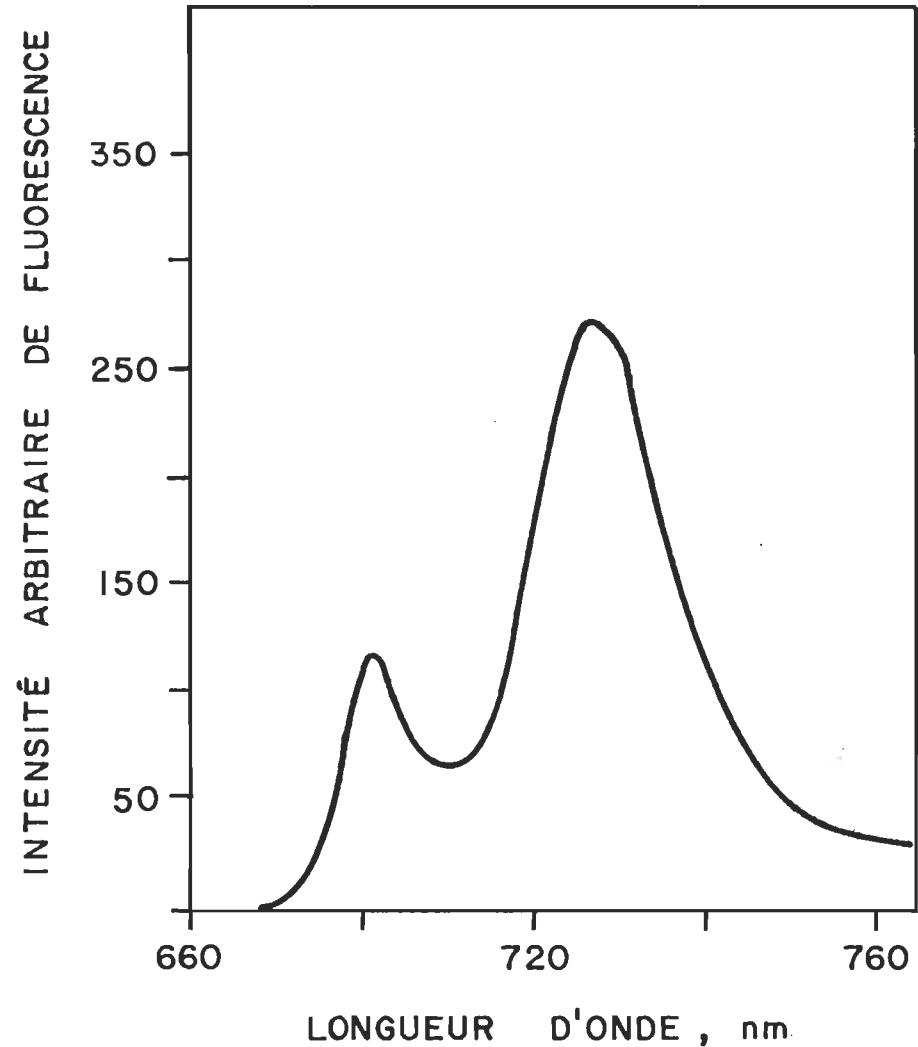


FIGURE 33 : SPECTRE DE FLUORESCENCE D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES BRUTS ($\lambda_{\text{exc}}: 441.6 \text{ nm}$; T: 77 K)

Les principaux problèmes auxquels il faut s'attendre sont les suivants:

il est difficile d'obtenir des parcours optiques identiques; il y a de multiples réflexions à cause de la présence des cristaux de glace.

Le mélange glycérol / H_2O (60/40 % V/V) nous a presque toujours permis d'avoir un assez bon signal de fluorescence à la température de l'azote liquide.

Le mélange glycérol / tampon tricine (60 % / 40% V/V) et le tampon tricine donne plutôt de mauvais signaux et même parfois le signal de fluorescence à 685 et 735 nm est complètement perdu à mesure que la température approche de 77 K.

Il semble aussi que le glycérol puisse causer le déplacement de la quantité relative d'émission vers les plus courtes longueurs d'onde (Brown 1977).

La vitesse de refroidissement de l'échantillon de même que sa concentration peut faire varier la hauteur relative de même que la position des maxima d'émission (Cho et Govindjee 1970 b).

Si la position du signal de fluorescence observé à 683 nm et à 298 K, est similaire à celle du signal de fluorescence observé à 683 nm et à 77 K, nous pensons que le milieu congelé est un verre adéquat pour des mesures de fluorescence.

Par exemple, dans le cas de la figure 32, l'intensité de fluorescence à 298 K et à 683 nm était de 310 μ V et l'intensité de fluorescence à 77 K et à 683 nm est maintenant de 290 μ V. Cette légère différence peut être due en partie à la diffusion de la lumière par le verre. En outre, lorsque la lumière d'excitation est continuellement appliquée sur l'échantillon nous remarquons que l'intensité de fluorescence à 683 nm décroît avec le temps. Cette deuxième hypothèse explique en partie la différence de voltage à 298 K et à 77 K. Tout de même, nous pensons que le premier phénomène a la plus grande part de responsabilité pour expliquer la différence de voltage.

Le tableau 4 résume les paramètres importants de l'émission de fluorescence de ce type de chloroplastes.

L'absorbance à 680 nm nous indique la concentration arbitraire de chlorophylle dans la suspension. Le second paramètre de référence à 298 K est l'intensité de fluorescence à 683 nm dénotée F₆₈₃. Les paramètres de fluorescence à 77 K sont l'intensité de fluorescence à 683 nm (F₆₈₃), l'intensité de fluorescence à 735 nm sur l'intensité de fluorescence à 690 nm (F_{735/F690}) et finalement l'intensité de fluorescence à 735 nm sur l'intensité de fluorescence à 683 nm (F_{735/F683}). Nous avons également indiqué dans le tableau la largeur des fentes du monochromateur.

On peut rapidement tirer une conclusion des résultats du tableau 4. On remarque que les rapports F_{735/F690} et F_{735/F683} sont beaucoup plus grands lorsque la longueur d'onde d'excitation est 441 nm. Cette conclusion était à prévoir puisque nous avons déjà établi à l'aide du spectre d'excitation que

TABLEAU 4: Paramètres de fluorescence d'une suspension de chloroplastes bruts (λ exc = 441.6 nm)

T = 298 K

T = 77 K

A680	F683	Fente	F683	$\frac{F735}{F690}$	$\frac{F735}{F683}$
0.1	--	2 nm	100 uV	3.24	2.29

Paramètres de fluorescence d'une suspension de chloroplastes bruts (λ exc= 632.8)

0.1	310 uV	4 nm	290 uV	2.53	1.65
-----	--------	------	--------	------	------

dans le cas du laser He/Cd ($\lambda_{exc} = 441.6$) nous pourrions obtenir des intensités de fluorescence proche du maximum.

Pour en terminer avec les suspensions de chloroplastes bruts nous avons observé l'effet du dithionite de sodium sur ce type de suspension.

Un spectre de chloroplastes en présence de dithionite de sodium est montré à la figure 34. De nouveau, il s'agit de deux bandes dont les maxima sont à 683 nm et à 735 nm. L'épaulement vers 690 - 695 est presque imperceptible.

Les paramètres de fluorescence, lorsque les chloroplastes sont empoisonnés au dithionite de sodium sont résumés dans le tableau 5. Il semble a priori que le dithionite de sodium fasse augmenter faiblement le rapport F735/F683 comparativement à une suspension de chloroplastes sans dithionite (Voir le tableau 4). Par contre, la différence entre le rapport F735/F690 pour des chloroplastes avec dithionite ($F735/F690 = 4.05$) et des chloroplastes sans dithionite ($F735/F690 = 2.53$) est beaucoup plus marquante.

Ces résultats indiquent clairement que l'addition du dithionite de sodium à la suspension de chloroplastes fait augmenter la fluorescence provenant de l'un des photosystèmes.

Pour appuyer notre hypothèse nous allons définir la provenance des bandes de fluorescence. A la température ambiante, la fluorescence à 683 nm et le satellite vibrationnel sont attribuables à la chlorophylle a 678 du PS II. A 77 K, la fluorescence à 685 nm et à 695 nm sont attribuables à l'activité

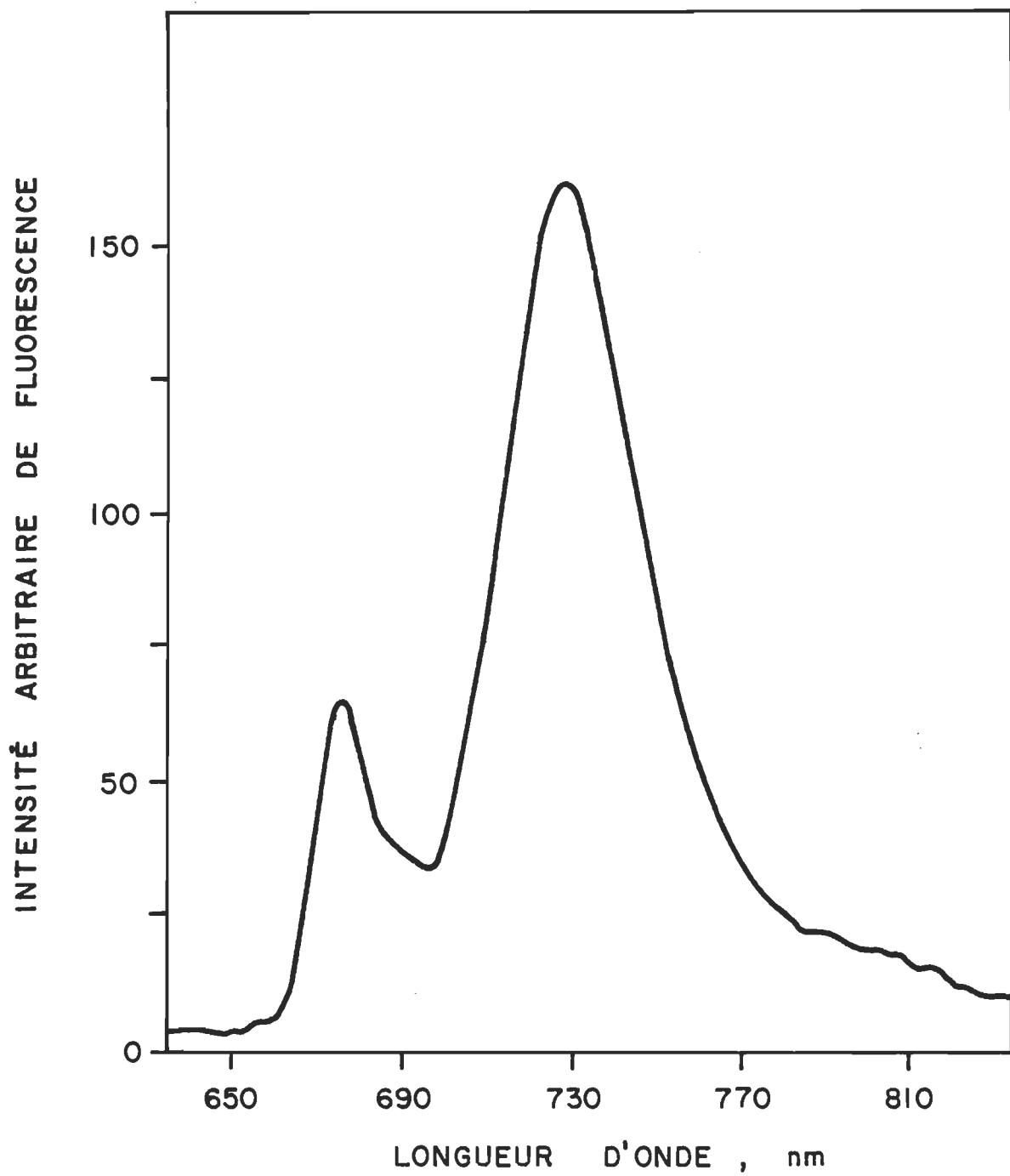


FIGURE 34 : SPECTRE DE FLUORESCENCE A 77 K D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES BRUTS EN PRESENCE DE 100 mM DE SODIUM DITHIONITE.

TABLEAU 5: Paramètres de fluorescence d'une suspension de chloroplastes bruts avec dithionite (λ exc = 632.8 nm)

T = 298 K	T = 77 K				
A680	F683	Fente	F683	$\frac{F735}{F690}$	$\frac{F735}{F683}$
0.09	96 uV	2 nm	66 uV	4.05	2.45
		4 nm	215 uV	4.10	2.67

du PS II (chl a 678); la plus grande partie de la fluorescence de la bande à 735 nm serait due à l'activité de PS I (chl a 705 du PS I).

D'autre part, on explique l'apparition à 77 K de la bande à 735 nm de la façon suivante: l'effet de la basse température ralentit l'activité photosynthétique du PS I; les photons absorbés par l'antenne collectrice du PS I ne sont plus utilisés pour les fins de la photosynthèse et sont réémis sous forme de fluorescence.

Suite à l'addition du dithionite de sodium, l'effet direct du poison serait de désorganiser l'arrangement spatial des molécules de chlorophylles au niveau des antennes collectrices du PS I; l'effet final serait l'augmentation de la fluorescence puisqu'il n'y aurait plus de transfert d'énergie. On doit également retenir l'hypothèse d'une action du dithionite de sodium au niveau du P 700; le surplus de fluorescence pourrait provenir des pièges d'énergie eux-mêmes. Dans les deux cas, l'effet du dithionite de sodium serait d'agir au niveau du PS I.

III.5.3 Spectre de fluorescence à 77 K d'une suspension de chloroplastes séparés sur gradient discontinu de Ludox et sur gradient continu de sucre

Dans cette dernière sous-section, nous présentons des spectres de fluorescence de chloroplastes séparés sur gradient discontinu de Ludox et sur gradient continu de sucre. Pour chaque classe de chloroplastes (classe I ou II) séparés sur ces deux types de gradients nous évaluerons les paramètres de fluorescence.

La figure 35, à gauche, montre un spectre d'émission à 77 K de chloroplastes intacts séparés sur gradient discontinu de Ludox.

Deux bandes d'émission sont observées à la température de l'azote liquide: leur maximum se situe à 683 et à 735 nm \pm 2 nm. L'épaulement vers 690 - 695 nm est très bien résolu (figure 35, à droite).

Ces résultats semblent conformes aux résultats obtenus par Govindjee et Yang (1966) sur des fragments de chloroplastes d'épinard sauf pour les exceptions suivantes:

- i) L'intensité de fluorescence de la bande à 695 nm est légèrement moins grande que l'intensité de fluorescence de la bande à 683 nm alors que chez les auteurs ci-haut mentionnés l'intensité de fluorescence à ces deux longueurs d'onde semble similaire.
- ii) De plus, pour une longueur d'onde d'excitation de 635 nm ils obtiennent un rapport F_{735}/F_{685} de 2.0 alors que pour une longueur d'onde d'excitation de 632.8 nm nous obtenons un rapport de 2.03.

Le profil de nos spectres est également différent de celui des spectres de fluorescence de chloroplastes intacts mesurés par Barber et Telfer (1964) et Telfer et coll 1976.

Dans tous ces cas, il est difficile de comparer les résultats obtenus car la méthode de préparation des chloroplastes, les méthodes de détection et les sources d'excitation sont différentes.

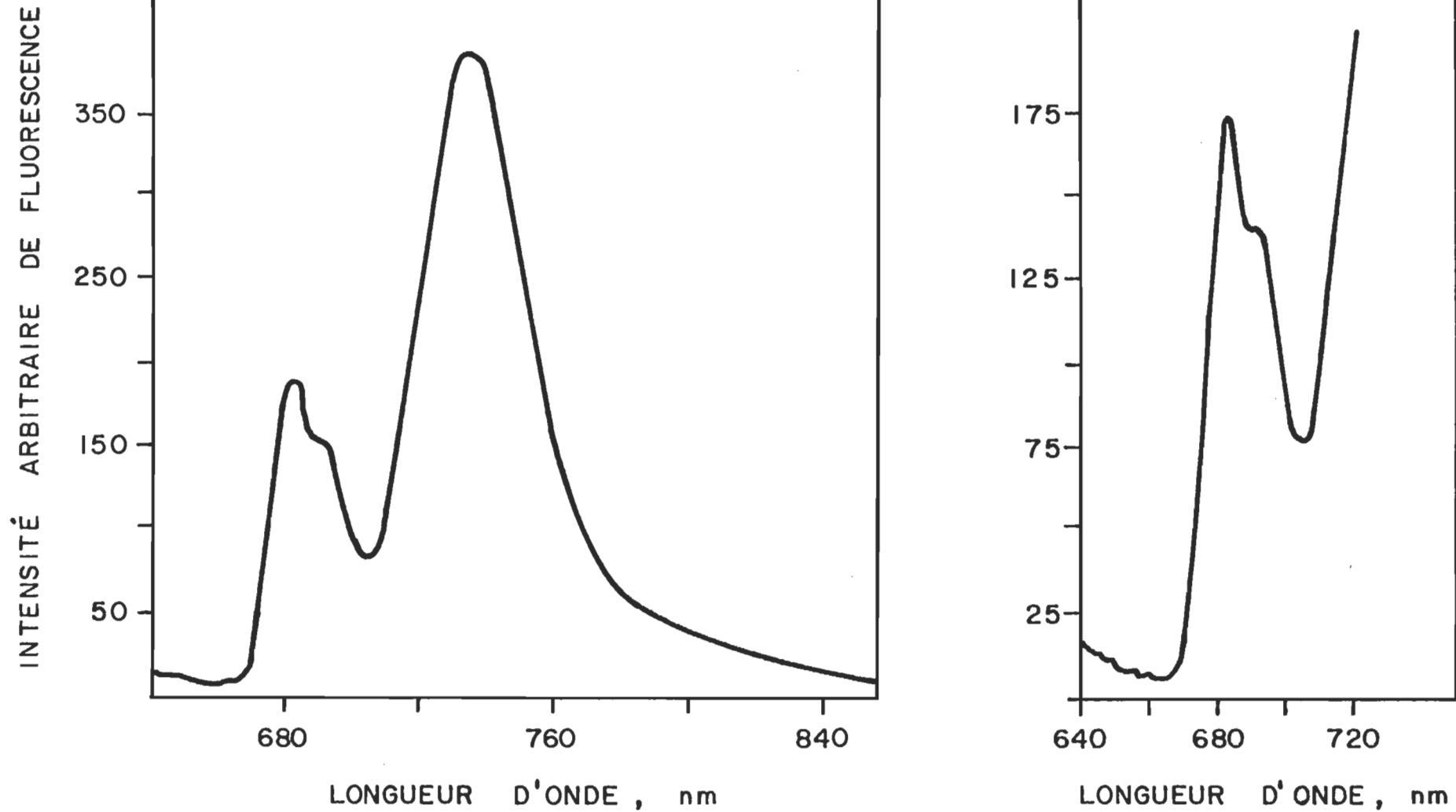


FIGURE 35 : SPECTRE DE FLUORESCENCE A 77 K D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES INTACTS SEPARES SUR GRADIENT DISCONTINU DE LUDOX

Il faut souligner que la résolution de la bande à 695 n'est possible qu'avec des fentes de 4 nm. Lorsque nous utilisons des fentes de 8 nm la bande à 695 se confond avec l'émission à 685 nm (figure 36).

Un spectre d'émission de chloroplastes mixtes (chloroplastes intacts et cassés mais dont la majorité sont cassés) séparés sur gradient discontinu de Ludox est montré à la figure 37.

Dans l'ensemble le spectre est similaire au spectre des chloroplastes intacts sauf que le rapport F_{735}/F_{693} a augmenté à 3.1.

Les paramètres de fluorescence des chloroplastes intacts et mixtes séparés sur gradient discontinu de Ludox sont résumés dans le tableau 6.

D'après les résultats inscrits dans ce tableau on peut tirer les conclusions suivantes. En ce qui concerne le rapport F_{735}/F_{683} il est similaire que ce soit dans le cas des chloroplastes de classe I (intacts) ou de classe II (cassés). Par contre il y a une différence assez appréciable entre le rapport F_{735}/F_{690} des chloroplastes intacts et le même rapport des chloroplastes cassés (à population mixte).

Il semble suite à ces résultats, que l'activité de fluorescence au niveau du PS I augmente légèrement dans le cas des chloroplastes qui ne retiennent plus leur membrane externe; la situation est comme si l'ablation de cette double membrane désorganiserait quelque peu l'arrangement spatial des molécules de chlorophylles au niveau du PS I; comme conséquence il y aurait une modification dans le réseau du transfert d'énergie et un excédent de fluorescence résulterait de cette anomalie.

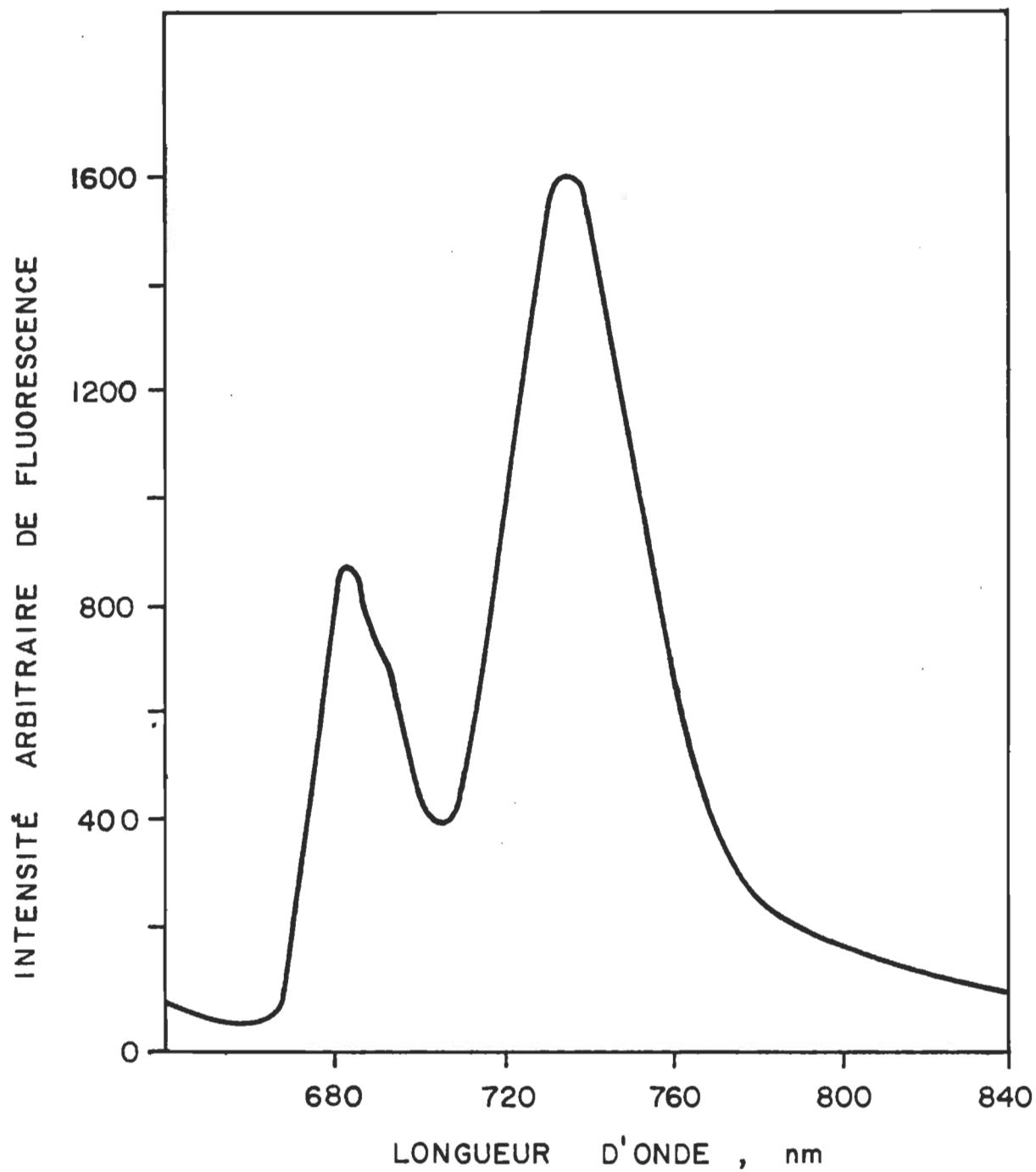


FIGURE 36 : SPECTRE DE FLUORESCENCE A 77 K D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES INTACTS SEPARES SUR GRADIENT DISCONTINU DE LUDOX (fente 8 nm)

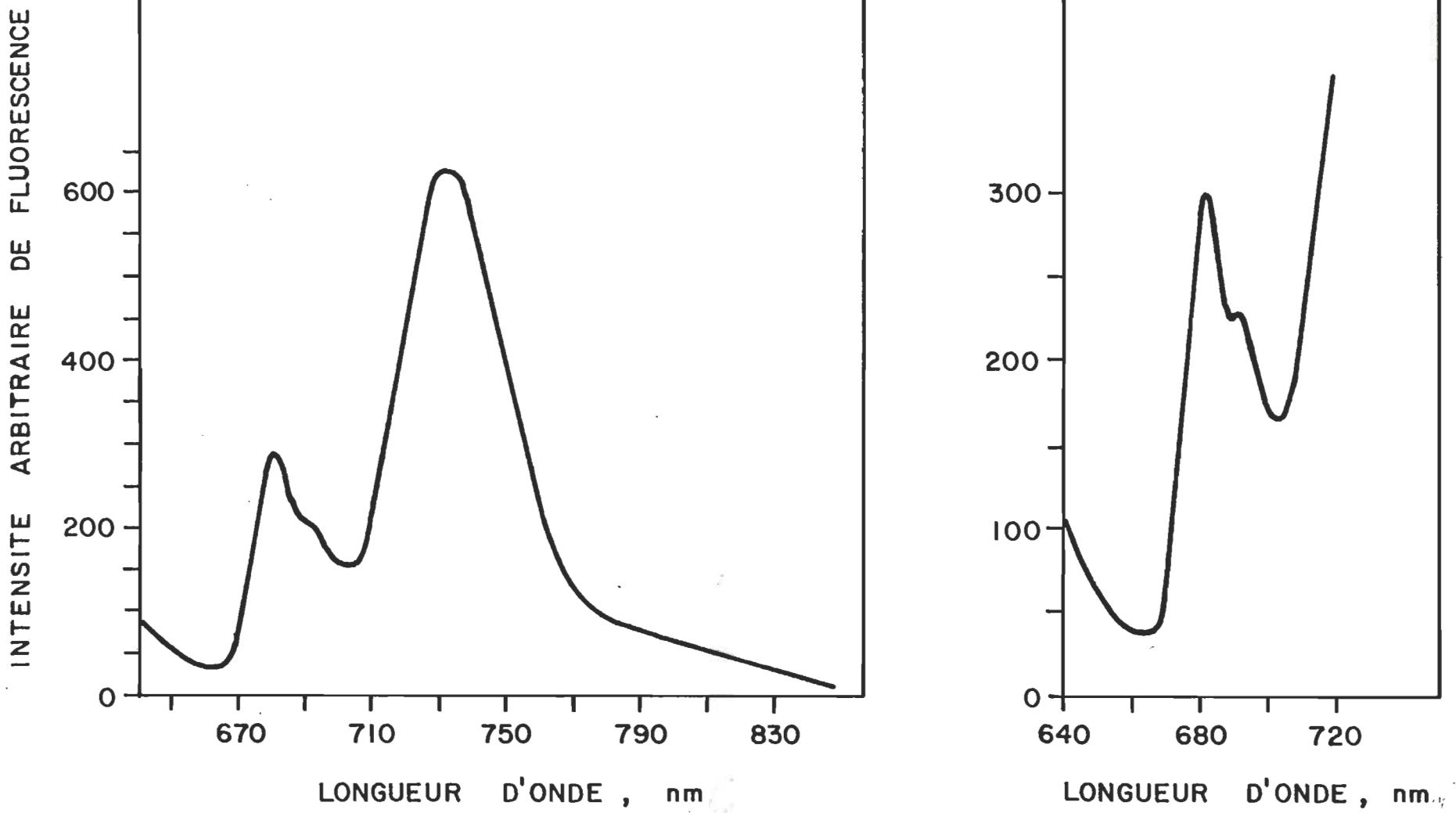


FIGURE 37 : SPECTRE DE FLUORESCENCE A 77 K D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES MIXTES SEPARES SUR GRADIENT DISCONTINU DE LUDOX

TABLEAU 6: Paramètres de fluorescence d'une suspension de chloroplastes intacts séparés sur gradient de Ludox ($\lambda_{exc} = 632.8 \text{ nm}$)

$T = 298 \text{ K}$

$T = 77 \text{ K}$

F683	A680	Fente	F683	$\frac{F735}{F690}$	$\frac{F735}{F683}$
1 mV	0.07	4 nm	0.9 mV	2.56	2.03

Paramètres de fluorescence d'une suspension de chloroplastes mixtes séparés sur gradient discontinu de Ludox.

1.36 mV	0.08	4 nm	1.0 mV	3.1	2.06
---------	------	------	--------	-----	------

Observons dans un second temps quelle est la situation dans le cas de chloroplastes séparés sur gradient de saccharose.

Un spectre de fluorescence (à 77 K) de chloroplastes intacts séparés sur gradient continu de saccharose nous est montré à la figure 38. Les caractéristiques spectrales de la suspension de chloroplastes sont les suivantes: deux bandes parfaitement résolues à 683 et 735 et un épaulement vers 690-695 nm. Cet épaulement est un peu mieux résolu à la figure 38 (à droite) alors que la sensibilité du détecteur a été doublée.

L'intensité de fluorescence à 683 nm est de 0.44 mv à 298 K alors que l'intensité de fluorescence à la même longueur d'onde mais à 77 K est de 0.36 mV.

Cette petite perte de signal est sûrement due à la diffusion de la lumière émise. Lorsque la température est abaissée à 77 K le mélange glycérol/H₂O ne forme pas un verre translucide; les points de cristallisation diffusent la lumière d'excitation autant que la lumière de fluorescence.

Le rapport F_{735}/F_{683} est de 2.11 alors que le rapport F_{735}/F_{690} est de 2.92 (Tableau 7).

Un spectre de fluorescence à 77 K de chloroplastes cassés séparés sur gradient continu de sucre nous est montré à la figure 39 (à gauche).

Les caractéristiques spectrales de la suspension de chloroplastes sont les suivantes: deux bandes, parfaitement résolues à 683 et 735 nm.

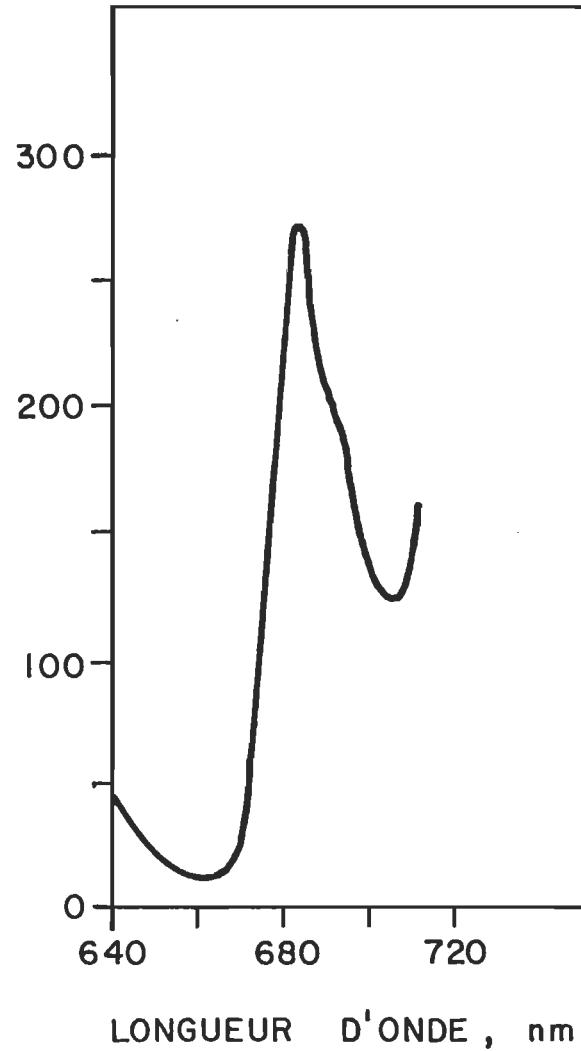
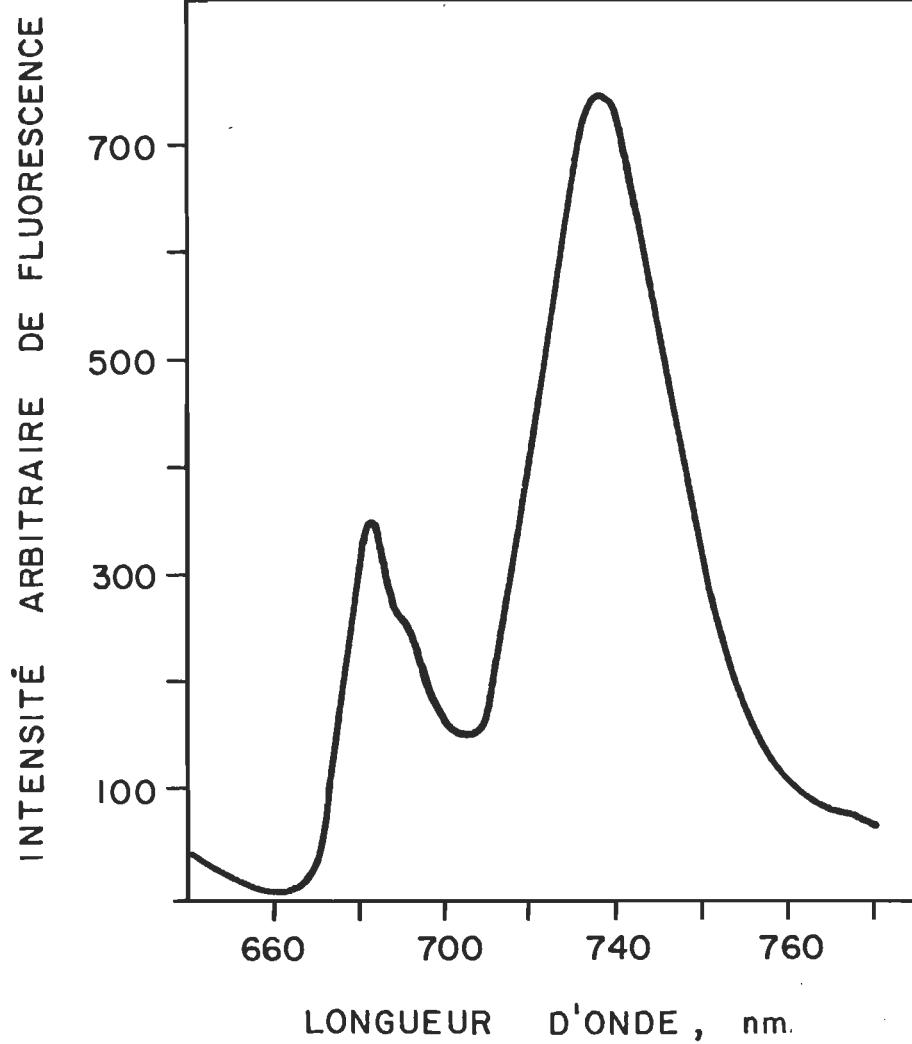


FIGURE 38 : SPECTRE DE FLUORESCENCE A 77 K' D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES INTACTS SEPARÉS SUR GRADIENT DE SUCROSE

TABLEAU 7: Paramètres de fluorescence d'une suspension de chloroplastes intacts séparés sur gradient continu de sucre. ($\lambda_{exc} = 632.8 \text{ nm}$)

$T = 298 \text{ K}$

$T = 77 \text{ K}$

F683	A680	Fente	F683	$\frac{F735}{F690}$	$\frac{F735}{F683}$
0.44 mV	0.13	4 nm	0.36	2.92	2.11

Paramètres de fluorescence d'une suspension de chloroplastes cassés séparés sur gradient continu de sucre. ($\lambda_{exc} = 632.8 \text{ nm}$)

0.51 mV	.09	4 nm	0.50	3.66	2.2
---------	-----	------	------	------	-----

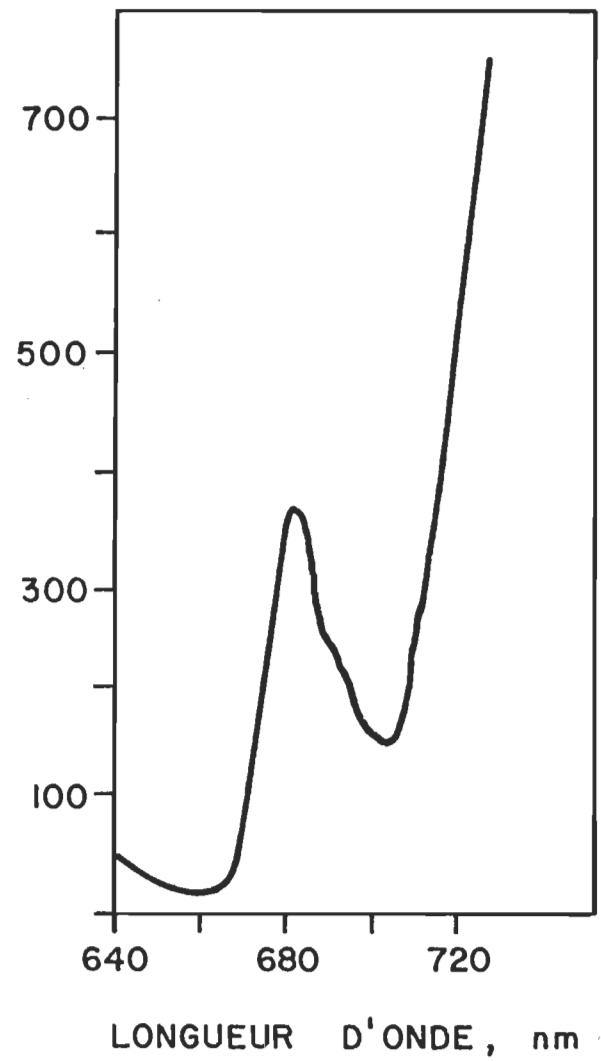
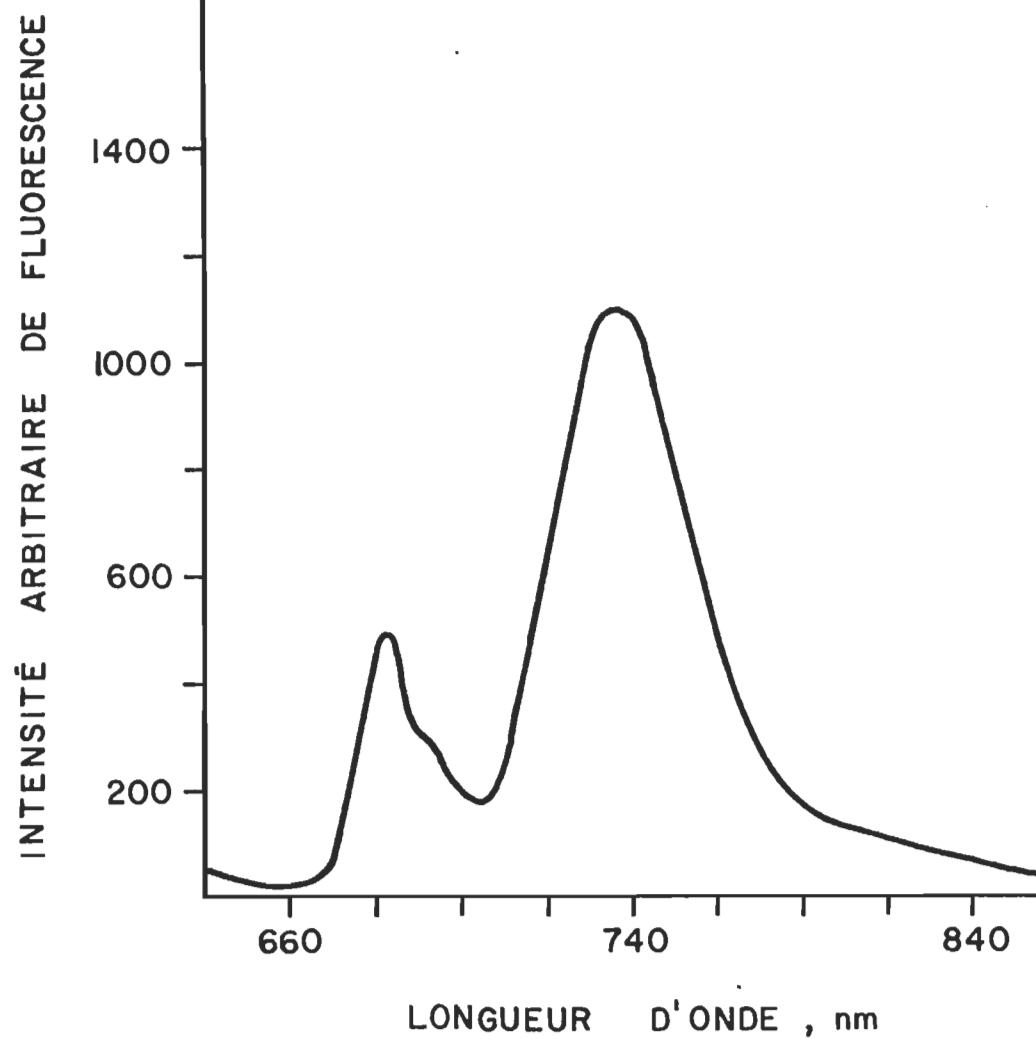


FIGURE 39 : SPECTRE DE FLUORESCENCE A 77 K D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES CASSES, SEPARES SUR GRADIENT CONTINU DE SUCROSE

L'épaulement entre 690 - 695 est presque imperceptible et ce, même lorsque la sensibilité du détecteur est doublée (figure 39, à droite).

L'intensité de fluorescence à 77 K à 683 nm et l'intensité de fluorescence à la même longueur d'onde mais à 298 K, est de 0.50 et 0.51 mV respectivement. La similitude des intensités de fluorescence aux températures opposées indique sûrement que le verre formé lors de l'abaissement de la température était en assez bon état.

Le rapport F735/F683 est 2.2 et le rapport F735/F690 est 3.66 (tableau 7).

Après avoir observé les spectres de fluorescence des différents types de chloroplastes ainsi que leurs paramètres de fluorescence, la question suivante se pose: Ces paramètres sont-ils indicateurs de la nature des chloroplastes ?

Avant d'ouvrir le débat nous voudrions préciser un autre phénomène observé.

Outre les problèmes mentionnés précédemment lorsque nous abaissons la température à 77 K, l'intensité de fluorescence d'une suspension de chloroplastes varie considérablement d'une journée à l'autre.

Pour ne donner qu'un exemple, l'intensité de fluorescence à 298 K d'une suspension de chloroplastes immédiatement après l'extraction est de l'ordre de 1000 à 1500 uV ($A_{680}=0.08$ et 0.13). Vingt-quatre heures plus tard,

l'intensité de fluorescence de la même suspension ne sera plus que de 400 à 1000 uV; 48 heures après l'extraction, l'intensité de fluorescence se maintient entre 150 et 400 uV. Il va sans dire que nous avons toujours travaillé dans le cas des chloroplastes séparés sur gradient, avec des suspensions fraîchement préparées. Maintenant revenons à la question.

Nous avons rassemblé dans le tableau 8 les différents types de chloroplastes avec leurs paramètres de fluorescence respectifs.

A première vue il semble que les rapports F735/F683 et F735/F690 sont indicateurs d'une relation entre la nature des chloroplastes et leur intensité de fluorescence.

Dans le cas des chloroplastes intacts et mixtes séparés sur gradient continu de Ludox, le rapport F735/F683 est similaire pour les deux types de chloroplastes, c'est dire que l'environnement de la chl a serait le même. Par contre, le rapport F735/F690 est différent; c'est dire que dans le PS I l'environnement de la chl a est différent pour chaque classe de chloroplastes.

Dans le cas des chloroplastes intacts et cassés, séparés sur gradient continu de sucre, le rapport F735/F683 est presque le même pour les deux classes de chloroplastes. Le rapport est de plus presque identique à celui des chloroplastes intacts et mixtes séparés sur gradient discontinu de Ludox.

Le rapport F735/F690 des chloroplastes séparés sur gradient est beaucoup plus grand dans le cas des chloroplastes cassés que dans le cas des chloroplastes intacts. Il est même encore plus grand que le rapport des

TABLEAU 8: Résumé des paramètres de fluorescence

T = 298 K		T = 77 K		
A680	F683	F683	F735 F690	F735 F683
1. Suspension de chloroplastes bruts.				
0.1	310 uV	290 uV	2.53	1.65
2. Suspension de chloroplastes intacts (Gradient de Ludox).				
0.07	1000 uV	900 uV	2.56	2.03
3. Suspension de chloroplastes mixtes (Gradient de Ludox).				
0.08	1360 uV	1000 uV	3.1	2.06
4. Suspension de chloroplastes intacts (Gradient de sucre).				
0.13	440 uV	360 uV	2.92	2.11
5. Suspension de chloroplastes cassés (Gradient de sucre).				
0.09	510 uV	500 uV	3.66	2.2

chloroplastes intacts et mixtes séparés sur gradient discontinu de Ludox.

Les résultats précédents démontrent qu'il semble exister un rapport entre l'état des chloroplastes et leurs paramètres de fluorescence. Pour établir rigoureusement la corrélation, il est clair que des données supplémentaires seraient nécessaires. Nous pensons à l'effet de certains poisons de la photosynthèse, la dénaturation par la chaleur et le vieillissement.

CHAPITRE IV

TENTATIVES DE MESURE DE LA PHOSPHORESCENCE DE LA CHLOROPHYLLE a IN VIVO

Dans ce chapitre, nous couvrons une émission bien particulière à la photosynthèse, c'est-à-dire l'émission de phosphorescence. Nous commençons par élaborer sur le rôle possible que peut jouer l'état triplet dans les processus primaires de la photosynthèse; nous discutons ensuite de la détection de l'état triplet par certaines techniques expérimentales dont entre autre, la détection par l'émission de phosphorescence. Finalement, nous terminons le chapitre en expliquant nos tentatives infructueuses de déterminer l'émission de phosphorescence.

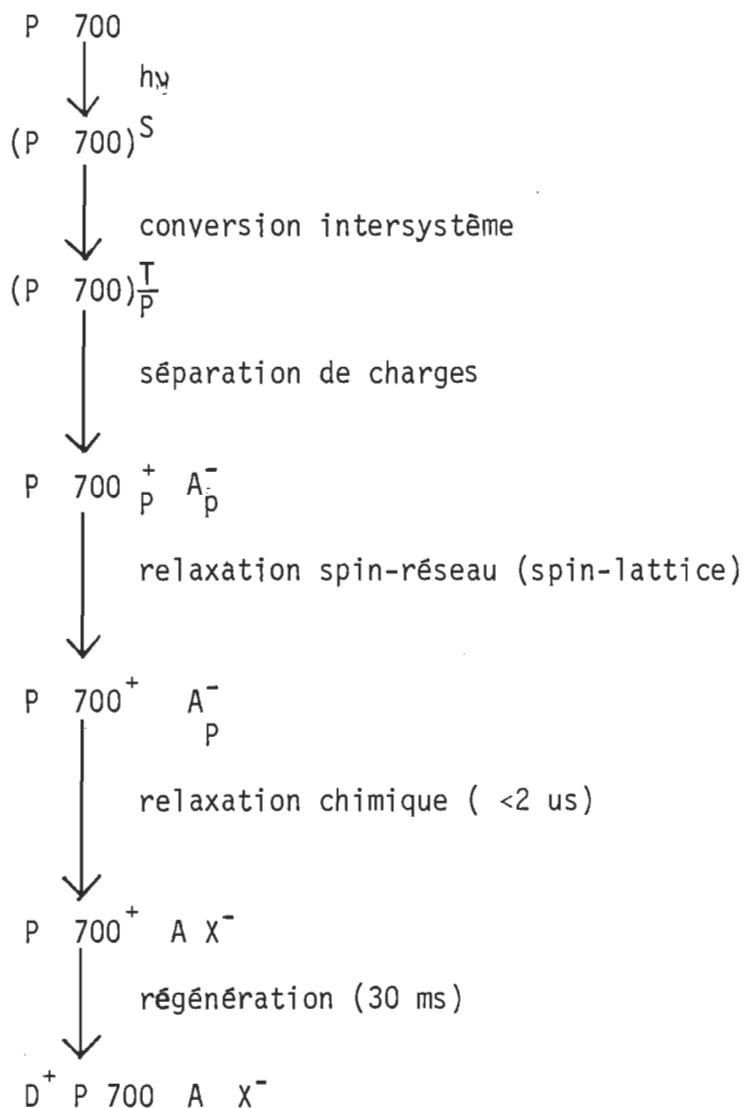
IV.1 Présence de l'état triplet dans les processus primaires de la photosynthèse.

On reconnaît maintenant que l'acte initial de la photosynthèse est la formation d'un oxydant P^+ et d'un réducteur X^- résultant de l'excitation du centre de réaction PX (Beddard 1976).



De plus, on croyait (McIntosh et Bolton 1976) que dans le cas du PS I et du PS II, le précurseur de la réaction du transfert d'un électron, devait être à l'état singulet excité. Ce point de vue était basé sur le fait que le temps de vie de fluorescence estimé à 7 picosecondes (Zankel et coll. 1968) au centre de réaction était beaucoup trop court comparativement au temps de vie de la conversion intersystème de 5 nanosecondes de la chlorophylle in vitro (Robinson 1967).

Mais la découverte d'un état triplet photoinduit chez la bactérie photosynthétique (Dutton et coll. 1973) et chez le chloroplaste (Uphaus et coll. 1974), a généré un débat à savoir si cet état triplet était un précurseur de la séparation des charges primaires tel le mécanisme suggéré par Blakenship et coll. (1975). Ce mécanisme peut s'écrire de la façon suivante:



où S et T désignent les états singulets et triplets de P₇₀₀

P désigne les espèces polarisées de spin

D et X sont le donneur et l'accepteur secondaire.

IV.2 Détection de l'état triplet

La polarisation d'un spin à l'état triplet photo-excité a été observée entre autre par spectroscopie de résonnance paramagnétique électronique (RPE) chez les porphyrines basiques (Levanon 1974) et chez les chlorophylles a et b (Levanon et Scherz 1975; Clarke et coll. 1976) à basse température (77 K).

Blakenship et coll. (1975) observent des signaux RPE exhibant le phénomène CIDEP (chemically induced dynamic electron polarisation) qui proviennent du photosystème I; Mc Intosh et Bolton (1976) observent le même phénomène mais le signal proviendrait cette fois-ci du photosystème II.

Des expériences de résonnance électronique dans un champ zéro par la technique de fluorescence induite de microondes (Hoff et van der Walls 1976) ont montré qu'il existait un triplet photoinduit chez le chloroplaste réduit et que ce triplet était lié au photosystème II.

Outre sa participation dans la séparation primaire des charges, l'état triplet pourrait avoir un rôle à jouer lors de la fluorescence retardée de la chlorophylle (Shuvalov 1976).

Il est connu que les molécules de chlorophylles chez les plantes vertes émettent de la lumière retardée (Strehler et Arnold 1951).

Depuis cette découverte, plusieurs chercheurs (Arnold et Sherwood 1957, Tollin et Calvin 1957, Brugger et Franck 1958, Lavorel 1969) ont attribué

cette émission à un processus de recombinaison trou-électron dans le chloroplaste.

D'autres (Robinson 1963, Franck et Rosenberg 1964, Lavorel 1969) ont suggéré que l'état triplet de la chlorophylle devait y jouer un certain rôle, c'est-à-dire que deux excitons triplet peuvent s'annihiler (fusion d'un exciton triplet) pour produire un état singulet excité qui pourrait revenir à l'état fondamental par l'émission d'un photon. L'argument le plus fort qui fût contre l'existence des états triplets chez le chloroplaste est basé sur les mesures de photolyse éclair qui a failli à démontrer l'absorption triplet - triplet (Muller et coll. 1963, Porter et Strauss 1966).

Stacy et coll. (1971) réexaminent le rôle de l'état triplet et relancent l'idée que la lumière retardée émise par les plantes peut s'expliquer par le modèle de la fusion d'un triplet; le médiateur de la production de ces triplets serait le centre de réaction du photosystème II.

Plus récemment (Shuvalov, 1976), l'état triplet aurait été mesuré à l'aide de données de fluorescence retardée à 20°C et par la phosphorescence de la chlorophylle à 77 K. Selon l'auteur, la fluorescence retardée à 20°C proviendrait de l'activation thermique d'un état triplet supérieur au niveau singulet excité de la chlorophylle, et à 77 K il serait dû à l'annihilation triplet- triplet.

A la suite de tous ces travaux, on constate que l'intermédiaire formé après l'absorption d'un photon est un radical d'ions pairés (Dutton et coll. 1973); mais on est loin d'avoir élucidé s'il existe une relation entre cet

intermédiaire et l'état triplet détecté via RPE ou encore si l'état triplet proviendrait de cet intermédiaire (Haberkorn et Beyerle 1977).

IV.3 Détection de l'état triplet via l'émission de phosphorescence

La détection de l'état triplet via l'émission de phosphorescence est également très limitée et plutôt contradictoire.

Quelques auteurs ont rapporté l'existence de phosphorescence $\pi-\pi$ de la chlorophylle b avec deux maxima d'émission à 860-890 nm et 915 nm. (Calvin et Dorough 1948, Becker et Kasha 1955, Singh et Becker 1960: voir le résumé dans le tableau 9).

L'émission de phosphorescence $\pi-\pi$ de la chlorophylle a avec des maxima à 885 nm et 925 nm a également été citée par Singh et Becker (1960).

D'autre part, Fernandez et Becker (1959) ont cité une émission de phosphorescence $n-\pi$ avec un maximum à 733 nm pour la chlorophylle b et à 755 nm pour la chlorophylle a.

Plus récemment, Krasnovskii et coll. (1973, 1974, 1975) rapportent l'émission de phosphorescence des chlorophylles a et b ainsi que de certains de leurs analogues.

Dans leur première publication (1973), ils suggèrent que le temps de décroissance de la phosphorescence est d'environ 10^{-3} s; si les maxima de l'émission s'étendent dans l'infrarouge. Les valeurs de ces maxima sont

TABLEAU 9: Résumé des paramètres de phosphorescence des chlorophylles et de leurs dérivés

AUTEUR	ANNEE	SUBSTANCE	EMISSION	TEMPS DE VIE s
<u>Calvin et Dorough</u>	1948	chl b	860	0.03
<u>Becker et Kasha</u>	1955	chl b	865	
<u>Fernandez et Becker</u>	1959	chl a	755	5×10^{-4}
		chl b	733	
<u>Singh et Becker</u>	1960	chl a	885,925	$> 5 \times 10^{-4}$
		chl b	875,915	$> 5 \times 10^{-4}$

Krasnovskii et coll. 1973

Temps de vie et émission maximum de pigments à 77 K. (Solvant: éthanol)

Pigment	Phosphorescence à 77 K	
	τ ms	$\lambda (\pm 15)$ nm
Chlorophylle a	1,6	985, 1050
Phéophytine a	1,4	940, 1000
Chlorophylle b	2,2	930, 1010
Phéophytine b	1,8	910, 980

Krasnovskii et coll. 1974

Principaux maximum (nm) des spectres d'excitation, de phosphorescence et des spectres d'émission de solutions de chlorophylle a et de phéophytine a.

Solvant	Chlorophylle <u>a</u>		Phéophytine <u>a</u>	
	Excitation	Émission	Excitation	Émission
Diéthyl éther	658	930	664	930
	618		605	
	431		536	
			508	
			418	

TABLEAU 9 (suite)

Solvant	Chlorophylle a Phosphorescence		Phéophytine a Phosphorescence	
	excitation	émission	excitation	émission
Ethanol	668 602 444	985	666 612 539 etc.	935
EPA	666 634 etc.	970	664 606 etc.	930
Ether ± Pyridine 6:1	669 640 etc.	975	665 610 etc.	940

Principaux maximum de phosphorescence (nm) de la chlorophylle *b* et de la phéophytine *b* dans différents solvants.

Solvant	chlorophylle b	phéophytine b
Diéthyl éther	890	890
Ethanol	912	910
EPA	890	890
Pentane	950	960

Krasnovskii et coll. 1975

Paramètres de phosphorescence de la chlorophylle et de ses analogues en solution et films à 77 K.

Les termes "monosolvates et disolvates" réfèrent aux pigments qui contiennent du magnésium. Les monosolvates sont prédominants dans le diéthyl éther, les disolvates sont prédominants dans les systèmes contenant de la pyridine et les agrégats dans les solvants non polaires et les films.

Chloroplastes et 100 mM de dithionite

Em. max. (nm)	τ
960	1,7

Mau et Puza 1977

Maximum de phosphorescence des chls (nm)

SOLVANT	PIGMENTS			
	Chl <u>a</u>	Phe <u>a</u>	Chl <u>b</u>	Phe <u>b</u>
Ethanol	960	932	901	900
EPA	950	922	890	888

résumées dans le tableau 9. Par exemple, pour la chl a dans l'éthanol les maxima se situent à 985 nm et 1050 nm avec un temps de vie de 1.6 ms.

Dans leur seconde publication (1974), ils étudient l'effet des solvants sur les propriétés spectrales de phosphorescence des chlorophylles a et b ainsi que de la phéophytine a et b. Les résultats de leur expérience sont présentés dans le tableau 9. Leurs résultats sont accompagnés des conclusions suivantes:

i) la phosphorescence de la chl a dans les solvants polaires est observée dans la région $\lambda > 900$ nm avec un temps de vie $\tau = 2.0 \pm 0.2$ ms.

Dans le mélange EPA (éther: pentane: éthanol 5:5:2), le maximum de l'émission de phosphorescence de la chl a est à 970 nm; dans le même mélange le maximum de l'émission de phosphorescence de la chl b se situe à 890 nm.

ii) Le maximum de l'émission dans le cas des phéophytines dans plusieurs solvants est déplacé vers les plus courtes longueurs d'onde; par exemple, il se situe à 935 nm dans le cas de la phéophytine a dans l'éthanol.

Il est à remarquer dans cette deuxième publication (1974) que des bandes d'émission ont été éliminées par rapport à la publication de 1973.

Dans leur troisième publication, ils présentent de nouveau les paramètres de phosphorescence de la chlorophylle et de ses analogues ainsi que du chloroplaste et de feuilles étiolées. Les résultats de leurs expériences sont de nouveau présentés dans le tableau 9. La conclusion à retenir est que l'émission de phosphorescence serait due aux solvates de courte

longueur d'onde dans les solvants polaires et aux monomères et aux agrégats dans les solvants non-polaires.

La même équipe russe aurait finalement détecté la phosphorescence de la protochlorophylle in vitro (Krasnovskii et coll. 1971), de la protochlorophylle in vivo (Krasnovskii et coll. 1975).

Tentant probablement d'élucider le problème, un autre groupe (Mau et Puza 1977) se lance dans la bataille de la détection de la phosphorescence de la chlorophylle. Leurs résultats sont présentés dans le tableau .9 à la suite des travaux de Krasnovskii et coll. On remarque que le maximum d'émission de la chl a dans l'éthanol ou dans l'EPA diffère du maximum d'émission trouvé par l'équipe russe. Dans le cas du maximum d'émission de la Phe a, de la chl b et de la Phe b les résultats sont à peu près similaires pour les deux équipes de recherche.

Suite à tous ces résultats, nous avons tenté d'embarquer dans la course de la détection de la phosphorescence de la chl a in vivo.

IV.4 Nos essais sur la détection de la phosphorescence de la chlorophylle in vivo

Nous avons fait des tentatives pour déceler l'émission de phosphorescence de la chl a "in vivo".

Nos premiers essais ont été effectués à l'aide du spectrofluorimètre laser équipé du détecteur pour le visible et le proche infra-rouge.

Les suspensions de chloroplastes intacts ou les suspensions de chloroplastes bruts dans le glycérol 60 % n'ont montré aucune émission dans le domaine spectral entre 800 et 1100 nm à 298 K ou à 77 K.

Les mêmes suspensions auxquelles nous avons ajoutés 100 mM de dithionite de sodium ne montrent pas d'émission entre 800 nm et 1100 nm à 298 K ou à 77 K.

Des suspensions de chloroplastes dégazées ne montrent pas d'émission non plus dans le domaine spectral déjà mentionné.

Les chloroplastes sont dégazés de la manière suivante:
Un volume de chloroplastes est déposé dans un ballon relié à une cellule. Le dispositif est tel qu'il permet de dégazer une solution et de la transférer dans la cellule sous vide: la suspension de chloroplastes dans le glycérol 60 % est refroidie à la température de l'azote liquide. Un vide de 1.33×10^{-3} Pa - 1.33×10^{-4} Pa est appliqué sur la suspension. Puis on laisse le milieu revenir à la température ambiante.

De nouveau la suspension est refroidie et le vide est appliqué. Cette opération est faite 5 fois.

Lorsque l'opération est terminée, une partie de la suspension de chloroplastes est transférée dans la cellule.

Le spectre de fluorescence à 298 K de cette suspension de chloroplastes est montré à la figure 40. On observe la bande majeure de fluorescence à

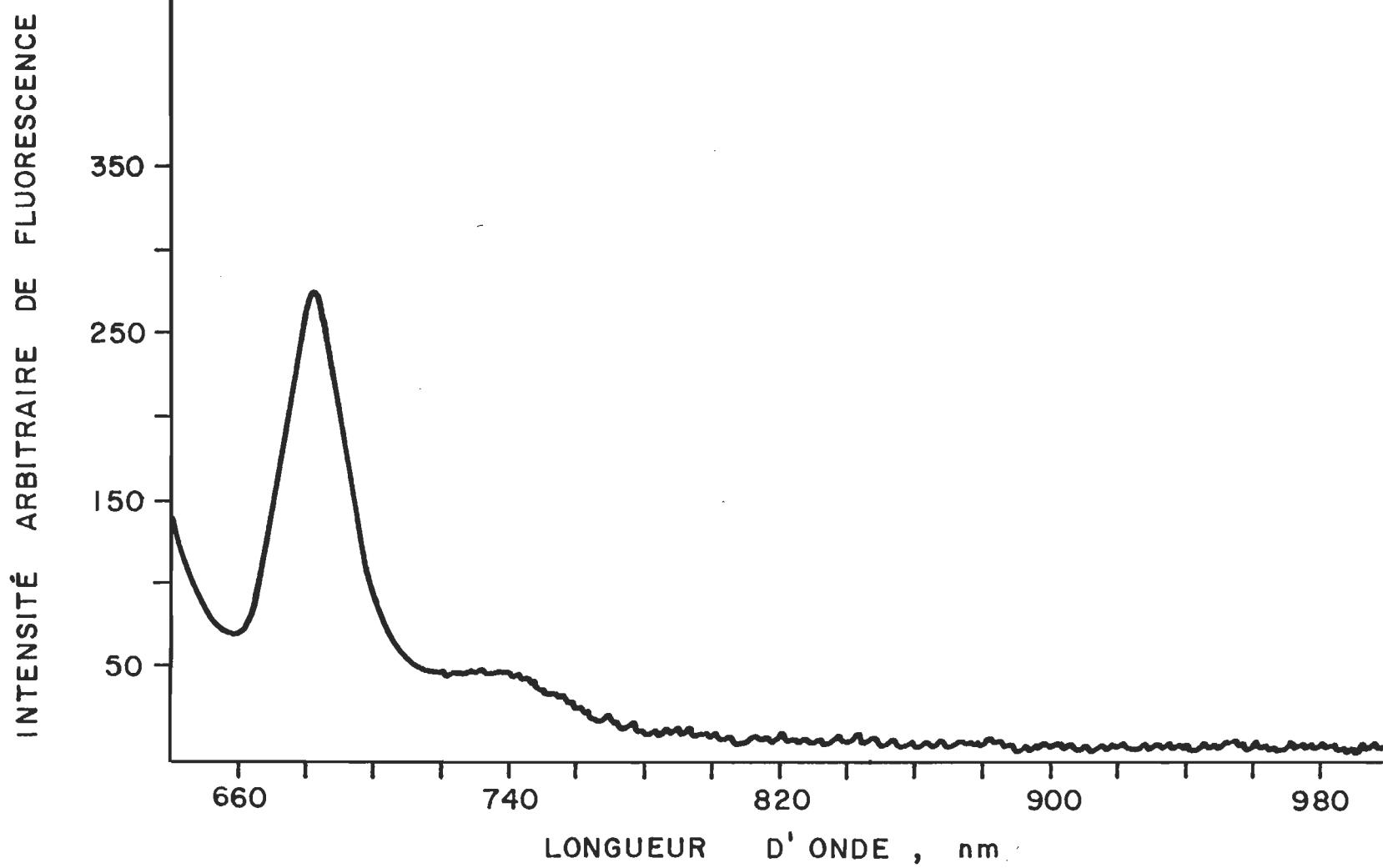


FIGURE 40 : SPECTRE D'EMISSION A 298 K D'UNE SUSPENSION DEGAZEE DE CHLOROPLASTES BRUTS

683 nm et le satellite vibrationnel vers 735 nm. Aucune émission de phosphorescence n'est détectée entre 770 et 990 nm.

Si on abaisse la température à 77 K (figure 41), on observe la première bande de fluorescence à 683 nm et la seconde à 735 nm. L'épaulement vers 690-695 nm n'est pas résolu car les fentes utilisées sont de 8 nm. De plus, même si on augmente la sensibilité du détecteur entre 780 et 1100 nm, aucune émission de phosphorescence n'est détectée (figure 45). Nous observons seulement la lente décroissance de la bande de fluorescence à 735 nm.

Une suspension de chloroplastes dans le glycérol 60 % auquel on a ajouté 50 mM de dithionite de sodium a été traitée sous vide de la même façon que la suspension précédente.

Son spectre de fluorescence à 77 K est montré à la figure 43. Il s'agit de nouveau d'une bande de fluorescence à 683 nm et d'une bande très intense à 735 nm. Aucune émission de phosphorescence est détectée jusqu'à 1100 nm. Entre 780 et 1100 nm nous observons la lente décroissance de la bande de fluorescence à 735 nm. Cette décroissance est du même type, telle que déjà présentée à la figure 42.

IV.5 Les contraintes à la mesure de l'émission de phosphorescence

Jusqu'à présent, nous n'avons pas détecté l'émission de phosphorescence de la chlorophylle soit in vivo ou soit in vitro. Nous pensons que les contraintes à mesurer l'émission de phosphorescence de la chl se résument à deux points: le rendement de l'émission et indirectement l'instrumentation utilisée.

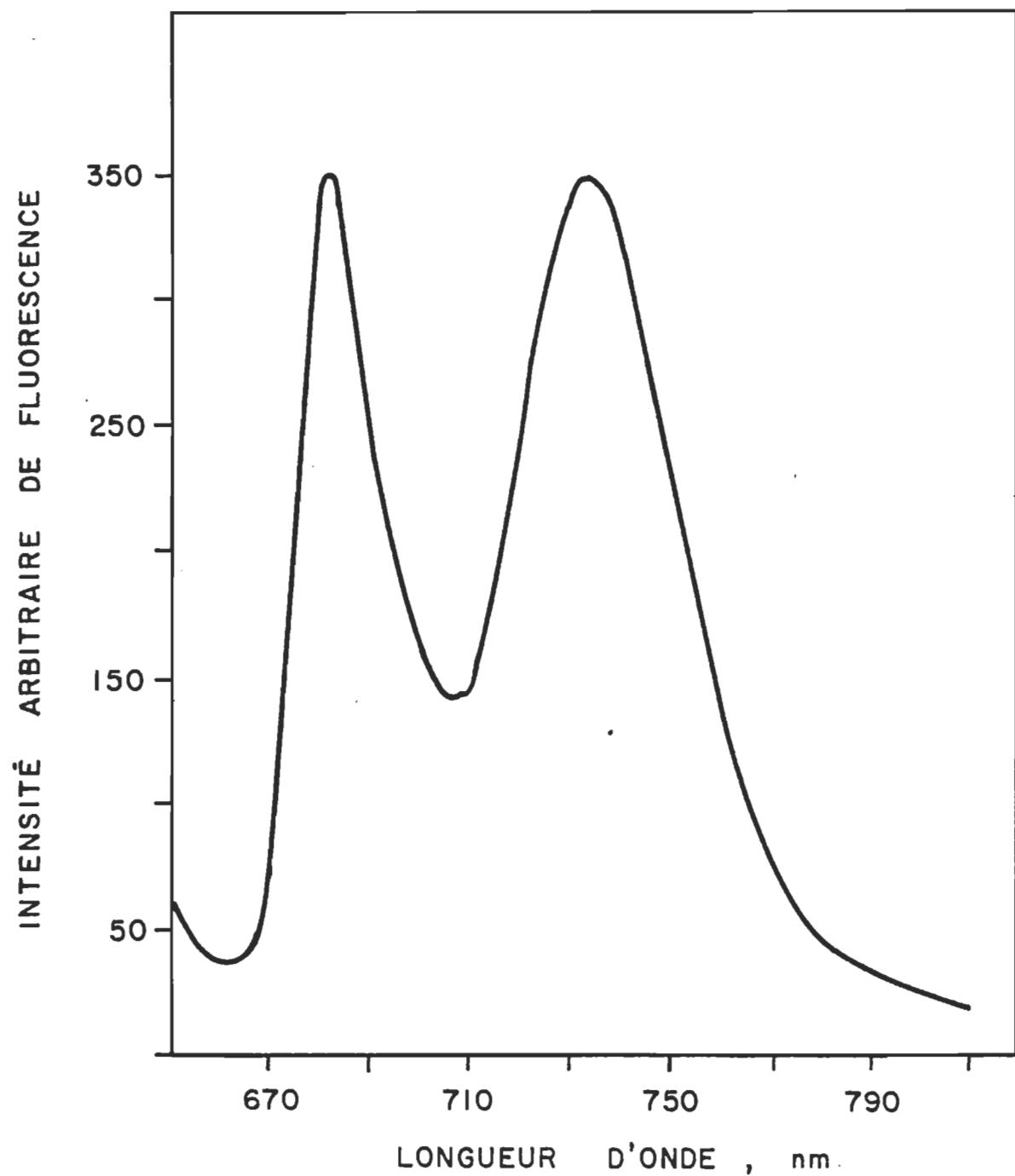


FIGURE 41 : SPECTRE D'EMISSION A 77 K D'UNE SUSPENSION DEGAZEE DE CHLOROPLASTES BRUTS

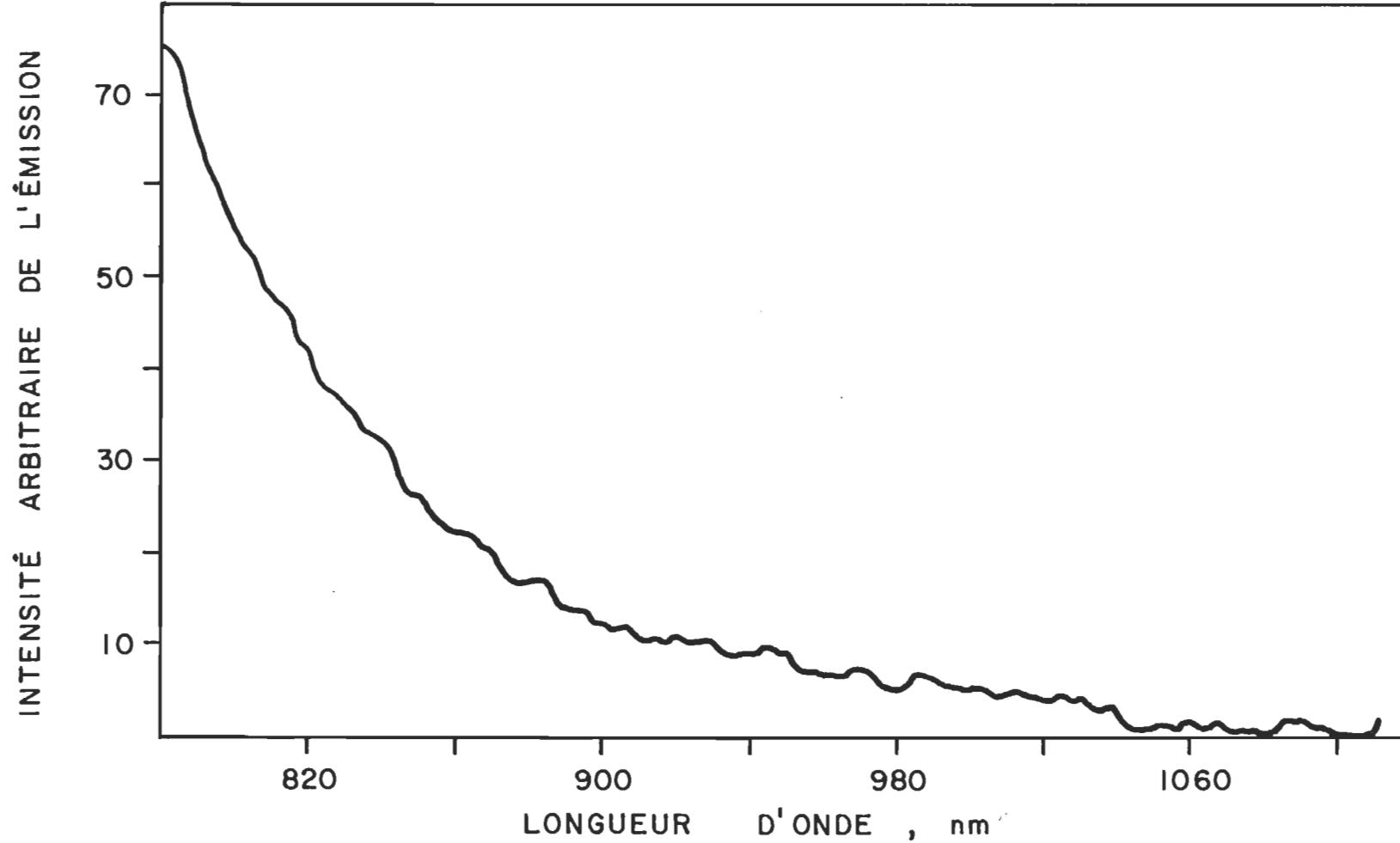


FIGURE 42 : SPECTRE D'EMISSION A 77 K DANS LE PROCHE INFRAROUGE D'UNE SUSPENSION DEGAZEE DE CHLOROPLASTES BRUTS

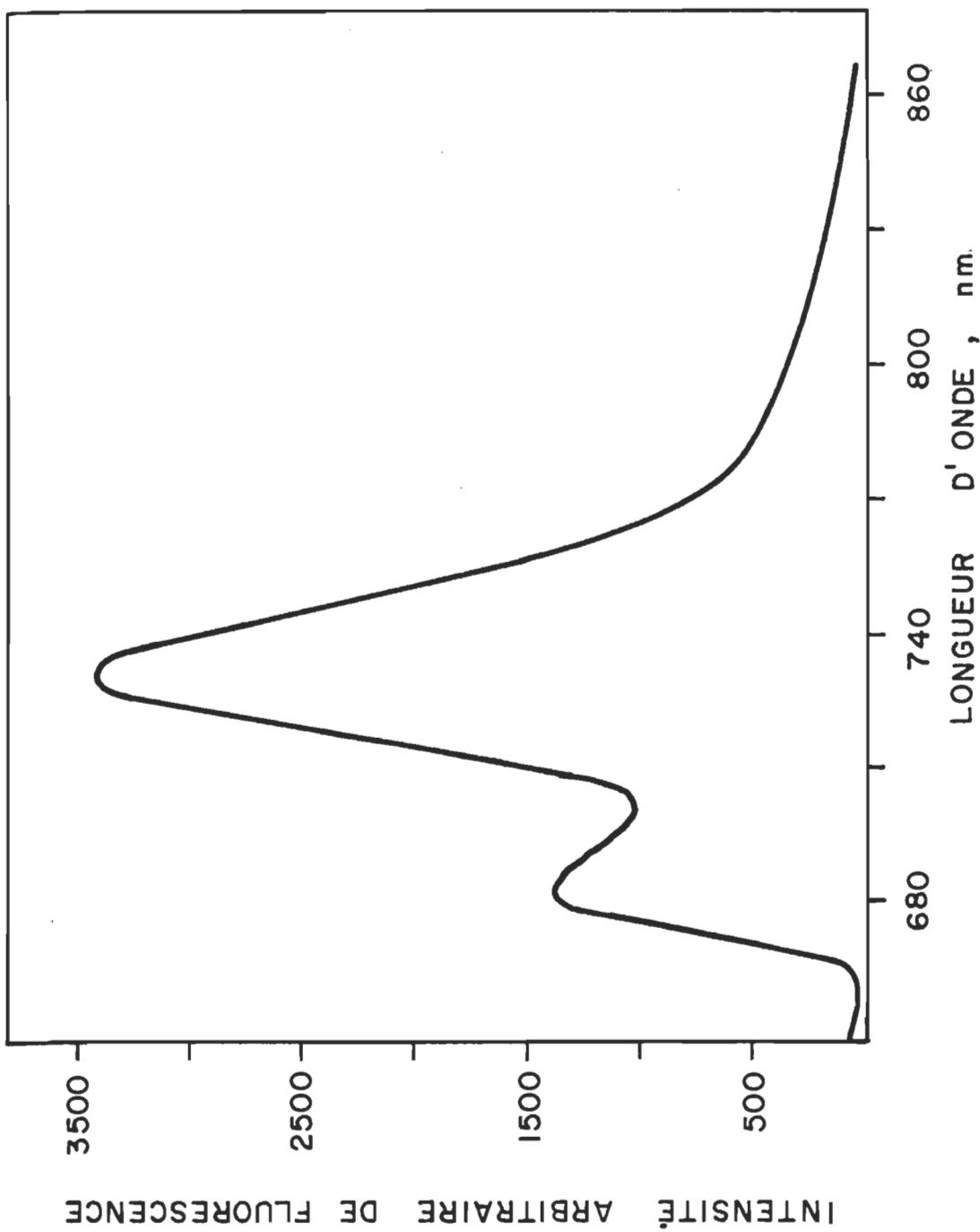


FIGURE 43 : SPECTRE D'EMISSION A 77 K D'UNE SUSPENSION DÉGAZÉE DE CHLOROPLASTES BRUTS (100 mM de dithionite de sodium)

L'émission de phosphorescence est dans le proche infra-rouge. La plupart des détecteurs sont insensibles dans cette région. Nous pensons que notre cellule photovoltaïque serait suffisamment sensible pour détecter le signal.

Mais le rendement quantique de phosphorescence semble être très faible. Selon Krasnovskii et coll. (1977), le rendement quantique de phosphorescence des chlorophylles est de 10^{-5} et sa demi-vie est de 10^{-4} s. Selon Mau et Puza (1977), le rendement quantique de phosphorescence de la chl a, phéo a, chl b, et phéo b serait de 5×10^{-5} .

Si le rendement quantique est aussi faible, il y a de sérieuse raison de penser que notre système de détection pour le visible et le proche infrarouge (mesure de la phosphorescence en continu) n'est pas assez sensible.

Une méthode indirecte de mesurer la sensibilité du système est le rapport signal de fluorescence sur bruit (S/N). En fluorescence, le signal maximum que nous pouvons obtenir à 735 nm et à 77 K. est 4000 uV. L'échelle de sensibilité de 10 uV de l'amplificateur lock-in est la limite pour que le signal d'une émission ne se confonde pas avec le bruit. Ceci indique que le rapport signal/bruit maximum est de 400. Pour un rendement quantique de 5×10^{-5} il faudrait donc un rapport S/N $2 \times 10^6/1$. Il est clair que le système pour le visible et le proche infra-rouge n'est pas assez sensible pour mesurer un signal de phosphorescence.

Le spectrophosphorimètre décrit à la section II.4 a permis d'augmenter le rapport signal/bruit à 3500/1.

Avec ce système, l'intensité du signal d'émission a été mesurée à 77 K à tous les 10 nm jusqu'à 1100 nm dans des suspensions de chloroplastes bruts contenant 100 mM de dithionite de sodium. Aucun signal de phosphorescence n'a été détecté.

Selon Shuvalov (1976), le rendement de la formation de l'état triplet au niveau du PS I est 0.9 fois le rendement de P-700⁻. In vitro, le rendement de la formation de l'état triplet de la chl a et de la chl b est de 0.64 et 0.88 respectivement (Porter et Strauss 1966).

Si le rendement quantique de phosphorescence est si faible, il faut croire que le destin de l'état triplet est orienté vers un processus de relaxation autre que l'émission de phosphorescence.

Selon Mau et Puza (1977), l'émission de phosphorescence peut aussi être masquée par la présence de certaines impuretés.

In vitro la phosphorescence de la chl peut être atténuee par les caroténoides.

In vivo, l'état triplet de la chlorophylle n'échappe pas davantage aux "quenchers". Selon Krasnovskii et coll. (1977), après la formation de l'appareil photosynthétique, le quenching de la luminescence provenant de l'état triplet est observé.

Les auteurs expliquent le phénomène par les deux hypothèses suivantes:

- l'état triplet participe à la photochimie primaire avant le processus de transition radiative (phosphorescence).
- Il pourrait y avoir quenching de l'état triplet suite à la migration non radiative entre molécules de chlorophylle pour se terminer à un quencher où il y aurait dissipation énergétique sous forme de chaleur (conversion interne)

Les caroténoides et les agrégats de chlorophylle aux grandes longueurs d'onde seraient les quenchers.

Pour observer la phosphorescence de la chl in vivo, les auteurs suggèrent des agents qui détruisent la structure naturelle du chloroplaste (v.g. chauffé au delà de 50°C, utiliser les solvants organiques, les détergents).

Le dithionite de sodium est utilisé car cet agent réducteur stimule la phosphorescence. Il semble que l'agent réducteur pourrait empêcher l'état triplet de participer à la photochimie primaire.

Comme ces conditions ont été respectées, il ne reste plus qu'à augmenter la sensibilité du système de détection.

Nous pensons qu'avec un photomultiplicateur du type S-1 (EMI) nous pourrions faciliter nos chances de détecter le signal de phosphorescence.

Le détecteur couplé au système pour le visible et le proche infrarouge (mesure de luminescence en continu) ou au spectrophosphorimètre laser (mesure discontinu de luminescence) nous permettrait, en premier lieu, de compléter cette étude. Dans un avenir immédiat, nous pourrions orienter l'étude vers le piège énergétique obtenu par traitement au détergent.

CHAPITRE V

CONCLUSION

CONCLUSION

Quelles que soient les mesures expérimentales effectuées sur un système in vivo, il serait souhaitable dans un avenir prochain d'avoir nos propres cultures de feuilles d'épinard. Une source d'épinard contrôlée se reflète sur la qualité des feuilles.

Par exemple, le rendement de chloroplastes intacts dès l'extraction des feuilles pourrait facilement être augmenté si nous pouvions choisir des plantes qui sont jeunes.

Les chloroplastes qui sont extraits de plants plus agés sont riches en grains d'amidon. Lors de la centrifugation ces grains sont poussés vers les membranes et causent leur rupture (Leech 1964). On peut minimiser la synthèse de l'amidon si l'intensité de lumière est contrôlée.

Le broyeur à hélice est également trop destructeur (Walker 1965). Un appareil tel le polytron devrait fournir de meilleurs rendements.

Nous avons déjà parlé du milieu de resuspension qui maintient la pression osmotique du milieu. Désormais le sorbitol devrait être utilisé à la place du sucre.

Quelques techniques peuvent nous indiquer le pourcentage de chloroplastes intacts dans une suspension de chloroplastes. Entre autres, il y a la microscopie électronique et la réaction de Hill.

La microscopie électronique est une méthode adéquate mais elle exige beaucoup de temps. La réduction du ferricyanure est une technique assez courte et suffisamment efficace.

Sur une moyenne statistique, elle permet de faire une bonne évaluation du pourcentage de chloroplastes intacts.

La séparation de chloroplastes sur gradient continu de sucre a été l'étape préliminaire ou plutôt une étape d'essai pour séparer les chloroplastes sur gradient de densité. Dans l'ensemble la séparation est efficace.

Mais ce type de gradient a le désavantage d'inhiber une activité photosynthétique importante, c'est-à-dire l'émission d'oxygène sous l'action de la lumière lorsque le CO_2 est l'oxydant unique.

Comme Morgenthaler et coll. (1974) avaient démontré que les chloroplastes séparés sur gradient continu de Ludox conservaient cette activité nous avons entrepris la séparation des chloroplastes sur ce type de gradient.

Le gradient continu de Ludox n'a pas toujours été efficace pour séparer les chloroplastes intacts des cassés. Par contre, la séparation sur gradient discontinu de Ludox a toujours été répétitive.

La séparation des chloroplastes sur gradient de densité de Ludox A.M. a permis de faire augmenter le pourcentage de chloroplastes intacts de 25 à 40% qu'il était dans une extraction simple à 75-80%.

La spectroscopie de fluorescence à 77 K des suspensions de chloroplastes semble indiquer qu'il existe une relation entre l'émission de fluorescence et la nature des chloroplastes. Des démonstrations expérimentales supplémentaires seraient nécessaires pour renforcer cette hypothèse.

Aucune émission de phosphorescence n'a été détectée avec l'appareillage que nous avons déjà décrit. En augmentant le rapport signal/bruit du spectrophosphorimètre laser, nous aurions de meilleures chances de démontrer l'existence de l'état triplet.

BIBLIOGRAPHIE

- Amesz, J., M.P.J. Pulles and B.R. Velthuys. 1973. Light-induced changes of fluorescence and absorbance in spinach chloroplasts at - 40⁰C. Biochim. Biophys. Acta. 325, 472-482.
- Arnold, W. and H.I. Kohn. 1934. The chlorophyll unit in photosynthesis. J. Gen. Physiol. 18, 109-112.
- Arnold, W. and H.K. Sherwood. 1957. Are chloroplasts semi-conductors ? Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 43, 105-114.
- Arnold, W. and J. Thompson. 1956. Delayed light production by blue green algae, red algae and purple bacteria. J. Gen. Physiol. 39, 311-18.
- Arnon, D.I. 1949. Copper Enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. Plant Physiol. 24, 1-15.
- Asada, K. and M. Takahashi. 1971. Conservation of electron transport and energy transfer reactions of spinach chloroplasts in glycerol. Plant Cell Physiol. 12, 709-715.
- Bannister, T.T. and G. Rice. 1968. Parallel time courses of oxygen evolution and chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophys. Acta. 162, 555-580.
- Barber, J. and A. Telfer. 1974. Ionic regulation in chloroplasts as monitored by prompted and delayed chlorophyll fluorescence. Membr. Transp. Plants.

(Int. Workshop). U. Zimmermann and J. Dainty. Springer; New-York. 281-288.

Barber, J. 1976. Cation control in photosyntheses. Trends Biochem. Sci. 1, 33-36.

Becker, R.S. and M. Kasha. 1955. Luminescence spectroscopy of porphyrin-like molecules including the chlorophylls. J. Amer. Chem. Soc. 77, 3669-3670.

Beddard, G. 1976. Chlorophyll dimer and triplet states-key roles in photosynthesis. Nature. 263, 459-460.

Bertsch, W., J.R. Azzi and J.B. Davidson. 1967. Delayed light studies in photosynthetic energy conversion. I. Identification of the oxygen - evolving photo-reaction as the delayed light emitter in mutants of SCENE - DESMUS OBLIQUUS. Biochim. Biophys. Acta. 143, 129-143.

Blakenship, R., A. Mc Guire and K. Sauer. 1975. Chemically induced dynamic electron polarisation in chloroplasts at room temperature: Evidence for triplet state participation in photosynthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 4943-4947.

Blinks, L.R. 1957. Chromatic transients in photosynthesis of red algae. In: Research in photosynthesis. H. Graffon, A.H. Brown, C.S. French, R.L. Strehler and N.E. Tolberts, Eds. Natl. Acad. Sci.-Natl. Research Council. 1955, (Pub 1957) 444-449.

- Brown, J.S. 1977. Fluorescence spectroscopy of a P700-chlorophyll-protein complex. *Photochem. Photobiol.* 26, 519-525.
- Brugger, J.E. and J. Franck. 1958. Experimental and theoretical contribution to studies of the afterglow of chlorophyll in plant materials. *Arch Biochem. Biophys.* 75, 465-496.
- Bruinsma, J. 1961. A comment on the spectrophotometric of chlorophyll. *Biochim. Biophys. Acta.* 52, 576-578.
- Butler, W.L. 1972. On the primary nature of fluorescence yield associated with photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 3420-3422.
- Calvin, M. and G.D. Dorrough. 1948. The possibility of triplet state intermediate in the photo-oxydation of a chlorin. *J. Amer. Chem. Soc.* 70, 699-706.
- Cho, F. and Govindjee. 1970 a. Low temperature (4 - 77 K) spectroscopy of chlorella; temperature dependence of energy transfer efficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 216, 139-150.
- Cho, F. and Govindjee. 1970 b. Fluorescence spectra of chlorella in the 295 - 77 K range. *Biochim. Biophys. Acta.* 205, 371-378.
- Clarke, R.H., R.E. Connors, T.J. Schaafsma, J.F. Kleibeuker and R.J. Platenkamp. 1976. The triplet state of chlorophyll. *J. Amer. Chem. Soc.* 98, 3674-3677.
- Clayton, R.K. 1969. Characteristics of prompt and delayed fluorescence from

spinach chloroplast. *Biophys. J.* 9, 60-76.

Cockburn, W., C.W. Baldry and D.A. Walker. 1967. Some effects of inorganic phosphate on O_2 evolution by isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 143, 614-624.

Colbow, K. and R.P. Danyluk. 1976. Energy transfer in photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 440, 107-121.

Den Haan, G.A., J.T. Warden and L.N.M. Duysens. 1973. Kinetics of the fluorescence yield of chlorophyll a in spinach chloroplasts at liquid nitrogen temperature during and following a 16 us flash. *Biochim. Biophys. Acta.* 325, 120-125.

Disch, O. 1977. La première photopile végétale artificielle. *Science et Vie.* 721, 71-73.

Doring, G., G. Renger, J. Vater and T.H. Witt. 1969. Properties of photoactive chlorophyll a in photosynthesis. *Z. Naturforsch. B* 24, 1139-1143.

Douce, R. et J. Joyard. 1977. Le chloroplaste. *Recherche.* 8, 527-538.

Dutton, H.J., W.M. Manning and B.M. Duggard. 1943. Chlorophyll fluorescence and energy transfer in the diatom Nitzschia Closterium. *J. Phys. Chem.* 47, 308-313.

Dutton, P.L., J.S. Leigh and D.W. Reed. 1973. Primary events in the photosynthetic reaction centre from rhodopseudomonas sphaeroides R26: triplet and

oxidized states of bacteriochlorophyll and the identification of the primary electron acceptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 292, 654-664.

Duysens, L.N.M. 1952. Transfer of excitation energy in photosynthesis. Ph. D. Thesis. Univ of Utrecht. The Netherlands. 96 p.

Emerson, R. and W. Arnold. 1932. A separation of the reactions in photosynthesis by means of intermittent light. *J. Gen. Physiol.* 15, 391-420.

Emerson, R. and C.M. Lewis. 1940. The dependance of the quantum yield of chlorella photosynthesis on wavelenght of light. *Amer. J. Bot.* 30, 165-178.

Emerson, R., R. Chalmers and C. Cederstrand. 1957. Some factors influencing the long-wave limit of photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 43, 133-143.

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

Emerson, R. and E. Rabinowitch. 1960. Red drop and role of auxiliary pigments in photosynthesis. *Plant Physiol.* 35, 477-485.

Fernandez, J. and R. Becker. 1959. Unique luminescence of dry chlorophyll. *J. Chem. Phys.* 31, 467-472.

Floyd, R.A., B. Chance and D. Devault. 1971. Low temperature photo-induced reactions in green leaves and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 226, 103-112.

- Fong, F.K. 1976. In vitro preparation and characterization of a 700 nm absorbing chlorophyll - water adduct according to the proposed primary molecular unit in photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1976, 52-64.
- Fragata, M. 1975. Effects of aging on chlorophyll fluorescence and photosystem II electron transport in isolated chloroplasts. *Can. J. Bot.* 53, 2842-2845.
- Franck, J. and J.L. Rosenberg. 1964. A theory of light utilisation in plant photosynthesis. *J. Theo. Biol.* 7, 276-301.
- French, C.S., J. Myers and G.C. Mc Lead. 1960. Automatic recording of photosynthesis action spectra used to measure the Emerson enhancement effect. *Symp. Comp. Biol.* 1, 361-365.
- French, C.S. 1971. The distribution and action in photosynthesis of several forms of chlorophyll. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 2893-2897.
- Gaffron, H. and K. Wohl. 1936 a. The theory of assimilation. *Naturwissenschaften.* 24, 81-90.
- Gaffron, H. and K. Wohl. 1936 b. The theory of assimilation. *Naturwissenschaften.* 24, 103-107.
- Gallinier, G. 1974. Importance du transfert d'énergie dans le système chlorophylle/B carotène à l'aide d'un spectrofluorimètre Laser. *Thèse de Maîtrise.* Université du Québec à Trois-Rivières. 180 p.

- Gasanov, R.A. and Govindjee. 1974. Chlorophyll fluorescence characteristics of photosystems I and II from grana and photosystem I from stroma lamellae. *Z. Planzenphysiol.* 72, 193-202.
- Goedheer, J.H.C. 1972. Fluorescence in relation to photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23, 87-112.
- Gorham, P.R. 1955. Preparation of chloroplasts and desintegrated chloroplasts. In: *Methods in Enzymology*. I. S. P. Colowick and N.O. Kaplan, Eds. Academic Press. New-York. 22-25.
- Govindjee and E. Rabinowitch. 1960. Two forms of chlorophyll a *in vivo* with distinct photochemical functions. *Science*. 132, 355-356.
- Govindjee and L. Yang. 1966. Structure of the red fluorescence band in chloroplasts. *J. Gen. Physiol.* 49, 763-780.
- Govindjee, G. Papageorgiou and E. Rabinowitch. 1967. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. In: *Fluorescence theory, instrumentation and practise*. G.G. Guilbault Ed. Dekker, New-York. 511-564.
- Govindjee, G. Papageorgiou and E. Rabinowitch. 1973. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. In: *Practical fluorescence; theory, methods and technique*. G.G. Guilbault, Ed. Dekker, New-York. 543-575.
- Govindjee and R. Govindjee, 1975. Introduction to photosynthesis. In: *Bioenergetics of photosynthesis*. Govindjee, Ed. Academic Press, New-York. 1-50.

Haberkorn, R. and M.E. Michel-Beyerle. 1977. Mechanism of triplet formation in photosynthesis via hyperfine interaction. FEBS Lett. 75, 5-8.

Hall, D.O. 1972. Nomenclature of isolated chloroplasts. Nature New Biol. 2, 1073-1074.

Heber, U. and K.A. Santarius. 1970. Direct and indirect transfer of ATP and ADP across the envelope. Z. Naturforsch. 25 b, 718-728.

Heber, U. 1974. Metabolite exchange between chloroplasts and cytoplasm. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25, 393-421.

Hercules, D.M. 1967. Fluorescence and phosphorescence analysis: principles and applications. Interscience. New-York. 258p.

Hill, R. and F. Bendall. 1960. Function of the two cytochrome components in chloroplasts - a working hypothesis. Nature (London). 186, 136-137.

Hipkins, M.F. and J. Barber. 1974 a. Estimation of the activation energy for millisecond delayed fluorescence from uncoupled chloroplasts. FEBS Lett. 42, 289-292.

Hipkins, M.F. and J. Barber. 1974 b. Analysis of kinetics and temperature sensitivity of delayed fluorescence from uncoupled spinach chloroplasts. Proc. Int. Congr. Photosynth. 3rd. M. Avron, Ed. Am. Elsevier. New-York. 101-114.

Hoff, A.J. and J.H. Van Der Walls. 1976. Zero field resonance and spin

alignment of the triplet state of chloroplasts at 2 K. *Biochim. Biophys. Acta.* 723, 615-620.

Joyard, J. and R. Douce. 1976. Préparation et activités enzymatiques des chloroplastes d'épinard. *Physiol. Veg.* 14, 31-48.

Jursinic, P. and Govindjee. 1972. Thermoluminescence and temperature effects on delayed light emission (corrected for changes in quantum yield of fluorescence) in DCMU - treated algae. *Photochem. Photobiol.* 15, 331-348.

Kamen, M.D. 1963. Primary processes, in photosynthesis. In: Advanced Biochemistry Vol I. A. San Pietro Ed. Academic Press. New-York. 183 p.

Kautsky, H., W. Apple and H. Amann. 1960. Chlorophyll fluorescence and carbonic acid assimilation. XIII. Fluorescence curve and photochemistry of plants. *Biochem Z.* 332, 277-292.

Ke, B. 1973. The primary electron acceptor of photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta.* 301, 1-33.

Kirk, J.T.O. 1968. Studies on the dependence of chlorophyll synthesis on protein synthesis in Euglena Gracilis, together with a nomogram for determination of chlorophyll concentration. *Planta.* 78, 200-207.

Kok, B. 1956. On the reversible absorption change at $705 \text{ m}\mu$ in photosynthetic organism. *Biochim. Biophys. Acta.* 22, 399-401.

- Krasnovskii, A.A. Jr., V.A. Shuvalov, F.F. Litvin and A.A. Krasnovskii. 1971. Phosphorescence and delayed fluorescence of protochlorophyll pigment. Dokl. Akad. Nauk SSSR. (Doklady Biophysics) 199, 85-88.
- Krasnovskii, A.A. Jr., V.A. Romanyuk, and F.F. Litvin. 1973. Phosphorescence and delayed fluorescence of chlorophylls and pheophytins a and b. Dokl. Akad. Nauk SSSR. (Doklady Biophysics) 209, 965-968.
- Krasnovskii, A.A. Jr., N.N. Lebedev and F.F. Litvin. 1974. Spectral characteristics of phosphorescence of chlorophylls and pheophytins a and b. Dokl. Akad. Nauk SSSR (Doklady Biophysics). 216, 39-42.
- Krasnovskii, A.A. Jr., N.N. Lebedev and F.F. Litvin. 1975. Detection of triplet states of chlorophyll and its precursors in leaves and chloroplasts from phosphorescence and delayed fluorescence at - 196⁰C. Dokl. Akad. Nauk SSSR (Doklady Biophysics). 225, 207-210.
- Krasnovskii, A.A. Jr., N.N. Lebedev and F.F. Litvin. 1977. Phosphorescence and delayed fluorescence of chlorophyll and its precursors in solutions, leaves and chloroplasts at 77 K. Stud. Biophys. 65, 81-89.
- Latimer, P. and E. Rabinowitch. 1956. Selective scattering of light by pigment-containing plant cells. J. Chem. Phys. 24, 480.
- Latimer, P. 1958. Apparent shifts of absorption bands of cell suspension and selective light scattering. Science. 127, 29-30.

Latimer, P. 1959. Influence of selective light scattering on measurements of absorption spectra of chlorella. Plant Physiol. 34, 193-199.

Lavorel, J. 1959. Induction of fluorescence in quinone poisoned chlorella. Plant Physiol. 34, 204-209.

Lavorel, J. 1962. Hétérogénéité de la chlorophylle in vivo. I. Spectres d'émission de fluorescence. Biochim. Biophys. Acta. 60, 510-623.

Lavorel, J. 1968. Sur une relation entre fluorescence et luminescence dans les systèmes photosynthétiques. Biochim. Biophys. Acta. 153, 727-730.

Lavorel, J. 1969. Relation between fluorescence in photosynthetic system. Prog. Photosynth. Res., Proc. Int. Congr. M. Helmut and V.C. Lichtenstern Eds. Munich. Ger. 2, 883-898.

Lavorel, J. and P. Joliot. 1972. A connected model of the photosynthetic unit. Biophys. J. 12, 815-31.

Lavorel, J. 1973. Simulation par la méthode de Monte Carlo, d'un modèle d'unités photosynthétiques connectées. Physiol. Veg. 11, 681-720.

Lavorel, J. 1975. Luminescence. In: Bioenergetics of photosynthesis. Govindjee Ed. Academic Press. New-York. 223-317.

Leblanc, R.M., G. Galinier, A. Tessier and L. Lemieux. 1975. Laser spectro-fluorimetry of chlorophylls. Can. J. Chem. 52, 3723-3737.

Leech, R.M. 1964. The isolation of structurally intact chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 79, 637-639.

Lesage, R. 1978. Contribution à l'étude de la luminescence des chlorophylles. Thèse de Maîtrise. Université du Québec à Trois-Rivières. 121 p.

Levanon, H. 1974. Photoexcited triplet state of free base porphyrins. Kinetic study by electron paramagnetic resonance. *Magn. Reson. Relat. Phenom., Proc. Congr. Ampere, 18 th.* P.S. Allen, E.R. Andrew and C.A. Bates, Eds. Amsterdam, Neth. 1, 225-226.

Levanon, H. and A. Scherze. 1975. EPR study of electron spin polarization in the photoexcited triplet state of chlorophyll a and b. *Chem. Phys. Lett.* 31, 157-161.

Lyttleton, J.W. 1970. Use of colloidal silica in density gradients to separate intact chloroplasts. *Anal. Biochem.* 38, 277-281.

Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140, 315-322.

Mar, T. and Govindjee. 1972. Decrease in the degree of polarization of chlorophyll fluorescence upon the addition of DCMU to algae. In: *Photosynthesis, two centuries after its discovery by Joseph Priestley.* Forti, G., M. Avron and B. A. Melandri. Eds. *Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd.* 1, 271-281.

Mau, A.W.H. and M. Puza. 1977. Phosphorescence of chlorophyll. Photochem. Photobiol. 25, 601-603.

McC. Lilley, R., M.P. Fitzgerald, K.G. Rienits and D.A. Walker. 1975. Criteria of intactness and the photosynthetic activity of spinach chloroplasts preparations. New Phytol. 75, 1-10.

Mc Intosh, A.R. and J.R. Bolton. 1976. Triplet state involvement in primary photochemistry of photosynthetic photosystem II. Nature. 263, 443-445.

Milfin, B.J. and H. Beevers. 1974. Isolation of intact plastids from a range of plant tissues. Plant. Physiol. 53, 870-874.

Morgenthaler, J.J., C.A. Price, J.M. Robinson and M. Gibbs. 1974. Photosynthetic activity of spinach chloroplasts after isopycnic centrifugation in gradients of silica. Plant. Physiol. 54, 532-534.

Morgenthaler, J.J., M.P.F. Marsden and C.A. Price. 1975. Factors affecting the separation of photosynthetically competent chloroplasts in gradient of silica sols. Arch. Biochem. Biophys. 168, 289-301.

Mousseron- Canet, M. et J.C. Mani. 1969. Photochimie et réactions moléculaires. Dunod. Paris. 244 p.

Mueller, A., R. Lumry and M.S. Walker. 1969. Light-intensity dependence of the in vivo fluorescence lifetime of chlorophyll. Photochem. Photobiol. 9, 113-126.

- Muller, A., B. Rumberg and H.T. Witt. 1963. On the mechanism of photosynthesis. Proc. Roy. Soc. B 157, 313-332.
- Nakatani, H.Y. and J. Barber. 1977. Improved method for isolating chloroplasts retaining their outer membrane. Biochim. Biophys. Acta. 461, 510-512.
- Newmann, J., J. Barber and P. Gregory. 1973. The relation between photophosphorylation and delayed light emission in chloroplasts. Plant. Physiol. 51, 1069-1073.
- Norris, J.R., H. Scheer, M.E. Druyan and J.J. Katz. 1974. An electron - nuclear double resonance (Endor) study of the special pair model for photo - reactive chlorophyll in photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4897-4900.
- Oster, G. 1965. Density gradients. Scient. Amer. 213, 70-76.
- Papageorgiou, G. 1975. Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. In: Bioenergetics of photosynthesis. Govindjee, Ed. Academic Press. New-York. 319-371.
- Porter, G. and G. Strauss. 1966. Studies of triplet chlorophyll by microbeam flash photolysis. Proc. Roy. Soc. (London) A 295, 1-12.
- Rabinowitch, E. and Govindjee. 1969. Photosynthesis. Wiley. New-York. 274 p.
- Robinson, G.W. 1963. Dynamic role of triplet states in photosynthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 49, 521-529.

Robinson, G.W. 1967. Excitation transfer and trapping in photosynthesis. U.S. Ht. Energy Comm. BNL 989 (C - 48), 16-48. (Brookhaven Symp. Biol. 19, 16-48).

Rocha, V. and I.P. Ting. 1970. Preparation of cellular plant organelles from spinach leaves. Arch. Biochem. Biophys. 140, 398-407.

Satoh, K., R. Strasser and W.L. Butler. 1976. A demonstration of energy transfer from photosystem II to photosystem I in chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 440, 337-345.

Sauer, K. 1975. Primary events and the trapping of energy. In: Bioenergetics of photosynthesis. Govindjee Ed. Academic Press. New-York. 115-181.

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

Shuvalov, V.A. 1976. The study of the primary photoprocesses in photosystem I of chloroplasts. Recombination luminescence, chlorophyll triplet state and triplet - triplet annihilation. Biochim. Biophys. Acta. 430, 113-121.

Singh, I.S. and R.S. Becker. 1960. The $\pi - \pi^*$ phosphorescence of chlorophylls a and b. J. Amer. Chem. Soc. 82, 2085-2084.

Stacy, W.T., T. Mar, C.E. Swenberg and Govindjee. 1971. An analysis of a triplet exciton model for the delayed light in chlorella. Photochem. Photobiol. 14, 197-219.

Still, C.C. and C.A. Price. 1967. Bulk separation of chloroplasts with intact membranes in the zonal centrifuges. *Biochim. Biophys. Acta.* 141, 176-178.

Strehler, B.L. and W. Arnold. 1951. Light production by green plants. *J. Gen. Physiol.* 34, 809-820.

Telfer, A., J. Nicolson and J. Barber. 1976. Cation control of chloroplasts structure and chlorophyll a fluorescence yield and its relevance to the intact chloroplast. *FEBS Lett.* 65, 77-83.

Thomas, J.B., O.H. Blaauw and L.N.M. Duysens. 1953. On the relation between size and photochemical activity of fragments of spinach grana. *Biochim. Biophys. Acta.* 10, 230-240.

Tollin, G. and M. Calvin. 1957. Luminescence of chlorophyll containing plant material. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 43, 895-908.

Uphaus, R.A., J.R. Norris and J.J. Katz. 1974. Triplet states in photosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 1057-1063.

Velthuys, B.R. and J. Amesz. 1975. Temperature and preillumination dependence of delayed fluorescence of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 376, 162-168.

Vermeglio, A. and P. Mathis. 1973. Photooxydation of cytochrome b_{559} and the electron donors in chloroplast photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta.* 292, 763-771.

Vishniac, W. 1957. Methods for study of the Hill Reaction. In: Methods in Enzymology. IV. S.P. Colowick and N.O. Kaplan, Eds. Academic Press. New-York, 342-355.

Walker, D.A. 1965. Photosynthetic activity of isolated pea chloroplasts. In: Biochemistry of the chloroplast. T.W. Goodyn Ed. Vol 2. Academic Press. New-York, 53-69.

Walker, D.A. 1971. Chloroplasts (and grana): Aqueous (including high carbon fixation ability). In: Methods in Enzymology XX III part A. San Pietro Ed. Academic Press. New-York. 211-220.

Wraight, C.A. and A.R. Crofts. 1971. Delayed fluorescence and the high energy state of chloroplasts. Eur. J. Biochem. 19, 386-397.

Zankel, K.L., D.W. Reed and R.K. Clayton. 1968. Fluorescence and photochemical quenching in photosynthetic reaction centers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 61, 1243-1249.