

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE ES SCIENCES

(SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT)

PAR

MARCEL MORIN

B.Sp.Sc. (CHIMIE)

ETUDE DES ISOTHERMES DE PRESSION DE  
SURFACE DU SYSTEME CHLOROPHYLLE/QUINONE

A L'INTERFACE AIR-EAU

NOVEMBRE 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.

## RESUME

La composition de l'unité photosynthétique, responsable de la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique, montre que les chlorophylles a et b et quelques quinones participent aux étapes primaires de la photosynthèse. Cependant, l'importance de l'interaction chlorophylle/quinone n'est pas encore bien connue.

Par la méthode des monocouches, laquelle nous permet de simuler une orientation probable des pigments photosynthétiques dans la membrane interne du chloroplaste, nous avons étudié les propriétés de pression de surface des systèmes chlorophylle/vitamine K<sub>1</sub>, chlorophylle/α-tocophérylquinone, chlorophylle/α-tocophérol et chlorophylle/phytol.

L'écart entre la loi additive des pressions de surface et les isothermes expérimentales détermine l'importance de cette interaction. Une analyse thermodynamique de ces résultats nous apporte une preuve supplémentaire de l'interaction chlorophylle/quinone.

Finalement, une étude en spectroscopie infrarouge du système chlorophylle a/α-tocophérylquinone nous permet de déterminer, d'une façon hypothétique, le type d'interaction entre la chlorophylle et la quinone.

Roger Leblanc

R.M. LEBLANC  
Directeur de Recherche

Marie Morin

M. MORIN  
Etudiant gradué M.Sc.

## Avant-propos

"Un arrangement ordonné est la tâche d'un homme de science. Une science est bâtie de faits tout comme une maison est bâtie de briques. Cependant, un simple ensemble de faits ne peut être appelé une science pas plus qu'une pile de briques peut être appelée une maison."

(Henri Poincaré)

"Le fait que nous n'avons pas réussi à nous voir comme étant une partie d'un monde immense et indivisible nous a probablement induit en erreur. Pendant trop longtemps, nous avons basé nos vies sur un sentiment primitif que le rôle de l'homme, donné par le Créateur, était de dominer les poissons de la mer, les oiseaux dans les cieux ainsi que toute chose vivante qui peut se mouvoir sur la terre. Nous n'avons pas réussi à comprendre que la terre ne nous appartient pas mais que nous appartenons à la terre."

(Rolf Edberg)

## REMERCIEMENTS

Un travail de recherche dans le domaine scientifique est souvent long et pénible, surtout au niveau des études graduées. Aussi, il est important d'avoir quelqu'un sur qui on peut compter en tout moment, en qui on peut avoir confiance et qui nous encourage à persévéérer dans les moments difficiles, bref un directeur de recherche qui prêche l'exemple par sa compétence et son ardeur au travail. Cette personne, c'est le Professeur Roger M. Leblanc. Lorsque je l'ai connu, il n'était, pour moi, qu'un professeur parmi tant d'autres. Il est devenu, après ces années de travail en sa compagnie, un ami pour qui j'ai énormément d'admiration. Roger, je te remercie du fond du cœur pour tout ce que tu as fait pour moi.

Je voudrais aussi remercier M. Gaétan Munger pour ses judicieux conseils et son aide lorsque le besoin se faisait sentir. Mes remerciements vont également au Professeur Jacques Aghion de l'Université de Liège en Belgique pour ses conseils et son encouragement prodigués à mon égard lors de ses séjours parmi nous au cours des années 1977 et 1978. Je voudrais aussi le remercier sincèrement pour son hospitalité lors de mon séjour dans son laboratoire de Liège en Février 1978.

Je remercie également Dr. Camille Chapados pour sa collaboration lors des travaux en spectroscopie infrarouge. Je tiens à remercier aussi tous les membres de l'équipe de recherche du Professeur Leblanc ainsi que les techniciens du Département de Chimie-Biologie pour l'atmosphère exceptionnelle de travail qui a régnée dans les laboratoires pendant tout le temps qu'a durée cette recherche.

Finalement, je voudrais exprimer mes sincères remerciements à Mlle Manon Goulet pour sa patience et son excellent travail lors de la dactylographie de cette thèse.

## TABLE DES MATIERES

	page
AVANT-PROPOS.....	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIERES.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xiv
1.0 INTRODUCTION.....	1
2.0 THEORIE ET RAPPEL DE LA LITTERATURE.....	3
2.1 Structure et fonction de l'appareil photosynthétique.....	3
2.1.1 Structure du chloroplaste.....	3
2.1.2 Transformation de l'énergie solaire en énergie chimique.....	6
2.1.3 Unité photosynthétique.....	9
2.1.4 Structure et orientation des pigments photosynthétiques.....	10
2.1.4.1 Les chlorophylles.....	10
2.1.4.2 Les autres pigments photosynthétiques (Quinones).....	13
2.2 Théorie sur l'état monomoléculaire de la chlorophylle.....	15
2.3 Interaction chlorophylle/quinone.....	24
2.3.1 En solution.....	24
2.3.2 A l'état monomoléculaire.....	34
3.0 BUT DE LA THESE.....	40
4.0 MATERIEL.....	42
4.1 Produits utilisés.....	42

4.1.1 Chlorophylles <u>a</u> et <u>b</u> .....	43
4.1.2 Vitamine K <sub>1</sub> et $\alpha$ -Tocophérylquinone.....	43
4.1.3 $\alpha$ -Tocophérol et Phytol.....	44
4.2 Appareils utilisés.....	44
4.3 Tableaux récapitulatifs.....	47
5.0 METHODES EXPERIMENTALES.....	54
5.1 Purification de l'eau.....	54
5.2 Extraction et purification des chlorophylles <u>a</u> et <u>b</u> .....	56
5.2.1 Extraction.....	57
5.2.2 Séparation chromatographique.....	59
5.2.3 Purification.....	61
5.2.4 Cristallisation et conservation.....	62
5.2.5 Vérification de la pureté.....	63
5.2.5.1 Spectroscopie d'absorption.....	63
5.2.5.2 Chromatographie sur couche mince (TLC).....	64
5.2.5.3 Isotherme de pression de surface.....	64
5.2.5.4 Autres techniques.....	65
5.3 Purification du phytol.....	65
5.4 Technique des monocouches.....	66
5.4.1 Théorie de Langmuir.....	66
5.4.2 Description du système.....	69
5.4.2.1 Méthode du cadran gradué en degrés.....	69
5.4.2.2 Méthode du transducteur magnétique linéaire.....	75
5.4.3 Technique de la manipulation.....	78
5.4.4 Etalonnage.....	83

5.4.4.1 Méthode des degrés.....	83
5.4.4.2 Méthode du transducteur.....	85
5.4.5 Isothermes de pression de surface.....	85
5.4.5.1 Standardisation.....	86
5.4.5.2 Isothermes des pigments photosynthétiques.....	86
5.4.5.3 Loi d'additivité.....	88
5.5 Spectroscopie infrarouge.....	90
5.5.1 Nettoyage des lamelles de germanium.....	91
5.5.2 Déposition des pigments sur la lamelle.....	91
6.0 RESULTATS ET DISCUSSION.....	94
6.1 Extraction et purification des chlorophylles.....	94
6.1.1 Critères de pureté des chlorophylles.....	94
6.1.1.1 Spectroscopie d'absorption.....	95
6.1.1.2 Chromatographie sur couche mince (TLC).....	99
6.1.1.3 Isothermes de pression de surface.....	100
6.1.2 Résultat global de la purification.....	100
6.2 Purification du phytol.....	102
6.3 Monocouches des pigments photosynthétiques.....	102
6.3.1 Etalonnage.....	103
6.3.1.1 Méthode des degrés.....	103
6.3.1.2 Méthode du transducteur.....	105
6.3.2 Standardisation.....	107
6.3.3 Isothermes de pression de surface des pigments photosynthétiques étudiés.....	110
6.3.3.1 Chlorophylle <u>a</u> .....	110

6.3.3.2 Chlorophylle b.....	115
6.3.3.3 Vitamine K <sub>1</sub> .....	116
6.3.3.4 $\alpha$ -Tocophérylquinone.....	120
6.3.3.5 $\alpha$ -Tocophérol.....	121
6.3.3.6 Phytol.....	125
6.3.3.7 Discussion.....	126
6.3.4 Isothermes de pression de surface du système chlorophylle/vitamine K <sub>1</sub> .....	129
6.3.4.1 Système chlorophylle <u>a</u> /vitamine K <sub>1</sub> .....	129
6.3.4.2 Système chlorophylle <u>b</u> /vitamine K <sub>1</sub> .....	131
6.3.4.3 Examen de la loi d'additivité. Discussion .....	134
6.3.5 Isothermes de pression de surface du système chlorophylle/ $\alpha$ -tocophérylquinone.....	138
6.3.5.1 Système chlorophylle <u>a</u> / $\alpha$ -tocophérylquinone.....	138
6.3.5.2 Système chlorophylle <u>b</u> / $\alpha$ -tocophérylquinone.....	142
6.3.5.3 Examen de la loi d'additivité. Discussion.....	144
6.3.6 Isothermes de pression de surface du système chlorophylle/ $\alpha$ -tocophérol.....	148
6.3.6.1 Système chlorophylle <u>a</u> / $\alpha$ -tocophérol.....	149
6.3.6.2 Examen de la loi d'additivité. Discussion.....	151
6.3.7 Isothermes de pression de surface du système chlorophylle / phytol.....	153
6.3.7.1 Système chlorophylle <u>a</u> /phytol.....	153
6.3.7.2 Examen de la loi d'additivité. Discussion.....	154
6.3.8 Vue d'ensemble des systèmes étudiés.....	158

6.4 Interprétation thermodynamique des résultats des différents systèmes binaires.....	160
6.5 Spectroscopie infrarouge du système chlorophylle <u>a/α-tocophérylquinone</u> .....	164
6.5.1 Spectroscopie de la chlorophylle <u>a</u> .....	166
6.5.2 Spectroscopie de l' <u>α</u> -tocophérylquinone.....	170
6.5.3 Spectroscopie du mélange chlorophylle <u>a/α-tocophérylquinone (0.80 : 0.20)</u> .....	172
7.0 CONCLUSION.....	176
8.0 BIBLIOGRAPHIE.....	179

## LISTE DES FIGURES

	<i>Page</i>
1. Structure du chloroplaste.....	5
2. Transfert d'électron dans le chloroplaste (Schéma en Z).....	7
3. Structure de la chlorophylle.....	12
4. Structure de la vitamine $K_1$ , l' $\alpha$ -tocophérylquinone, l' $\alpha$ -tocophérol et du phytol.....	14
5. Représentation schématique de la formation d'une monocouche d'acide gras selon la théorie de Langmuir.....	68
6. Système de Langmuir permettant l'étude à l'interface air-eau.....	70
7. Montage d'un transducteur magnétique linéaire sur le balan- cier d'un système de Langmuir.....	77
8. Principe de fonctionnement et caractéristiques d'un transduc- teur magnétique linéaire.....	79
9. Représentation schématique de l'orientation de molécules d'aci- de gras en monocouche avant (1) et après (2) compression.....	81
10. Distribution moléculaire possible résultant de l'étalement d'une monocouche "mixte" à l'interface air-eau.....	89
11. Spectre d'absorption des chlorophylles <u>a</u> et <u>b</u> en solution dans l'éther éthylique.....	98
12. Courbe d'étalonnage du système de Langmuir utilisant la méthode des degrés (Fil de torsion en Ni de 0.023 cm de diamètre).....	104
13. Courbe d'étalonnage du système de Langmuir utilisant le transducteur magnétique linéaire (Fil de torsion en acier de 0.038 cm de diamètre).....	106
14. Isothermes de pression de surface de l'acide arachidique.....	108
15. Isothermes de pression de surface des pigments photosyn- thétiques.....	112
16. Isothermes de pression de surface du système chlorophyl- le <u>a</u> /vitamine $K_1$ .....	130

17. Isothermes de pression de surface du système chlorophylle <u>b</u> /vitamine K <sub>1</sub> .....	133
18. Relation entre le $\Delta\sigma$ ( $\sigma$ exp. - $\sigma$ théo.) et la fraction molaire de chlorophylle <u>a</u> pour le système chlorophylle <u>a</u> /vitamine K <sub>1</sub> .....	136
19. Relation entre le $\Delta\sigma$ et la fraction molaire de chlorophylle <u>b</u> pour le système chlorophylle <u>b</u> /vitamine K <sub>1</sub> .....	139
20. Isothermes de pression de surface du système chlorophylle <u>a</u> / $\alpha$ -tocophérylquinone.....	141
21. Isothermes de pression de surface du système chlorophylle <u>b</u> / $\alpha$ -tocophérylquinone.....	143
22. Relation entre le $\Delta\sigma$ et la fraction molaire de chlorophylle <u>a</u> pour le système chlorophylle <u>a</u> / $\alpha$ -tocophérylquinone.....	146
23. Relation entre le $\Delta\sigma$ et la fraction molaire de chlorophylle <u>b</u> pour le système chlorophylle <u>b</u> / $\alpha$ -tocophérylquinone.....	147
24. Isothermes de pression de surface du système chlorophylle <u>a</u> / $\alpha$ -tocophérol.....	150
25. Relation entre le $\Delta\sigma$ et la fraction molaire de chlorophylle <u>a</u> pour le système chlorophylle <u>a</u> / $\alpha$ -tocophérol.....	152
26. Isothermes de pression de surface du système chlorophylle <u>a</u> /phytol.....	155
27. Relation entre le $\Delta\sigma$ et la fraction molaire de chlorophylle <u>a</u> pour le système chlorophylle <u>a</u> /phytol.....	157
28. Relation entre le $\Delta\sigma$ et la fraction molaire de chlorophylle pour les six systèmes étudiés.....	159
29. Relation entre l'excès d'énergie libre de mélange et la fraction molaire de chlorophylle <u>a</u> .....	163
30. Relation entre la variation de l'aire moléculaire à une pression donnée et la fraction molaire de chlorophylle <u>a</u> .....	165
31. Spectres infrarouge de l' $\alpha$ -tocophérylquinone, de la chlorophylle <u>a</u> et du mélange chlorophylle <u>a</u> / $\alpha$ -tocophérylquinone.....	168, 171

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
1. Résumé des travaux sur les monocouches de chlorophylle.....	16
2. Résumé des principaux travaux sur l'interaction chlorophylle/ quinone en solution.....	29
3. Résumé des travaux sur l'interaction chlorophylle/quinone à l'état monomoléculaire.....	38
4. Caractéristiques des produits chimiques.....	48
5. Caractéristiques des appareils et matériaux.....	51
6. Propriétés spectrales des chlorophylles <u>a</u> et <u>b</u> extraites et purifiées. Comparaison entre certaines valeurs déjà publiées et les valeurs obtenues pour la chlorophylle SIGMA.....	96
7. Aire moléculaire de l'acide arachidique: comparaison entre la valeur expérimentale et les valeurs de références.....	109
8. Paramètres expérimentaux des isothermes de pression de sur- face de la chlorophylle <u>a</u> . Comparaison avec des travaux antérieurs.....	114
9. Paramètres expérimentaux des isothermes de pression de sur- face de la chlorophylle <u>b</u> . Comparaison avec des travaux antérieurs.....	117
10. Paramètres expérimentaux des isothermes de pression de sur- face de la vitamine K <sub>1</sub> . Comparaison avec certains travaux antérieurs.....	119
11. Paramètres expérimentaux des isothermes de pression de sur- face de l' $\alpha$ -tocophérylquinone. Comparaison avec certains travaux antérieurs.....	122
12. Paramètres expérimentaux des isothermes de pression de sur- face de l' $\alpha$ -tocophérol. Comparaison avec certains travaux antérieurs.....	124
13. Paramètres expérimentaux des isothermes de pression de sur- face du phytol. Comparaison avec certains travaux antérieurs.....	127
14. Rapports de déposition pour la multicoche de chlorophylle <u>a</u> .....	167
15. Rapports de déposition pour la multicoche du mélange chloro- phylle <u>a</u> / $\alpha$ -tocophérylquinone (0.80:0.20).....	173

## LISTE DES ABREVIATIONS

Chl <u>a</u> :	Chlorophylle <u>a</u>
Chl <u>b</u> :	Chlorophylle <u>b</u>
$\alpha$ -TCPQ :	$\alpha$ -Tocophérylquinone
Vit. K <sub>1</sub> :	Vitamine K <sub>1</sub>
$\alpha$ -TCPol:	$\alpha$ -Tocophérol
PQ :	Plastoquinone
Cyt f :	Cytochrome f
PC :	Plastocyanine
PS I :	Photosystème I
PS II :	Photosystème II
P680 :	Centre réactionnel du photosystème II
P700 :	Centre réactionnel du photosystème I
FRS :	Substance réduisant la ferrédoxine
Fd :	Ferrédoxine
NADP :	Nicotinamide Adenine Dinucléotide Diphosphate
ADP :	Adénosine Diphosphate
ATP :	Adénosine Triphosphate
Pheo <u>a</u> :	Phéophytine <u>a</u>
ESR :	Electron Spin Resonance
EPR :	Electron Paramagnetic Resonance
PMR :	Proton Magnetic Resonance
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire

## 1.0 INTRODUCTION

Tous les efforts faits pour comprendre la base de la vie sur terre doivent toujours être ramenés à la photosynthèse, ce processus qui permet aux plantes de croître en utilisant le gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ), l'eau et de petites quantités de minéraux. La photosynthèse est un processus à grande échelle qui convertit des composés inorganiques simples et stables en une combinaison d'oxygène et de matières organiques riches en énergie, ce qui rend possible une vie abondante sur terre.

La transformation par les plantes vertes, les algues et autres organismes photosynthétiques d'une toute petite partie de l'énergie solaire (environ 1%) arrivant sur terre permet la fixation annuelle de milliards de tonnes de carbone dans les molécules organiques.

C'est essentiellement au sein d'organites très spécialisés, les chloroplastes, que se déroulent ces réactions. Ainsi, des mécanismes très élaborés permettent la transformation de l'énergie solaire en énergie chimique potentielle assimilable par tous les êtres vivants.

L'homme dépend étroitement de la production végétale pour vivre et se développer: chaque molécule d'oxygène que nous respirons, chaque atome de carbone de chaque molécule de notre corps a nécessairement traversé la membrane limitante d'un chloroplaste.

La connaissance des processus photosynthétiques devrait permettre, et permet déjà, d'améliorer les plantes en vue d'obtenir un meilleur rendement photosynthétique, et par conséquent, une meilleure productivité.

Par ailleurs, la perspective de voir nos réserves énergétiques s'épuiser est inquiétante; aussi, pour aider à résoudre ce problème, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes qui permettent aux végétaux d'utiliser l'énergie solaire, seule forme d'énergie qui parvienne en permanence sur la terre. Ces mécanismes de la photosynthèse sont nombreux et souvent très complexes. Nous nous sommes donc intéressé à un de ces mécanismes, soit celui qui régit l'interaction des chlorophylles avec les différentes quinones présentes dans le chloroplaste des végétaux.

## 2.0 THEORIE ET RAPPEL DE LA LITTERATURE

### 2.1 Structure et fonction de l'appareil photosynthétique

L'observation de la feuille d'un végétal supérieur fait apparaître les relations qui existent entre sa structure et sa fonction. La grande surface du limbe en fait un récepteur efficace du rayonnement solaire. Sa faible épaisseur, sa structure lacunaire et la présence de stomates sont favorables aux échanges gazeux. Les vaisseaux conducteurs, qui vont dans les moindres recoins de la feuille, la mettent en relation avec le reste de la plante. Ils véhiculent les molécules nécessaires à la photosynthèse et ils exportent les produits synthétisés. Enfin les cellules du parenchyme de la feuille contiennent dans leur cytoplasme une très grande quantité de chloroplastes. Ces organites, renfermant la totalité de la chlorophylle, sont spécialisés dans l'accomplissement de la photosynthèse. Dans un gramme de feuille d'épinard, il y a environ 500 millions de chloroplastes. En moyenne, c'est près de 60% de la masse totale des protéines de la feuille qui sont localisées dans ces organites.

#### 2.1.1 Structure du chloroplaste

Observé au microscope électronique, un chloroplaste d'épinard se présente comme un disque ovoïde de 7 à 8 microns de longueur sur 2 à 3 microns de diamètre. Il est limité par une double membrane, l'enveloppe, et renferme un réseau membranaire qu'on appelle les thylakoïdes.

L'espace limité par l'enveloppe et dans lequel baignent les thylakoïdes a, au microscope électronique, un aspect granuleux: c'est le stroma. Chacune de ces parties jouent un rôle bien particulier dans la photosynthèse. (Fig. 1)

Les thylakoïdes présentent une structure extrêmement ordonnée. Ils sont formés de vésicules closes, aplatis et plus ou moins longues. Les vésicules de petite taille sont très souvent empilées les unes sur les autres pour former les grana. Contrairement aux autres systèmes membranaires de végétaux, la membrane des thylakoïdes est remarquablement pauvre en phospholipides. Cependant, 80% des lipides polaires de la membrane des thylakoïdes sont des glycolipides, galactolipides et sulfolipides. De plus, c'est dans cette membrane que se trouvent localisés spécifiquement les chlorophylles et d'autres pigments tels les caroténoides et les quinones. Par ailleurs, près de la moitié des protéines du chloroplaste sont concentrées dans la membrane des thylakoïdes. Parmi elles, on a pu caractériser des cytochromes et de la plastocyanine, protéines pouvant, selon leur environnement, recevoir ou céder des électrons. Les thylakoïdes baignent dans une phase liquide, le stroma, qui contient l'autre 50% des protéines du chloroplaste. La double membrane du chloroplaste, l'enveloppe, maintient en étroit contact les thylakoïdes avec les protéines du stroma.

Ces structures sont les supports d'activités enzymatiques participant d'une manière ou d'une autre à la photosynthèse. Grâce à l'utilisation de chloroplastes isolés rigoureusement intacts, il est possible

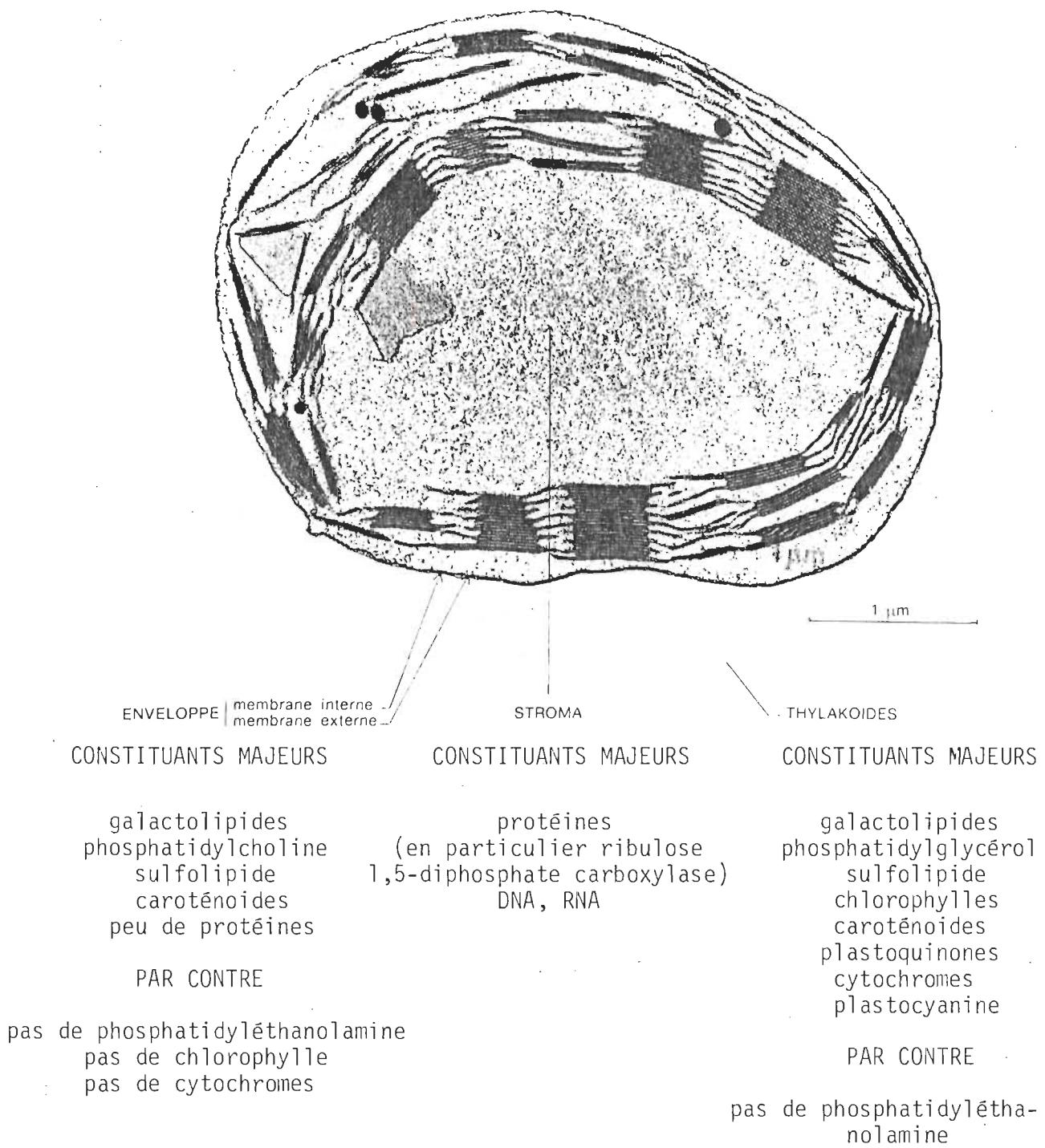


FIGURE 1. Structure du chloroplaste (Douce et Joyard, 1977).

de localiser avec une très grande précision les différentes étapes du processus photosynthétique: absorption de la lumière, dégagement d'oxygène, fixation du gaz carbonique, synthèse et transport des molécules carbonées.

### 2.1.2 Transformation de l'énergie solaire en énergie chimique

Les thylakoïdes sont le siège des réactions primaires de la photosynthèse, i.e. des réactions transformant l'énergie lumineuse en énergie chimique utilisée ensuite dans le stroma pour la réduction du gaz carbonique. Lorsqu'on illumine les thylakoïdes, un transfert d'électrons s'établit entre l'eau et un accepteur final (X) dont la structure n'est pas encore établie (Fig. 2). Comme le potentiel d'oxydoréduction de l'eau ( $E_0^1 = \pm 0.81$  volt) est nettement supérieur au potentiel d'oxydoréduction de l'accepteur final ( $E_0^1 = - 0.6$  volt), il faut un apport d'énergie pour que ce transfert puisse s'effectuer; c'est ce qu'apporte la lumière. De plus, à ce transfert d'électrons est couplée la phosphorylation de l'ADP en ATP, qui constitue un système de stockage de l'énergie.

L'énergie lumineuse est captée au sein de la membrane des thylakoïdes par deux antennes collectrices, appartenant chacune à l'un des photosystèmes successifs: le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII) (Fig. 2). Ces antennes sont constituées par un ensemble de protéines et de pigments (chlorophylles, caroténoides) qui absorbent l'énergie lumineuse et la cèdent ensuite par résonance à une forme particulière de chlorophylle a, différente pour chacun des photosystèmes.

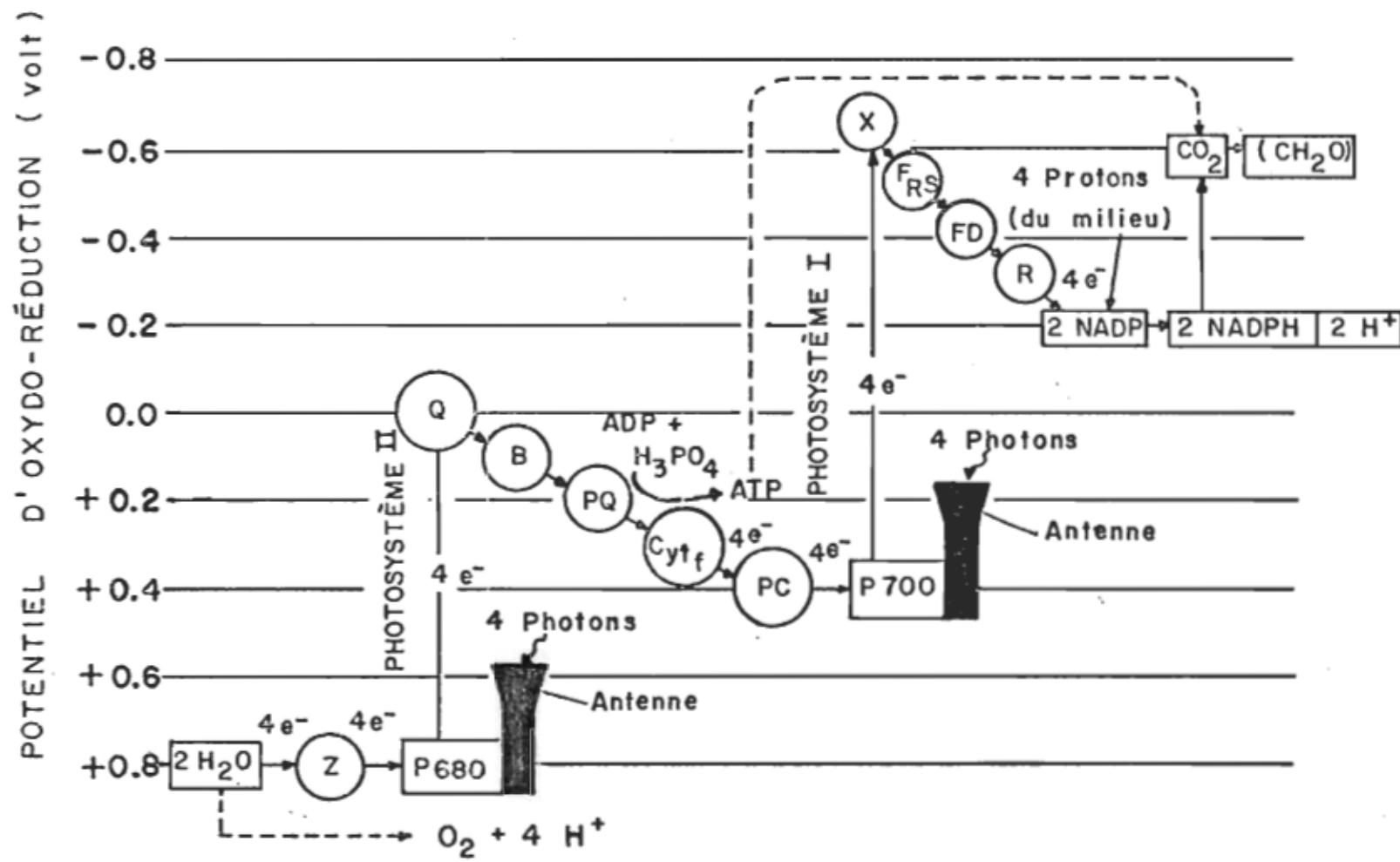


FIGURE 2. Transfert d'électron dans le chloroplaste (Schéma en Z) (Govindjee et Govindjee, R., 1974)

Dans le PS I, on appelle cette chlorophylle particulière le P700 et il est suggéré que ce P700 représente le piège du PS I où l'énergie lumineuse, absorbée par l'unité photosynthétique, est captée et impliquée directement dans les processus primaires photochimiques. Au niveau du PS II, ce piège se nomme le P680. Cette chlorophylle particulière s'oxyde par la suite en perdant un électron qui est transféré sur un accepteur. A chaque photosystème est associé un accepteur et un donneur d'électrons; ce dernier permet à la chlorophylle oxydée de retrouver son niveau énergétique initial. Un tel mécanisme rend possible le transfert d'électrons dans chaque photosystème, entre molécules capables de donner et d'accepter un électron, contre un gradient de potentiel considérable.

Le processus commence par l'absorption d'un photon par l'antenne du PS II. L'énergie d'excitation est transmise à une molécule de chlorophylle située dans le centre réactionnel de l'unité photosynthétique, soit le P680. Cette molécule excitée transfère un électron à un accepteur Q, de structure inconnue, et revient à son état énergétique initial en recevant un électron du donneur Z. Après avoir donné 4 électrons, la molécule Z les regagne en oxydant deux molécules d'eau. De l'accepteur Q, l'électron passe à travers une série de molécules transporteur d'électrons, soit B, une molécule inconnue que l'on suppose être une quinone, la plastoquinone (PQ), le cytochrome f (Cyt f), pour arriver à la plastocyanine (PC). Cette plastocyanine injecte l'électron dans le photosystème I (PSI) en le donnant au P700 pour compenser la perte d'électrons subie lorsque, excité par les pigments de sa propre antenne collectrice, le P700 a cédé un électron à l'accepteur X, protéine

à base de fer et de soufre de structure inconnue. Finalement, l'électron passe de l'accepteur X à une substance réduisant la ferrédoxine (FRS), puis à la ferrédoxine (FD) et à un enzyme (R) pour arriver au NADP. Le NADP est ensuite réduit en NADPH sous l'influence de quatre protons provenant de l'oxydation de l'eau. Le NADPH est le produit primaire de ces réactions. De plus, durant deux de ces transferts d'électrons, de l'ATP est généré à partir de l'ADP et du phosphate inorganique ( $H_3PO_4$ ). Le premier site de production de l'ATP se trouve quelque part entre la plastoquinone et le cytochrome f; le deuxième site est associé au PS II mais n'a pas encore été localisé avec précision. L'ATP formé s'unit au NADPH pour convertir le  $CO_2$  en hydrates de carbone  $(CH_2O)_n$ .

Ce processus est répété pour chacun des quatre électrons donnés par la molécule Z. Ainsi, huit transferts d'électrons et huit quanta de lumière (photons) sont requis pour libérer une molécule d'oxygène et réduire une molécule de  $CO_2$  en hydrates de carbone (Govindjee et R. Govindjee, 1974).

### 2.1.3 Unité photosynthétique

Des expériences réalisées par Emerson et Arnold (1932) ont démontré qu'un minimum de 2,400 molécules de chlorophylles étaient nécessaires pour produire une molécule d'oxygène. Un agrégat de cette dimension, disaient-ils à cette époque, serait ce qu'on appelle une unité photosynthétique. Cependant, depuis ce temps, le concept d'unité photosynthétique a été quelque peu modifié. Ainsi nous savons maintenant que chaque centre réactionnel transfère un électron par photon absorbé, que chaque électron passe à travers les deux centres réactionnels, et qu'il faut

4 électrons pour réduire une molécule de gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) en hydrate de carbone et produire une molécule d'oxygène à partir de l'eau. Donc huit actes photochimiques sont impliqués de telle sorte que l'on doit s'attendre à avoir huit fois moins de chlorophylles associées à chaque centre réactionnel, soit environ 300 molécules de chlorophylles par centre. Ces 300 molécules représentent l'unité photosynthétique telle qu'on la conçoit de nos jours (Gregory, 1977, p. 43).

#### 2.1.4 Structure et orientation des pigments photosynthétiques

##### 2.1.4.1 Les chlorophylles

Dans la série de processus qui débute avec l'absorption de la lumière et résulte dans la biosynthèse de composés caractérisant l'organisme vivant, les chlorophylles jouent un rôle de première importance. Ainsi, ces chlorophylles constituent les photoaccepteurs primaires des organismes photosynthétiques (Leblanc, 1975).

Parmi les chlorophylles, notons les chlorophylles a et b et la bactériochlorophylle. On retrouve les deux premières dans les végétaux supérieurs tels l'épinard; la bactériochlorophylle est le principal pigment des bactéries photosynthétiques. Il existe aussi des chlorophylles auxiliaires telles les chlorophylles c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub> et d qui sont beaucoup moins importantes que les chlorophylles a et b. En effet, de toutes ces chlorophylles, la chlorophylle a est présente dans tous les organismes photosynthétiques où nous avons une production d'oxygène.

La figure 3 représente la constitution chimique de la chlorophylle a. C'est un dérivé de la porphyrine, système hétérocyclique composé de 4 anneaux pyrrole auxquels se rattache une queue phytol. Les molécules de chlorophylles sont plutôt lipophiles, mais elles contiennent des groupements polaires tels que le carbonyle et l'atome de magnésium central. La chaîne phytol ( $C_{20} H_{39}$ ), longue de  $20 \text{ \AA}^0$ , attachée au système polycyclique de la porphyrine est strictement lipophile. La molécule de chlorophylle se présente donc comme constituée d'une tête porphyrine plus ou moins polaire et d'une queue apolaire.

Nous savons que la chlorophylle est située dans la membrane interne du chloroplaste, là où a lieu la conversion énergétique de la photosynthèse; cependant nous ne connaissons pas son emplacement exact dans le chloroplaste ainsi que l'état sous ~~quel~~ on la retrouve et la relation existante entre les chlorophylles et les autres pigments photosynthétiques.

Jusqu'à présent, il n'y a pas de données expérimentales directes sur l'emplacement de la chlorophylle dans le chloroplaste bien que la majorité des expérimentateurs considèrent que la chlorophylle devrait avoir une tendance à former une monocouche à l'interface entre les couches hydrophiles (telles les protéines) et hydrophobes (telles les lipides) (Leblanc, 1975).

On a estimé, à partir de micrographies électroniques et de la teneur en chlorophylle, que l'aire totale disponible était juste assez

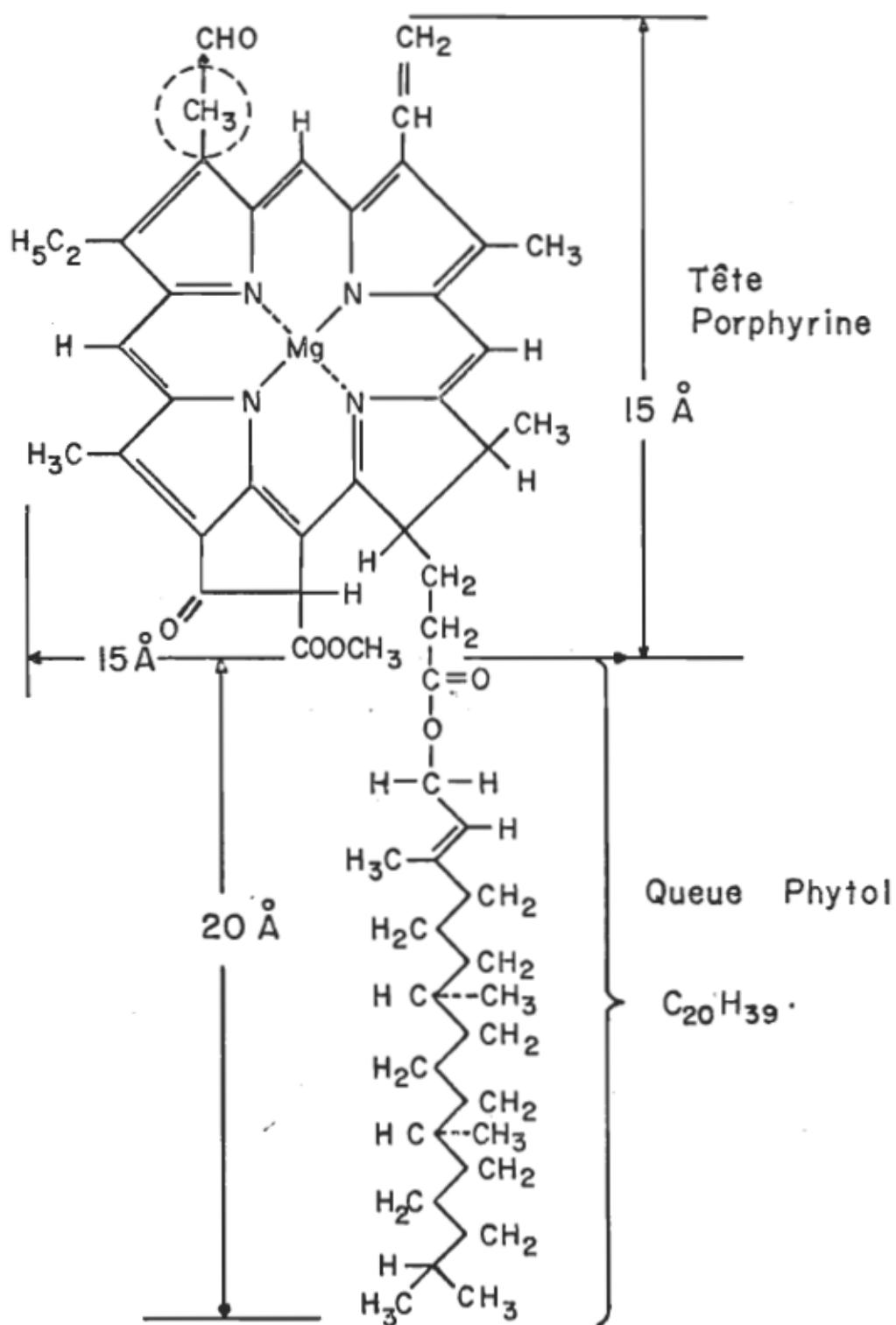


FIGURE 3. Structure de la chlorophylle a. Le groupement CH<sub>3</sub> encerclé est remplacé par le groupement CHO dans la chlorophylle b.

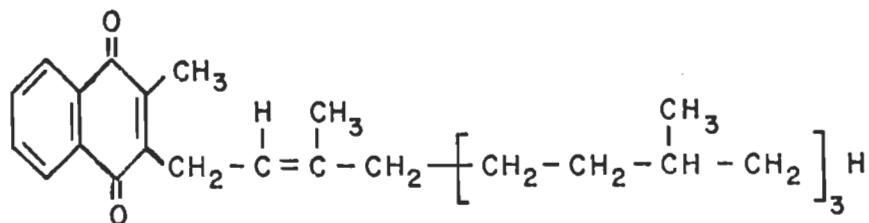
large pour accomoder toutes les molécules de chlorophylle dans une couche monomoléculaire bien tassée (Ke, 1966).

#### 2.1.4.2 Les autres pigments photosynthétiques (Quinones)

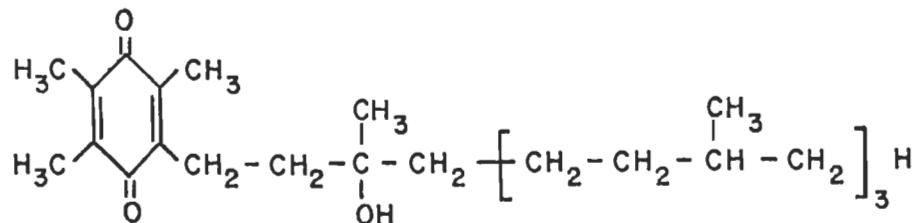
Il y a déjà plusieurs années, Bishop (1958) et Krogmann (1961) ont démontré que les chloroplastes contenaient des quinones substituées à longue chaîne. Au moins huit de ces quinones ont été identifiées par la suite par Henninger et Crane (1963a), Lichtenthaler et Calvin (1964) ainsi que Crane et coll. (1966). Parmi ces quinones, les plus importantes étaient les plastoquinones, les tocophérylquinones et la vitamine K<sub>1</sub>. De plus les travaux de Henninger et Crane (1963b), Dilley et Crane (1963) ainsi que Dilley et coll. (1963) ont clairement indiqué que ces substances avaient un rôle important à jouer dans le transfert d'électrons de la photosynthèse et qu'ils subissent des réactions d'oxydoréduction lorsque les chloroplastes sont illuminés. La même observation a aussi été faite dans le cas de l'α-tocophérol.

La structure chimique de ces différents composés, soit la vitamine K<sub>1</sub>, l'α-tocophérylquinone et l'α-tocophérol, est représentée sur la figure 4. Comme chacun de ces composés possède une longue chaîne non-polaire d'au moins 16 carbones, ils devraient donc avoir une orientation préférentielle à l'interface lipide-eau, telle la surface des lamelles de chloroplastes. En effet, la vitamine K<sub>1</sub>, par exemple, a un groupement phytol de vingt atomes de carbones, hautement hydrophobe, qui est attaché sur le carbone 3 du noyau naphtoquinone.

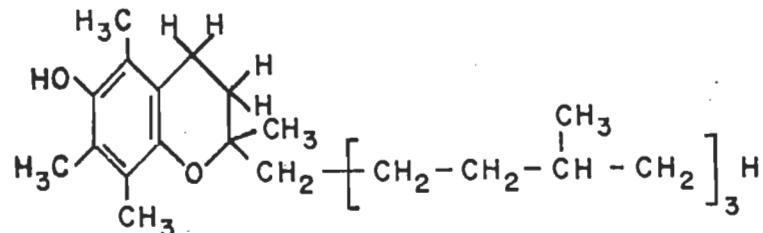
Vitamine  $K_1$  ( $C_{31}H_{46}O_2$ )



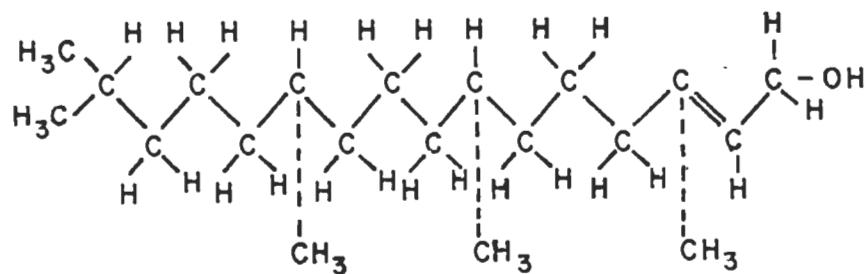
$\alpha$ -Tocophérylquinone ( $C_{29}H_{50}O_3$ )



$\alpha$ -Tocophérol (Vitamine E) ( $C_{29}H_{50}O_2$ )



Phytol ( $C_{20}H_{40}O$ )



Ceci renforce l'orientation de la molécule à la surface que ce soit en monocouche pure ou en monocouche mixte, i.e. mélangé avec d'autres lipides. Cette orientation est suffisamment prononcée pour forcer le groupement naphtoquinone, qui n'est pas très hydrophile, à pénétrer la région polaire d'une couche condensée à la surface (Miller et coll. 1977). De plus, Gaines (1968) a déjà étudié le comportement de certains pigments photosynthétiques à l'interface air-eau, soit l' $\alpha$ -tocophérylquinone, la vitamine K<sub>1</sub>, et le phytol, et il a effectivement noté une orientation des pigments à l'interface.

## 2.2 Théorie sur l'état monomoléculaire de la chlorophylle

Le concept de l'agrégation de la chlorophylle *in vivo*, tel que mentionné auparavant, a amené plusieurs chercheurs à simuler la structure fonctionnelle de l'appareil photosynthétique. Pour simuler cet état d'agrégation, ils ont utilisé la méthode des couches monomoléculaires afin d'en étudier les propriétés physiques et chimiques. La technique employée par la plupart des chercheurs a été mise au point par Irving Langmuir en 1917 lorsqu'il a élaboré une méthode pour mesurer des pressions de surface. Depuis ce temps, cette technique a subi diverses modifications selon la nature des travaux exécutés. Le tableau 1 résume la majorité des travaux importants réalisés sur les monocouches de chlorophylle au cours des quarantes dernières années.

L'état et les propriétés d'une monocouche sont régis par la structure moléculaire du matériel formant la couche, la température, la pression latérale à l'intérieur de la monocouche et la composition de la

TABLEAU 1 : RESUME DES TRAVAUX SUR LES MONOCOUCHES DE CHLOROPHYLLE

AUTEURS	ANNEE	PRESSION DE SURFACE	SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION (Visible)	FLUORESCENCE	POTENTIEL DE SURFACE	AUTRES MESURES
HUGHES	1936	X	-	-	X	-
SJOERDSMA	1936	X	-	-	-	-
ALEXANDER	1937	X	-	-	X	Microscopie
LANGMUIR ET SCHAEFER	1937	X	-	X	-	Epaisseur du film Viscosité du film
HANSON	1939	X	-	-	X	Rayons-X
RODRIGO	1953	X	-	X	-	-
JACOBS et coll.	1954	-	X	X	-	-
TRURNIT et coll.	1959	-	X	-	-	-
COLMANO	1961	-	X	-	-	-
COLMANO	1962	-	X	-	-	-
BELLAMY et coll.	1963	X	X	-	X	-
GAINES et coll.	1964	X	X	X	-	Interaction chla/ alcool oléique

RESUME DES TRAVAUX SUR LES MONOCOUCHES DE CHLOROPHYLLE  
(SUITE)

AUTEURS	ANNEE	PRESSION DE SURFACE	SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION (Visible)	FLUORESCENCE	POTENTIEL DE SURFACE	AUTRES MESURES
TWEET et coll.	1964 (a)	X	-	X	-	-
TWEET et coll.	1964 (b)	-	-	X	-	Distribution angulaire de fluorescence
ROSOFF et ARON	1965	X	-	-	X	Cinétique de phéophytinisation
McCREE	1965	-	-	-	-	Photoconduction
GAINES et coll.	1965	X	-	X	X	Interaction chla/vit K <sub>1</sub>
SPERLING et KE	1966	-	X	-	-	Dichroïsme
NEKRASOV	1967	-	X	-	-	-
TROSPER et SAUER	1968	X	X	-	-	Interaction avec lipides de chloroplaste
AGHION et coll.	1969	X	-	-	-	Photochimie
KLEUSER et BUCHER	1969	X	X	-	-	Electrochimie

RESUME DES TRAVAUX SUR LES MONOCOUCHES DE CHLOROPHYLLE  
(SUITE)

AUTEURS	ANNEE	PRESSION DE SURFACE	SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION (Visible)	FLUORESCENCE	POTENTIEL DE SURFACE	AUTRES MESURES
BRODY	1971	X	-	-	X	Photochimie
SINESCHEKOV et coll.	1972	-	X	X	-	Spectre d'excitation Interaction avec carotène
COSTA et coll.	1972	X	X	X	-	-
McPHEE et BRODY	1973	X	-	-	-	Photophosphorylation
KARAN et BRODY	1974	X	-	-	-	Interaction chl a/cyt. c à l'interface heptane/eau
TANG et ALBRECHT	1974	-	X	-	-	Electrodéposition
COSTA et PORTER	1974	-	X	X	-	Photoréduction
LEBLANC et coll.	1974	-	-	X	-	Spectrofluorométrie Laser
DEN ENGELSEN et DE KONING	1974	X	-	-	-	Dichroïsme et Ellipsométrie
TANG et coll.	1975	-	X	-	-	Photoconductivité
AOSHIMA et coll.	1975	-	-	X	-	-

RESUME DES TRAVAUX SUR LES MONOCOUCHES DE CHLOROPHYLLE  
(SUITE)

AUTEURS	ANNEE	PRESSION DE SURFACE	SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION (Visible)	FLUORESCENCE	POTENTIEL DE SURFACE	AUTRES MESURES
BRODY	1975	X	-	-	X	Interaction plastocyanine/chlorophylle
CHIN et BRODY	1976	X	-	-	X	Interaction chl/cyt.
BRODY et OWENS	1976	X	-	-	X	Interaction chl/Pc, chl/cyt. et chl/Fd
VILLAR	1976	-	-	-	-	Photoélectrochimie
LEBLANC et CHAPADOS	1976	-	X	-	-	Interaction chl/dioxane Infrarouge
CHAPADOS et LEBLANC	1977	-	-	-	-	Infrarouge -Monocouche -Multicouche
HIRSCH	1977	X	X	-	X	Interaction chlorophylle/agents réducteurs
WATANABE et coll.	1978	-	X	-	-	Photoélectrochimie

sous-phase. Les paramètres les plus importants et les plus souvent mesurés pour caractériser les monocouches de chlorophylle sont les isothermes de pression de surface et de potentiel de surface, la viscosité du film, le spectre d'absorption et de fluorescence.

Les premières recherches sur les monocouches de chlorophylle remontent à 1936 lorsque Hugues ainsi que Sjoerdsma effectuèrent des mesures de pression de surface des chlorophylles a et b. Par la suite, la plupart des travaux sur les monocouches de chlorophylle comprenaient des mesures de pression de surface. Les plus récents sont ceux de Costa et coll. (1972) et Hirsch(1977).

La pression maximale pour la chlorophylle a est d'environ  $30 \text{ mN.m}^{-1}$  ( $\text{dynes.cm}^{-1}$ ) et la plupart des valeurs publiées varient entre 22 et  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ . Ces différences entre les valeurs rapportées par les différents auteurs sont attribuables aux diverses conditions expérimentales, telles le pH de l'eau, le solvant utilisé et la pureté de la chlorophylle utilisée. Les surfaces moléculaires obtenues suite aux travaux des différents chercheurs varient entre 100 et  $135 \text{ \AA}^{02}$  pour une pression  $\pi=0$ . Puisque la surface plane de l'anneau porphyrine de la chlorophylle occupe une surface de  $225 \text{ \AA}^{02}$  ( $15 \times 15 \text{ \AA}^0$ ), il devient évident que l'anneau porphyrine de la chlorophylle est orienté à la surface de l'eau avec un angle d'inclinaison défini. Ainsi, Hanson (1939) assume, suite à ses travaux, que le plan porphyrine a un angle de  $55^0$  par rapport à la surface de l'eau. De plus, des études de spectroscopie d'absorption polarisée de la chlorophylle dans les membranes lipidiques a démontré que le plan de l'anneau porphyrine de la chlorophylle a a une inclinaison de  $48^0$  par rapport à la surface

de la membrane et la chlorophylle b une inclinaison de 51° (Cherry et coll., 1972). Selon Bellamy et coll. (1963), la configuration la plus probable pour la chlorophylle serait une molécule pliée, ancrée à la surface de l'eau par les liaisons esters de la molécule, laissant l'anneau porphyrine et la chaîne phytol se redresser perpendiculairement à la surface de l'eau.

Hughes (1936) fut le premier à effectuer des mesures de potentiel de surface des monocouches de chlorophylle. Par la suite, les travaux de Alexander (1937) et Hanson (1939) ont confirmé ce que Hughes avait avancé. Puis Bellamy et coll. (1963), Rosoff et Aron (1965), Gaines et coll. (1965), et Brody (1971, 1975 et 1976) ont, tour à tour, étudié ces propriétés de la chlorophylle. Ainsi, pour un type donné de chlorophylle, le potentiel de surface augmente légèrement et de façon graduelle avec l'augmentation de compression. Ce léger changement dans le moment dipolaire du film de chlorophylle sous l'effet d'une compression indique qu'aucun changement important ne se produit dans la configuration de la liaison ester par rapport à la surface de l'eau.

La spectroscopie d'absorption est une propriété physique très importante des monocouches de chlorophylle. La première étude importante en spectroscopie d'absorption fut l'oeuvre de Jacobs, Holt et Rabinowitch (1954). Par la suite, d'autres travaux furent réalisés sur la spectroscopie d'absorption des monocouches de chlorophylle, en particulier ceux de Trurnit et coll. (1959), Colmano (1961, 1962), Bellamy, Gaines et Tweet (1963), Sperling et Ke (1966), Trosper et Sauer (1968), Costa et coll. (1972), Tang et Albrecht (1974), Costa et Porter (1974), Leblanc

et Chapados (1976) et Hirsch (1977). Presque tous ces travaux de spectroscopie ont été réalisés après avoir déposé les monocouches de chlorophylle sur des lamelles de verre ou de quartz. Cependant, Bellamy, Gaines et Tweet (1963) ont mis au point un système qui permet de prendre le spectre d'absorption directement à l'interface air-eau, ce qui élimine la déposition sur lamelle. Un tel système a aussi été utilisé par Hirsch (1977).

La fluorescence des monocouches de chlorophylle est aussi fréquemment mesurée et les travaux de Langmuir et Schaefer (1937) furent les premiers dans ce domaine. Par la suite, des études similaires ont été réalisées par Rodrigo (1953), Jacobs et coll. (1954), Tweet et coll. (1964), Gaines et coll. (1965), Costa et coll. (1972) et Aoshima et coll. (1975). Récemment, dans nos laboratoires de l'UQTR, nous avons mis au point un appareil qui permet de mesurer la fluorescence des monocouches de chlorophylle à l'aide d'un laser et ce système permet de travailler à des concentrations très faibles, soit de l'ordre de  $10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . (Leblanc et coll. (1974).

D'autres genres d'études furent réalisées sur les monocouches de chlorophylle au cours des quarantes dernières années. Ainsi, Langmuir et Schaefer (1937) furent les premiers à mesurer l'épaisseur d'une monocouche de chlorophylle ainsi que sa viscosité absolue. McCree (1965) fut le premier à obtenir des résultats concluants de photoconductivité et il fut suivi par Tang et coll. en 1975. Aghion, Broyde et Brody (1969) furent les premiers à réaliser une étude de la photochimie des monocouches de chlorophylle, déposées à l'interface air-eau.

Des études similaires ont été réalisées par Brody en 1971 lorsqu'il complexa la chlorophylle a à l'interface air-eau avec différents donneurs et accepteurs d'électrons pour essayer de reproduire le processus de transfert d'électrons de la photosynthèse. Finalement, les premières études en spectroscopie infrarouge de la chlorophylle en monocouches et en multicouches furent réalisées par Leblanc et Chapados (1976) et Chapados et Leblanc (1977). Des études ir avaient déjà été réalisées en solution (Holt, 1963, Katz et coll. 1966), à l'état solide (Weigl et Livingston, 1953; Ballschmiter et Katz, 1972) mais encore aucune étude n'avait été faite sur la chlorophylle à l'état monomoléculaire avant 1976.

Un dernier aspect très important des monocouches est l'étude des monocouches mixtes obtenues en mettant en présence deux ou plusieurs substances. Ainsi, Colmano (1962) a été un des premiers à étudier les pigments photosynthétiques en monocouches mixtes; dans le but, justement, de simuler l'arrangement pigmentaire de l'appareil photosynthétique naturel, il a mélangé de la chlorophylle a, de la chlorophylle b et du  $\beta$ -carotène à l'état monomoléculaire. Par la suite, d'autres études similaires ont été réalisées: Trosper et Sauer (1968) ont étudié l'interaction de la chlorophylle a avec des glycolipides du chloroplaste à l'état monomoléculaire; Sineshchekov et coll. (1972) ont étudié l'interaction de la chlorophylle a avec certaines caroténoides du chloroplaste.

Par la suite, Seymour S. Brody et son équipe (Brody, 1971 (b); Brody, 1975; Chin et Brody, 1976; Brody et Owens, 1976) ont étudié

l'interaction de la chlorophylle avec certains transporteurs d'électrons photosynthétiques, tels la plastocyanine, les cytochromes c et f et la ferrédoxine. Ils ont effectivement noté des interactions entre la chlorophylle et ces divers transporteurs d'électrons par des mesures de pression de surface et de potentiel de surface ainsi que par des mesures photochimiques.

L'interaction entre la chlorophylle et certaines quinones du chloroplaste a fait l'objet de plusieurs travaux au cours des dix dernières années et comme c'est le but de ce travail, nous allons y consacrer un chapitre spécial.

### 2.3 Interaction chlorophylle/quinone

#### 2.3.1 En solution

L'étude de l'interaction chlorophylle/quinone en solution n'est pas le but de notre travail, mais, avant de voir ce qui a déjà été fait sur cette interaction à l'état monomoléculaire, il serait bon de faire ici une brève revue des principaux travaux de l'interaction chlorophylle/quinone en solution.

Depuis que l'on sait que certaines quinones peuvent servir d'accepteurs primaires lors du transfert d'électrons suivant l'absorption de la lumière par la chlorophylle (Arnon et Crane, 1965; Witt, 1967; Boardman, 1968), on a porté une grande attention à l'étude de l'interaction photochimique de la chlorophylle avec ces quinones. La majeure partie

de ces travaux ont été faits en solution et les quinones les plus fréquemment employées pour ces études sont les para-benzoquinones substitués, la vitamine K<sub>1</sub>, l' $\alpha$ -tocophérylquinone, la plastoquinone et l'ubiquinone.

Livingston et Ke (1950) ainsi que Dilung et Chemyuk (1961) ont démontré par fluorescence l'interaction de l'état excité singulet de la chlorophylle a avec des quinones. Tollin et Green (1962), en observant la formation d'un radical anionique semi-quinone par la technique EPR (electron paramagnetic resonance) ont démontré que de telles interactions pouvaient amener une séparation de charges. Kelly et Porter (1970) ont étudié l'interaction entre la chlorophylle a photo-excitée et la duroquinone, l' $\alpha$ -tocophérylquinone et la vitamine K<sub>1</sub> en solution dans l'éthanol par des mesures de fluorescence et de photolyse éclair. Plus récemment, Lamola et coll. (1975) ont étudié l'interaction de la chlorophylle photo-excitée avec certaines benzoquinones en solution par la technique de résonance magnétique nucléaire. Puis, Beddard, Porter et Weese (1975) ont étudié les rendements de fluorescence, le temps de vie de fluorescence et les rendements quantiques de l'état triplet pour des films solides de chlorophylle a dans de la lecithine en présence de différentes quinones dont l' $\alpha$ -tocophérylquinone et la plastoquinone (PQ9). Ils ont aussi noté que le processus de quenching avait lieu par un transfert d'électrons de l'état excité singulet de la chlorophylle a à la molécule de quinone la plus proche.

Au cours des dix dernières années, les chercheurs soviétiques ont effectué beaucoup de travaux dans le but de connaître davantage la nature de l'interaction photochimique de la chlorophylle avec des quinones. Ainsi, Yevstigneyev et coll. (1968) ont démontré, par des mesures potentiométriques et spectrophotométriques, que les chlorophylles a et b en solution dans l'alcool sont capables de réactions photochimiques directes avec la plastoquinone isolée des plantes. Drozdova et Krasnovskii (1972) ont comparé l'interaction photochimique de la chlorophylle avec des quinones selon l'état dans lequel les pigments sont placés, soit en solution dans un solvant organique, soit en solution dans un détergent, soit dans une suspension de chloroplastes. Bobrovskii et Kholmogorov (1972) ont étudié l'interaction photochimique de la chlorophylle avec des quinones en solution dans l'éthanol par la technique de l'ESR (electron spin resonance). Gordeyev et coll. (1973) se sont intéressés au processus de la photo-oxydation de la chlorophylle a par la p-benzoquinone dans l'éthanol comme étant fonction du pH du milieu. Kutyurin et coll. (1973) ont étudié le rôle de l'eau dans la réaction de photo-oxydation de la chlorophylle par la p-benzoquinone. Yevstigneyev et Chudar (1974a, b) ont observé des changements dans le pH du milieu lors de la photo-oxydation ou de la photoréduction des chlorophylles a et b et de leurs phéophytines correspondantes par la p-benzoquinone ainsi que la conséquence de ces changements de pH sur la concentration des pigments oxydants et réducteurs. Gudkov et coll. (1975) ont étudié la photoconductivité de la chlorophylle a en présence de p-benzoquinone en solution dans l'hexanol. Yevstignayev et Gavrilova (1975 a, b) ont effectué des mesures de

photopotentiel de l'interaction photochimique de la chlorophylle avec la duroquinone puis ont étudié l'effet de la constante diélectrique du milieu sur la photooxydation de la chlorophylle a par la p-benzoquinone. Finalement, Kostikov et coll. (1976) ont démontré que, lors d'une photooxydation de la chlorophylle par des quinones, les produits primaires de la photoréaction étaient le radical cationique de la chlorophylle ( $\text{chl}^+$ ) et le radical anionique de la quinone ( $\text{Q}^-$ ); Ils ont employés principalement la p-benzoquinone, la duroquinone, l'ubiquinone et une naphtoquinone disubstituée, la 1,4-naphtoquinone.

En 1976, Huppert, Rentzepis et Tollein ont étudié le mécanisme de quenching du plus bas état excité singulet de la chlorophylle par des quinones au moyen de la spectroscopie laser dans la picoseconde. Avec la chlorophylle seule, ils ont remarqué qu'une excitation par le laser causait un blanchiment immédiat, dans un temps inférieur à 10 picosecondes, de la bande à 665 nm et une production de nouvelles bandes entre 460 et 550 nm et entre 800 et 830 nm avec des temps de vie supérieurs à 500 picosecondes. L'addition du 2,6-diméthylbenzoquinone a provoqué un quenching de ces changements d'absorption et ils n'ont remarqué aucune formation de radical cation de la chlorophylle. Ils ont ainsi conclu que l'interaction entre une quinone et l'état excité singulet de la chlorophylle résulte en une énergie de dissipation sans formation mesurable d'espèces radicalaires ayant des temps de vie plus longs que 10 picosecondes.

Récemment, G.R. Seely (1978) a publié un bref résumé des principaux travaux sur la photochimie du complexe chlorophylle-quinone en solution et, selon lui, le but le plus souvent visé dans de telles études est de définir les conditions par lesquelles l'eau peut être oxydée après la photooxydation de la chlorophylle ou d'un pigment analogue par une quinone.

Le tableau 2 nous donne un aperçu des principaux travaux réalisés au cours des quinze dernières années sur l'interaction photochimique entre la chlorophylle et certaines quinones.

TABLEAU 2: RESUME DES PRINCIPAUX TRAVAUX SUR L'INTERACTION CHLOROPHYLLE/QUINONE EN SOLUTION

REFERENCES (AUTEURS)	ANNEE	SOLVANT	TYPE D'ETUDE
TOLLIN et GREEN	1962	Ether/isopentane/ éthanol (8:3:5 v/v)	Formation d'un radical anionique semiquinone par EPR
YEVSTIGNEYEV et coll.	1968	Ethanol	Interaction photochimique de la chlorophylle et de la plastoquinone
KELLY et PORTER	1970	Ethanol	Interaction photochimique de la chlorophylle avec la duroquinone, l' $\alpha$ -tocophérylquinone et la vitamine K <sub>1</sub>
YEVSTIGNEYEV et coll.	1971	Ethanol	Influence du signal EPR sur l'acidité du milieu durant la photo-oxydation de la chlorophylle par la p-benzoquinone
WHITE et TOLLIN	1971 (a)	Alcool, pyridine	Photochimie des systèmes phorphyrines/quinones ESR
WHITE et TOLLIN	1971 (b)	Alcool	Photolyse éclair du système chlorophylle <u>a</u> / quinone
RAMAN et TOLLIN	1971	Pyridine, Isooctane	Photolyse éclair du système chlorophylle <u>a</u> / benzoquinone
BOBROVSKII et KHOLOMO- GOROV	1972	Ethanol	Photochimie du système chlorophylle/quinone par ESR

RESUME DES PRINCIPAUX TRAVAUX SUR L'INTERACTION CHLOROPHYLLE/QUINONE EN SOLUTION  
(SUITE)

REFERENCES (AUTEURS)	ANNEE	SOLVANT	TYPE D'ETUDE
DROZDOVA et KRASNOVSKII	1972	Ethanol, Triton X-100	Influence de l'état de la chlorophylle sur son interaction photochimique avec des quinones
HARBOUR et TOLLIN	1972	Ethanol	Illumination à basse température. Photo-oxydation de la chlorophylle et mesures par ESR
TOMKIEWICZ et KLEIN	1973		Photo-oxydation de la chlorophylle <u>b</u> par des benzoquinones. Mesures par PMR
HALES et BOLTON	1972	Alcool	Photo-oxydation du système chlorophylle/benzoquinone par photolyse éclair et spectroscopie ESR
GORDEYEV et coll.	1973	Ethanol	Photolyse éclair du système chl <u>a</u> /p-benzoquinone. Influence du pH du milieu
KUTYURIN et coll.	1973	Solvants organiques	Effet de l'eau sur la réaction de photo-oxydation de la chlorophylle par la p-benzoquinone
HARBOUR et TOLLIN	1974 (a)	Ethanol	Etude par ESR des radicaux produits à basse température par l'illumination de la chlorophylle en présence de quinones

RESUME DES PRINCIPAUX TRAVAUX SUR L'INTERACTION CHLOROPHYLLE/QUINONE EN SOLUTION  
 (SUITE)

<u>REFERENCES (AUTEURS)</u>	<u>ANNEE</u>	<u>SOLVANT</u>	<u>TYPE D'ETUDE</u>
SEELY	1978		Revue de la littérature sur l'interaction photochimique chlorophylle/quinone
TOLLIN et RIZZUTO	1978	Ethanol	Effet du $FeCl_3$ sur la photochimie du complexe chlorophylle/benzoquinone

RESUME DES PRINCIPAUX TRAVAUX SUR L'INTERACTION CHLOROPHYLLE/QUINONE EN SOLUTION  
(SUITE)

REFERENCES (AUTEURS)	ANNEE	SOLVANT	TYPE D'ETUDE
GUDKOV et coll.	1975	Hexanol	Photoconductivité de la chlorophylle <u>a</u> en présence de <u>p</u> -benzoquinone. Mesures de cinétique et de température
YEVSTIGNEYEV et GAVRILOVA	1975 (a)	Ethanol	Photopotentiel de l'interaction photochimique entre les chlorophylles <u>a</u> et <u>b</u> et la duroquinone
YEVSTIGNEYEV et GAVRILOVA	1975 (b)	Solvants organiques	Effet de la constante diélectrique du milieu sur la photo-oxydation de la chlorophylle <u>a</u> par la <u>p</u> -benzoquinone
HUPPERT et coll.	1976	Ethanol	Spectroscopie laser dans la picoseconde du système chlorophylle/benzoquinone
TOLLIN	1976	Alcool	Photoréactions chlorophylle/quinone par photolyse éclair laser et par ESR
KOSTIKOV et coll.	1976	Alcool	Etude du rendement de formation des radicaux cationiques ( $ch1^+$ ) lors de la photo-oxydation de la chlorophylle avec plusieurs quinones

### 2.3.2 A l'état monomoléculaire

Les études concernant l'interaction chlorophylle/quinone à l'interface air-eau sont très peu nombreuses; en effet, au cours des treize dernières années, on n'en dénombre que quatre.

La première étude fut celle de Gaines, Tweet et Bellamy (1965) qui ont démontré le rôle de la vitamine  $K_1$  sur la fluorescence de la chlorophylle a à l'état monomoléculaire. Les courbes de pression de surface qu'ils ont obtenues à partir de monocouches mixtes composées de chlorophylle a et de vitamine  $K_1$ , à diverses concentrations, ont toutes démontré une déviation négative par rapport au comportement idéal (courbe théorique). Par les mesures de potentiel de surface, ils ont suggéré qu'il existe une interaction quelconque entre les dipôles moléculaires des deux substances en monocouches mixtes. Ils ont aussi émis l'hypothèse que la portion quinone de la molécule de vitamine  $K_1$  pourrait être immergée dans l'eau, de telle façon que lorsque de telles molécules sont entremêlées dans une monocouche de chlorophylle, les anneaux quinones se trouvent sous les anneaux porphyrines de la chlorophylle. Les études de fluorescence leur ont permis d'affirmer que la vitamine  $K_1$  est un quencher assez efficace de la fluorescence de la chlorophylle en films dilués et que ce quenching est limité par la diffusion et est dû aux collisions entre les molécules excitées de chlorophylle et les molécules de vitamine  $K_1$ . En monocouches concentrées, ils ont noté une efficacité de quenching légèrement inférieure parce que le transfert d'énergie entre les molécules de chlorophylle était plus rapide et le temps

de vie des molécules excités était plus court.

Par la suite, deux études furent réalisées par Sir Georges Porter et son équipe de recherche de l'Institution Royale de Londres (Costa et coll., 1972; Costa et Porter, 1974). Ils ont étudié l'interaction chlorophylle-quinone par spectroscopie d'absorption, par spectroscopie de fluorescence, et par photoréactions.

Ainsi, en déposant directement une monocouche d' $\alpha$ -tocophérylquinone sur une monocouche de chlorophylle a, ils ont observé que la bande rouge du spectre d'absorption de la chlorophylle a subissait un déplacement de 4 nm vers le bleu (679nm  $\rightarrow$  675nm) et que l'absorbance maximale par couche diminuait de 0.009 à 0.007. Par contre, l'effet de la vitamine K<sub>1</sub> était beaucoup plus drastique, soit une diminution de l'absorbance maximale par couche de 0.009 à 0.005 et une large bande d'absorbance de 550 à 470 nm.

En fluorescence, ils ont observé que la vitamine K<sub>1</sub> avait une efficacité plus grande comme quencher que l' $\alpha$ -tocophérylquinone et que la vitesse de quenching de la fluorescence de la chlorophylle était proportionnelle à la concentration de quinone dans la couche adjacente à la couche de chlorophylle. Lorsque les monocouches de chlorophylle et de quinone étaient séparées par une ou plusieurs couches d'arachidate de cadmium, ils ont remarqué une diffusion de la quinone dans les couches d'arachidate.

Dernièrement, des travaux de R.E. Hirsch (1977) ont porté sur les propriétés spectroscopiques de monocouches mixtes chlorophylle/quinone à diverses concentrations et les quinones étudiées sont la vitamine K<sub>1</sub>, l' $\alpha$ -tocophérylquinone et l' $\alpha$ -tocophérol. De son travail, Hirsch en est arrivé aux conclusions suivantes: l'introduction de la vitamine K<sub>1</sub> dans des films de chlorophylle résulte en un changement rigoureux des agrégats de chlorophylle et des autres espèces après une irradiation. La vitamine K<sub>1</sub> pourrait réduire les espèces de chlorophylle. De plus, l'addition de la vitamine K<sub>1</sub> à une monocouche de chlorophylle cause une diminution assez importante du coefficient d'absorption et un déplacement des maxima d'absorption de 678 nm à 682 nm et de 721 nm à 725 nm.

De même l'addition de l' $\alpha$ -tocophérylquinone à une monocouche de chlorophylle résulte en une diminution assez importante de la densité optique (absorbance) pour les pics à 670, 698 et 732 nm. L'irradiation d'un film mixte chl:  $\alpha$ -TCPQ n'a apporté aucun changement dans le spectre d'absorption, ce qui amène Hirsch à supposer que l' $\alpha$ -tocophérylquinone, en phase obscure, provoque un alignement parallèle des molécules de chlorophylle résultant en la formation d'un pic à 682 nm aux dépens de la forme monomère (670 nm) et de la forme agrégat (698 nm). La forme cristalline observée dans le noir (736 nm) pourrait résulter du changement d'orientation des cristaux observés dans une monocouche de chlorophylle pure à 730 et 748 nm.

Ainsi, il semble que les deux quinones (vit. K<sub>1</sub> et  $\alpha$ -TCPQ) amorcent la formation d'un agrégat à 680 nm qui pourrait être analogue au centre

réactionnel du PS II, soit le P680. Ce P680 pourrait alors être formé de portions de thylakoïdes où des quinones ou d'autres substances du PS II sont présentes.

Avec l' $\alpha$ -tocophérol associé à la chlorophylle dans une monocouche mixte, Hirsch n'a remarqué aucun changement dans la densité optique du spectre d'absorption après une irradiation, sauf que la maximum d'absorption subit un léger déplacement de 677 à 681 nm. Le tocophérol agit alors comme un "intermédiaire inerte" (inert spacer).

Le tableau 3 nous donne un bref aperçu des travaux réalisés sur l'interaction chlorophylle-quinone à l'état monomoléculaire depuis 1965.

Toutes ces études du système chlorophylle-quinone ont apporté un peu de lumière sur ce processus d'interaction encore très mal connu; cependant, personne ne s'est vraiment aventuré à émettre l'hypothèse d'un modèle d'interaction entre la chlorophylle et une quinone à l'intérieur de la membrane photosynthétique, sauf peut-être l'approche déjà faite il y a quelques années dans nos laboratoires par LeBrech, Leblanc et Antippa (1974) qui ont suggéré un modèle d'interaction entre la chlorophylle a et la p-benzoquinone, modèle impliquant deux molécules de chlorophylle a reliées à une molécule de p-benzoquinone par les atomes de magnésium.

Certaines approches ont aussi été faites pour expliquer les processus photobiologiques associés aux membranes photosynthétiques, telles les membranes bilipidiques (BLM) et les liposomes (Tien, 1974; Berns, 1976;

RESUME DES PRINCIPAUX TRAVAUX SUR L'INTERACTION CHLOROPHYLLE/QUINONE EN SOLUTION  
(SUITE)

REFERENCES (AUTEURS)	ANNEE	SOLVANT	TYPE D'ETUDE
HARBOUR et TOLLIN	1974 (b)	Acétone	Effet photochimique de l'addition d'eau dans un système chlorophylle-quinone
TOLLIN	1974		Mécanismes réactionnels de l'interaction photochimique chlorophylle-quinone
YEVTIGNEYEV et CHUDAR	1974 (a)	Alcool, Acétone	Effet du changement du pH du milieu sur les réactions photochimiques chlorophylle/quinone
KIM et coll.	1974	Ethanol, HCl	Effet de l'acidité du milieu sur la formation de radicaux cationiques ( $chl^+$ ) lors de la photo-oxydation de la chlorophylle en présence de quinones
YEVTIGNEYEV et CHUDAR	1974 (b)	Méthanol	Conséquence des changements de pH du milieu sur la concentration des pigments oxydants et réducteurs lors des réactions photochimiques chlorophylles/quinones et phéophytines/quinones
LAMOLA et coll.	1975	Ethanol deutéré	Etude par RMN de la photo-oxydation des chlorophylles par des quinones
BEDDARD et coll.	1975	Chloroforme	Etude de fluorescence chlorophylle/quinone/lécithine en film solide

TABLEAU 3: RESUME DES TRAVAUX SUR L'INTERACTION CHLOROPHYLLE/QUINONE A L'ETAT MONOMOLECULAIRE

AUTEURS	ANNEE	TYPE D'ETUDE
GAINES, TWEET et BELLAMY	1965	Influence de la vitamine K <sub>1</sub> sur la fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> .
COSTA et coll.	1972	Spectroscopie d'absorption et de fluorescence du système chlorophylle/quinone sur des monocouches mixtes déposées sur un support solide à l'interface air-eau.
COSTA et PORTER	1974	Spectroscopie d'absorption et de fluorescence sur des monocouches déposées sur un support solide à l'interface lipide-eau. Réactions photochimiques au moyen d'agents réducteurs.
HIRSCH	1977	Spectroscopie d'absorption du système chlorophylle/quinone pris directement à l'interface air-eau.

Chen et Berns, 1976; Thornber et coll., 1976 et Sauer, 1978). Tout récemment, Masters et Mauzerall (1978) ont étudié l'effet de certaines quinones, et particulièrement les plastoquinone PQ-5 et PQ-9, sur les propriétés photoélectriques de bicouches lipidiques (BLM) contenant de la chlorophylle a. Ils ont conclu de leurs travaux que l'addition des plastoquinones PQ-5 ou PQ-9 augmentait la photoconductance jusqu'à 20 fois ce qu'elle était dans la bicoche sans quinone.

Cette étude est intéressante dans son ensemble mais ne nous renseigne pas vraiment sur un modèle d'interaction entre la chlorophylle et la quinone dans la membrane. Nous croyons que la méthode des monocouches associée à certaines techniques spectroscopiques nous aidera à faire un pas dans la bonne direction car cette méthode des monocouches nous renseigne principalement sur l'aire moléculaire et l'orientation moléculaire d'un système chlorophylle/quinone ainsi que sur l'interaction intermoléculaire entre ces deux pigments photosynthétiques.

### 3.0 BUT DE LA THESE

La composition de l'unité photosynthétique, unité responsable de la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique, montre que les chlorophylles a et b, les caroténoides et quelques quinones participent aux étapes primaires de la photosynthèse. En effet, les chlorophylles servent, on le sait, à capturer l'énergie solaire et à transférer cette énergie tandis que les caroténoides protègent les chlorophylles de la photooxydation et les quinones transfèrent les électrons libérés au piège d'énergie.

Jusqu'à présent, nous savons que certaines quinones du chloroplaste jouent un rôle assez important dans le transfert d'électrons mais on ne connaît pas encore l'importance de leur interaction avec la chlorophylle. L'examen de la nature du complexe chlorophylle/quinone nous permettrait de prévoir la possibilité d'avoir un tel complexe comme piège d'énergie, phénomène encore inconnu de nos jours et qui passionne une foule de chercheurs.

Comme nous croyons que les pigments photosynthétiques forment une couche monomoléculaire dans la membrane interne du chloroplaste, nous avons adopté la méthode de Langmuir pour simuler cette orientation. L'examen des propriétés de pression de surface des systèmes chlorophylle/quinone nous permettra de savoir s'il y a interaction ou non et d'en évaluer une intensité relative mais ne nous permettra, en aucune façon, d'identifier le type d'interaction. Pour cela, nous nous proposons d'effectuer une étude en spectroscopie infrarouge de ces

RESUME DES PRINCIPAUX TRAVAUX SUR L'INTERACTION CHLOROPHYLLE/QUINONE EN SOLUTION  
(SUITE)

REFERENCES (AUTEURS)	ANNEE	SOLVANT	TYPE D'ETUDE
HARBOUR et TOLLIN	1974 (b)	Acétone	Effet photochimique de l'addition d'eau dans un système chlorophylle-quinone
TOLLIN	1974		Mécanismes réactionnels de l'interaction photochimique chlorophylle-quinone
YEVSTIGNEYEV et CHUDAR	1974 (a)	Alcool, Acétone	Effet du changement du pH du milieu sur les réactions photochimiques chlorophylle/quinone
KIM et coll.	1974	Ethanol, HCl	Effet de l'acidité du milieu sur la formation de radicaux cationiques ( $chl^+$ ) lors de la photo-oxydation de la chlorophylle en présence de quinones
YEVSTIGNEYEV et CHUDAR	1974 (b)	Méthanol	Conséquence des changements de pH du milieu sur la concentration des pigments oxydants et réducteurs lors des réactions photochimiques chlorophylles/quinones et phéophytines/quinones
LAMOLA et coll.	1975	Ethanol deutéré	Etude par RMN de la photo-oxydation des chlorophylles par des quinones
BEDDARD et coll.	1975	Chloroforme	Etude de fluorescence chlorophylle/quinone/lécithine en film solide

RESUME DES PRINCIPAUX TRAVAUX SUR L'INTERACTION CHLOROPHYLLE/QUINONE EN SOLUTION  
(SUITE)

REFERENCES (AUTEURS)	ANNEE	SOLVANT	TYPE D'ETUDE
GUDKOV et coll.	1975	Hexanol	Photoconductivité de la chlorophylle <u>a</u> en présence de p-benzoquinone. Mesures de cinétique et de température
YEVSTIGNEYEV et GAVRILOVA	1975 (a)	Ethanol	Photopotentiel de l'interaction photochimique entre les chlorophylles <u>a</u> et <u>b</u> et la duroquinone
YEVSTIGNEYEV et GAVRILOVA	1975 (b)	Solvants organiques	Effet de la constante diélectrique du milieu sur la photo-oxydation de la chlorophylle <u>a</u> par la p-benzoquinone
HUPPERT et coll.	1976	Ethanol	Spectroscopie laser dans la picoseconde du système chlorophylle/benzoquinone
TOLLIN	1976	Alcool	Photoréactions chlorophylle/quinone par photolyse éclair laser et par ESR
KOSTIKOV et coll.	1976	Alcool	Etude du rendement de formation des radicaux cationiques ( $ch1^{\pm}$ ) lors de la photo-oxydation de la chlorophylle avec plusieurs quinones

RESUME DES PRINCIPAUX TRAVAUX SUR L'INTERACTION CHLOROPHYLLE/QUINONE EN SOLUTION  
 (SUITE)

<u>REFERENCES (AUTEURS)</u>	<u>ANNEE</u>	<u>SOLVANT</u>	<u>TYPE D'ETUDE</u>
SEELY	1978		Revue de la littérature sur l'interaction photochimique chlorophylle/quinone
TOLLIN et RIZZUTO	1978	Ethanol	Effet du $FeCl_3$ sur la photochimie du complexe chlorophylle/benzoquinone

### 2.3.2 A l'état monomoléculaire

Les études concernant l'interaction chlorophylle/quinone à l'interface air-eau sont très peu nombreuses; en effet, au cours des treize dernières années, on n'en dénombre que quatre.

La première étude fut celle de Gaines, Tweet et Bellamy (1965) qui ont démontré le rôle de la vitamine  $K_1$  sur la fluorescence de la chlorophylle a à l'état monomoléculaire. Les courbes de pression de surface qu'ils ont obtenues à partir de monocouches mixtes composées de chlorophylle a et de vitamine  $K_1$ , à diverses concentrations, ont toutes démontré une déviation négative par rapport au comportement idéal (courbe théorique). Par les mesures de potentiel de surface, ils ont suggéré qu'il existe une interaction quelconque entre les dipôles moléculaires des deux substances en monocouches mixtes. Ils ont aussi émis l'hypothèse que la portion quinone de la molécule de vitamine  $K_1$  pourrait être immergée dans l'eau, de telle façon que lorsque de telles molécules sont entremêlées dans une monocouche de chlorophylle, les anneaux quinones se trouvent sous les anneaux porphyrines de la chlorophylle. Les études de fluorescence leur ont permis d'affirmer que la vitamine  $K_1$  est un quencher assez efficace de la fluorescence de la chlorophylle en films dilués et que ce quenching est limité par la diffusion et est dû aux collisions entre les molécules excitées de chlorophylle et les molécules de vitamine  $K_1$ . En monocouches concentrées, ils ont noté une efficacité de quenching légèrement inférieure parce que le transfert d'énergie entre les molécules de chlorophylle était plus rapide et le temps

de vie des molécules excités était plus court.

Par la suite, deux études furent réalisées par Sir Georges Porter et son équipe de recherche de l'Institution Royale de Londres (Costa et coll., 1972; Costa et Porter, 1974). Ils ont étudié l'interaction chlorophylle-quinone par spectroscopie d'absorption, par spectroscopie de fluorescence, et par photoréactions.

Ainsi, en déposant directement une monocouche d' $\alpha$ -tocophérylquinone sur une monocouche de chlorophylle a, ils ont observé que la bande rouge du spectre d'absorption de la chlorophylle a subissait un déplacement de 4 nm vers le bleu (679nm  $\rightarrow$  675nm) et que l'absorbance maximale par couche diminuait de 0.009 à 0.007. Par contre, l'effet de la vitamine K<sub>1</sub> était beaucoup plus drastique, soit une diminution de l'absorbance maximale par couche de 0.009 à 0.005 et une large bande d'absorbance de 550 à 470 nm.

En fluorescence, ils ont observé que la vitamine K<sub>1</sub> avait une efficacité plus grande comme quencher que l' $\alpha$ -tocophérylquinone et que la vitesse de quenching de la fluorescence de la chlorophylle était proportionnelle à la concentration de quinone dans la couche adjacente à la couche de chlorophylle. Lorsque les monocouches de chlorophylle et de quinone étaient séparées par une ou plusieurs couches d'arachidate de cadmium, ils ont remarqué une diffusion de la quinone dans les couches d'arachidate.

Dernièrement, des travaux de R.E. Hirsch (1977) ont porté sur les propriétés spectroscopiques de monocouches mixtes chlorophylle/quinone à diverses concentrations et les quinones étudiées sont la vitamine K<sub>1</sub>, l' $\alpha$ -tocophérylquinone et l' $\alpha$ -tocophérol. De son travail, Hirsch en est arrivé aux conclusions suivantes: l'introduction de la vitamine K<sub>1</sub> dans des films de chlorophylle résulte en un changement rigoureux des agrégats de chlorophylle et des autres espèces après une irradiation. La vitamine K<sub>1</sub> pourrait réduire les espèces de chlorophylle. De plus, l'addition de la vitamine K<sub>1</sub> à une monocouche de chlorophylle cause une diminution assez importante du coefficient d'absorption et un déplacement des maxima d'absorption de 678 nm à 682 nm et de 721 nm à 725 nm.

De même l'addition de l' $\alpha$ -tocophérylquinone à une monocouche de chlorophylle résulte en une diminution assez importante de la densité optique (absorbance) pour les pics à 670, 698 et 732 nm. L'irradiation d'un film mixte chl:  $\alpha$ -TCPQ n'a apporté aucun changement dans le spectre d'absorption, ce qui amène Hirsch à supposer que l' $\alpha$ -tocophérylquinone, en phase obscure, provoque un alignement parallèle des molécules de chlorophylle résultant en la formation d'un pic à 682 nm aux dépens de la forme monomère (670 nm) et de la forme agrégat (698 nm). La forme cristalline observée dans le noir (736 nm) pourrait résulter du changement d'orientation des cristaux observés dans une monocouche de chlorophylle pure à 730 et 748 nm.

Ainsi, il semble que les deux quinones (vit. K<sub>1</sub> et  $\alpha$ -TCPQ) amorcent la formation d'un agrégat à 680 nm qui pourrait être analogue au centre

réactionnel du PS II, soit le P680. Ce P680 pourrait alors être formé de portions de thylakoïdes où des quinones ou d'autres substances du PS II sont présentes.

Avec l' $\alpha$ -tocophérol associé à la chlorophylle dans une monocouche mixte, Hirsch n'a remarqué aucun changement dans la densité optique du spectre d'absorption après une irradiation, sauf que la maximum d'absorption subit un léger déplacement de 677 à 681 nm. Le tocophérol agit alors comme un "intermédiaire inerte" (inert spacer).

Le tableau 3 nous donne un bref aperçu des travaux réalisés sur l'interaction chlorophylle-quinone à l'état monomoléculaire depuis 1965.

Toutes ces études du système chlorophylle-quinone ont apporté un peu de lumière sur ce processus d'interaction encore très mal connu; cependant, personne ne s'est vraiment aventuré à émettre l'hypothèse d'un modèle d'interaction entre la chlorophylle et une quinone à l'intérieur de la membrane photosynthétique, sauf peut-être l'approche déjà faite il y a quelques années dans nos laboratoires par LeBrech, Leblanc et Antippa (1974) qui ont suggéré un modèle d'interaction entre la chlorophylle a et la p-benzoquinone, modèle impliquant deux molécules de chlorophylle a reliées à une molécule de p-benzoquinone par les atomes de magnésium.

Certaines approches ont aussi été faites pour expliquer les processus photobiologiques associés aux membranes photosynthétiques, telles les membranes bilipidiques (BLM) et les liposomes (Tien, 1974; Berns, 1976;

TABLEAU 3: RESUME DES TRAVAUX SUR L'INTERACTION CHLOROPHYLLE/QUINONE A L'ETAT MONOMOLECULAIRE

AUTEURS	ANNEE	TYPE D'ETUDE
GAINES, TWEET et BELLAMY	1965	Influence de la vitamine K <sub>1</sub> sur la fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> .
COSTA et coll.	1972	Spectroscopie d'absorption et de fluorescence du système chlorophylle/quinone sur des monocouches mixtes déposées sur un support solide à l'interface air-eau.
COSTA et PORTER	1974	Spectroscopie d'absorption et de fluorescence sur des monocouches déposées sur un support solide à l'interface lipide-eau. Réactions photochimiques au moyen d'agents réducteurs.
HIRSCH	1977	Spectroscopie d'absorption du système chlorophylle/quinone pris directement à l'interface air-eau.

Chen et Berns, 1976; Thornber et coll., 1976 et Sauer, 1978). Tout récemment, Masters et Mauzerall (1978) ont étudié l'effet de certaines quinones, et particulièrement les plastoquinone PQ-5 et PQ-9, sur les propriétés photoélectriques de bicouches lipidiques (BLM) contenant de la chlorophylle a. Ils ont conclu de leurs travaux que l'addition des plastoquinones PQ-5 ou PQ-9 augmentait la photoconductance jusqu'à 20 fois ce qu'elle était dans la bicoche sans quinone.

Cette étude est intéressante dans son ensemble mais ne nous renseigne pas vraiment sur un modèle d'interaction entre la chlorophylle et la quinone dans la membrane. Nous croyons que la méthode des monocouches associée à certaines techniques spectroscopiques nous aidera à faire un pas dans la bonne direction car cette méthode des monocouches nous renseigne principalement sur l'aire moléculaire et l'orientation moléculaire d'un système chlorophylle/quinone ainsi que sur l'interaction intermoléculaire entre ces deux pigments photosynthétiques.

### 3.0 BUT DE LA THESE

La composition de l'unité photosynthétique, unité responsable de la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique, montre que les chlorophylles a et b, les caroténoides et quelques quinones participent aux étapes primaires de la photosynthèse. En effet, les chlorophylles servent, on le sait, à capter l'énergie solaire et à transférer cette énergie tandis que les caroténoides protègent les chlorophylles de la photooxidation et les quinones transfèrent les électrons libérés au piège d'énergie.

Jusqu'à présent, nous savons que certaines quinones du chloroplaste jouent un rôle assez important dans le transfert d'électrons mais on ne connaît pas encore l'importance de leur interaction avec la chlorophylle. L'examen de la nature du complexe chlorophylle/quinone nous permettrait de prévoir la possibilité d'avoir un tel complexe comme piège d'énergie, phénomène encore inconnu de nos jours et qui passionne une foule de chercheurs.

Comme nous croyons que les pigments photosynthétiques forment une couche monomoléculaire dans la membrane interne du chloroplaste, nous avons adopté la méthode de Langmuir pour simuler cette orientation. L'examen des propriétés de pression de surface des systèmes chlorophylle/quinone nous permettra de savoir s'il y a interaction ou non et d'en évaluer une intensité relative mais ne nous permettra, en aucune façon, d'identifier le type d'interaction. Pour cela, nous nous proposons d'effectuer une étude en spectroscopie infrarouge de ces

complexes. Ainsi, nous pourrons alors nous permettre l'hypothèse d'un modèle d'interaction et envisager une étude plus exhaustive de ces systèmes chlorophylles/quinones à l'interface air-eau pour en arriver éventuellement à un modèle de membrane photosynthétique.

## 4.0 MATERIEL

Comme la technique des monocouches requiert certaines exigences tout à fait particulières, il est important de bien choisir les matériaux et instruments nécessaires à la réalisation de l'expérience. Ainsi, le choix des produits mis en cause, leur pureté, les méthodes de purifications de l'eau et la description sommaire des appareils utilisés sont autant de sujets qui seront traités dans ce chapitre.

### 4.1 Produits utilisés

La technique de monocouche nous oblige à apporter une attention tout à fait spéciale à tous les paramètres expérimentaux pouvant influencer de quelque façon que ce soit le résultat final. Ainsi, toute manipulation doit se faire avec précision et minutie et tous les produits chimiques utilisés doivent être d'une très grande pureté (99% et plus).

En monocouche, les causes d'erreurs peuvent être très nombreuses si on ne fait pas attention et il est parfois difficile de retracer avec exactitude la cause de l'erreur. Comme il est presque impossible de faire une compilation des sources d'erreur possibles pour une technique comme celle des monocouches, il faut mettre la chance de notre côté et utiliser dès le départ les produits les plus purs possibles.

#### 4.1.1 Chlorophylle a et b

La chl étant la substance de base de notre travail, il convient d'utiliser celle qui nous semble la plus pure possible selon des critères bien définis. La chlorophylle est de deux catégories: celle que l'on peut obtenir commercialement (Sigma Chem. Co.) et celle que l'on extrait à partir de feuilles d'épinard. La chlorophylle commerciale est d'une pureté variable; en effet, la pureté varie pour chaque lot de chlorophylle que la compagnie extraie, soit de 95 à 98 % pour la chlorophylle a et de 92 à 98 % pour la chlorophylle b.

En ce qui concerne la chlorophylle extraite des feuilles d'épinard, la méthode d'extraction et de purification ainsi que les résultats obtenus seront décrits ultérieurement dans ce travail.

#### 4.1.2 Vitamine K<sub>1</sub> et $\alpha$ -tocophérylquinone

Ces deux quinones sont parmi les plus importantes dans le chloroplaste avec la plastoquinone. Cependant, comme la plastoquinone n'est pas disponible commercialement et que nous n'avons pu en extraire, faute de temps, nous nous sommes limités à la vitamine K<sub>1</sub> et à l' $\alpha$ -tocophérylquinone.

La vitamine K<sub>1</sub> (2-méthyl-3-phytyl-1, 4-naphtoquinone) a été obtenue de la compagnie Sigma et a été utilisée telle qu'achetée sans aucune autre purification, son degré de pureté étant de l'ordre de 99% environ.

L' $\alpha$ -tocophérylquinone a été obtenue de la compagnie Eastman Kodak et possède un degré de pureté de l'ordre d'environ 99 %. Elle a donc été employée tel quelle, sans autre purification.

#### 4.1.3 $\alpha$ -Tocophérol et phytol

Nous avons utilisé l' $\alpha$ -tocophérol parce que c'est un des principaux constituants du chloroplaste; on le retrouve même en concentration deux fois plus grande (4%) que la vitamine K<sub>1</sub> (2%) et l' $\alpha$ -tocophérylquinone (2%) dans les chloroplastes d'épinard. Il a été obtenu commercialement de la compagnie Eastman Kodak et possède un degré de pureté d'environ 99 %. Il a donc été utilisé tel quel sans autre forme de purification.

Le phytol est obtenu commercialement de la compagnie Sigma et le degré de pureté varie selon les échantillons (de 90 à 97 %). Comme cette pureté n'était pas suffisante pour nos besoins, nous avons dû le purifier. Pour cela, nous avons procédé à une distillation sous vide des divers échantillons à notre disposition afin d'obtenir une pureté d'approchant ou même dépassant 99 %. La méthode employée sera décrite ultérieurement dans ce travail.

#### 4.2 Appareils utilisés

La liste des différents appareils utilisés au cours de ces expériences se résume à quatre types différents. Ce sont les suivants:

- le bain de monocouche (système de Langmuir)
- les systèmes de distillation de l'eau
- les spectrophotomètres d'absorption -Unicam SP1800  
-Perkin-Elmer Coleman 124
- le spectrophotomètre infrarouge -Perkin-Elmer Modèle 180

Le système de Langmuir et les systèmes de distillation de l'eau seront décrits en détail dans les chapitres suivants. En ce qui concerne les spectrophotomètres, voici quelques caractéristiques de chacun.

#### Unicam Modèle SP-1800

- .Source : une lampe à arc au deutérium et une lampe à filaments au tungstène.
- .Faisceau : double
- .Echelle : 190 à 850 nm
- .Balayage : manuel ou automatique
- .Filtres : changement automatique de l'uv au visible
- .Fentes : variable entre 0.1 et 1.0 nm. Largeur de fentes utilisées à 0.25 mm (largeur de bande passante de 0.8 nm)
- .Monochromateur : à réseau du type Ebert F/10, ayant une limite de résolution de 0.1 nm.

- .Absorption : 4 échelles de densité optique (0-2.0, 0-1.0, 0-0.5, 0-0.2)
- .Sensibilité :  $\pm 1\%$  sur toutes les échelles
- .Enregistreur : Unicam AR-25 possédant deux échelles de vitesse (sec/cm et min/cm)

#### Perkin-Elmer Modèle Coleman 124

- .Source : une lampe à arc au deutérium et une lampe à filaments au tungstène.
- .Faisceau : double
- .Echelle : 190 à 800 nm ( $\pm 0.5$  nm)
- .Balayage : manuel ou automatique
- .Filtres : changement manuel de l'uv au visible
- .Fentes : fixes à trois positions (0.1, 0.5 et 1.0 nm)
- .Absorption : 2 échelles de densité optique (0-1.0 et 0-2.0)
- .Sensibilité :  $\pm 1\%$  sur toutes les échelles
- .Enregistreur : Perkin-Elmer Modèle 56 possédant une échelle de voltage de 1 mV à 10 V.

#### Perkin-Elmer Modèle 180 (Infrarouge)

- .Résolution :  $4 \text{ cm}^{-1}$  à  $4000 \text{ cm}^{-1}$   
 $3 \text{ cm}^{-1}$  à  $3000 \text{ cm}^{-1}$   
 $1.8 \text{ cm}^{-1}$  à  $1700 \text{ cm}^{-1}$
- .Précision des bandes :  $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$
- .Vitesse de balayage :  $150 \text{ cm}^{-1}/\text{minute}$

.Expansion de l'ordonnée : 2

.Expansion de l'abscisse : 5 (1800 -1400  $\text{cm}^{-1}$ )  
1 (4000 -2000  $\text{cm}^{-1}$ )

#### 4.3 Tableaux récapitulatifs

La compilation des produits chimiques, des solvants et des appareils utilisés est présentée dans les tableaux 4 et 5.

TABLEAU 4: CARACTERISTIQUES DES PRODUITS

PRODUIT	ORIGINE	PROPRIETE	PURETE
Acétate d'éthyle	Fisher Sci. Co.	Certified ACS	99 Mol %
Acétone	Fisher Sci. Co.	Certified ACS	99.5 %
Acide arachidique (n-eicosanoïque)	Applied Sci. Labo.	P.F. 74-76 °C	99 + %
Acide chlorhydrique	Fisher Sci. Co.	Reagent grade ACS	Concentré (36.5 - 38 %)
Acide fluorhydrique	Fisher Sci. Co.	Reagent grade ACS	Concentré (w/w 49 %)
Acide sulfochromique	Fisher Sci. Co.	Cleaning solution	Concentré
Chlorophylle <u>a</u>	Sigma Chem. Co.	Anhydre	98 %
Chlorophylle <u>b</u>	Sigma Chem. Co.	Anhydre	95 - 98 %
Chlorure de sodium	Fisher Sci. Co.	Certified ACS	99.5 %
Diethylamine	Fisher Sci. Co.	Reagent grade	
Ether éthylique	BDH Chem. Co.	Analar Aristar	Analytical grade Ultrapure grade

PRODUIT	ORIGINE	PROPRIETE	PURETE
Ether de pétrole	J.T. Baker Chem. Co.	Certified ACS P.Eb. 35-60 °C P.Eb. 60-80 °C	
Eau distillée	Voir texte p. 54		
n-Hexane	Fisher Sci. Co.	Certified grade	99 Mol %
Hydroxyde de sodium	Canlab Co.	Pastilles	Concentré
Iso-octane	Fisher Sci. Co.	Certified grade	99 Mol %
Ligroïne	Fisher Sci. Co. Eastman Kodak Co.	P.Eb. 90-120 °C P.Eb. 35- 60 °C	
Méthanol	J.T. Baker Chem. Co.	Absolute grade	99.5 %
No-chromix	Godax Lab., N.Y.	Cleaning solution (non-chromique)	
Paraffine	Fisher Sci. Co.	Dure, P.Eb. 56 °C	
Permanganate de potassium	Fisher Sci. Co.	Cristallin	
Phytol	Sigma Chem. Co.		90-97 %

PRODUIT	ORIGINE	PROPRIETE	PURETE
n-Propanol	Fisher Sci. Co.	Certified ACS	
Sable de mer	Fisher Sci. Co.		
Sucre à glacer	Sucres Redpath Ltée	Impalpable	Peut contenir jusqu'à 5% d'a- midon
Tampon phosphate de sodium	J.T. Baker Chem. Co.	Monobasique Dibasique	99.8 % 99.1 %
d- $\alpha$ -Tocophérol	Eastman Kodak Co.		99 %
d- $\alpha$ -Tocophérylquinone	Eastman Kodak Co.		99 %
Vitamine K <sub>1</sub>	Sigma Chem. Co.	Anhydre	99 %

TABLEAU 5: CARACTERISTIQUES DES APPAREILS ET MATERIAUX

APPAREIL	ORIGINE	PROPRIETES
Cellules de quartz	Hellma Canada Ltd Toronto	Parcours optique de 0.1, 0.2, 0.5 et 1.0 cm
Collecteur de fractions	Fisher Sci. Co. Modèle LKB 7000 Ultrarac	Automatique
Colonnes à distiller	Pegasus Ind. Spe- cialities Ltd. Toronto	Verre industriel Sovirel, Colonne à 8 plateaux
Entonnoir et support pour filtration	Millipore Co., Mis- sisauga, Ontario	Pyrex
Evaporateur	Fisher Sci. Co.	Modèle Rotovapor R (Brinkman-Buschi)
Feuille d'or	Georges M. Whiley Ltd., Ruisly, Mid- dlesex England	0.00061 cm X 10.16 cm X 10.16 cm
Fil de torsion	Fil de guitare Fender Musical Instr. California	Nickel-chrome 0.038 cm diamètre
Filtres millipores	Millipore Co. Mis- sisauga, Ontario	Pore de $5\mu$ , $0.45\mu$ et $0.22\mu$
Illuminateur	Fisher Sci. Co.	5 intensités différen- tes
Lamelles de germanium	Harrick Sci. Co. Ossining, N.Y.	$50 \times 20 \times 2$ mm, $\theta = 45^\circ$
Lampe verte	Westinghouse Co.	Fluorescent 2 pieds long. # F20T. 12/G (20 watts)
Mica	Cenco Co.	$0.0058 \text{ cm} \times 12.7 \text{ cm}$ $\times 17.8 \text{ cm}$

APPAREIL	ORIGINE	PROPRIETES
Moteur	Power Drive Inc. Québec	Zero-Max, 0-400 RPM
Mylar	Dupont of Canada Ltd, Montréal	0.000125 cm X 22.0 cm X 28.0 cm
pH mètre	Fisher Sci. Co.	Accumet Modèle 420 (digital)
Seringues	Hamilton Co., Calif. (Fisher Sci. Co.)	Capacité 100 $\mu$ l (0.1 ml)
Source de puissance	Lab-Volt Bruck En- gineering Com. Inc. New York	Modèle 194
Spectrophotomètre d'absorption uv-visible	Unicam	Modèle SP-1800 (voir texte p. 45)
	Perkin Elmer Co.	Modèle Coleman 124 (voir texte p. 46)
Spectrophotomètre ir	Perkin Elmer Co. Newark, N.Y.	Modèle 180
Support de lamelle	Perkin Elmer Co.	Type F-MIR
Système à distiller	Brinkmann Inst. Canada Ltd, Rexdale Ontario	Système en quartz Modèle Bi-18 (Heraens Schott) (voir texte p. 55)
Système de Langmuir	Ateliers de l'UQTR	(voir texte p. 69)
Système Millipore	Millipore Co. Mis- sisauga, Ontario	Modèle Super Q (SQ)
Teflon	Commercial Plastics Montréal, P.Q.	Tape-Type T et Type 3T; 2.54 cm de large et 18 mètres de long (1 côté adhésif)

APPAREIL	ORIGINE	PROPRIETES
Téflon	Resinol Plastics Ltd, Saint-Laurent P.Q.	Type SKAP/D3T 30 cm X 0.0076 cm X 16.5 m
Tensiomètre de surface	Fisher Sci. Co.	Modèle 20 ( $\pm 0.05 \text{ mN.m}^{-1}$ )
Transducteur linéaire	Hewlett Packard	Modèle 24 DCDT 500
Voltmètre digital	Radionics Ltd, Montréal	Keithley Modèle 172
	A. Crawford Assoc. Ltd. Montréal	Fluke Modèle 8000 A

## 5.0 METHODES EXPERIMENTALES

Les méthodes expérimentales qui seront décrites ci-après se réfèrent aux trois principales étapes de ce projet, soit l'extraction et la purification des chlorophylles a et b, la technique des monocouches et la spectroscopie infrarouge du système chlorophylle/quinone.

### 5.1 Purification de l'eau

Les différentes manipulations effectuées lors d'une expérience en monocouche (préparation des solutions-tampons, calibration du système de Langmuir, isothermes de pression de surface, déposition sur un support solide) requièrent une eau possédant un degré de pureté maximum. Habituellement, nous vérifions cette pureté en mesurant la conductivité et la tension superficielle. Une eau est considérée comme acceptable pour un travail en monocouche, si, après purification, elle présente une tension superficielle variant entre 67.0 et 72.0  $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$  ( $\text{dyne} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) et une conductivité supérieure ou égale à 18 Megohms  $\cdot \text{cm}^{-1}$ . Cependant, une eau ayant une conductivité légèrement inférieure à 18 Megohms  $\cdot \text{cm}^{-1}$  peut être utilisée sans pour autant contaminer la surface active.

Chaque expérience exige habituellement une mesure préalable de la tension superficielle de l'eau, mesure réalisée à l'aide d'un tensiomètre de surface Fisher Modèle 20 qui fonctionne selon la méthode de DuNouy (Munger, 1978).

Dans nos laboratoires, nous avons utilisé plusieurs systèmes ayant de réussir à obtenir une eau qui satisfasse à nos besoins. Ce sont les systèmes suivants:

- Système "Barnstead"
- Système "Corning Pyrex Brand Glass and Teflon" (Megapure)
- Système à triple distillation
- Système Pegasus à colonnes à plateaux
- Système Millipore type Super Q (SQ)
- Système en quartz Bi-18

Pour les cinq premiers systèmes, nous vous referons aux travaux de G. Munger (1978) qui a étudié et décrit chacun de ces systèmes avec leurs caractéristiques respectives.

En ce qui concerne le système en quartz Bi-18, soit celui que nous avons surtout utilisé, voici son principe de fonctionnement et ses principales caractéristiques:

Il se compose de deux sections distinctes permettant une distillation continue et produisant environ 1.8 litre d'eau pure par heure. A la sortie, la température de l'eau est de  $85^{\circ}\text{C}$  (358 K) et par conséquent, elle n'est utilisable que 24 heures plus tard lorsqu'elle est à une température d'environ  $20^{\circ}\text{C}$  (293 K). La conductivité d'une telle eau est supérieure à  $18 \text{ Megohms}\cdot\text{cm}^{-1}$  et la tension superficielle obtenue est de  $68.20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $\text{dyne}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), ce qui satisfait nos conditions d'utilisation.

L'évaporation des résidus produits par un tel système n'est que de 0.4 ppm.

Cette méthode de purification de l'eau nous permet d'obtenir une eau très pure, la meilleure jamais obtenue dans nos laboratoires au cours des dernières années (Munger, 1978). Ce système en quartz ainsi que le système Millipore SQ qui l'alimente sont vérifiés et nettoyés régulièrement de façon à conserver la qualité de notre eau.

### 5.2 Extraction et purification des chlorophylles a et b

Il est bien connu que les chlorophylles ne sont pas les seuls pigments des plantes vertes; en effet, on y retrouve aussi des caroténoides et des xanthophylles entre autres. Le  $\beta$ -carotène est la caroténoïde la plus fréquente mais les xanthophylles varient énormément selon la classe de plantes vertes. Ainsi, à cause de cette grande variété de pigments, les procédés chromatographiques des pigments chlorophylliens ont suivi plusieurs chemins. Ceci va des procédés de séparation entre les caroténoides et les chlorophylles jusqu'à des méthodes élaborées pour séparer les chlorophylles les unes des autres. Pour certains extraits, une seule chromatographie suffit alors que pour d'autres mélanges, la séparation doit être répétée plusieurs fois et, occasionnellement, on doit varier le solvant et l'adsorbant. A cause de l'instabilité de ces pigments, des précautions doivent être prises pour toutes les manipulations en chromatographie (Strain, 1958; Strain et Svec, 1975).

Notre méthode d'extraction et de purification des chlorophylles a et b est principalement basée sur la méthode de Strain et Svec (1966) et a été mise au point conjointement par H. Dijckmans du Département de Botanique de l'Université de Liège, Belgique et L. Lemieux de notre équipe de recherche de l'UQTR en 1973. Elle se compose des étapes suivantes:

#### 5.2.1 Extraction

- Choisir des feuilles d'épinard, jeunes et bien vertes pour ne pas être gênés par trop de pigments jaunes.
- Laver 200 g de feuilles, les dénervurer et les découper en morceaux
- Les plonger dans l'eau bouillante (eau déionisée) et laisser bouillir pendant 2 minutes (environ 2 litres d'eau pour 200 g de feuilles, i.e. environ 10 fois le poids des feuilles).

Cette technique d'ébouillantage a le dé-savantage d'isomériser partiellement quelques-unes des chlorophylles qui sont cependant facilement séparables par chromatographie; par contre, elle a l'avantage de réduire le contenu en eau des feuilles, de faciliter l'extraction des pigments et de réduire l'oxydation enzymatique et l'hydrolyse des chlorophylles.

- Filtrer sur un filtre en porcelaine (Buchner), ou sur un tamis, et refroidir rapidement avec de l'eau froide; presser pour en extraire l'eau.
- Extraire les pigments dans un mélange méthanol, éther de pétrole (MeOH - EP) (4:1) par macération pendant quelques minutes.
- Répéter l'extraction jusqu'à ce que les feuilles soient incolores.
- Verser l'extrait dans des ampoules à décantation de 2 litres; transférer les pigments dans EP en ajoutant 2 litres d'une solution de NaCl dans l'eau (solution saturée diluée 10 fois) (le sel empêche la formation d'une émulsion). Bien agiter sans trop secouer et laisser décanter.
- Recueillir la phase éthérée et la conserver à l'obscurité; extraire les pigments restant dans la sous-phase avec EP à deux reprises.
- Les extraits éthérés sont combinés et lavés plusieurs fois avec du méthanol aqueux (75%) qui enlève une grande partie des pigments jaunes. Répéter 3 fois et ne pas trop laver car on extrait aussi la chl b.
- Laver avec du tampon phosphate  $10^{-3}$  M à pH 8 pour enlever les traces d'alcool jusqu'à ce que l'interface ne présente plus de bulles (ne pas secouer l'ampoule mais mélanger par

un mouvement circulaire et s'il se forme une phase intermédiaire avec des particules brunes, l'éliminer).

- Concentrer l'extrait sous vide jusqu'à 30 ml ou évaporer à sec et redissoudre le résidu dans de l'éther de pétrole frais.
- Conserver l'extrait au réfrigérateur pendant la nuit.

#### 5.2.2 Séparation chromatographique

La séparation se fait habituellement par une chromatographie sur colonne. L'adsorbant utilisé le plus fréquemment et qui donne les meilleurs résultats est le sucre en poudre (sucre à glacer). La colonne utilisée est une colonne de verre de 30 cm de hauteur et de 9 à 10 cm de diamètre fermé par un robinet à une extrémité ainsi qu'un verre frité pour empêcher le sucre de boucher le robinet.

- verser dans la colonne une suspension de sucre dans EP par fractions successives de 150 ml ou verser directement dans la colonne le sucre et l'EP en même temps. Laisser chaque fraction se tasser dans la colonne en faisant couler l'EP. Eviter toute formation de bulles d'air. Remplir la colonne jusqu'à environ 2 à 4 pouces du bord.
- Protéger la surface du sucre par un papier filtre et ajouter un peu de sable de mer (Sea sand) préalablement lavé avec de l'EP sur le papier filtre.

- Déposer délicatement l'extrait sur la colonne sous une couche d'EP et laisser les pigments pénétrer dans le sucre. Lorsque presque tout a pénétré dans le sucre, on ajoute EP petit à petit pour ne pas trop diluer ce qui reste à la surface. Puis, lorsque tout a pénétré la colonne, ajouter de grandes quantités de EP.
- Développer avec EP jusqu'à ce que les caroténoïdes soient éluées; puis développer avec un mélange EP + n-propanol 0.5 % ce qui sépare les chlorophylles des autres pigments (la chl<sub>a</sub> passe au-dessus des xanthophylles).
- Recueillir des fractions de 25 ml au moyen d'un collecteur automatique. Normalement, les premières fractions sont contaminées par la phéophytine a et les dernières par les xanthophylles.
- Eluer la chl b avec une solution EP + n-propanol 1%.
- Prendre des spectres d'absorption des fractions et ne garder que celles qui ne contiennent que de la chlorophylle pure et celles qui ne sont que très peu contaminées par la phéophytine ou les xanthophylles.
- Concentrer les fractions de chl a et b pures par évaporation à sec et les conserver au froid.

- Reprendre les fractions contaminées et les évaporer à sec; puis refaire une deuxième chromatographie avec ces fractions. A ce moment, on utilise une colonne de diamètre plus faible mais de longueur plus grande, soit 3.7 cm X 40 cm. Eluer avec un mélange EP-0.5% n-propanol. Recueillir des fractions de 4-5 ml et prendre des spectres d'absorption de ces fractions. Concentrer à sec les fractions pures et garder au froid.

#### 5.2.3 Purification

- Toutes les fractions pures de chlorophylles a ou b sont reprises dans EP (si EP ne dissout pas toutes les chl, dissoudre dans l'acétone et transférer dans EP par addition de tampon).
- Laver une fois avec du méthanol aqueux de 50 à 80 % pour la chl a et de 50 à 70 % pour la chl b, pour enlever les traces de xanthophylles non décelées au spectrophotomètre. Laver plusieurs fois avec du tampon pour enlever l'alcool.

Généralement, il fallait ajouter un peu d'acétone afin de dissoudre toutes les chlorophylles. Ensuite on transférait dans EP par addition de tampon. On lavait une fois avec du méthanol aqueux à 75% pour la chl a, puis on lavait environ 5 fois au tampon pour enlever l'alcool.

#### 5.2.4 Cristallisation et conservation

chl a: -la solution de chla dans EP est additionnée d'un volume d'hexane, mélangée et lavée plusieurs fois au tampon;

elle est évaporée sur une sous-couche de tampon sous vide et le film de chl a est recueilli, dissous dans l'acétone et transféré:

-soit\_dans l'hexane: la solution est lavée plusieurs fois avec de l'acétone puis du tampon et évaporée par la suite sur une sous-couche aqueuse.

L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une valeur du coefficient d'absorption identique à la valeur de référence soit 86,300 à 662 nm et 111,700 à 428.5 nm (Strain et coll. 1963). Conserver la chl sèche sous vide au froid et à l'obscurité.

-soit\_dans l'iso-octane: la solution est lavée plusieurs fois avec de l'acétone puis du tampon; la phase aqueuse est soigneusement séparée et la solution de chlorophylle est laissée au froid (-18°C) pendant plusieurs jours.

La chlorophylle précipite sous forme de cristaux; ceux-ci sont centrifugés pendant une heure à 20,000g. Le culot est séché puis conservé sous vide, au froid et à l'obscurité.

chl b: -la solution de chl b dans EP est additionnée d'un volume d'hexane et lavée plusieurs fois avec du tampon. La chl b précipite sous forme de cristaux à l'interphase. Ils sont recueillis sur une sous-couche de tampon, séchés sous-vide et conservés au froid et à l'obscurité.

Il est très important de noter que toutes ces opérations d'extraction et de purification doivent se dérouler à l'abri de la lumière vive et de la chaleur; nous travaillons donc sous une lumière verte. De plus, la vaisselle utilisée doit être très propre.

### 5.2.5 Vérification de la pureté

#### 5.2.5.1 Spectroscopie d'absorption

Afin de vérifier la pureté de la chlorophylle, on se sert principalement de la spectroscopie d'absorption dans la région du visible. Les appareils utilisés ont déjà été décrits précédemment. Nous avons surtout vérifié la position des maxima d'absorption et l'allure générale du spectre. La valeur du coefficient d'absorption molaire pourrait être également considérée comme un critère de pureté: cependant, nous avons préféré prendre en considération le rapport du maximum d'absorption dans la région du bleu sur celui dans la région du rouge du spectre. Habituellement ce rapport est d'environ 1.29 pour la chlorophylle a et 2.84 pour la chlorophylle b (voir résultats page 95).

#### 5.2.5.2 Chromatographie sur couche mince (TLC)

Cette technique consiste à faire migrer sur une plaque recouverte d'un adsorbant, à l'aide d'un solvant approprié, une certaine quantité d'une solution de chlorophylle à analyser (50  $\mu$ l). Ainsi, si nous n'avons qu'une seule tache verte sur la plaque après l'élution, c'est que la chlorophylle n'est pas contaminée par les autres pigments photosynthétiques.

Les adsorbants les plus fréquemment employés sont le gel de silice (Strain et Sherman, 1969; Shiraki et coll., 1978), la cellulose (Sievers et Hynninen, 1977) et le sucre (Jeffrey, 1968). Il est possible d'employer aussi d'autres adsorbants. Une description assez complète de ces adsorbants ainsi que les solvants à employer est donnée par Bollinger et Konig (1969) et Sestak (1967).

#### 5.2.5.3 Isothermes de pression de surface

Quoique la technique de chromatographie sur couche mince et celle de spectroscopie d'absorption soient de bons indicateurs de pureté de la chlorophylle, nous croyons que l'isotherme de pression de surface est encore plus révélatrice de la pureté d'une solution de chlorophylle. En effet, par la technique de monocouches, il peut devenir possible de détecter des impuretés qui seraient passées inaperçues en chromatographie sur couche mince et en spectroscopie d'absorption. Cette technique nous permet ainsi de calculer l'aire occupée par une molécule à

l'interface air-eau et si nous obtenons une aire moléculaire plus grande que ce qu'elle devrait être, c'est que la chlorophylle contient des impuretés. Cette technique est donc le critère ultime dont nous tenons compte lors de la purification de la chlorophylle.

#### 5.2.5.4. Autres techniques

D'autres techniques peuvent aussi être employées pour vérifier la pureté de la chlorophylle extraite. Ainsi, la spectroscopie infrarouge peut être utile pour déceler les impuretés. On peut aussi employer la spectroscopie Raman, la spectroscopie d'émission et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). Cependant, ces techniques demandent une quantité assez importante de chlorophylle pour pouvoir donner des renseignements révélateurs sur la pureté de cette chlorophylle. Comme le procédé d'extraction de la chlorophylle nous donne un rendement de l'ordre du milligramme, ces techniques spectroscopiques ne peuvent être utilisées et nous devons nous limiter à la spectroscopie d'absorption, à la chromatographie sur couche mince et surtout à l'isotherme de pression de surface.

### 5.3 Purification du phytol

Comme il est important de travailler avec de la chlorophylle pure, il l'est aussi pour les quinones et autres pigments employés. Nous avons utilisé la vitamine K<sub>1</sub>, l' $\alpha$ -tocophérylquinone et l' $\alpha$ -tocophérol sans autres purifications. Cependant, ce n'est pas le cas avec le phytol.

Le phytol, à notre disposition, n'était pur qu'à environ 98%, ce qui ne satisfaisait pas nos exigences. Ainsi, nous avons dû procéder à une purification du phytol. Cette purification s'est faite au moyen d'une distillation fractionnée sous vide. Le vide est fait à l'aide d'une pompe mécanique et est relié à un manomètre au mercure pour connaître la pression tout au long de l'expérience. La température d'ébullition du phytol est vérifiée au moyen d'un thermomètre. La distillation se fait à l'aide d'un bain d'huile pour éviter une évaporation trop rapide du phytol sous l'effet de la chaleur. L'appareillage utilisé pour la distillation est du type "Microkit KIMAX 14/20".

#### 5.4 Technique des monocouches

##### 5.4.1 Théorie de Langmuir

En peu de mots, nous pourrions dire qu'une monocouche est un film flottant à la surface de l'eau et qui a l'épaisseur d'une molécule. Mais comment en est-on arrivé à cette définition?

Durant de nombreuses années, beaucoup de scientifiques ont cherché à expliquer ce phénomène, i.e. à comprendre le comportement des films à la surface de l'eau. Finalement, Langmuir (1917) a développé une technique pour expliquer le comportement des molécules en monocouches insolubles et cette théorie est encore valable de nos jours.

Pour expliquer sa théorie, Langmuir a étudié le comportement de certains acides gras possédant une longue chaîne aliphatique tels l'acide stéarique ou l'acide arachidique. Ainsi, il a démontré que ces acides formaient des films dans lesquels les molécules occupaient la même surface "bidimensionnelle" (environ  $20 \text{ \AA}^2$  par molécule) peu importe la longueur de la chaîne. Puisque le volume moléculaire augmente en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique, l'épaisseur du film doit dépendre de l'acide utilisé. Ainsi, Langmuir en a conclu que non seulement les films avaient l'épaisseur d'une molécule, mais que les molécules étaient orientées à la surface de l'eau de façon à ce que le groupement polaire soit immergé dans l'eau et que la longue chaîne non-polaire soit dirigée verticalement à la surface de l'eau (Gaines, 1966).

La figure 5 illustre schématiquement le comportement d'une monocouche sur un bain de monocouche tel que conçu par Langmuir lui-même.

Ce système comprend un bain pour l'étalement de la monocouche à l'interface air - eau, un flotteur mobile relié aux parois du bain et qui sépare la surface propre et la surface couverte par le film et un mécanisme de détection permettant de mesurer directement la pression de surface.

La technique, mise au point par Langmuir, est toujours valide aujourd'hui. Cependant, ce qui a changé, ce sont les moyens employés pour mesurer les différents paramètres expérimentaux. Ainsi, si on se réfère aux travaux de Guastala (1939), Kogl et Havinga (1940), Anderson

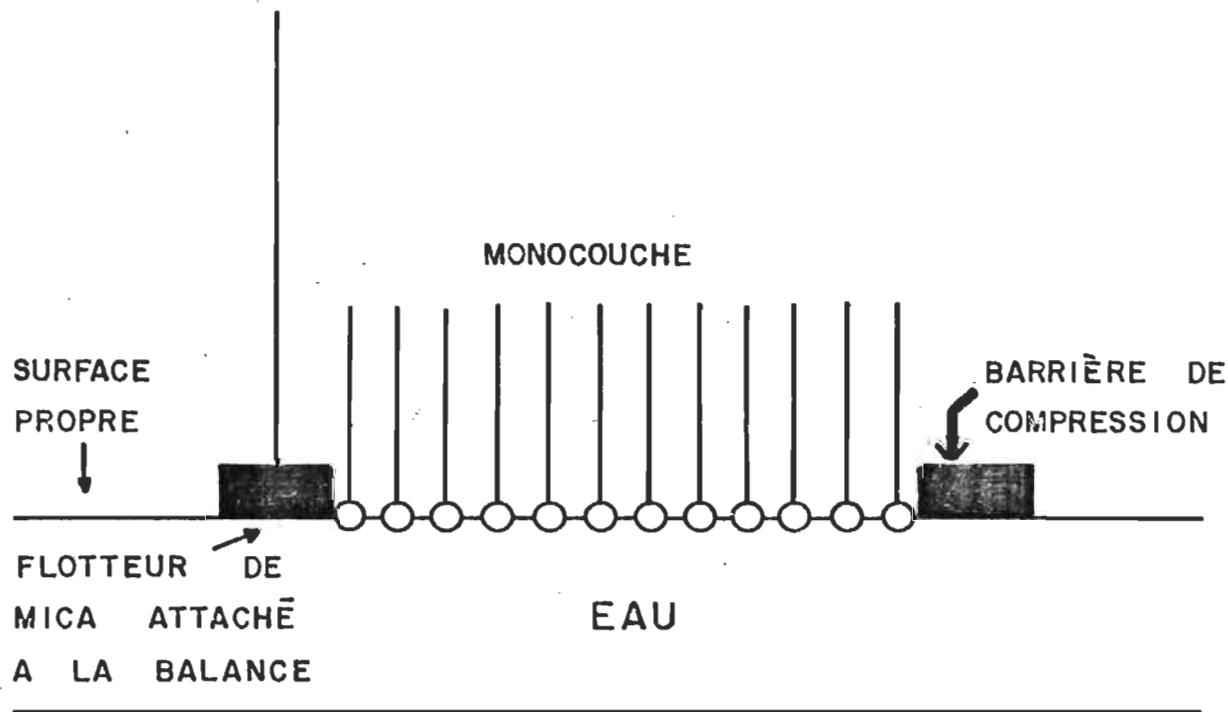


FIGURE 5. Représentation schématique de la formation d'une monocouche d'acide gras selon la théorie de Langmuir (Gaines, 1966 a).

et Evett (1952), Trurnit et Lauer (1959), Gaines (1963), Frommer et Miller (1965), Suzuki et coll. (1967), Pagano et Gershfeld (1972), Fromherz (1971, 1973 et 1975), Den Engelsen et coll. (1976), Tabak et Notter (1977) et Munger (1978) nous remarquons que chacun d'eux a apporté une certaine modification au système de base tel que conçu par Langmuir. Ces systèmes deviennent de plus en plus mécanisés et automatisés permettant de faciliter les mesures expérimentales et d'augmenter la précision des résultats.

#### 5.4.2 Description du système

Le système que nous avons utilisé est naturellement basé sur le principe de Langmuir et a été adapté selon nos propres besoins. Il a d'ailleurs été fabriqué par les techniciens des ateliers de mécanique de l'UQTR.

Notre bain de monocouche peut utiliser deux systèmes de détection différents, soit un système fonctionnant selon la méthode standard du cadran gradué en degrés, soit un système équipé d'un transducteur magnétique linéaire. Chacun des deux systèmes sera décrit en détail. Voici les principales caractéristiques de chaque composante du système de Langmuir que nous avons utilisée (Fig. 6).

##### 5.4.2.1 Méthode du cadran gradué en degrés

###### Bain principal

Ce bain, fait de verre ayant 5 mm d'épaisseur, a les dimensions

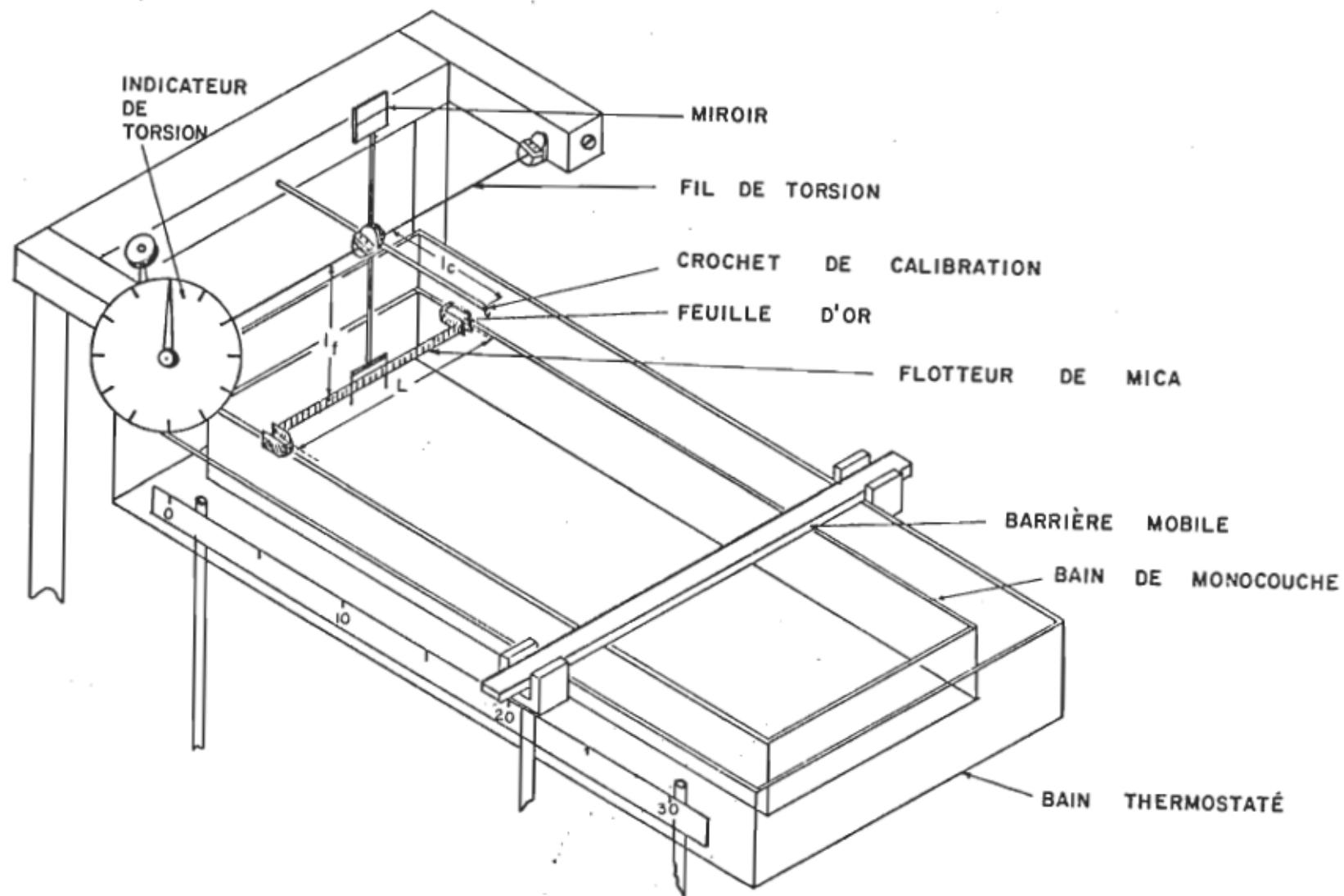


FIGURE 6. Système de Langmuir permettant l'étude à l'interface air-eau.

suivantes: 33.0 cm de long, 14.8 cm de large et 5.0 cm de haut. Chaque section de verre est reliée ensemble au moyen d'une colle silicone non toxique. L'ensemble du bain principal est recouvert de téflon pour éviter le contact de la colle avec l'eau et les produits étudiés. Ce téflon peut être remplacé au besoin, c'est-à-dire, lorsqu'il nous semble contaminé (il y a contamination lorsqu'il se forme de petites mares dans le fond du bain en enlevant l'eau). On applique aussi du téflon sur les parois du bain, là où la barrière mobile glisse et cela, dans le but d'empêcher les fuites d'eau ou de molécules se trouvant à la surface.

#### Bain thermostaté

Long de 48 cm, large de 22 cm et haut de 6.4 cm, ce bain thermostaté se trouve sous le bain principal et les parois sont collées de la même façon. On contrôle habituellement la température du bain principal au moyen d'une pompe à circulation. La circulation de l'eau dans le bain thermostaté se fait par des ouvertures d'entrée et de sortie à la base de la paroi verticale. Ces ouvertures sont reliées à la pompe par des tubes. Cependant l'utilisation du bain thermostaté n'est pas essentielle; en effet, si on parvient à maintenir une température inférieure à  $20^{\circ}\text{C}$  à l'intérieur même du laboratoire, alors il n'est plus nécessaire de "thermostater" notre bain de monocouche.

### Barrière mobile

Cette barrière, fait de verre de 22.0 cm X 1 cm X 0.6 cm, est aussi recouverte de téflon pour assurer un contact étanche avec les parois du bain et un glissement plus doux sur ces parois. Pour avoir ce contact étanche avec les parois, on place une pesée métallique (environ 50 g) à chacune des extrémités de cette barrière. La mobilité de cette barrière se fait au moyen d'une vis sans fin et le mouvement peut être fait dans les deux sens de façon manuelle ou automatique en utilisant un moteur synchronisé ayant une vitesse de compression constante, ce qui élimine les fluctuations possibles.

### Fil de torsion

Le fil de torsion est la partie la plus importante du système. Sa composition et son diamètre variable permet de modifier la sensibilité du système selon les expériences. Habituellement, le fil est fait de nickel, d'acier, de molybdène ou d'un alliage nickel-chrome et c'est ce dernier que nous employons le plus fréquemment. Son diamètre peut varier de 0.0127 à 0.0381 cm. Lors des manipulations, on doit absolument éviter une trop grande torsion du fil car cela causerait un étirement du fil, un changement de ses propriétés physiques et finalement une modification de la sensibilité du bain. On mesure la torsion appliquée au fil au moyen du cadran gradué en degré avec le système conventionnel. Avec un système équipé d'un transducteur linéaire, le fil ne subit aucune torsion.

### Balancier

Le balancier est composé de deux bras métalliques, l'un horizontal et l'autre vertical, qui sont reliés au fil de torsion à leur intersection. Le bras vertical, situé au centre du bain, est relié à une espèce de fourchette qui pénètre dans deux petits trous pratiqués dans le flotteur. Ces deux trous ont un diamètre de 1 mm chacun. La longueur du bras vertical est de 7.9 cm et la fourchette, large de 6.4 cm est à 1 cm au-dessus du flotteur. La partie supérieure du bras vertical est longue de 7 cm au-dessus du fil et porte un petit miroir à son extrémité. Ce miroir permet d'observer la déviation du faisceau lumineux lorsqu'on exerce une pression sur le flotteur ou lorsque l'on calibre le système. Le bras horizontal a un rôle moins important à jouer; l'extrémité avant du bras, longue de 7.3 cm, comporte un petit crochet qui sert à la calibration. L'extrémité arrière, pour le système utilisant le cadran en degré, n'a aucun rôle à jouer. Par contre, pour un système équipé du transducteur magnétique linéaire, il est relié à la bobine du transducteur (voir la description du transducteur, p. 75 ).

La fourchette possède un double rôle. Elle permet d'abord au flotteur de se déplacer transversalement de façon uniforme lorsqu'on exerce une pression sur celui-ci. Puis, le fait qu'elle traverse le flotteur en deux points précis, empêche une distorsion de ce dernier lors de la compression.

### Flotteur et feuilles d'or

Le flotteur est habituellement fait de mica ou de mylar. Il possède les dimensions suivantes: 12.7 cm de long, 0.8 cm de large et 0.0085 cm d'épais. Sa caractéristique importante est son inertie et sa très grande hydrophobie. Il est relié aux parois du bain par deux minces feuilles d'or de 4.0 à 5.0 cm de long X 0.6 à 0.8 cm de large X 0.0006 cm d'épais. La liaison flotteur - feuille d'or - paroi du bain se fait à l'aide de cire. L'utilisation des feuilles d'or permet une plus grande mobilité du flotteur tout en ayant la propriété d'être très inerte.

### Cage de plexiglass

Tout le système est protégé par une cage de plexiglass pour éliminer la contamination externe par la poussière de l'air. L'accès au bain se fait par un couvercle sis sur le dessus de la cage.

### Autres caractéristiques

Sur un côté du bain, une règle graduée permet de suivre le mouvement de la barrière mobile et de calculer la surface occupée par les molécules à l'interface air-eau.

Le système est installé sur une table antivibration montée sur coussins d'air, dans le but d'éliminer les causes d'erreurs dues aux

chocs qui pourraient survenir sur la table et aux vibrations provenant du moteur.

Un système de ventilation avec contrôle de température permet de maintenir une température constante inférieure à  $20^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ) dans le laboratoire.

#### 5.4.2.2 Méthode du transducteur magnétique linéaire

La conception de cet appareil remonte à 1959 et fut l'œuvre de H. J. Trurnit et W. E. Lauer. Par la suite, en utilisant le même principe, plusieurs groupes de chercheurs travaillant dans le même domaine ont apporté différentes modifications au système, et parmi les plus importantes, citons celle de Mann et Hansen (1960, 1963), Gaines (1963), Frommer et Miller (1965), Suzuki et coll. (1967), Fromherz (1975) et Munger (1978). Ces modifications ont ainsi permis d'améliorer le système et d'obtenir de meilleurs résultats dans les différentes recherches sur les substances d'intérêt biologique comme les protéines, les polypeptides et la chlorophylle à l'interface air-eau.

Le bain de monocouche utilisé est le même que décrit auparavant sauf que le système de détection de la force appliquée sur le flotteur et son agencement avec le reste du bain est modifié.

Ainsi, le bain principal, le bain thermostaté, la barrière mobile, le flotteur et le moteur de compression sont identiques à ceux déjà décrits pour le système utilisant la méthode des degrés. Ce qui change,

c'est le fil de torsion et le balancier qui est relié au transducteur.

Dans ce système, à cause du transducteur, le fil de torsion est de diamètre supérieur à ce qu'il est avec le système conventionnel. On utilise alors un fil de 0.038 cm ou plus de diamètre pour être capable de travailler à des pressions supérieures à  $30\text{mN. m}^{-1}$  ( $\text{dyne}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Le diamètre du fil peut varier selon les limites de pression correspondant au collapse de la substance à étudier.

En ce qui concerne le balancier, la partie inférieure de son bras vertical est identique à celui du système précédent et est relié de la même façon au fil de torsion. Cependant, la partie supérieure du bras vertical, où se trouvait le miroir dans le système précédent, a été supprimée. La partie arrière du bras horizontal, qui était libre dans l'autre système, est cette fois-ci, rattachée à la partie métallique qui se déplace dans le centre de la bobine du transducteur (Fig. 7).

Le principe de fonctionnement du transducteur est très simple. Il s'agit du déplacement d'une tige métallique à l'intérieur d'une bobine. Ce déplacement produit un changement de phase entre deux signaux et le signal résultant est amplifié puis visualisé sur un multimètre numérique (Munger, 1978). Nous avons utilisé un transducteur du type Hewlett Packard 24 DCDT qui fonctionne sur un courant continu de 24 volts ou moins, le signal obtenu étant proportionnel à la puissance d'entrées à l'intérieur du déplacement maximum qui est de  $\pm 1.27$  cm. Avec une puissance d'entrée de 24 volts, le transducteur est ajusté afin d'obtenir le zéro puis il reste fixe. Les caractéristiques du transducteur

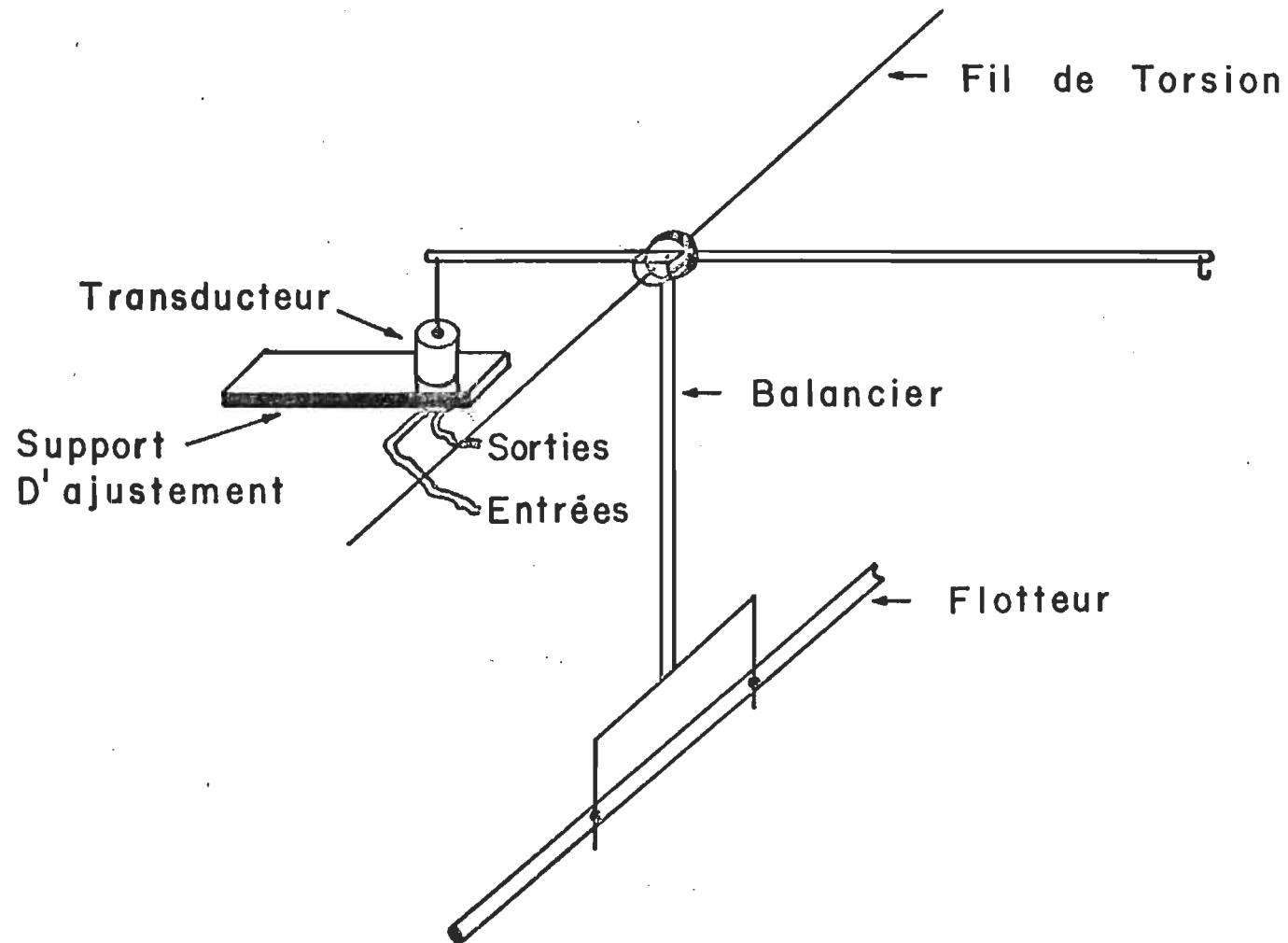
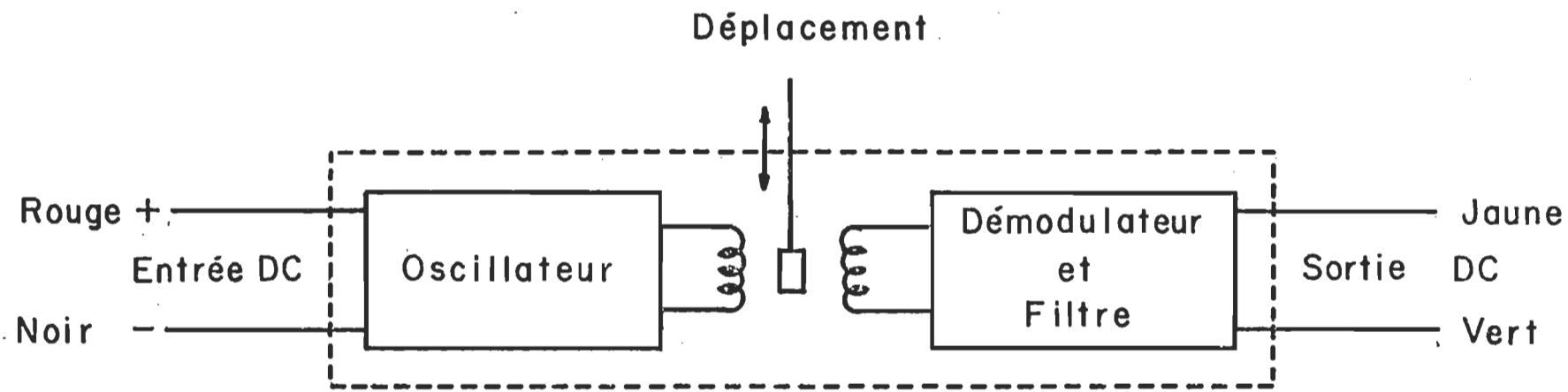


FIGURE 7. Montage d'un transducteur magnétique linéaire sur le balancier d'un système de Langmuir.

sont indiquées sur la figure 8.

#### 5.4.3 Technique de la manipulation

Avant de verser l'eau pure dans le bain, il est très important de bien laver les diverses parties du système telles le bain lui-même, le flotteur et la barrière mobile. Ces différentes parties sont donc soigneusement lavées à la ligroine et rincées d'abord avec de l'éther éthylique et finalement avec de l'eau pure à plusieurs reprises. Une fois le système bien propre, on remplit le bain avec de l'eau pure où une solution tampon adéquate préparée à partir de cette eau pure. Après s'être assuré qu'il n'y a aucune fuite possible aux points de contact barrière-paroi du bain et flotteur-feuille d'or-paroi (voir Munger 1978, p. 65), on procède au nettoyage de la surface de l'eau qui est destinée à recevoir la substance à étudier. Ce nettoyage s'effectue en faisant glisser une barrière de verre jusqu'au flotteur et en aspirant les impuretés au moyen d'une pipette pasteur reliée à un système de succion. Ce nettoyage doit être fait autant sur la partie avant du flotteur que sur la partie arrière, dans le but de maintenir une tension superficielle identique dans les deux espaces. La surface est considérée comme étant propre lorsqu'il n'y a plus de déflection du rayon lumineux ou de réponse du transducteur quand on approche la barrière de verre à environ 3.0 cm du flotteur. Le niveau d'eau dans le bain doit être à environ 0.1 cm au dessus de la limite des parois. A ce moment, nous sommes prêt à étaler la substance à la surface de l'eau et à la compresser pour étudier son comportement à l'interface air-eau.



Model : 24 DCDT - 500  
 Voltage d'entrée : 24 volts DC  
 Déplacement :  $\pm 1.27$  cm  
 Lecture maximum = 26.0 volts  
 Linéarité =  $\pm 0.5\%$  pleine échelle.

FIGURE 8. Principe de fonctionnement et caractéristiques d'un transducteur magnétique linéaire.

La barrière mobile étant à l'extrémité opposée du flotteur, on dépose la substance à la surface de l'eau au moyen d'une seringue micrométrique. Cette substance est dissoute dans un solvant volatil approprié, choisi selon les conditions expérimentales et selon sa vitesse d'étalement et d'évaporation à la surface de l'eau (Gaines, 1966, 1968). Notre choix de solvant s'est porté sur le n-hexane pour dissoudre l'acide arachidique et l'éther éthylique pour les pigments photosynthétiques. On place la seringue contenant la solution à environ 5 mm de la surface de l'eau et on laisse tomber une goutte (5  $\mu$ l) à la fois du mélange. Il est important d'attendre que l'indicateur lumineux ou le transducteur magnétique linéaire revienne en position zéro entre chaque déposition. On en dépose une quantité suffisante de façon à ce que chaque molécule ait une espace limite et que la pression qu'elle exerce sur le flotteur soit nulle (Munger, 1978).

Puis, après avoir attendu 10 minutes pour permettre au film de se stabiliser, nous compressons, manuellement ou mécaniquement, à l'aide de la barrière mobile, de façon régulière et continue. Les molécules qui, au départ, avaient une disposition et une orientation quelconque à l'interface air-eau, se mettent graduellement à se redresser et à s'orienter selon leur caractère polaire, pour finir par former une couche monomoléculaire plus ou moins compacte, selon qu'elle soit en phase solide ou liquide (Fig. 9) (Kossi, 1975). La distance finale entre la barrière mobile et le flotteur dépend de l'espace minimum occupé par les molécules.

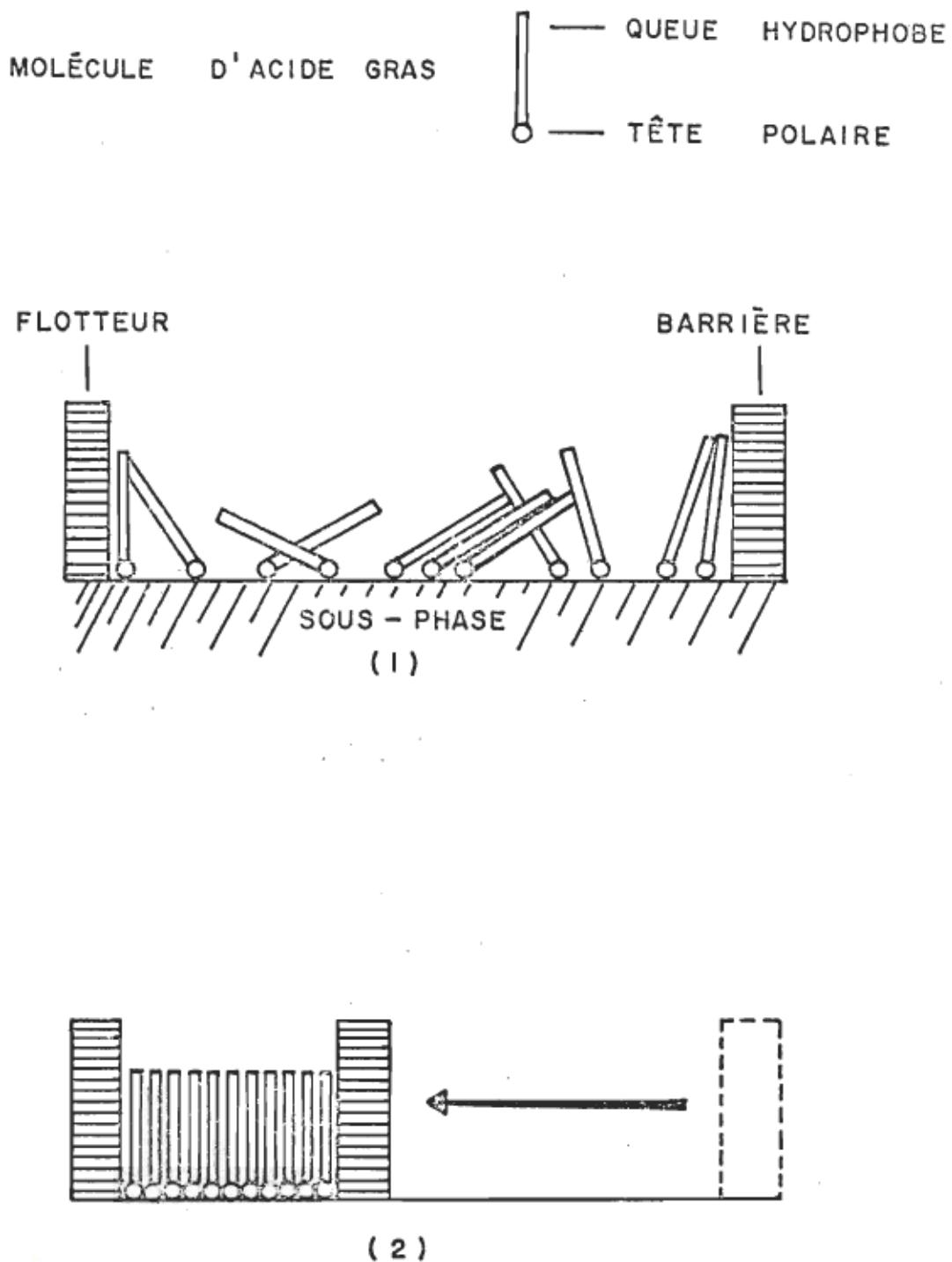


FIGURE 9. Représentation schématique de l'orientation de molécules d'acide gras en monocouche avant (1) et après (2) compression.

Lors de la compression, la surface recouverte par les molécules de la substance subit une diminution progressive de sa tension superficielle par rapport à la surface libre derrière le flotteur. Cette diminution de tension superficielle se traduit par une force appliquée sur le flotteur qui fait dévier le point lumineux de sa position de repère sur l'écran ou qui fait déplacer la tige métallique dans le transducteur. Cette force est mesurée tout au long de la compression. Pour un système utilisant la méthode du cadran gradué en degrés, nous mesurons l'angle correspondant à la torsion qu'il faut appliquer au fil pour ramener le système aux conditions de départ. Pour un système utilisant le transducteur magnétique linéaire, nous n'appliquons aucune torsion au fil et nous mesurons simplement le déplacement de la tige métallique dans le transducteur, déplacement qui se traduit, une fois amplifié, par un voltage lu sur le multimètre numérique.

Il faut surtout éviter une trop forte compression à proximité de l'aire limite de la substance à étudier. En effet, si la compression est poussée trop loin, il se produit une formation de films où les molécules, trop serrées entre elles, se chevauchent les unes sur les autres; ce phénomène est appelée le collapse. Une fois la position du collapse connue pour une substance, il suffit d'arrêter la compression avant de l'atteindre si nous voulons conserver la monocouche intacte.

Finalement, il suffit de porter sur graphique la force mesurée en fonction de l'aire moléculaire pour obtenir l'isotherme de pression de surface. Cette valeur de la force est obtenue en multipliant la

valeur mesurée en degré ou en volt, selon le système utilisé, par la valeur de la sensibilité du montage. Voilà pour la technique proprement dite des monocouches. Cependant, il est important, avant de prendre des mesures de pression de surface, de vérifier la qualité de l'eau et le bon fonctionnement du système. On procède donc à son étalonnage et à sa standardisation.

#### 5.4.4 Etalonnage

On procède à un étalonnage dans le but de connaître la sensibilité du montage. Cette opération se fait au moyen de poids calibrés que l'on dépose avec précaution sur le crochet prévu à cette fin à l'extrémité du bras horizontal du balancier (voir Fig. 6). Le bain doit être rempli d'eau pure et la surface bien nettoyée, surtout la portion entre la barrière et le flotteur et celle derrière le flotteur. Pour procéder à l'étalonnage, nous amenons la barrière mobile près du flotteur à une distance égale à la distance entre le flotteur et la partie arrière du bain.

##### 5.4.4.1 Méthode des degrés

Lorsque la surface est bien nettoyée et le système de détection en position neutre (au zéro), on peut débuter la calibration. Nous plaçons un poids marqué sur le crochet et la force appliquée par ce poids sur le flotteur entraîne une déviation du point zéro sur l'écran indiquée par la lumière réfléchie sur le miroir. Nous ramenons

alors le balancier à son point zéro en lui appliquant une force inverse au moyen du fil de torsion. Cette torsion est mesurée en degrés de rotation sur un cadran circulaire. Après chaque mesure, on enlève le poids et on ramène le fil de torsion à sa position originale (zéro) afin de vérifier la réponse du balancier à mesure que l'on augmente la force appliquée. Normalement le fil devrait revenir au zéro mais une déviation inférieure à un degré pour les poids importants est acceptable; cependant, si cela se produit, on doit réajuster le zéro avant d'accrocher le poids suivant.

Après un certain nombre de mesures, nous portons sur graphique la force appliquée, soit le poids ( $P$ ) en fonction de l'angle de rotation ( $\theta$ ) du fil mesuré pour chaque poids. Nous devons alors obtenir une droite dont la pente  $P/\theta$  sert à calculer la sensibilité du système selon la relation de Gaines (1966):

$$S = \frac{P}{\theta} \times \frac{g}{L_f} \times \frac{L_c}{L}$$

où  $S$  = sensibilité

$P$  = poids (en grammes)

$\theta$  = angle de rotation (en degrés)

$g$  = facteur de conversion

$(980 \times 10^{-5} \text{ newton} \cdot \text{g}^{-1})$

$L_c$  = longueur du bras horizontal

$L_f$  = longueur du bras vertical

$L_f$  = longueur effective du flotteur

i.e. longueur réelle du flotteur  
+ 1/2 (longueur du bain - longueur  
du flotteur)

La sensibilité ( $S$ ) s'exprime en  $\text{mNewton.m}^{-1}.\text{degré}^{-1}$  et est fonction du diamètre du fil de torsion.

#### 5.4.4.2 Méthode du transducteur

Avec un système équipé d'un transducteur, la méthode d'étalement est presque identique à quelques exceptions près. Avec le système en position neutre (zéro), nous plaçons un poids sur le crochet et la force appliquée par ce poids sur le flotteur entraîne un mouvement de la tige métallique à l'intérieur du transducteur. A ce moment, nous notons simplement ce déplacement exprimé par un voltage sur le multimètre et nous n'appliquons aucune torsion au fil pour le ramener au point neutre. Après la lecture, nous enlevons le poids et le balancier revient à sa position originale, i.e. à un voltage nul sur le multimètre. Une déviation inférieure à 0.1 volt pour des poids importants est acceptable. On doit cependant réajuster le zéro pour la mesure suivante. Dans ce cas-ci le graphique représente la force appliquée exprimée en grammes en fonction de la déviation exercée exprimée en volt. La relation mathématique de la sensibilité se lit maintenant comme suit:

$$S: \frac{P}{V} \propto \frac{g}{L_f} \times \frac{L_c}{L} \quad \text{où } V = \text{voltage} \\ P/V = \text{pente de la droite}$$

La sensibilité du système s'exprime maintenant en  $\text{mNewton} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ .

#### 5.4.5 Isothermes de pression de surface

Afin de savoir si le montage fonctionne bien et si l'eau est de bonne qualité, nous procérons d'abord à un standardisation du système.

Pour cela, nous traçons l'isotherme de pression de surface d'une substance bien connue, comme l'acide stéarique, l'acide arachidique ou le cholestérol.

#### 5.4.5.1 Standardisation

Nous avons utilisé l'acide arachidique, d'une pureté supérieure à 99 %, et mis en solution dans du n-hexane à une concentration d'environ  $10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup> (M). Nous déposons ensuite 0.1 ml de la solution sur une sous-phase aqueuse de HCl ( $10^{-2}$  M) à pH 2. Si les résultats correspondent à ceux de la littérature scientifique, on peut alors passer à l'étape suivante, soit l'étude des pigments photosynthétiques. Il est cependant à conseiller de refaire cette standardisation à intervalle régulier, soit environ une à deux fois par mois ou lorsqu'il y a un changement dans le montage ou dans les conditions expérimentales de l'expérience. Cette vérification régulière permet de savoir si le système fonctionne toujours de façon adéquate et satisfaisante.

#### 5.4.5.2 Isothermes des pigments photosynthétiques

Pour connaître ou vérifier le comportement des pigments photosynthétiques à l'interface air-eau, nous devons tracer l'isotherme de pression de surface de chaque pigment dans les mêmes conditions expérimentales. Les pigments sont dissous dans un solvant approprié dont la vitesse d'étalement et d'évaporation est assez rapide. Habituellement, nous utilisons l'éther éthylique car tous les pigments photosyn-

thétiques sont solubles dans ce solvant. L'étalement de la substance se fait sur une eau tamponnée à un pH presque neutre (7.5 -8.0). La compression se fait à vitesse constante ( $1.0-1.6 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ ) à l'aide d'un moteur et les valeurs obtenues sont portées sur graphique où nous exprimons la force appliquée (en millinewton  $\cdot \text{m}^{-1}$ ) en fonction de la surface occupée par les molécules (en  $\text{\AA}^2 / \text{molécule}$ ).

Lorsqu'on utilise un transducteur magnétique linéaire, la façon de calculer l'isotherme de pression de surface est légèrement différente. En effet, il faut faire un réajustement pour l'aire moléculaire parce que le transducteur ne revient pas au zéro et que nous n'appliquons aucune torsion au fil pour le ramener au point neutre comme dans le système avec le cadran gradué en degré. Ainsi, pendant l'expérience, à cause de la pression exercée par le film compressé sur le flotteur, il y a un léger déplacement du zéro pour le calcul de la surface. Pour chaque volt mesuré sur le multimètre, nous devons ajouter une certaine distance (0.115 cm) à la distance mesurée sur le bain et, par un calcul simple, nous trouvons une nouvelle surface, supérieure à la première, qui correspond à une mesure de pression donnée.

Avec la technique du transducteur, nous avons étudié le comportement des différents pigments photosynthétiques à l'interface air-eau. Nous avons d'abord étudié chaque pigment séparément et comparé les résultats obtenus aux résultats publiés antérieurement. Les pigments étudiés sont les chlorophylles a et b, la vitamine K<sub>1</sub>, l' $\alpha$ -tocophéryl-quinone, l' $\alpha$ -tocophérol et le phytol. Par la suite, nous avons fait l'étude des mélanges binaires, soit les mélanges de chlorophylle a

avec chacun des 4 pigments précédemment mentionnés et les mélanges de chlorophylle b avec uniquement la vitamine K<sub>1</sub> et l' $\alpha$ -tocophérylquinone.

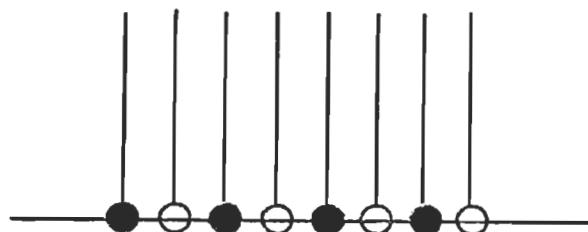
#### 5.4.5.3 Loi d'additivité

Lorsqu'on dépose une solution contenant deux substances à l'interface air-eau, on se demande toujours si nous aurons une monocouche vraiment mixte, i.e. s'il y aura une miscibilité complète entre les deux substances. Si les deux produits ne sont pas miscibles dans le film lors de l'étalement de la solution, nous aurons alors des parcelles d'une monocouche distribué dans l'autre monocouche (Fig. 10) et une telle distribution est souvent instable.

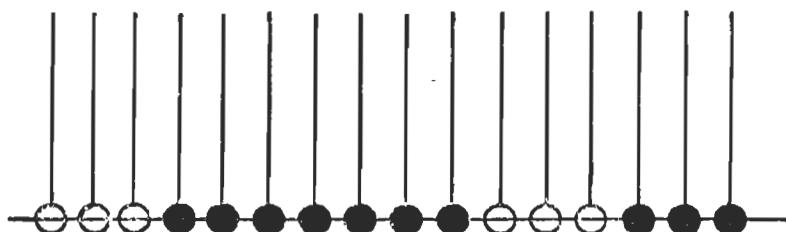
Ainsi, les propriétés d'une monocouche dans laquelle les deux composés ne sont pas miscibles se ramènent aux propriétés des deux films purs pris séparément. Ce film serait formé de deux monocouches séparées en équilibre l'une par rapport à l'autre. La surface occupée par le film résultant serait la somme des surfaces des deux films purs. Alors les monocouches formés de produits non-miscibles obéiront à la loi suivante:

$$A_{1,2} = n_1 A_1 + n_2 A_2 \quad (\text{Equation 1})$$

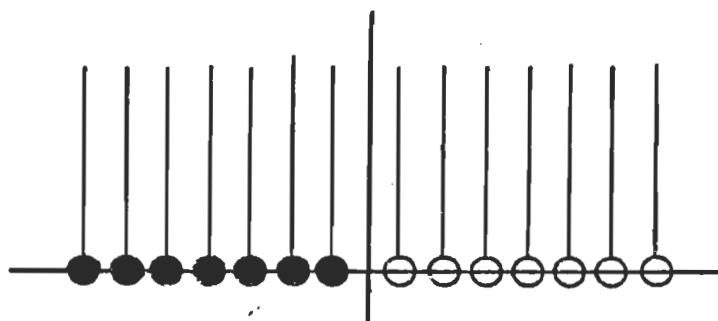
où  $A_{1,2}$  est la surface moléculaire du film mixte à une pression donnée,  $A_1$  et  $A_2$  les surfaces moléculaires des deux films purs à la même pression et  $n_1$  et  $n_2$  les fractions molaires des deux composés dans le mélange (Gaines, 1966, p. 282).



a) Composés miscibles. Film mixte homogène



b) Composés non miscibles. Ilots dispersés



c) Composés non miscibles. Séparation complète

FIGURE 10. Distribution moléculaire possible résultant de l'étalement d'une monocouche "mixte" à l'interface air-eau (Gaines, 1966 a, p. 282).

Toute déviation du comportement d'une monocouche mixte d'après l'équation 1 démontre qu'il y a miscibilité dans le film et, par la même occasion, qu'il y a interaction entre les deux composés. Le film mixte peut montrer, à l'intérieur des limites expérimentales, soit une surface plus grande que la surface calculée selon l'équation 1, soit une surface plus petite. Plusieurs études ont démontré de telles déviations, mais l'interprétation est souvent difficile et parfois confuse. Pour une revue détaillée des propriétés des monocouches mixtes, les ouvrages à consulter sont ceux de N.K. Adam (1941), A.D. Harkins (1952), J.T. Davies et E.K. Rideal (1961) et G.L. Gaines jr. (1966). En ce qui concerne les monocouches mixtes impliquant la chlorophylle, les principaux travaux sont ceux de Gaines et coll. (1964, 1965) ainsi que ceux de Brody (1971), Chin et Brody (1976) et Karan et Brody (1974).

Cependant, les études de pression de surface de monocouches mixtes ne nous permettent pas de dire exactement quel type d'interaction il pourrait y avoir entre une chlorophylle et une quinone. Il faut alors approfondir l'étude en utilisant des techniques spectroscopiques comme la spectroscopie infrarouge qui peut nous donner des informations assez précises sur les possibilités de liaison entre les différents groupements des deux molécules.

### 5.5 Spectroscopie infrarouge

Cette technique nous permet donc d'étudier le type d'interaction possible entre une chlorophylle et une quinone. Puisqu'il s'avère impossible de travailler directement à l'interface air-eau à cause de

l'interférence de l'eau dans la bande spectrale 3000 - 3500  $\text{cm}^{-1}$  de l'infrarouge, nous devons nécessairement utiliser une autre technique. L'usage d'un support solide sur lequel nous déposons les pigments photosynthétiques selon la méthode de Blodgett et Langmuir (1937) s'avère la solution idéale. Des études ont déjà démontré qu'un support en germanium donnait le meilleur rendement lors d'études infrarouge de pigments photosynthétiques à l'interface air-solide (Chapados et Leblanc, 1977).

#### 5.5.1 Nettoyage des lamelles de germanium

Avant de déposer les pigments photosynthétiques sur la lamelle de germanium, il est primordial de bien la nettoyer. La procédure employée est la suivante:

- laver généreusement la lamelle avec de l'eau déminéralisée. Répéter plusieurs fois.
- laver plusieurs fois avec de l'alcool éthylique puis avec de l'acétone.
- rincer finalement avec de l'éther éthylique
- prendre le spectre de la lamelle pour vérifier s'il reste encore des impuretés. Si on détecte des impuretés sur le spectre, on recommence le lavage jusqu'au moment où nous obtenons un spectre libre de toutes impuretés. A ce moment, elle est prête à servir à la déposition.

#### 5.5.2 Déposition des pigments sur la lamelle

Le principe de la déposition est basée sur les travaux de Langmuir

(1920) et repris plus tard par Blodgett (1935) et Gaines (1966). La déposition se fait mécaniquement dans le bain contenant une sous-phase appropriée maintenue à une température constante. La lamelle est placée horizontalement sur le support et plongée dans l'eau à une profondeur de 1.5 cm. Le moteur utilisé complète le cycle de déposition, plongée et sortie, en 4 minutes.

Pour la déposition des monocouches de pigments photosynthétiques, la sous-phase est une solution tampon (pH = 7.5 -8.0) fait à partir de solutions de phosphate monobasique et dibasique de sodium. Les solutions de pigments préparées dans l'éther sont de concentration environ  $10^{-4}$  M et l'expérience se fait sous une lumière verte. Nous étalons d'abord une certaine quantité (environ 250  $\mu$ l) de substance à l'interface air-eau et nous compressons la monocouche jusqu'à une pression de 20 mN.  $m^{-1}$  pour la chlorophylle a et 15 mN.  $m^{-1}$  pour le mélange chlorophylle/quinone. Puis, une fois la pression atteinte, nous transférons la monocouche sur la lamelle. Durant la déposition, cependant, nous devons toujours appliquer une pression uniforme sur le film, sinon il en résulterait des irrégularités dans l'agrégation des molécules en monocouches (Hotchandani et coll., 1975).

Par la suite, pour connaître le rendement d'une déposition, il suffit de calculer le rapport entre la surface balayée par la barrière mobile et l'aire occupée par la monocouche sur les faces de la lamelle. En principe, le rapport idéal doit être égal à 1.0, c'est-à-dire que toutes les molécules qui ont quittées la surface de l'eau doivent nécessairement se retrouver sur les deux faces de la lamelle. Cependant

on considère un rapport variant entre 0.95 et 1.05 comme étant un très bon résultat. (voir résultats p. 167, 173).

Immédiatement après la déposition des pigments sur la lamelle, nous enregistrons les spectres infrarouges au moyen du spectromètre Perkin-Elmer Modèle 180.

Les différentes méthodes expérimentales étant bien expliquées, voyons maintenant ce que nous avons obtenu comme résultats.

## 6.0 RESULTATS ET DISCUSSION

Nous pouvons facilement diviser nos résultats en trois étapes principales. Il y a d'abord l'extraction et la purification des chlorophylles ainsi que la purification du phytol, puis l'étude des pigments photosynthétiques à l'interface air-eau et finalement la spectroscopie infrarouge du système chlorophylle-quinone.

### 6.1 Extraction et purification des chlorophylles

Avant de donner les résultats de l'extraction et de la purification des chlorophylles, il serait utile de donner les principaux critères de pureté de la chlorophylle dont nous nous sommes servis pour savoir si l'extraction était réussie ou non.

#### 6.1.1 Critères de pureté des chlorophylles

Ils sont de trois types principaux, soit la spectroscopie d'absorption, la chromatographie sur couche mince et l'isotherme de pression de surface. On peut employer à l'occasion la spectroscopie infrarouge et la spectroscopie d'émission. Nous n'avons pas employé ces deux dernières techniques et nous nous sommes limités aux trois premières dont deux d'entre elles sont les plus fréquemment employées.

### 6.1.1.1 Spectroscopie d'absorption

La chlorophylle se caractérise principalement par son spectre d'absorption pris dans la région spectrale de 400 à 800 nm.

Le spectre d'absorption de la chlorophylle a, en solution dans l'éther éthylique, présente deux bandes importantes situées à 428.5 et 660.5 nm et cinq autres bandes de moindre importance à 409.0, 500.0, 530.0, 575.5 et 613.5 nm. Quant à la chlorophylle b, aussi en solution dans l'éther éthylique, elle présente deux bandes importantes à 451.0 et 642.0 nm ainsi que quatres autres bandes moins importantes à 433.0, 545.0, 567.0 et 594.0 nm.

A partir du spectre d'absorption, nous pouvons calculer un rapport entre les deux principales bandes et ce rapport est un critère relativement important pour déterminer la pureté d'un échantillon de chlorophylle. Pour la chlorophylle a, nous calculons le rapport  $A_{428\text{nm}}/A_{660\text{nm}}$  et pour la chlorophylle b, le rapport  $A_{451\text{nm}}/A_{642\text{nm}}$ . On désigne habituellement ce rapport sous le terme "rapport B/R", ce qui représente le rapport de l'absorbance de la bande dans la région du bleu du spectre sur l'absorbance de la bande dans la région du rouge du spectre.

Pour une chlorophylle a pure, en solution dans l'éther éthylique, le rapport idéal est de 1.30 et pour une chlorophylle b pure, il est de 2.84. Cependant, ces rapports peuvent varier légèrement sans pour autant altérer de beaucoup la pureté de la chlorophylle. Dans notre cas, nous avons obtenu un rapport moyen B/R de 1.26, ce qui est inférieur aux valeurs déjà publiées dans la littérature pour la chlorophylle a pure. (Voir tableau 6).

TABLEAU 6: PROPRIETES SPECTRALES DES CHLOROPHYLLES a ET b EXTRAITES ET PURIFIEES. COMPARAISON AVEC CERTAINES VALEURS DEJA PUBLIEES ET AVEC LA CHLOROPHYLLE SIGMA. (SOLVANT EMPLOYE: ETHER ETHYLIQUE).

CHLOROPHYLLE <u>a</u>	$\lambda$ MAX. (BLEU) (nm)	$\lambda$ MAX. (ROUGE) (nm)	RAPPORT B/R
Présent travail	428.5	660.5	1.26
ZSCHEILE (1934)	427.5	660.0	-
SMITH et BENITEZ (1955)	430.0	662.0	-
TRURNIT ET COLMANO (1959)	428.0	660.6	1.32
ANDERSON et CALVIN (1962)	430.0	662.0	1.19
ANDERSON (1963)	428.0	660.0	-
BELLAMY et coll. (1963)	427.0	661.0	1.28
STRAIN, THOMAS et KATZ (1964)	428.5	660.5	1.30
PERKINS et ROBERTS (1964)	428.0	660.0	1.32
SEELY et JENSEN (1965)	428.8	660.5	1.31
IRIYAMA et YOSHIURA (1977)	-	660.0	-
CHLOROPHYLLE "SIGMA"	428.5	660.5	1.25

CHLOROPHYLLE <u>b</u>	$\lambda$ MAX. (BLEU) (nm)	$\lambda$ MAX. (ROUGE) (nm)	RAPPORT B/R
Présent travail	453.0	643.0	2.85
ZSCHEILE (1934)	452.5	642.5	-
SMITH et BENITEZ (1955)	455.0	644.0	-
TRURNIT et COLMANO (1959)	452.4	642.1	2.86
STRAIN, THOMAS et KATZ (1964)	452.5	642.0	2.84
CHLOROPHYLLE "SIGMA"	451.0	642.0	2.84

Etant donné que les rapports d'absorption maximum bleu à rouge (B/R) obtenus dans nos expériences sont inférieurs à ceux obtenus par les autres auteurs, on peut supposer que nos échantillons n'étaient pas tellement contaminés par les carotènes. En effet, les carotènes absorbent beaucoup dans la région du bleu, ce qui fait apparaître une bande plus intense pour la chlorophylle a si celle-ci est contaminée par les carotènes. On peut donc conclure que notre méthode pour séparer les chlorophylles des carotènes est très efficace.

Pour la chlorophylle b, nous avons obtenu un rapport moyen B/R de 2.85, ce qui correspond très bien à la valeur déjà publiée de 2.84 (Strain et coll., 1964). Dans ce cas-ci, le spectre d'absorption et le rapport B/R nous permettent d'affirmer que la chlorophylle b est pure suivant le critère du spectre d'absorption.

Le tableau 6 nous montre d'ailleurs nos résultats en comparaison avec les diverses valeurs déjà publiées par différents auteurs pour les chlorophylles a et b pures ainsi que les valeurs obtenues avec la chlorophylle commerciale (SIGMA).

La figure 11 représente les spectres d'absorption des chlorophylles a et b commerciales (SIGMA) en solution dans l'éther éthylique à une concentration d'environ  $10^{-4}$  M. Le spectre des chlorophylles extraites est identique à ce dernier, sauf que la position des maximum d'absorption est légèrement déplacée dans le cas de la chl b, comme on peut le remarquer dans le tableau 6.

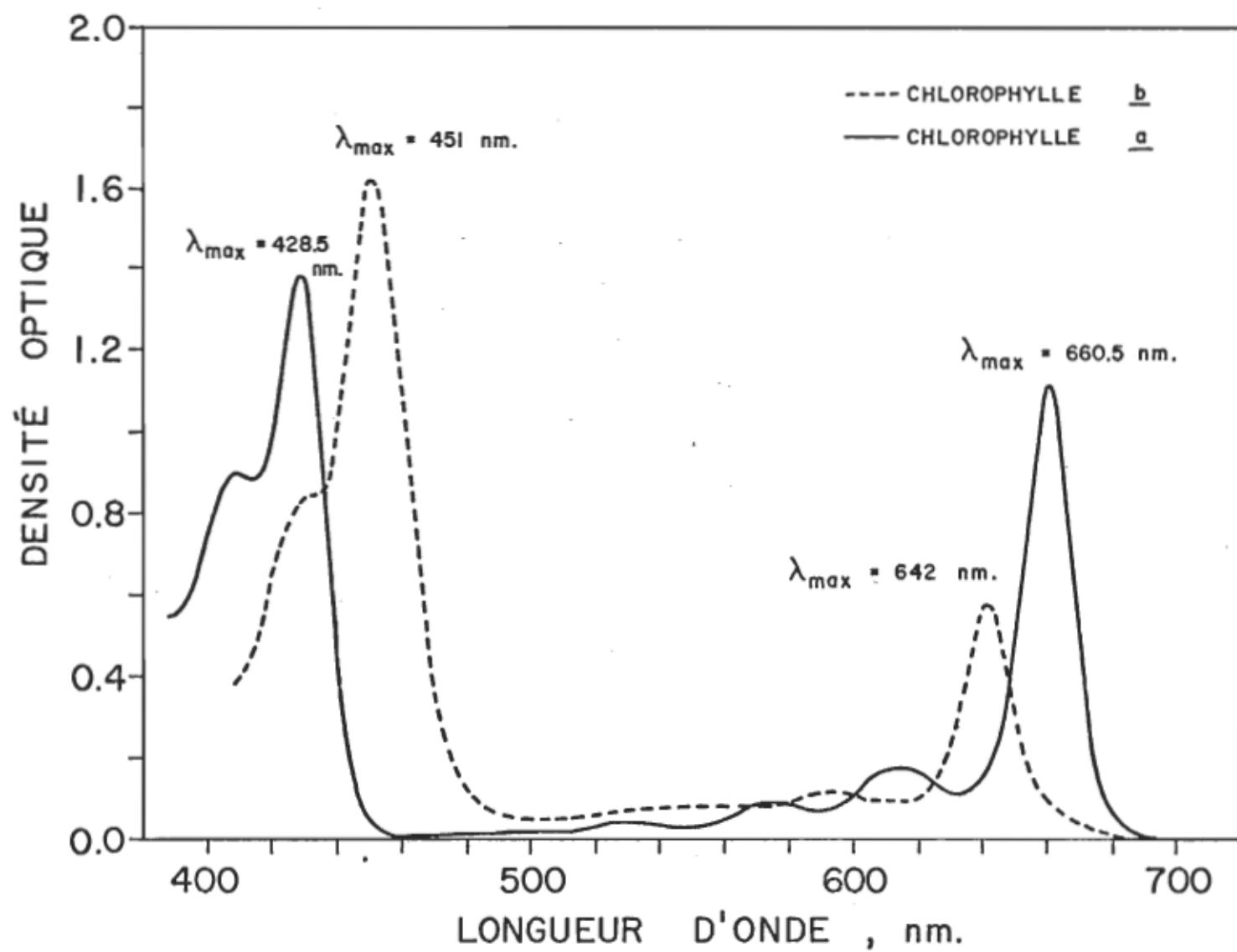


FIGURE 11. Spectre d'absorption des chlorophylles a et b en solution dans l'éther éthylique.

### 6.1.1.2 Chromatographie sur couche mince (TLC)

La chromatographie sur couche mince nous a permis, tout au long de l'extraction, de vérifier si notre chlorophylle était encore contaminée par d'autres pigments. Ainsi, en se basant sur les travaux de Bollinger et Konig (1969), nous avons employé des plaques de gel de silice et un solvant composé, soit d'éther de pétrole (60-80<sup>0</sup>) - acétate d'éthyle - diéthylamine (58% - 30% - 12% v/v), soit d'éther de pétrole - n-propanol (99% - 1% v/v) ou d'éther de pétrole - acétone - n-propanol (90% - 10% - 0.45% v/v). Avec ces solvants, nous étions en mesure de séparer facilement les impuretés des chlorophylles a ou b.

Ainsi, avec le solvant composé d'éther de pétrole - acétate d'éthyle - diéthylamine, nous avons révélé la présence d'une tache verte (chl a) et une tache jaune, probablement des caroténoides. Comme la séparation était très bonne sur une plaque de gel de silice, nous avons pensé qu'il pouvait en être de même sur une colonne de gel de silice. C'est ce qui s'est produit et c'est ainsi que nous avons éliminé les caroténoides.

Le mélange éther de pétrole - acétone - n-propanol a servi à séparer la chlorophylle a de la phéophytine a d'abord sur une plaque puis, par la suite, sur une colonne. Le mélange éther de pétrole - n-propanol a servi, quant à lui, à séparer la chlorophylle a de la chlorophylle b sur une plaque puis, sur une colonne.

En résumé, la chromatographie sur couche mince nous a servi d'abord à expérimenter, sur une plaque, la séparation entre deux produits au moyen d'un mélange de solvants appropriés, puis à vérifier si la séparation sur une colonne était bien complète, i.e. si nous avions de la chlorophylle pure suivant le critère de la chromatographie sur couche mince.

#### 6.1.1.3 Isothermes de pression de surface

L'isotherme de pression de surface de la chlorophylle était notre test ultime pour vérifier la pureté de nos échantillons. Malgré des spectres d'absorption presque parfaits et une seule tache verte caractéristique de la chlorophylle a sur les plaques de TLC, nous n'avions pas de chlorophylle pure. En effet, l'isotherme de pression de surface nous a démontré que la chlorophylle contenait des impuretés en assez grande quantité, impuretés qui ne se détectaient pas en spectroscopie d'absorption ou en TLC. En monocouche, nous avons donc obtenu une aire moléculaire d'environ  $1000 \text{ \AA}^2$  pour la chlorophylle a et  $350 \text{ \AA}^2$  pour la chlorophylle b alors que la chlorophylle pure possède une aire moléculaire d'environ  $120 \text{ \AA}^2$ .

#### 6.1.2 Résultat global de la purification

Malgré de bons résultats en spectroscopie d'absorption et en chromatographie sur couche mince, la chlorophylle extraite contenait

beaucoup d'impuretés dont nous n'avons pu nous débarasser par quelque moyen que ce soit. Ces impuretés étaient probablement des molécules d'adsorbant (gel de silice, cellulose) dont nous avons fait usage au cours de l'extraction.

Quoique le gel de silice permet de séparer facilement les caroténoides des chlorophylles et que la cellulose permet la séparation de la chlorophylle a et de la phéophytine a, il est préférable de s'en tenir aux colonnes de sucre pour séparer les différents pigments photosynthétiques car ce dernier adsorbant n'altère la chlorophylle en aucune façon. Ainsi, nous avons plus de chance de garder la chlorophylle intacte tout au long de l'expérience.

De plus, le choix des solvants pour l'élution des pigments lors des séparations chromatographiques est très important. Pour une description des principaux solvants et adsorbants utilisés en chromatographie, nous vous référerons aux travaux de Bollinger et Konig (1969).

Comme la chlorophylle extraite ne satisfaisait pas à nos exigences de travail, nous avons dû nous résoudre à utiliser la chlorophylle commerciale (SIGMA) pour nos travaux. Nous l'avons utilisé sans aucune purification subséquente puisque la compagnie Sigma a pu nous fournir, à ce moment là, une chlorophylle a et b d'une pureté que l'on pourrait qualifier d'exceptionnelle pour de la chlorophylle commerciale.

## 6.2 Purification du phytol

La purification du phytol, réalisée au moyen d'une distillation fractionnée sous vide, a donné de très bons résultats. Pour connaître la pureté, nous nous sommes basés sur l'indice de réfraction. Le phytol pur a un indice de réfraction de  $1.4595^{25^{\circ}\text{C}}$ .

En travaillant à basse pression, soit à 200 Pa (1.5 mm Hg), nous avons obtenu, après deux distillations fractionnées, un échantillon dont l'indice de réfraction était de  $1.4610^{25^{\circ}\text{C}}$  alors qu'il était de  $1.4645^{25^{\circ}\text{C}}$  avant distillation. La première distillation n'avait abaissé l'indice de réfraction qu'à  $1.4624^{25^{\circ}\text{C}}$ . La température au point d'ébullition pour la deuxième distillation était de  $145-150^{\circ}\text{C}$ .

Nous avons finalement vérifié sa pureté par une mesure de l'isotherme de pression de surface et en la comparant avec les valeurs déjà publiées (Gaines 1968; Leblanc et Orger, 1970). Les résultats concernant ces isothermes de pression de surface seront donnés dans le chapitre suivant sur les monocouches de pigments photosynthétiques. Nous pouvons cependant dire que la purification du phytol a été un succès puisque les courbes de pression de surface correspondaient très bien aux courbes de référence.

## 6.3 Monocouches des pigments photosynthétiques

Cette section des résultats est naturellement la plus importante du travail. La minutie apportée aux différentes manipulations fait que les résultats sont d'autant plus précis. Voici maintenant les résultats obtenus.

### 6.3.1 Etalonnage

L'étalonnage nous permet de déterminer la sensibilité des systèmes de Langmuir et se fait à l'aide de poids calibrés comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent. Que nous employons un système utilisant un cadran gradué en degrés ou un transducteur magnétique linéaire pour mesurer la pression de surface, la technique d'étalonnage reste la même; ce qui change, c'est le tracé de la courbe de calibration.

#### 6.3.1.1 Méthode des degrés

Après avoir mesuré la pression exercée sur le flotteur par chacun des poids, nous portons sur un graphique les valeurs obtenues, soit en ordonnée la masse des poids et en abscisse le nombre de degrés de déviation. La figure 12 représente un exemple de courbe d'étalonnage. Dans ce cas précis, la pente de la droite ( $W/\theta$ ) est de  $3.838 \times 10^{-3} \text{ g. degré}^{-1}$  pour un fil de torsion de 0.023 cm de diamètre. Ainsi, on peut calculer la sensibilité à l'aide de la formule qui suit et nous avons obtenu les résultats suivants:

$$S = \frac{W}{\theta} \times \frac{g}{L_f} \times \frac{L_f}{L} \quad (\text{voir p. 84})$$

$$S = 3.838 \times 10^{-3} \text{ g. degré}^{-1} \times \frac{980 \times 10^{-5} \text{ N.g}^{-1}}{8.5 \text{ cm}} \times \frac{7.4 \text{ cm}}{(12.7 - 1.0) \text{ cm}}$$

$$S = 0.239 \times 10^{-5} \text{ newton. cm}^{-1} \cdot \text{degré}^{-1}$$

$$S = 0.239 \text{ mN.m}^{-1} \cdot \text{degré}^{-1}$$

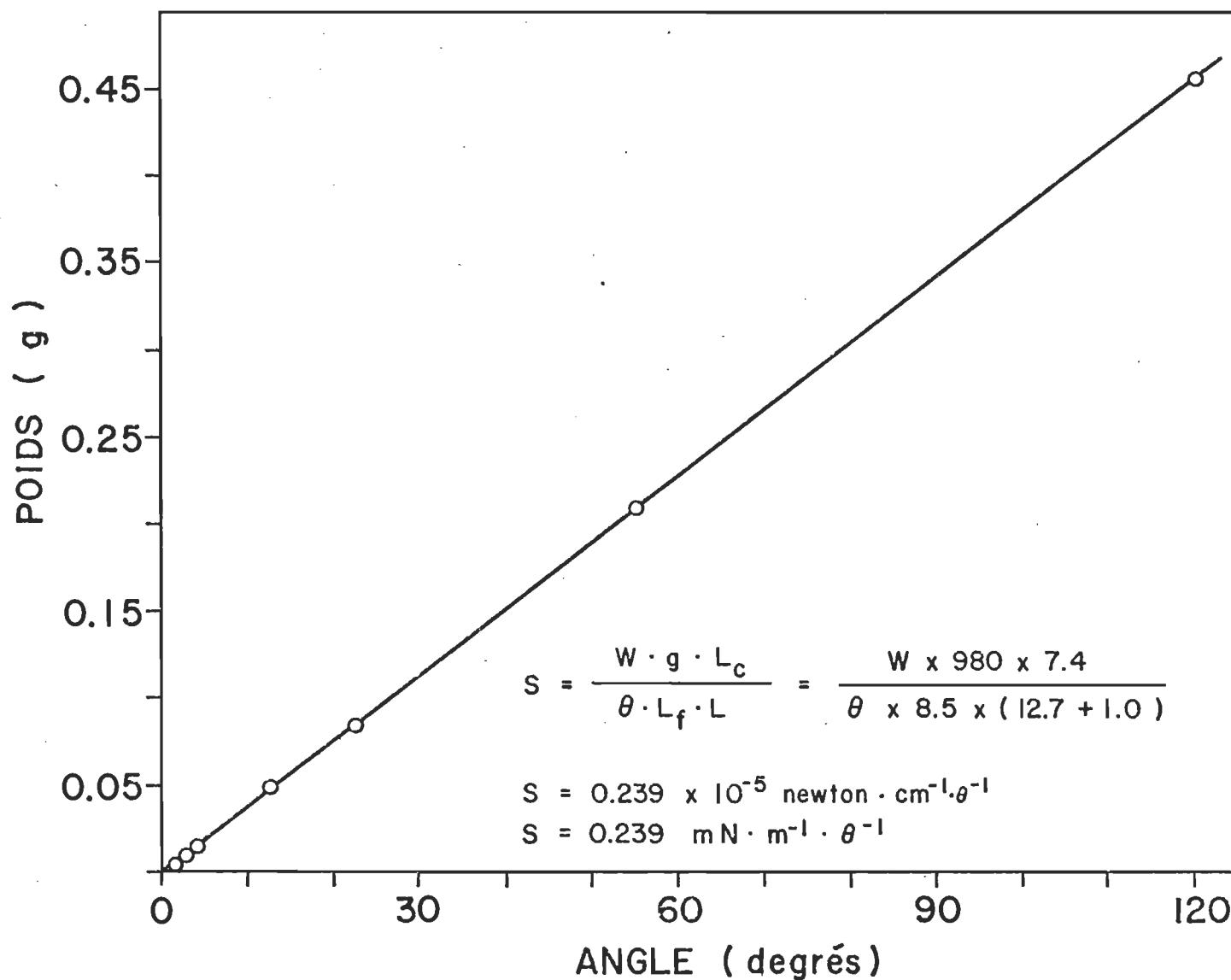


FIGURE 12. Courbe d'étalonnage du système de Langmuir utilisant la méthode des degrés (Fil de torsion en Ni de 0.023 cm de diamètre).

Si nous varions le diamètre du fil de torsion ou la nature du fil, nous obtiendrons une sensibilité différente pour chacun des paramètres modifiés (Munger, 1978, p. 108).

Comme les résultats obtenus pour les courbes de pression de surface de plusieurs composés, dont la chlorophylle, n'étaient pas satisfaisants, nous avons préféré utiliser un système de Langmuir muni d'un transducteur magnétique linéaire.

#### 6.3.1.2 Méthode du transducteur

Avec un tel système, la calibration est la même sauf que nous mesurons une déviation en volt plutôt qu'en degré. Ainsi, sur le graphique nous aurons maintenant le poids en fonction du voltage. Le fil de torsion utilisé possède un diamètre supérieur à celui utilisé dans le premier système. La figure 13 nous donne un exemple de courbe d'étalonnage obtenue avec un transducteur. Dans ce cas, la pente de la droite (W/V) est de  $2.33 \times 10^{-2} \text{ g. V}^{-1}$  pour un fil de torsion en acier de 0.038 cm de diamètre. La sensibilité obtenue est de:

$$S = \frac{W}{V} \times \frac{g}{L_f} \times \frac{L_c}{L}$$

$$S = 0.0233 \times \frac{980 \times 10.4}{8.6 \times 13.65}$$

$$S = 2.02 \times 10^{-5} \text{ newton. cm}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$$

$$S = 2.02 \text{ mN. m}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$$

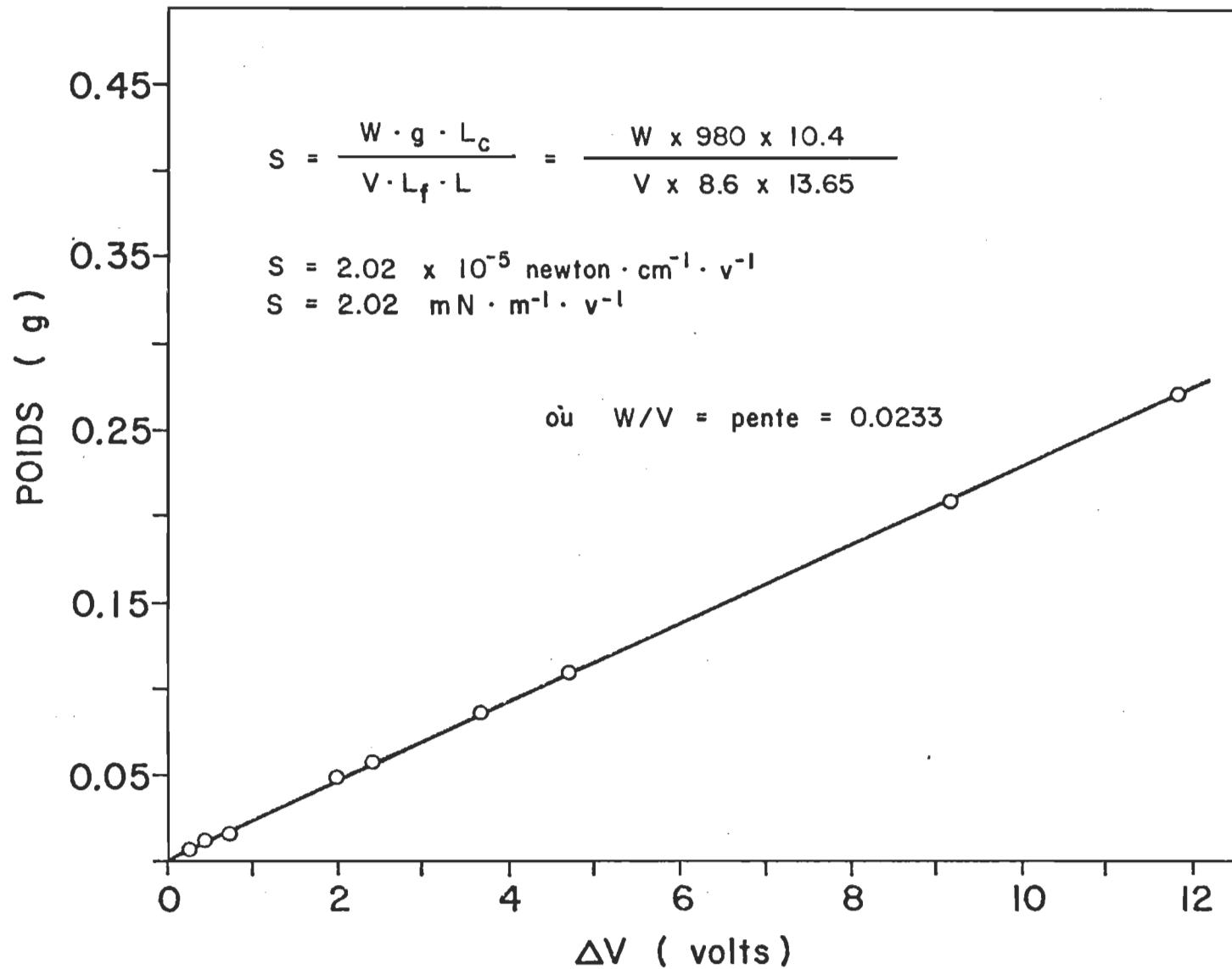


FIGURE 13. Courbe d'étalonnage du système de Langmuir utilisant le transducteur magnétique linéaire (Fil de torsion en acier de 0.038 cm de diamètre).

Dans ce cas aussi, si nous modifions le diamètre du fil de torsion, nous modifierons également la sensibilité du système (Munger, 1978, p. 133).

Comme nous le remarquons sur les figures 12 et 13, l'étalonnage se fait jusqu'à 0.45 g pour le système utilisant la méthode des degrés et jusqu'à 0.25 g pour le système muni du transducteur. Cela est dû au fait que l'étalonnage est fonction du diamètre du fil de torsion et que ce diamètre est environ deux fois plus grand dans le système muni du transducteur. De plus, pour un tel système, la relation W/V n'est plus linéaire pour des poids supérieurs à 0.25 g.

Il est bon de vérifier périodiquement la calibration du système de Langmuir pour savoir si nous travaillons toujours avec la même sensibilité. Comme le système muni d'un transducteur facilite les manipulations tout en augmentant la précision des résultats, nous avons décidé de travailler uniquement avec ce système. Donc, tous les résultats qui vont suivre (courbes de standardisation et de pression de surface) ont été obtenus avec le système de Langmuir muni du transducteur magnétique linéaire.

### 6.3.2 Standardisation

Pour standardiser notre système, nous avons utilisé de l'acide arachidique dans les conditions expérimentales suivantes:

- Déposition : 0.10 ml
- Solvant : n-Hexane
- Sous-phase : HCl ( $10^{-2}$  M) à pH = 2
- Concentration :  $1.12 \times 10^{-3}$  M
- Température du laboratoire : 293 K ( $20^{\circ}\text{C}$ )
- Température du bain : 292.5 K ( $19.5^{\circ}\text{C}$ )
- Eau pure provenant du système en quartz
- Vitesse de compression :  $1.125 \text{ cm. min}^{-1}$  (uniforme)

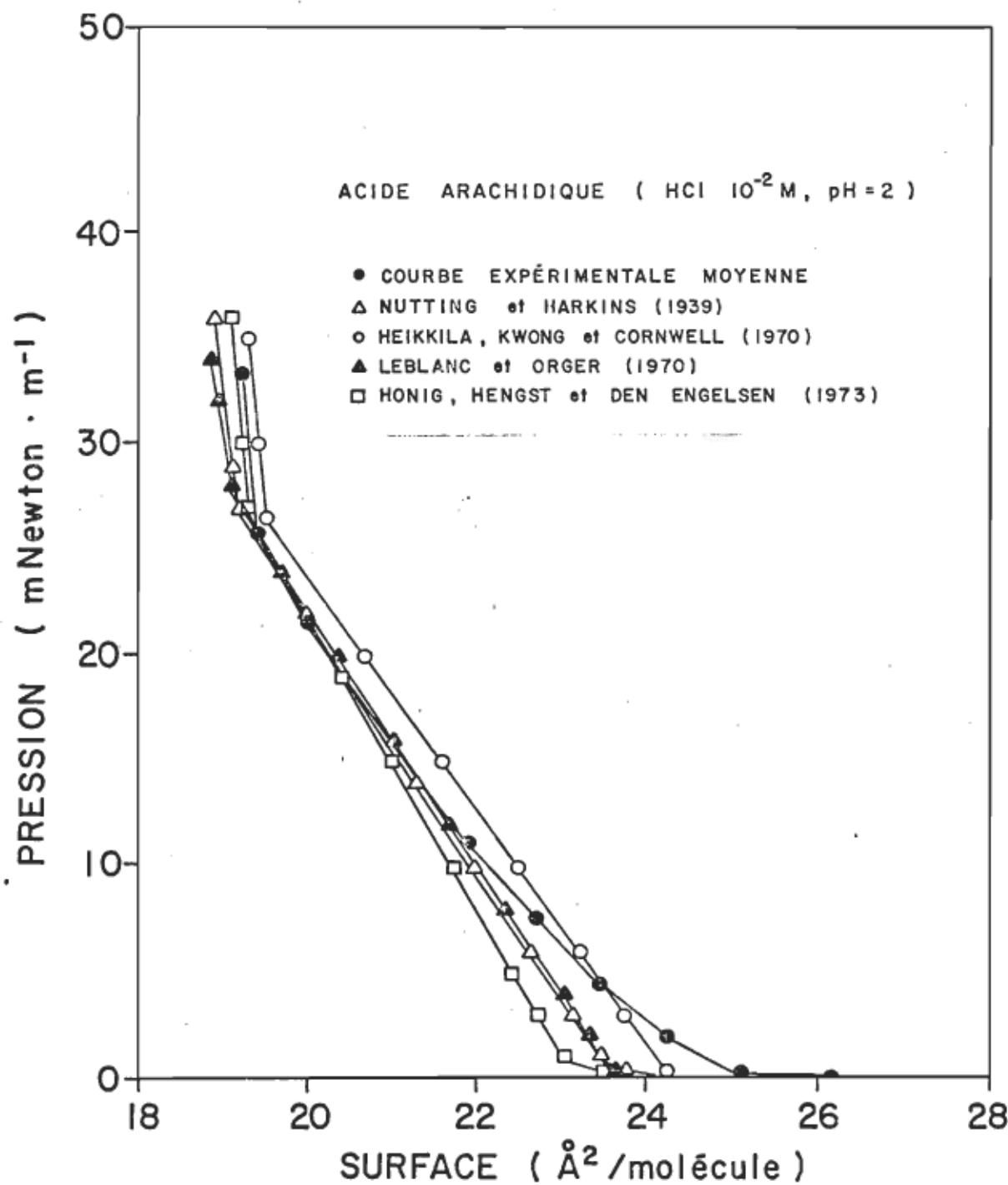


FIGURE 14. Isothermes de pression de surface de l'acide arachidique.

La courbe expérimentale moyenne est représentée sur la figure 14 et nous l'avons comparé avec quatre courbes de références provenant de travaux publiés antérieurement. Nous remarquons facilement que notre courbe se compare très bien avec les quatres courbes de références, surtout à des pressions supérieures à  $10 \text{ mN. m}^{-1}$ .

Si nous extrapolons sur l'axe des abscisses la portion de la courbe correspondant aux fortes pressions de surface, soit supérieures à  $26 \text{ mN.m}^{-1}$  nous obtenons une aire moléculaire de  $20.10 \text{ } \overset{\circ}{\text{A}}^2$  pour notre courbe expérimentale. Le tableau 7 permet de comparer l'aire moléculaire de notre courbe avec l'aire moléculaire des courbes de références.

TABLEAU 7: AIRE MOLECULAIRE DE L'ACIDE ARACHIDIQUE: COMPARAISON DE NOTRE VALEUR EXPERIMENTALE AVEC DES VALEURS DE REFERENCES

AUTEURS	SOLVANT	AIRE MOLECULAIRE ( $\overset{\circ}{\text{A}}^2$ )
Présent travail	n-Hexane	20.10
NUTTING et HARKINS (1939)	Benzène	20.05
HEIKKILA et coll. (1970)	n-Hexane	20.15
LEBLANC et ORGER (1970)	n-Hexane	20.30
HONIG et coll. (1973)	$\text{CHCl}_3$ - n-Hexane (1:3 v/v)	19.90
FEHER et coll. (1977)	n-Hexane	20.10

En examinant ce tableau, on se rend bien compte que le système fonctionne bien et que l'eau ne contient aucune impureté mesurable. Une vérification périodique de cette courbe de pression de surface ne nous a pas donné une variation supérieure à  $0.3 \text{ } \overset{\circ}{\text{A}}^2$  dans la mesure de l'aire moléculaire de l'acide arachidique, ce qui entre dans les limites de l'erreur expérimentale. Maintenant que le système est à point, passons aux résultats des pigments photosynthétiques.

### 6.3.3 Isothermes de pression de surface des pigments photosynthétiques étudiés

Les pigments dont nous avons étudié les propriétés de pression de surface à l'interface air-eau sont les suivants: la chlorophylle a, la chlorophylle b, la vitamine K<sub>1</sub>, l' $\alpha$ -tocophérylquinone, l' $\alpha$ -tocophérol et le phytol. Nous avons d'abord étudié chacune de ces substances seule puis en mélange binaire formé d'une chlorophylle avec un des quatres autres pigments. Voici d'abord les résultats des isothermes de pression de surface pour chacune des substances étudiées isolément.

#### 6.3.3.1 Chlorophylle a

La chlorophylle a utilisée pour cette étude est celle obtenue commercialement chez SIGMA. La chlorophylle est mise en solution dans de l'éther éthylique et sa concentration est déterminée à partir du spectre d'absorption obtenu sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer Modèle Coleman 124. La concentration est calculée à partir de l'absorbance à 660 nm et du

coefficient d'absorptivité molaire, fourni par la compagnie SIGMA pour cet échantillon en particulier; on se sert naturellement de la relation de Beer-Lambert pour calculer la concentration:

$$A = \epsilon c b \rightarrow c = \frac{A}{\epsilon b}$$

où  $A$  = absorbance

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

$c$  = concentration ( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )

$b$  = trajet optique (cm)

L'isotherme de pression de surface de la chlorophylle a a été tracé dans les conditions expérimentales suivantes:

- Déposition : 0.175 ml
- Concentration :  $1.20 \times 10^{-4} \text{ M}$
- Solvant : éther éthylique
- Sous-phase : tampon phosphate ( $10^{-3} \text{ M}$ ) à pH = 7.8
- Température : 293 K
- Vitesse de compression :  $1.60 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $17 \text{ A}^2 \cdot \text{molécule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ .)

L'isotherme est représentée sur la figure 15 par la courbe A.

La compression se fait environ 5 minutes après la déposition, pour permettre au solvant de s'évaporer et à la chlorophylle a de se stabiliser à la surface de l'eau. Après la compression, la monocouche est plus ou moins stable au cours des 60 premières secondes puis se stabilise par la suite et ne change plus.

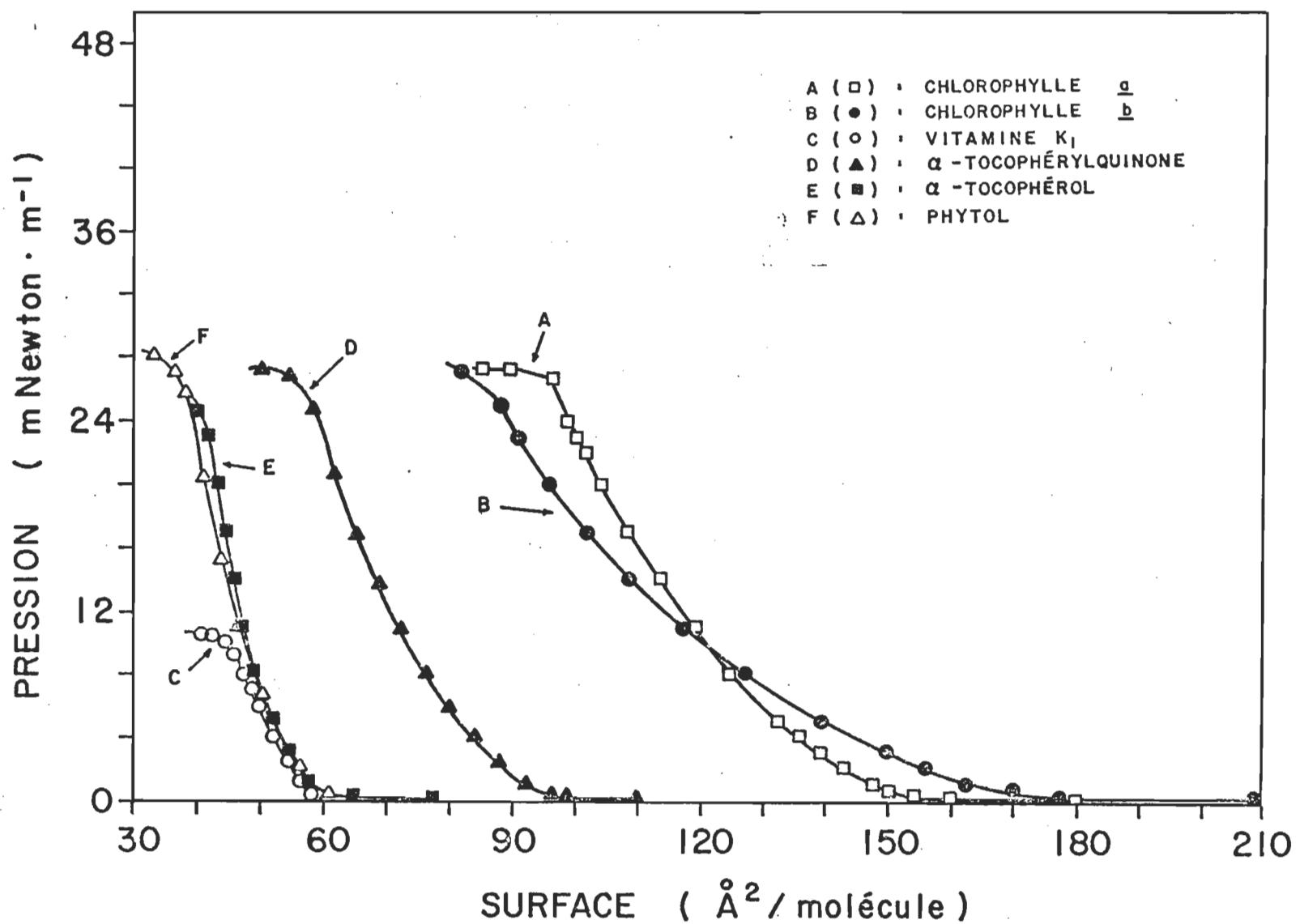


FIGURE 15. Isothermes de pression de surface des pigments photosynthétiques.

L'isotherme de la chlorophylle a (Fig. 15) se divise en deux phases distinctes, soit une phase gazeuse aux faibles pressions de surface et une phase liquide aux fortes pressions de surface. Contrairement à l'isotherme de l'acide arachidique, par exemple, nous n'avons pas, pour la chlorophylle a, de phase solide dans les fortes pressions de surface. En extrapolant la portion de l'isotherme correspondant aux fortes pressions de surface, nous obtenons l'aire moléculaire approximative de la chlorophylle a, soit  $131 \text{ \AA}^2$ . Il est important de noter que cette valeur a été obtenue à partir d'une monocouche en phase liquide et non d'une monocouche très compacte en phase solide.

En tenant compte d'une erreur expérimentale possible, cette valeur de  $131 \text{ \AA}^2$ , comme aire moléculaire de la chlorophylle a, correspond assez bien aux valeurs déjà publiées dans la littérature scientifique. Le tableau 8 nous permet de comparer notre valeur avec 9 autres valeurs obtenues entre 1936 et 1977 selon diverses conditions expérimentales. Ainsi, nous avons obtenu une valeur qui nous semble satisfaisante compte tenu du fait que nous avons utilisé de la chlorophylle commerciale plutôt que de la chlorophylle extraite et purifiée dans nos laboratoires.

Cette aire moléculaire de  $131 \text{ \AA}^2$  reflète le comportement de la molécule à la surface de l'eau. Puisque la surface plane de l'anneau porphyrine de la chlorophylle est de  $225 \text{ \AA}^2$  ( $15 \text{ \AA}^0 \times 15 \text{ \AA}^0$ ), il devient évident que cet anneau porphyrine est orienté avec un certain angle à la surface de l'eau plutôt qu'étendu à plat sur l'eau (Ke, 1966) et cet angle pourrait varier entre  $48^\circ$  (Cherry, 1972) et  $55^\circ$  (Hanson, 1939).

TABLEAU 8: PARAMETRES EXPERIMENTAUX DES ISOTHERMES DE PRESSION DE SURFACE DE LA CHLOROPHYLLE a. COMPARAISON AVEC DES TRAVAUX ANTERIEURS.

REFERENCES	SOLVANT	SOUS-PHASE	pH SOUS-PHASE	TEMPERATURE	AIRE MOLECULAIRE	PRESSION DE SURFACE EN COLLAPSE
MORIN, M. (présent travail)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	7.8	293 K	131.0 $\text{\AA}^2$	26.5 $\text{mN.m}^{-1}$
HUGHES (1936)	-	tampon phosphate	7.0-7.5	293	132.0	20.0
ALEXANDER (1937)	-	tampon phosphate	7.3	293	132.0	24.0
TRURNIT et COLMANO (1959)	éther éthylique	eau distillée	7.5	293	122.0	27.4
GAINES (1966)	-	tampon phosphate	8.0	293	117.5	> 20.0
AGHION et coll. (1969)	benzène	tampon phosphate $10^{-2}$ M	7.8	298	122.0	> 26.0
LEBLANC et ORGER (1970)	éther éthylique	tampon phosphate	7.8-8.0	288-293	125.0	24.0
COSTA et coll. (1972)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	7.8-8.0	290	114.0	26.5
DEN ENGELSEN et DE KONING (1974)	benzène	tampon phosphate $10^{-3}$ M	8.0	293	133.0	24.0
HIRSCH (1977)	chloroforme	tampon phosphate	8.0	290	133.0	> 20.0

### 6.3.3.2 Chlorophylle b

Pour la chlorophylle b, nous avons aussi utilisé les échantillons commerciaux de la compagnie SIGMA, qui, au moment de l'expérience, nous a fourni des échantillons de chlorophylle b d'une pureté hors de l'ordinaire. La chlorophylle est mise en solution dans l'éther éthylique et sa concentration est obtenue à partir du spectre d'absorption comme pour la chlorophylle a. Pour ce calcul, nous utilisons l'absorbance à 642 nm et la valeur du coefficient d'absorptivité molaire à cette longueur d'onde est de  $5.57 \times 10^4 \text{ l.mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Les conditions expérimentales sont les suivantes:

- Déposition : 0.130 ml
- Concentration :  $1.30 \times 10^{-4} \text{ M}$
- Solvant : éther éthylique
- Sous-phase : tampon phosphate ( $10^{-3} \text{ M}$ ) à pH = 7.8
- Température : 292-293 K
- Vitesse de compression :  $1.30 \text{ cm. min}^{-1}$  ( $15 \text{ A}^2 \cdot \text{molécule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )

Afin de permettre un étalement uniforme des molécules à la surface de l'eau, nous attendons environ cinq minutes ayant de compresser. La compression se fait uniformément et de façon constante à l'aide d'un moteur. Après la compression, la monocouche de chlorophylle b est plus ou moins stable et finit par se stabiliser après environ cinq minutes.

L'isotherme de pression de surface est représentée sur la figure 15 par la courbe B. En extrapolant la portion de l'isotherme aux fortes pressions de surface, soit la région de la courbe précédant le collapse, nous obtenons une aire moléculaire de  $130 \text{ \AA}^2$ , soit presque la même aire moléculaire que la chlorophylle a. Donc, la chlorophylle b a, elle aussi, un angle d'inclinaison d'environ  $51^\circ$  de son plan porphyrine par rapport à la surface de l'eau (Cherry et coll., 1972).

Le tableau 9 nous permet de comparer nos résultats avec certains travaux antérieurs. Ainsi, on voit que, pour des conditions expérimentales apparemment identiques, notre valeur de  $130 \text{ \AA}^2$  pour l'aire moléculaire de la chlorophylle b semble bonne. On note cependant une différence entre l'aire moléculaire obtenue dans le présent travail et celle donnée par Leblanc et Orger (1970) et Costa et coll. (1972) qui ont aussi utilisé de la chlorophylle b commerciale. Cette différence est sans doute attribuable au fait que la pureté de la chlorophylle Sigma peut légèrement varier d'un lot à un autre et cette variation peut facilement causer une différence allant jusqu'à  $25 \text{ \AA}^2$ .

#### 6.3.3.3 Vitamine K<sub>1</sub>

Les conditions expérimentales de l'isotherme de pression de surface de la vitamine K<sub>1</sub> sont les suivantes:

- Déposition : 0.075 à 0.100 ml
- Concentration :  $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$
- Solvant : éther éthylique

TABLEAU 9: PARAMETRES EXPERIMENTAUX DES ISOTHERMES DE PRESSION DE SURFACE  
DE LA CHLOROPHYLLE *b*. COMPARAISON AVEC CERTAINS TRAVAUX ANTERIEURS

REFERENCE	SOLVANT	SOUS-PHASE	pH SOUS-PHASE	TEMPERATURE	AIRE MOLECULAIRE	PRESSION DE SURFACE AU COLLAPSE
MORIN, M. (pré- sent travail)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	7.8	293 K	130.0 $\text{\AA}^2$	25.0 mN. $\text{m}^{-1}$
HUGHES (1936)	-	tampon phosphate	7.0-7.5	293	137.0	20.0
ALEXANDER (1937)	-	tampon phosphate	7.3	293	137.0	> 28.0
TRURNIT et COLMANO (1959)	éther éthylique	eau distillée	7.5	293	120.0	30.5
LEBLANC et ORGER (1970)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	7.8-8.0	290	110.0	28.0
COSTA et coll. (1972)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	7.8-8.0	290	107.5	28.5

- Sous-phase : Tampon phosphate ( $10^{-3}$  M) à pH = 7.8
- Température : 293 K
- Vitesse de compression:  $1.00 \text{ cm. min}^{-1}$  ( $2.6 \text{ } \overset{\circ}{\text{A}}^2 \cdot \text{molécule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )

L'isotherme est représentée sur la figure 15 par la courbe C. La vitamine K<sub>1</sub> est une substance très stable, que ce soit avant ou après la compression. Le collapse est atteint à une pression de  $10.35 \pm 0.35 \text{ mN. m}^{-1}$  et la courbe de pression de surface est indépendante de la vitesse de compression, soit dans l'intervalle de 2 à  $20 \text{ } \overset{\circ}{\text{A}}^2 \cdot \text{molécule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Comme pour les chlorophylles, la vitamine K<sub>1</sub> forme une monocouche en phase liquide. L'extrapolation de la portion linéaire de la courbe comprise entre 5 et 10  $\text{mN. m}^{-1}$  nous permet de connaître assez précisément l'aire moléculaire expérimentale; nous avons ainsi obtenu une aire moléculaire de  $58.5 \text{ } \overset{\circ}{\text{A}}^2$ .

Le tableau 10 permet de voir une comparaison entre les différents paramètres expérimentaux de l'isotherme de pression de surface du présent travail avec ceux de quelques travaux réalisés sur le même sujet, soit les travaux de Weitzell (1956), Gaines (1965, 1968), Leblanc et Orger (1970) et ceux de Costa et coll. (1972). Nous pouvons ainsi voir que notre valeur de l'aire moléculaire se compare assez bien avec les autres résultats quoiqu'elle est légèrement supérieure à ceux-ci. Cependant, une différence d'environ  $3-4 \text{ } \overset{\circ}{\text{A}}^2/\text{molécule}$  est acceptable, compte tenu des erreurs expérimentales possibles. Quant à la pression de surface au collapse, notre valeur de  $10.35 \text{ mN. m}^{-1}$  correspond approximativement à la valeur moyenne des valeurs de référence du tableau 10.

TABLEAU 10: PARAMETRES EXPERIMENTAUX DES ISOTHERMES DE PRESSION DE SURFACE DE LA VITAMINE K<sub>1</sub>. COMPARAISON AVEC CERTAINS TRAVAUX ANTERIEURS

REFERENCES	SOLVANT	SOUS-PHASE	pH SOUS-PHASE	TEMPERATURE	AIRE MOLECULAIRE	PRESSION DE SURFACE AU COLLAPSE
MORIN, M. (présent travail)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	7.8	293 K	58.5 $\text{\AA}^2$	10.35 mN.m <sup>-1</sup>
WEITZELL et coll. (1956)	-	HCl $10^{-2}$ M	2.0	293	56.8	10.70
GAINES et coll. (1965)	benzène	tampon phosphate $10^{-3}$ M	8.0	293	55.5	10.60
GAINES (1968)	benzène	tampon phosphate	8.0	293	56.0	10.60
LEBLANC et ORGER (1970)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	8.0	288	54.5	11.00
COSTA et coll. (1972)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	7.8-8.0	290	54.0	10.00

De plus, la courbe de pression de surface de la vitamine K<sub>1</sub> est indépendante du pH de la sous-phase utilisé; en effet, Weitzell et coll. (1956) ont employé une sous-phase HCl ( $10^{-2}$  M) à pH = 2.0 alors que Gaines (1968) a employé une sous-phase de tampon phosphate à pH = 8 et pourtant leurs résultats sont presque identiques autant en ce qui concerne l'aire moléculaire que la pression de surface au collapse. Ainsi, la pression de surface de la vitamine K<sub>1</sub> est uniquement fonction du caractère hydrophobe de la chaîne carbonée de la molécule (Gaines, 1966, p. 254) et non des différents paramètres expérimentaux utilisés lors de l'expérience.

#### 6.3.3.4 $\alpha$ -Tocophérylquinone

La courbe D sur la figure 15 représente l'isotherme moyenne de l' $\alpha$ -tocophérylquinone et a été réalisée dans les conditions expérimentales suivantes:

- Déposition : 0.040 ml
- Concentration :  $1.39 \times 10^{-3}$  M
- Solvant : éther éthylique
- Sous-phase : Tampon phosphate ( $10^{-3}$  M) à pH = 7.8
- Température : 292.5 K
- Vitesse de compression :  $1.1 \text{ cm. min}^{-1}$  ( $4 \text{ A}^2/\text{molécule/min.}$ )

Comme pour les autres pigments, la compression s'est effectuée de façon automatique et constante et cela, après une attente d'environ cinq minutes pour permettre un étalement complet des molécules à la surface de l'eau et l'évaporation du solvant. L' $\alpha$ -tocophérylquinone forme, comme pour les chlorophylles, une monocouche en phase liquide très stable.

La chaîne carbonée en  $C_{16}$  de la molécule d' $\alpha$ -tocophérylquinone étant la même que celle de la vitamine  $K_1$ , on pourrait s'attendre à obtenir un comportement semblable à l'interface air-eau; cependant la présence de la fonction quinone et du groupement hydroxyle (OH) dans la molécule d' $\alpha$ -tocophérylquinone fait que l'aire moléculaire est presque deux fois plus grande que celle de la vitamine  $K_1$  tout en rendant le film beaucoup plus stable au collapse (Gaines, 1968).

Ainsi, en extrapolant la portion linéaire de l'isotherme dans la région des fortes pressions de surface, on obtient une aire moléculaire expérimentale de  $80.5 \text{ \AA}^2$ . Le tableau 11 nous permet de comparer nos résultats avec ceux de Gaines (1968), Leblanc et Orger (1970) ainsi que ceux de Costa et coll. (1972). Dans l'ensemble, nos résultats se situent à mi-chemin entre ceux de Gaines (1968) et ceux de Costa (1972), tant au point de vue de l'aire moléculaire que de la pression de surface au collapse, et cela pour des conditions de sous-phase, de pH et de température presque identiques.

#### 6.3.3.5 $\alpha$ -Tocophérol

L'isotherme de pression de surface de l' $\alpha$ -tocophérol a été réalisée dans les conditions expérimentales suivantes:

- Déposition : 0.015 ml
- Concentration :  $5.18 \times 10^{-3} \text{ M}$
- Solvant : éther éthylique
- Sous-phase : Tampon phosphate ( $10^{-3} \text{ M}$ ) à pH = 8

TABLEAU 11: PARAMETRES EXPERIMENTAUX DES ISOTHERMES DE PRESSION DE SURFACE DE L' $\alpha$ -TOCOPHERYLQUINONE. COMPARAISON AVEC CERTAINS TRAVAUX ANTERIEURS

REFERENCES	SOLVANT	SOUS-PHASE	pH SOUS-PHASE	TEMPERATURE	AIRE MOLECULAIRE	PRESSION DE SURFACE AU COLLAPSE
MORIN, M. (présent travail)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	7.8	292.5 K	80.5 $\text{\AA}^2$	26.0 mN. $\text{m}^{-1}$
GAINES (1968)	benzène	tampon phosphate $10^{-3}$ M	8.0	293	78.0	24.0
LEBLANC et ORGER (1970)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	8.0	288	82.5	27.0
COSTA et coll. (1972)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	7.8-8.0	290	81.0	27.0
PATIL et CORNWELL (1978)	n-hexane	HCl	$10^{-2}$ M	1.2	295-297	86.6
						26.6

- Température : 293 K
- Vitesse de compression : 1.5 cm.  $\text{min}^{-1}$  (3.8  $\text{\AA}^2/\text{molécule/min.}$ )

La courbe E sur la figure 15 représente une courbe moyenne de l' $\alpha$ -tocophérol résultant de 3 essais réalisés dans des conditions expérimentales identiques. Après une attente de cinq minutes pour permettre un étalement complet des molécules à la surface de l'eau, la compression est faite automatiquement à une vitesse constante de 1.5 cm par minute. A la fin de la compression, le film est très stable.

En extrapolant sur l'axe des abscisses la portion linéaire de l'isotherme située juste avant le collapse, nous obtenons une aire moléculaire de  $51.5 \text{ \AA}^2$ . Ce résultat s'avère excellent si on le compare à celui de Weitzel et coll. (1956) qui ont obtenu  $51.1 \text{ \AA}^2$  et à celui de Leblanc et Orger (1970) qui ont obtenu une valeur de  $53.3 \text{ \AA}^2$ . La courbe de pression de surface est indépendante de la sous-phase utilisée ainsi que du pH car nous avons utilisé une sous-phase de tampon phosphate à pH 8.0 alors que Weitzel et ses collaborateurs (1956) ont utilisé une sous-phase HCl à pH 2.0 et les résultats de l'aire moléculaire sont presque identiques.

La pression de surface au collapse de l' $\alpha$ -tocophérol est inférieure à l' $\alpha$ -tocophérylquinone; en effet, l' $\alpha$ -tocophérol collapse à une pression variant entre 23 et  $24 \text{ mN. m}^{-1}$  alors que l' $\alpha$ -tocophérylquinone a son collapse à une pression variant entre 26 et  $27 \text{ mN. m}^{-1}$ . Le tableau 12 nous donne une comparaison de nos résultats avec ceux de Weitzel et coll. (1956) et ceux de Leblanc et Orger (1970).

TABLEAU 12: PARAMETRES EXPERIMENTAUX DES ISOTHERMES DE PRESSION DE SURFACE DE L' $\alpha$ -TOCOPHEROL. COMPARAISON AVEC CERTAINS TRAVAUX ANTERIEURS

REFERENCES	SOLVANT	SOUS-PHASE	pH SOUS-PHASE	TEMPERATURE	AIRE MOLECULAIRE	PRESSION DE SURFACE AU COLLAPSE
MORIN, M. (présent travail)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	8.0	293 K	51.5 $\text{\AA}^2$	23.0 $\text{mN.m}^{-1}$
WEITZEL et coll. (1956)	-	HCl $10^{-2}$ M	2.0	294	51.1	24.2
LEBLANC et ORGER (1970)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	8.0	291	53.3	24.0
PATIL et CORNWELL (1978)	n-hexane	NaCl 0.1 M HCl 0.01 M	1.2	295-297	55.0	25.0
PATIL et CORNWELL (1978)	n-hexane	NaOH 0.1 N	12.8	295-297	66.0	18.5

La structure de l' $\alpha$ -tocophérol ressemble à celle de la vitamine K<sub>1</sub> tant au niveau des noyaux benzéniques que de la chaîne carbonée (voir figure 4, p. 14).

Ainsi l'aire moléculaire des deux composés est presque la même soit,  $52.5 \text{ \AA}^2$  pour l' $\alpha$ -tocophérol contre  $58 \text{ \AA}^2$  pour la vitamine K<sub>1</sub>.

#### 6.3.3.6 Phytol

Les différents paramètres expérimentaux utilisés pour l'isotherme de pression de surface du phytol sont les suivants:

- Déposition : 0.050 ml
- Concentration :  $1.27 \times 10^{-3} \text{ M}$
- Solvant : éther éthylique
- Sous-phase : tampon phosphate ( $10^{-3} \text{ M}$ ) à pH = 7.67
- Température : 292.5 K
- Vitesse de compression :  $1.67 \text{ cm/min}$  ( $2.5 \text{ \AA}^2/\text{molécule/min.}$ )

Les résultats de cette expérience sont représentés par une courbe moyenne, soit la courbe F sur la figure 15. La compression a été faite, comme pour les autres pigments, après une attente de cinq minutes pour permettre au solvant de s'évaporer et aux molécules de s'étaler parfaitement sur l'eau. Après compression, le film est très stable, même après une attente de plusieurs minutes.

L'extrapolation sur l'axe des abscisses, soit à une pression égale à zéro, de la portion linéaire de l'isotherme située juste avant le collapse nous donne une aire moléculaire de  $52.5 \text{ \AA}^2$ . Si nous comparons cette valeur avec certaines valeurs de référence (Tableau 13) on se rend compte que nos résultats correspondent assez bien avec les valeurs de références, quoique très légèrement supérieurs, autant en ce qui concerne l'aire moléculaire que la pression de surface au collapse.

#### 6.3.3.7 Discussion

De ces résultats sur les isothermes de pression de surface des pigments photosynthétiques, nous pouvons tirer quelques points importants.

Les chlorophylles a et b ont un comportement presque identiques à l'interface air-eau tant au point de vue de l'aire moléculaire que de la pression de surface au collapse, puisque les deux molécules sont semblables à l'exception d'un groupement  $\text{CH}_3$  de la chlorophylle a qui est remplacé par un groupement  $\text{CHO}$  dans la chlorophylle b (Voir figure 3). Dans les deux cas, l'aire moléculaire est fonction de l'inclinaison du plan porphyrine de la molécule par rapport à la surface de l'eau et cette inclinaison est d'environ 48 degrés pour la chlorophylle a et 51 degrés pour la chlorophylle b.

La vitamine  $\text{K}_1$ , l' $\alpha$ -tocophérol et le phytol ont à peu près le même comportement à l'interface air-eau. En effet, ces trois substances ont une chaîne aliphatique identique de 16 carbones et la seule différence entre ces 3 substances est le groupement polaire à l'extrémité de la

TABLEAU 13: PARAMETRES EXPERIMENTAUX DES ISOTHERMES DE PRESSION DE SURFACE DU PHYTOL. COMPARAISON AVEC CERTAINS TRAVAUX ANTERIEURS

REFERENCES	SOLVANT	SOUS-PHASE	pH SOUS-PHASE	TEMPERATURE	AIRE MOLECULAIRE	PRESSION DE SURFACE AU COLLAPSE
MORIN, M. (présent travail)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	7.67	292.5 K	52.5 $\text{\AA}^2$	26.0 mN. $\text{m}^{-1}$
TWEET et coll. (1964)	benzène	tampon phosphate $10^{-3}$ M	8.0	293	48.5	-
GAINES (1968)	benzène	tampon phosphate $10^{-3}$ M	8.0	293	47.5	24.0
LEBLANC et ORGER (1970)	éther éthylique	eau distillée	6.2	288.0	50.0	29.0
COSTA et coll. (1972)	éther éthylique	tampon phosphate $10^{-3}$ M	7.8-8.0	290.0	50.0	29.0
HIRSCH (1977)	chloroforme	tampon phosphate	8.0	290.0	42.5	20.0

chaîne carbonée (voir figure 4). Dans chacun des trois cas, l'aire moléculaire est approximativement la même soit,  $58.5$ ,  $51.5$  et  $52.5 \text{ } \text{Å}^2$  pour la vitamine  $K_1$ , l' $\alpha$ -tocophérol et le phytol respectivement. Ainsi, la substitution de l'anneau naphtoquinone (vitamine  $K_1$ ) par un simple groupement OH (phytol) n'a que très peu d'influence sur l'aire moléculaire de ces monocouches. Cependant, dans le cas de la vitamine  $K_1$ , la présence d'une double liaison entre la chaîne carbonée et le noyau naphtoquinone fait que le col-lapse est atteint à une pression de surface beaucoup plus basse ( $10.35 \text{ mN. m}^{-1}$ ) que l' $\alpha$ -tocophérol ( $23.0 \text{ mN. m}^{-1}$ ) ou le phytol ( $26 \text{ mN. m}^{-1}$ ).

Dans le cas de l' $\alpha$ -tocophérylquinone, la présence d'une fonction qui-none et d'une fonction hydroxyle en même temps sur la molécule augmente l'aire moléculaire ( $81.5 \text{ } \text{Å}^2$ ) tout en stabilisant le film dans la région du col-lapse.

Passons maintenant aux résultats concernant l'étude des différents mé-tanges binaires de ces pigments photosynthétiques.

### 6.3.4 Isothermes de pression de surface du système chlorophylle / vitamine K<sub>1</sub>

#### 6.3.4.1 Système chlorophylle a/vitamine K<sub>1</sub>

Dans le but de vérifier les résultats obtenus, treize ans auparavant, par Gaines, Tweet et Bellamy (1965) sur l'interaction entre la chlorophylle a et la vitamine K<sub>1</sub> en films monomoléculaires à l'interface air-eau, nous avons tenté de répéter ces expériences en gardant les mêmes conditions expérimentales.

Voici d'ailleurs les conditions expérimentales dans lesquelles nos expériences ont été réalisées:

- Concentration :  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  M
- Solvant : éther éthylique
- Température : 292 K
- Sous-phase : tampon phosphate ( $10^{-3}$  M) à pH = 7.8-8.0
- Vitesse de compression : 0.70 - 1.00 cm/min ( $5-17 \frac{\text{A}^2}{\text{molécule/min.}}$ )
- Déposition : 0.175 à 0.300 ml (selon la concentration)

En variant la proportion de chaque constituant du mélange, nous avons obtenu une série d'isothermes de pression de surface et elles sont représentées sur la figure 16. Ainsi, les courbes 1 et 2 représentent les isothermes de chacun des films purs, soit respectivement la chlorophylle a et la vitamine K<sub>1</sub>. Chacune de ces deux courbes correspond bien aux courbes déjà publiées (voir tableau 8 et 10).

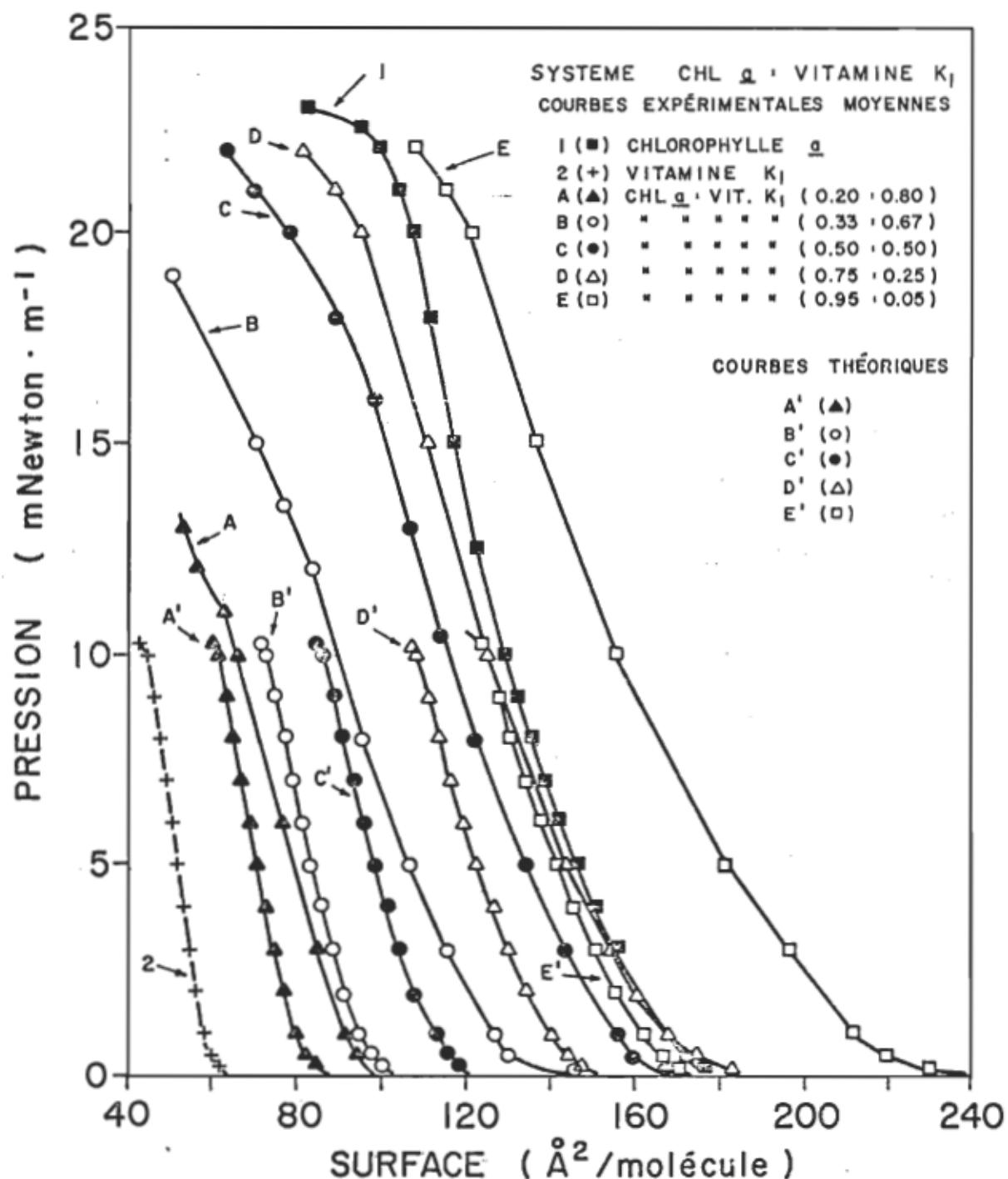


FIGURE 16. Isothermes de pression de surface du système chlorophylle  $\alpha$ /vitamine K<sub>1</sub>.

Les courbes A, B, C, D et E représentent les isothermes expérimentales de chacun des mélanges étudiés en variant la proportion de chlorophylle a et de vitamine K<sub>1</sub> pour chaque mélange. Nous avons ainsi étudié les mélanges suivants: (0.20 : 0.80), (0.33 : 0.67), (0.50 : 0.50), (0.75 : 0.25) et (0.95 : 0.05), la première fraction molaire étant celle de la chlorophylle a et la deuxième celle de la vitamine K<sub>1</sub>.

Pour chacun des mélanges, nous avons aussi calculé une courbe théorique selon la loi d'additivité (Gaines, 1966) (voir section 5.4.5.3) et ces isothermes théoriques sont représentées sur la figure 16 par les courbes A<sup>1</sup> à E<sup>1</sup>, correspondant aux mélanges déjà cités.

La région du collapse des courbes expérimentales est fortement influencée par la présence de la vitamine K<sub>1</sub> dont le collapse n'atteint que 10.35 mN. m<sup>-1</sup>. Ainsi, pour les courbes A et B, on note une inflexion dans l'allure générale de l'isotherme entre 10 et 15 mN. m<sup>-1</sup> et cela est dû à la forte concentration de vitamine K<sub>1</sub> dans ces deux mélanges. À mesure que la concentration de vitamine K<sub>1</sub> diminue, on observe que le collapse du film se produit à une pression plus grande, soit aux environs de 20 mN. m<sup>-1</sup>. Ainsi, on remarque que les courbes D et E, correspondant à une fraction molaire de 0.25 et 0.05 respectivement, ont un collapse identique vers 20 mN. m<sup>-1</sup> et à partir de ces concentrations, on voit que la concentration de vitamine K<sub>1</sub> n'a presque plus d'influence sur le collapse du film.

#### 6.3.4.2 Système chlorophylle b / vitamine K<sub>1</sub>

La chlorophylle b étant aussi présente dans les membranes des végétaux supérieurs, nous avons voulu savoir si une interaction pouvait être possible

avec la vitamine  $K_1$ . Nous avons donc fait une étude similaire à celle impliquant la chlorophylle a en gardant les mêmes conditions expérimentales, soit les suivantes:

- Déposition : 0.250 à 0.300 ml (selon la concentration)
- Concentration :  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  M
- Solvant : éther éthylique
- Température : 290 - 293 K
- Sous-phase : tampon phosphate ( $10^{-3}$  M) pH = 7.8-8.0
- Vitesse de compression: 0.75 - 1.50 cm/min ( $7-40 \frac{\text{cm}}{\text{min}} \frac{\text{A}^2}{\text{molécule}}$ ).

La figure 17 représente la série de résultats expérimentaux moyens obtenus pour un tel système en variant les concentrations des deux constituants du mélange. La courbe 1 représente l'isotherme de pression de surface du film pur de la vitamine  $K_1$  et la courbe 2 celle de la chlorophylle b. Ces deux courbes sont en accord avec celles déjà publiées (voir tableaux 9 et 10).

Les courbes A, B, C, D, E et F sont les courbes moyennes expérimentales obtenues de chacun des mélanges étudiés en variant la fraction molaire de chlorophylle b entre 0.10 et 0.95. A chaque courbe expérimentale correspond une courbe théorique calculée selon la loi d'additivité et elles sont représentées sur la figure 17 par les courbes  $A^1$ ,  $B^1$ ,  $C^1$ ,  $D^1$ ,  $E^1$  et  $F^1$ .

Comme pour le système chlorophylle a/vitamine  $K_1$ , la concentration de vitamine  $K_1$  dans le mélange influence grandement le collapse de l'isotherme expérimentale. Ainsi, pour une forte concentration de vitamine  $K_1$  (courbes A et B), on observe une inflexion dans l'allure de la courbe entre  $10$  et  $15 \text{ mN.m}^{-1}$ . A faible concentration de vitamine  $K_1$  (courbes C, D,

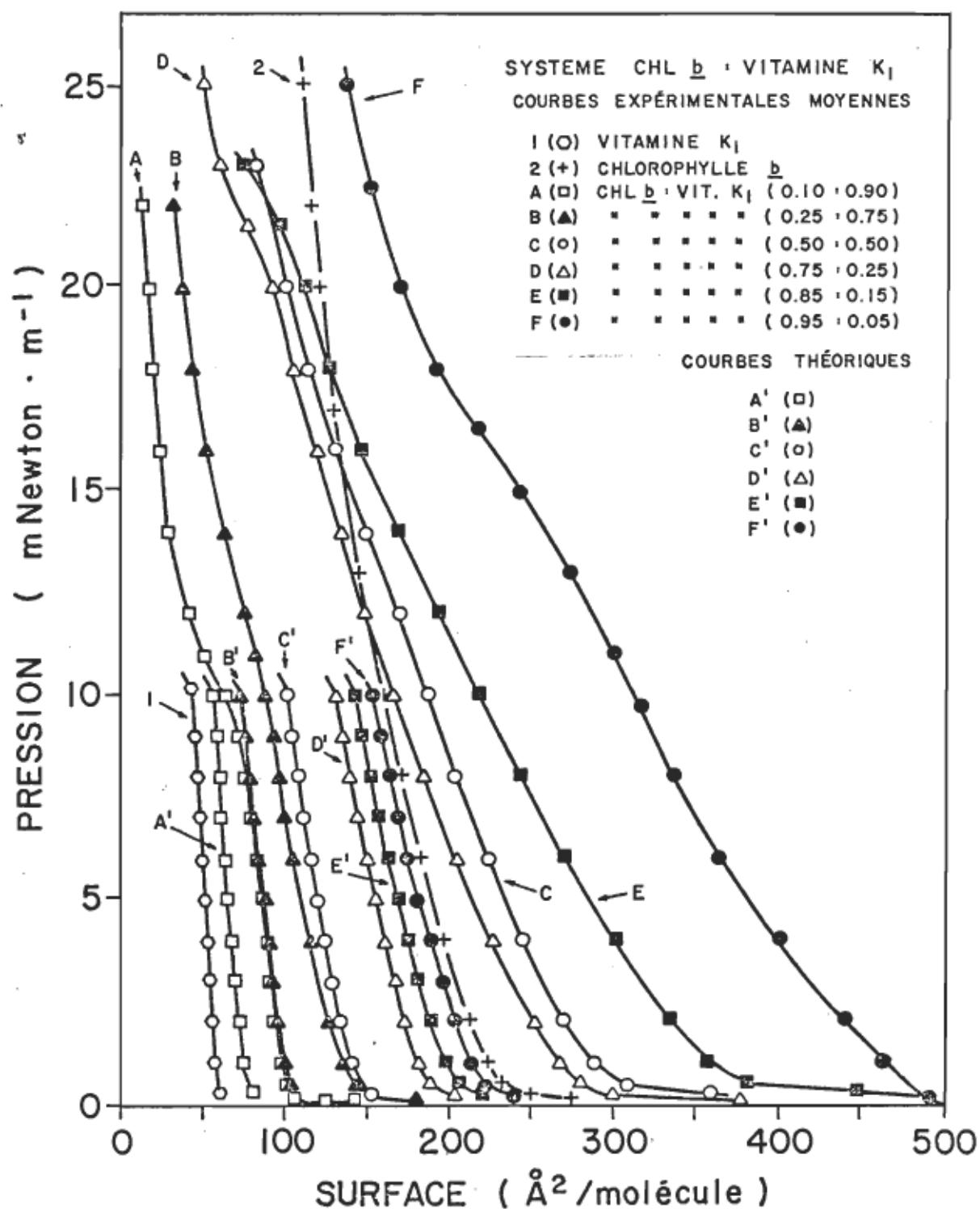


FIGURE 17. Isothermes de pression de surface du système chlorophylle b/vitamine K<sub>1</sub>.

E et F), l'inflexion se produit à une pression plus grande, soit aux environs de  $20 \text{ mN. m}^{-1}$ .

#### 6.3.4.3 Examen de la loi d'additivité. Discussion

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'examen de la loi d'additivité, nous indique principalement s'il y a miscibilité ou non entre les deux substances. Ainsi, toute déviation à l'équation 1 (voir p. 88) nous indique que les deux substances forment un mélange homogène et par conséquent, qu'il existe une espèce d'interaction moléculaire entre elles.

Une façon d'établir s'il y a miscibilité ou non entre deux substances est d'appliquer ce qu'on appelle la règle de phase de surface développée par Crisp (1949). Ainsi, si les deux composés du film mixte ne sont pas miscibles, et qu'un des deux composés collapse à une pression où l'autre composé forme un film stable, le composé possédant la plus basse pression de collapse va confirmer le collapse du film à cette pression. Le film mixte sera donc instable à n'importe quelle pression au-dessus de cette pression, et cela peu importe la concentration de ce composé dans le film. Cependant, si les deux composés du film mixte sont miscibles, la pression de surface au collapse variera avec la composition du film.

A la lumière des résultats obtenus, nous voyons que le système chl/vit.K<sub>1</sub> est un système où les composants sont miscibles puisque la pression de surface au collapse varie en fonction de la concentration des composants.

Pour le système chlorophylle a : vitamine K<sub>1</sub> (figure 16), nous remarquons qu'il y a effectivement une interaction entre les deux substances et cette interaction se manifeste dans la déviation à la loi d'additivité.

déviation qui augmente graduellement à mesure que l'on augmente le pourcentage de chlorophylle a dans le mélange, pour atteindre un maximum à une fraction molaire de 0.95 de chlorophylle a.

Maintenant si, pour une même pression de  $5 \text{ mN. m}^{-1}$ , nous faisons la différence entre l'aire moléculaire de la courbe expérimentale et celle de la courbe théorique pour chacun des cinq mélanges et si nous portons sur graphique ces valeurs ( $\Delta\sigma = \sigma_{\text{exp.}} - \sigma_{\text{théo.}}$ ) en fonction de la fraction molaire de chlorophylle a, nous obtenons un graphique comme celui de la figure 18. Sur cette figure, nous voyons que l'interaction maximale entre la chlorophylle a et la vitamine  $K_1$  se situe à une fraction molaire de chlorophylle a de 0.95. Cependant, nous observons une baisse du  $\Delta\sigma$  à une fraction molaire de 0.75, baisse qui nous semble difficile à expliquer. Comme cette expérience a été faite à plusieurs reprises et qu'elle a toujours donné des résultats identiques, on peut donc supposer qu'il ne s'agit pas d'une erreur expérimentale. On pourrait cependant émettre l'hypothèse suivante comme une explication plausible, à savoir, qu'à cette concentration de chlorophylle dans le mélange ( $x = 0.75$ ), il y aurait une formation d'agglomérats ou d'îlots du complexe chlorophylle a/vitamine  $K_1$  à l'interface air-eau qui provoquerait une contraction de la surface, d'où la diminution observée sur la figure 18.

La comparaison de nos résultats avec ceux de G.L. Gaines devient difficile du fait que ce dernier a utilisé deux notations différentes pour exprimer la surface dans ses publications, soit la surface en  $\text{A}^2$  par molécule de vitamine  $K_1$  du mélange (Gaines et coll., 1965, p. 2194) et la surface moyenne par molécule de mélange (Gaines, 1966, p. 293), alors que

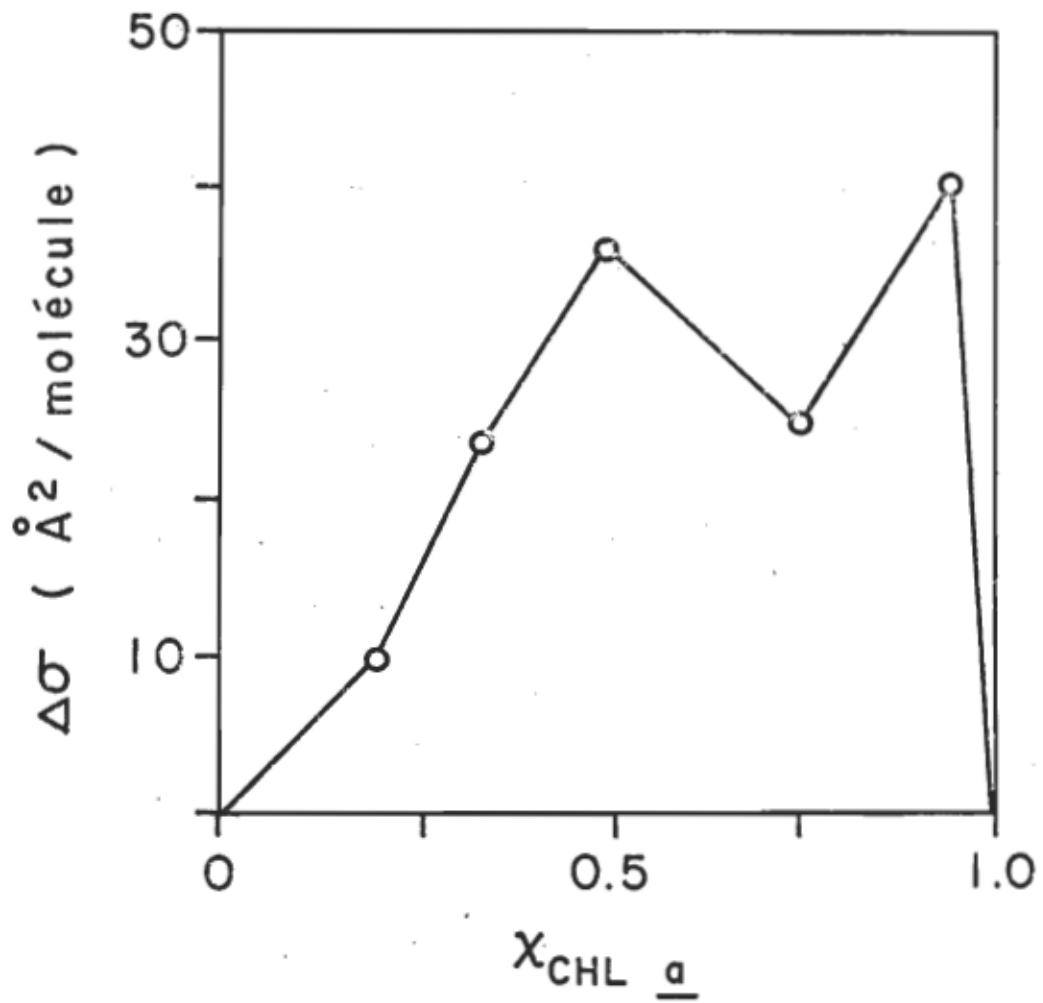


FIGURE 18. Relation entre le  $\Delta\sigma$  ( $\sigma$  exp. -  $\sigma$  théo.) et la fraction molaire de chlorophylle a pour le système chlorophylle a/vitamine K<sub>1</sub>.

nous avons exprimé toutes nos valeurs de surface en  $\text{A}^2$  par molécule de mélange. Cependant, nous avons observé, pour tous les mélanges étudiés, une déviation positive des courbes expérimentales par rapport aux courbes théoriques correspondantes, i.e. la courbe expérimentale occupe une surface plus grande que ce qu'elle occuperait si le mélange était idéal. Contrairement à ce que nous avons observé expérimentalement, Gaines a obtenu, pour tous ses mélanges, une déviation négative par rapport à la courbe théorique (Gaines, 1966, p. 293). Comme ces publications ne contiennent pas beaucoup de détails quant à la méthode expérimentale et qu'elles datent de 1965, il est assez difficile de trouver une explication à ces résultats très différents les uns des autres.

Dans le cas du système chlorophylle b/vitamine  $K_1$ , nous avons noté aussi une interaction appréciable entre les deux substances, comme nous pouvons le voir sur la figure 17. En effet, même à faible concentration de chlorophylle b, l'interaction semble forte car la différence entre la courbe expérimentale et la courbe théorique est loin d'être négligeable. La déviation à la loi d'additivité augmente graduellement avec l'augmentation de la concentration de chlorophylle pour atteindre un maximum avec la courbe F contenant 95 % de chlorophylle b.

Comme dans le cas du système chlorophylle a/vitamine  $K_1$ , si nous portons sur graphique la différence entre la courbe expérimentale et la courbe théorique ( $\Delta\sigma$ ) à une pression de  $5 \text{ mN. m}^{-1}$ , nous observons, pour le système chlorophylle b/vitamine  $K_1$ , une relation presque identique à celle obtenue pour le système chlorophylle a/vitamine  $K_1$ , sauf que le  $\Delta\sigma$  est

environ 5 fois supérieur en terme d' $A^2$ /molécule. C'est donc dire que le complexe chlorophylle b/vitamine  $K_1$  serait très différent du complexe chlorophylle a/vitamine  $K_1$ , du moins en ce qui concerne son orientation à l'interface air-eau. Ce graphique est représenté sur la figure 19.

La molécule de chlorophylle b possède une surface plane de  $225 A^2$  ( $15 \overset{o}{A} \times 15 \overset{o}{A}$ ) (voir figure 3); or, en regardant les courbes expérimentales du système chlorophylle b/vitamine  $K_1$ , nous remarquons, pour les mélanges contenant 50 % et plus de chlorophylle b, la surface occupée est supérieure à  $225 A^2$ . Ainsi, nous pourrions dire que la vitamine  $K_1$ , dans un tel système, provoque un affaissement complet de la chlorophylle à la surface de l'eau par une liaison quelconque entre les deux molécules, liaison qui pourrait être déterminée par des analyses spectroscopiques ultérieures.

#### 6.3.5 Isothermes de pression de surface du système chlorophylle/ $\alpha$ -tocophérylquinone

L' $\alpha$ -tocophérylquinone est la deuxième quinone du chloroplaste que nous avons étudiée; nous la retrouvons en quantité à peu près équivalente à la vitamine  $K_1$ , *in vivo*, dans les chloroplastes d'épinards.

##### 6.3.5.1 Système chlorophylle a/ $\alpha$ -tocophérylquinone

Ces expériences ont été réalisées dans les conditions expérimentales suivantes:

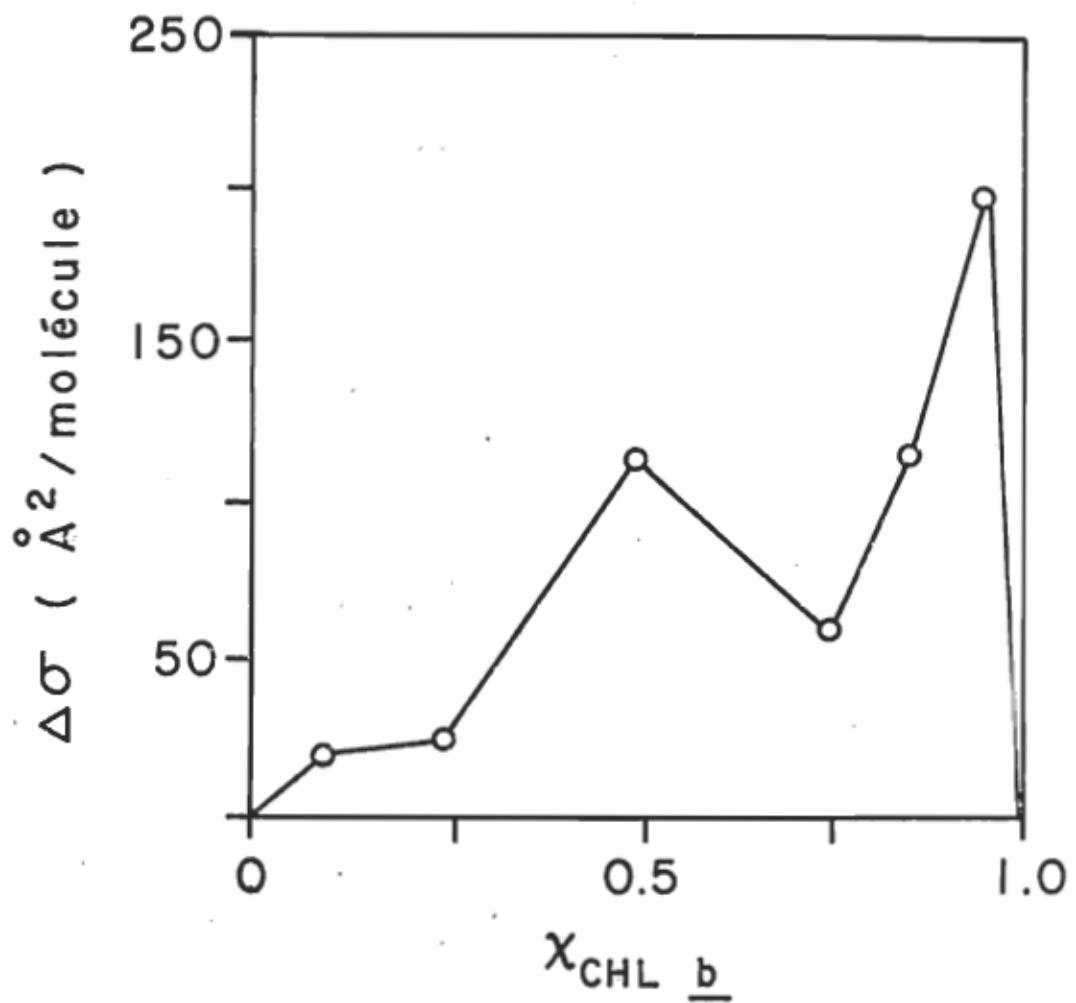


FIGURE 19. Relation entre le  $\Delta\sigma$  et la fraction molaire de chlorophylle b pour le système chlorophylle b/vitamine  $K_1$ .

- Déposition : 0.125 à 0.275 ml (selon la concentration)
- Concentration :  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  M
- Solvant : éther éthylique
- Température : 292 - 293 K
- Sous-phase : tampon phosphate ( $10^{-3}$  M) pH = 7.8-8.0
- Vitesse de compression : 1.40-1.60 cm/min ( $10$  à  $40$   $\text{A}^2/\text{molécule/min}$ )

En prenant comme point de départ les isothermes des pigments purs, nous avons étudié une série de six (6) mélanges en variant la proportion de chlorophylle a et par conséquent d' $\alpha$ -tocophérylquinone à chaque mélange. La figure 20 représente les isothermes expérimentales des mélanges chlorophylle a/ $\alpha$ -tocophérylquinone (0.10 : 0.90), (0.25 : 0.75), (0.50 : 0.50), (0.65 : 0.35), (0.80 : 0.20) et (0.90 : 0.10), soit les courbes A à F inclusivement avec leurs courbes théoriques correspondantes calculées selon la loi d'additivité (courbes  $A^1$  à  $F^1$  inclusivement). La courbe 1 représente l'isotherme de pression de surface de la chlorophylle a pure et la courbe 2 celle de l' $\alpha$ -tocophérylquinone pure.

On remarque que l' $\alpha$ -tocophérylquinone et la chlorophylle atteignent le collapse à peu près à la même pression, soit environ  $24 \text{ mN. m}^{-1}$ . Cependant, les courbes expérimentales ont un collapse à une pression beaucoup plus basse variant entre 17 et  $24 \text{ mN. m}^{-1}$  selon la concentration en chlorophylle a dans le mélange. De plus, les courbes expérimentales ont une allure générale beaucoup plus évasée que leurs courbes théoriques correspondantes, ceci étant sans doute dû à l'interaction entre les deux substances en présence. L'interprétation de ces résultats, au point de vue interaction moléculaire, sera donnée dans un chapitre ultérieur.

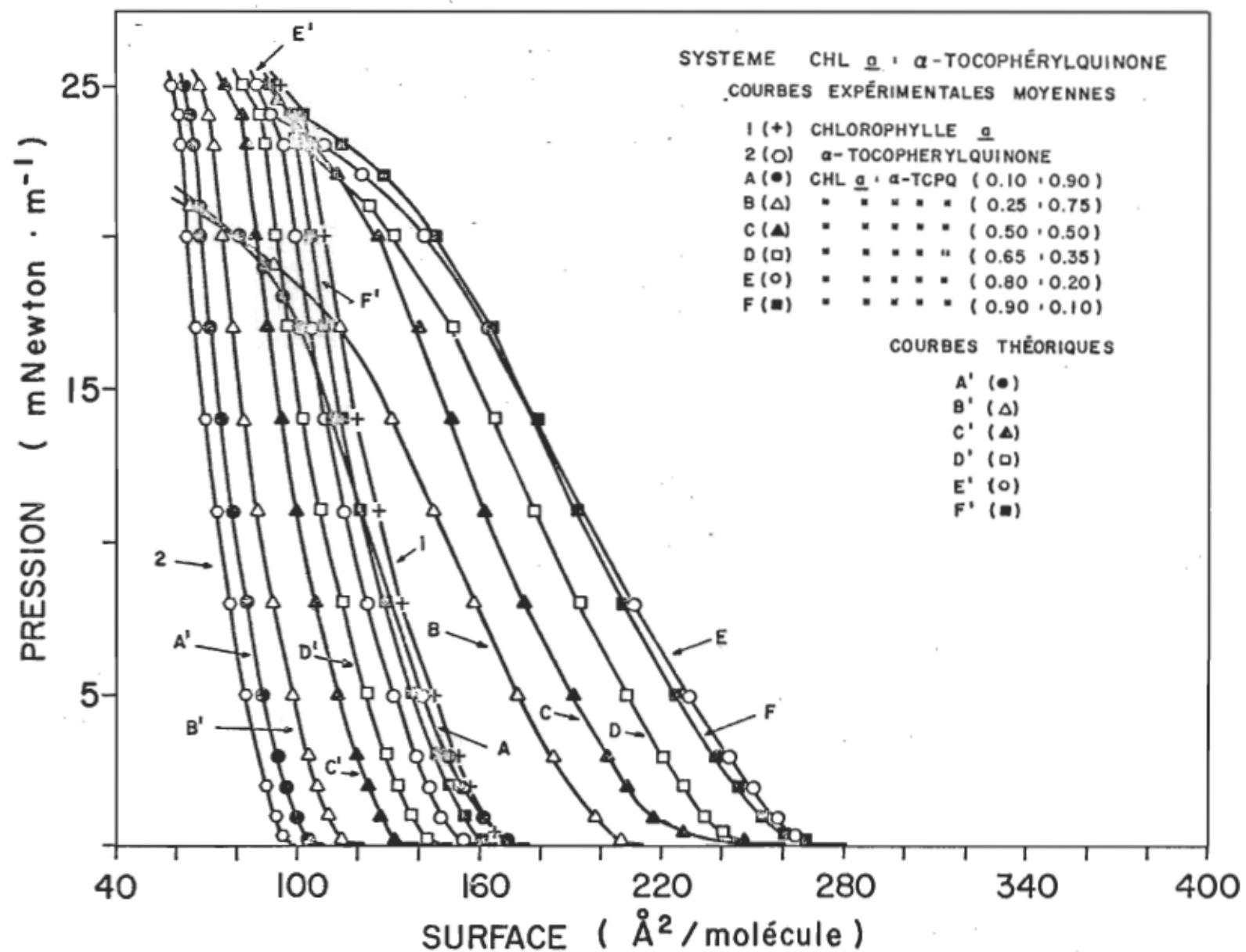


FIGURE 20. Isothermes de pression de surface du système chlorophylle  $\alpha$ / $\alpha$ -tocophérylquinone.

### 6.3.5.2 Système chlorophylle b/α-tocophérylquinone

Suite aux résultats obtenus avec le système chlorophylle b/vitamine  $K_1$ , nous avons pensé qu'il serait intéressant de savoir si l'α-tocophérylquinone aurait un effet semblable à celui de la vitamine  $K_1$  sur la chlorophylle b. Nous avons ainsi étudié les mélanges (0.15 : 0.85), (0.30 : 0.70), (0.40 : 0.60), (0.50 : 0.50), (0.65 : 0.35), (0.80 : 0.20) et (0.90 : 0.10), la première fraction molaire étant celle de la chlorophylle b et la seconde celle de l'α-tocophérylquinone.

Ces expériences ont été réalisées dans les conditions expérimentales suivantes:

- Déposition : 0.230 à 0.250 ml (selon la concentration)
- Concentration :  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  M
- Solvant : éther éthylique
- Sous-phase : tampon phosphate ( $10^{-3}$  M) pH = 7.8-8.0
- Température : 292 - 294 K
- Vitesse de compression : 1.25 à 1.55 cm/min ( $10^{-75}$   $\text{A}^2/\text{molécule/min}$ )

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 21; cependant, sur cette figure nous n'avons représenté qu'une partie des résultats, soit trois des sept mélanges étudiés, pour ne pas trop surcharger le graphique. En effet, à cause du complexe chlorophylle b/α-tocophérylquinone (0.80 : 0.20) (courbe C) qui occupe une très grande surface moléculaire par rapport aux autres mélanges, nous avons dû ajuster l'échelle des abscisses en fonction de ce mélange, et, par le fait même, la plupart des autres courbes sont

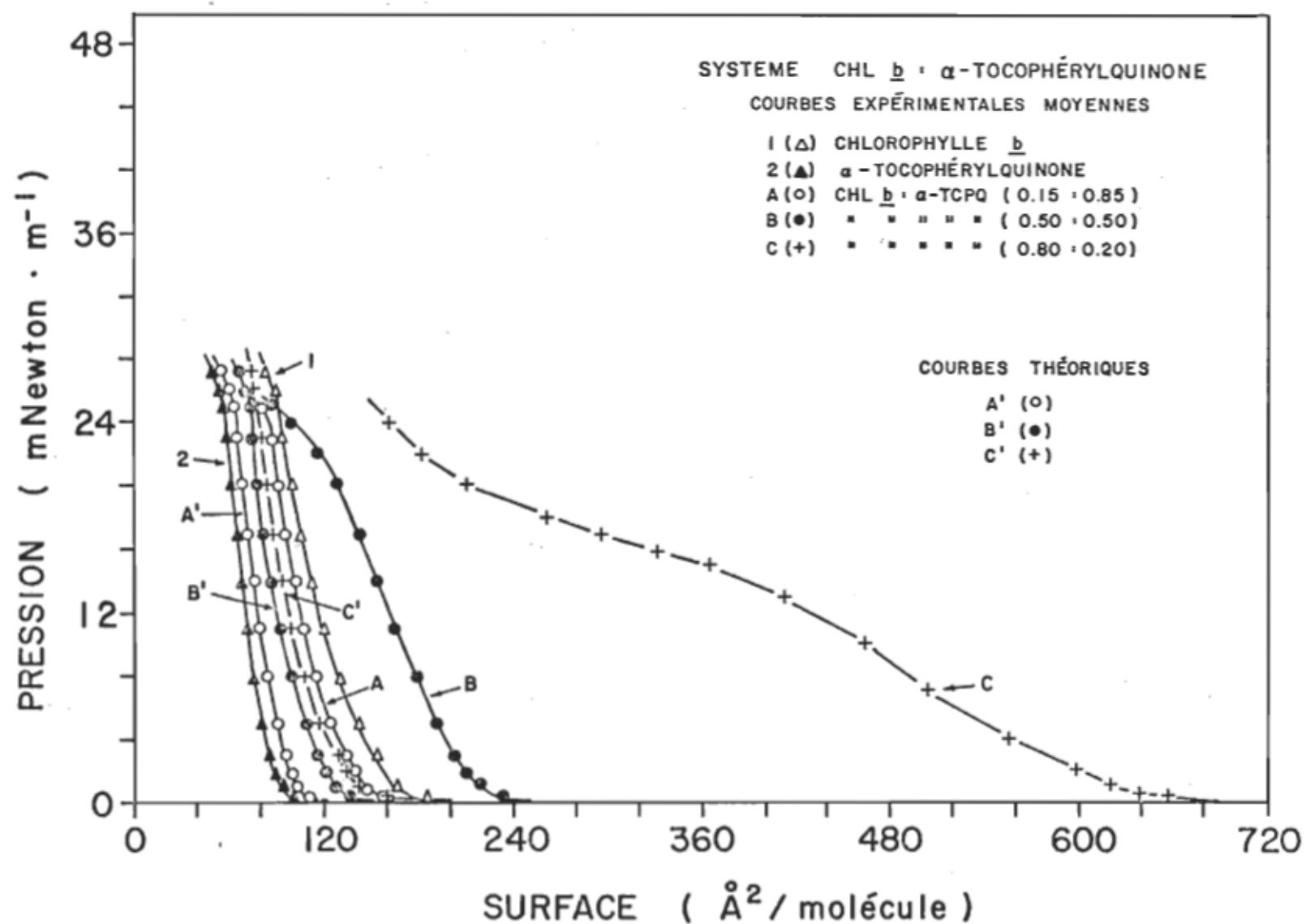


FIGURE 21. Isothermes de pression de surface du système chlorophylle b/ $\alpha$ -tocophérylquinone.

regroupées dans la même région, soit entre 100 et 300  $\text{A}^2/\text{molécule}$ . Nous n'avons donc représenté que trois courbes expérimentales, soit les courbes A, B et C correspondant aux mélanges (0.15 : 0.85), (0.50 : 0.50) et (0.80 : 0.20) ainsi que les courbes théoriques correspondantes  $A^1$ ,  $B^1$  et  $C^1$ . Les courbes 1 et 2 représentent les isothermes de pression de surface de la chlorophylle b et de l' $\alpha$ -tocophérylquinone respectivement.

Comme dans le cas du système précédent (chl a/ $\alpha$ -TCPQ), la chlorophylle b et l' $\alpha$ -tocophérylquinone ont un collapse presque à la même pression, soit 26  $\text{mN. m}^{-1}$  alors que les courbes expérimentales des mélanges binaires ont un collapse beaucoup plus bas, soit entre 20 et 24  $\text{mN. m}^{-1}$ , sauf le mélange (0.80 : 0.20) qui présente une courbe tout à fait particulière. En effet, pour ce mélange, la courbe présente un genre de collapse ou de plateau vers 16  $\text{mN. m}^{-1}$  avant de remonter vers 20  $\text{mN. m}^{-1}$ ; la courbe possède une allure générale très évasée et occupe une très grande surface.

#### 6.3.5.3 Examen de la loi d'additivité. Discussion

Examinons maintenant si nos résultats suivent ou non la loi d'additivité. Si nous regardons les figures 20 et 21, nous voyons immédiatement que les systèmes chlorophylle a/ $\alpha$ -tocophérylquinone et chlorophylle b/ $\alpha$ -tocophérylquinone présentent tous les deux une déviation positive à la loi d'additivité et cela pour tous les mélanges étudiés; donc, cela veut dire surtout qu'il y a une interaction entre la chlorophylle et l' $\alpha$ -tocophérylquinone à l'interface air-eau. Dans les deux systèmes, cette déviation positive semble augmenter de façon graduelle jusqu'à atteindre un maximum pour le mélange (0.80 : 0.20).

Maintenant, si, pour une même pression de  $5 \text{ mN. m}^{-1}$ , nous calculons la différence entre l'aire moléculaire expérimentale et l'aire moléculaire théorique pour chacun des mélange des deux systèmes, nous obtenons, pour la chlorophylle a, la relation exprimée sur la figure 22 et, pour la chlorophylle b, la relation exprimée sur la figure 23. On voit donc que pour chacun des systèmes, la déviation positive augmente graduellement à mesure que l'on augmente la concentration de chlorophylle dans le mélange et, dans les deux cas, la déviation maximale a lieu pour une fraction molaire de chlorophylle égale à 0.80.

Il existe cependant une différence entre les deux relations. Ainsi, pour une même fraction molaire de 0.80 en chlorophylle, l'interaction est environ 4 fois plus importante avec la chlorophylle b qu'avec la chlorophylle a, i.e. que le  $\Delta\sigma$  est 4 fois plus grand, soit  $410 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$  pour le système chl b/ $\alpha$ -TCPQ contre  $96.5 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$  pour le système chl a/ $\alpha$ -TCPQ. C'est donc dire que l'orientation du complexe chl b/ $\alpha$ -TCPQ est tout à fait différente de celle du complexe chl a/ $\alpha$ -TCPQ à l'interface air-eau.

Il est intéressant de noter également la similitude qui existe entre les systèmes chl/vit.  $K_1$  et chl/ $\alpha$ -TCPQ. Ainsi, dans les deux cas, la déviation positive de la quinone avec la chlorophylle b est environ 4 fois plus grande qu'avec la chlorophylle a pour une même fraction molaire de chlorophylle (0.80) dans le mélange.

Comme pour la vitamine  $K_1$ , la liaison intermoléculaire du complexe chlorophylle/ $\alpha$ -tocophérylquinone semble causer un affaissement presque complet de la molécule de chlorophylle à l'interface air-eau, et cela pour

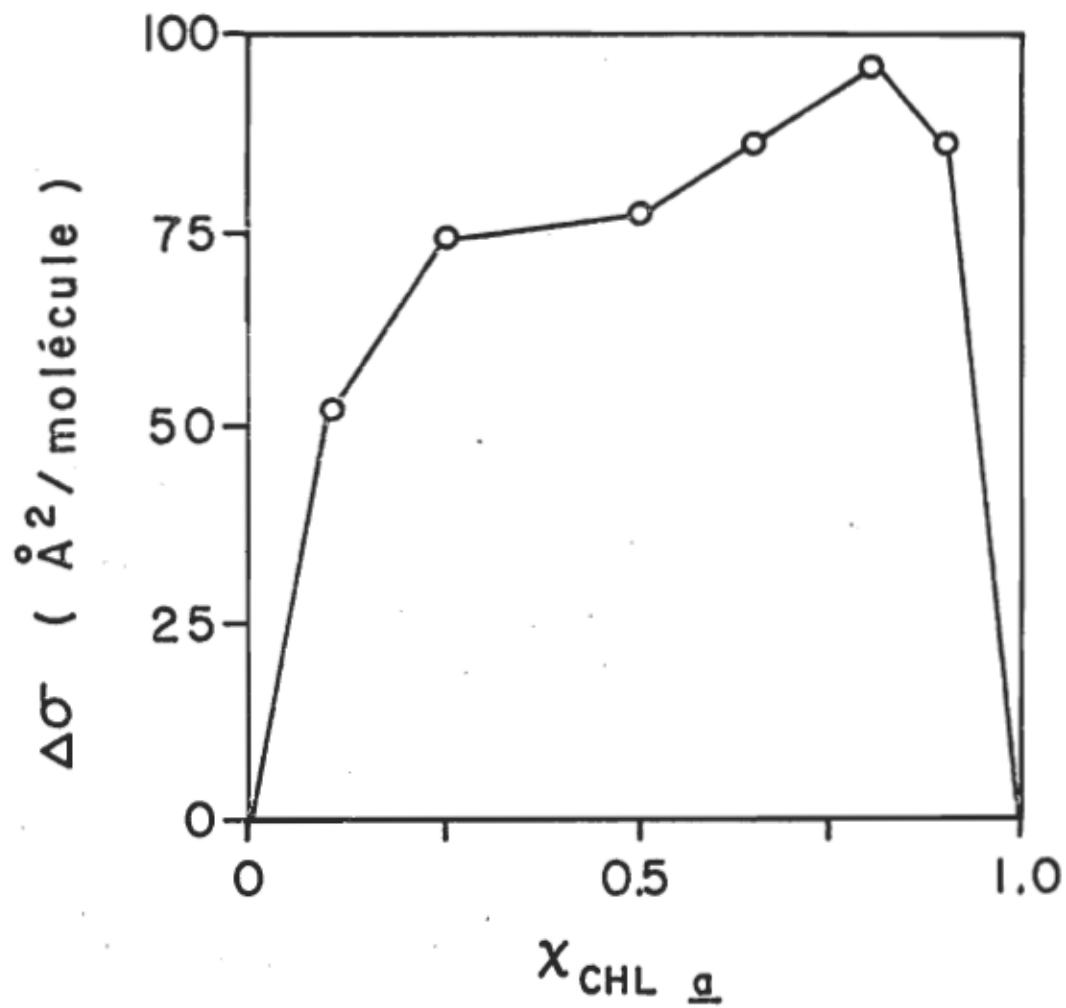


FIGURE 22. Relation entre le  $\Delta\sigma$  et la fraction molaire de chlorophylle a pour le système chlorophylle a/ $\alpha$ -tocophérylquinone.

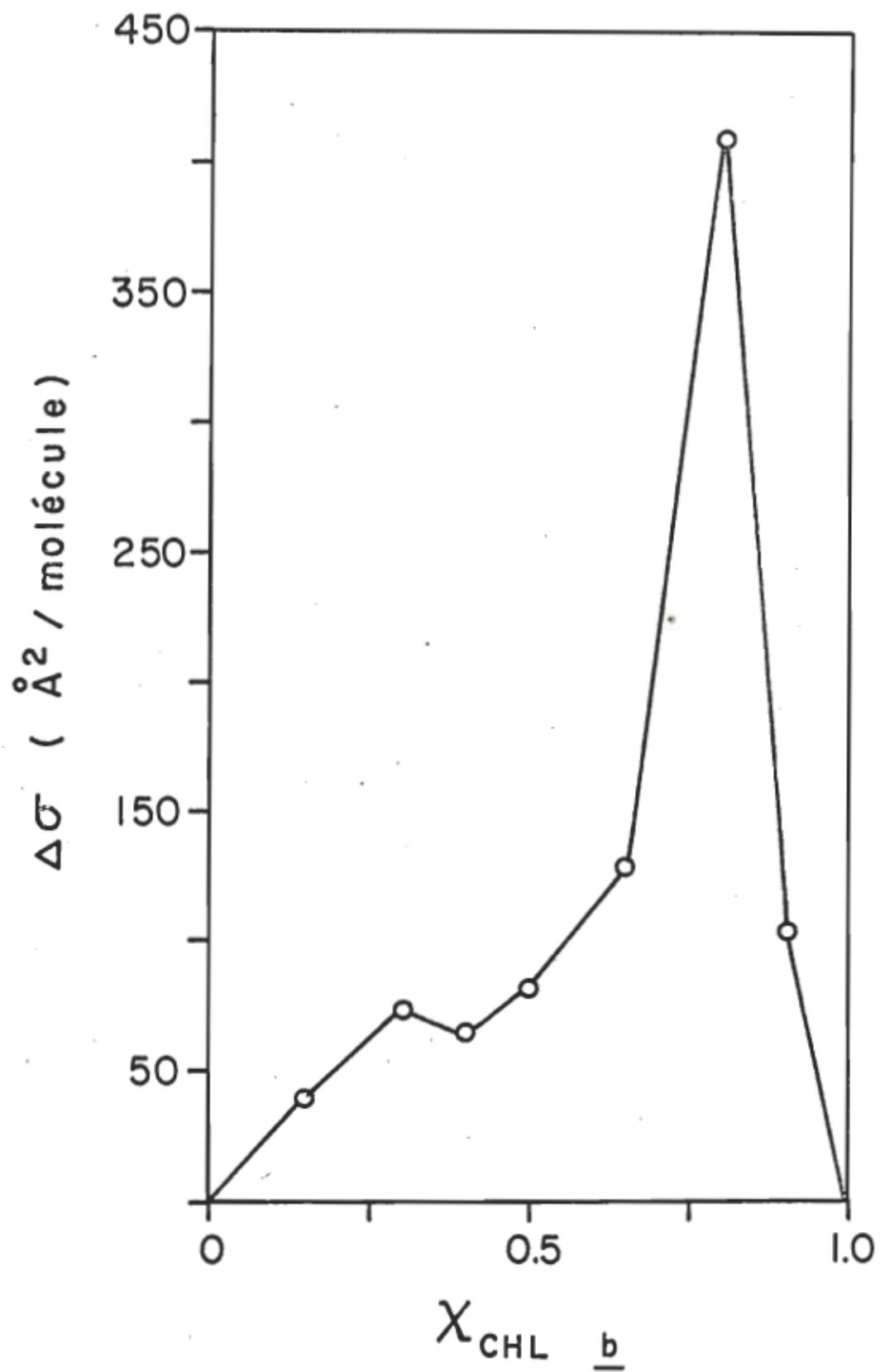


FIGURE 23. Relation entre le  $\Delta\sigma$  et la fraction molaire de chlorophylle  $b$  pour le système chlorophylle  $b/\alpha$ -tocophérylquinone.

tous les mélanges contenant 50 % et plus de chlorophylle. Cela s'applique surtout pour les mélanges impliquant la chlorophylle b.

Ainsi, l'augmentation de l'aire moléculaire, due à la formation d'un complexe, peut provenir soit d'un changement d'orientation de la chlorophylle à l'interface air-eau, soit de la dimension de la molécule complexée à la chlorophylle, soit des deux en même temps. Cependant, comme les molécules de vitamine K<sub>1</sub> et d' $\alpha$ -tocophérylquinone sont de dimensions assez faibles comparativement à la dimension de la chlorophylle a, il devient évident que la dimension de ces molécules n'est pas la seule cause à l'augmentation de la surface du film mixte; la chlorophylle est donc réorientée à la surface de l'eau selon le complexe formé et cette réorientation est plutôt due à l'anneau porphyrine qu'à la chaîne phytol.

#### 6.3.6 Isothermes de pression de surface du système chlorophylle / $\alpha$ -tocophérol

Un autre pigment que l'on retrouve en quantité assez importante dans la membrane du chloroplaste, c'est l' $\alpha$ -tocophérol. On le trouve dans une proportion environ 2 fois supérieure à l' $\alpha$ -tocophérylquinone dans le chloroplaste d'épinard (Park, 1966, p. 307). Le rôle de l' $\alpha$ -tocophérol dans le transport d'électrons de la photosynthèse a déjà fait l'objet de plusieurs études en solutions et nous avons voulu savoir quelle était la possibilité d'interaction de cette molécule avec la chlorophylle par des études à l'interface air-eau.

### 6.3.6.1 Système chlorophylle a/α-tocophérol

Nous avons donc étudié les propriétés de pression de surface de ce système dans les conditions expérimentales suivantes:

- Déposition : 0.075 à 0.250 ml (selon la concentration)
- Concentration :  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  M
- Solvant : éther éthylique
- Sous-phase : tampon phosphate ( $10^{-3}$  M) à pH = 7.8-8.0
- Température : 292 - 293 K
- Vitesse de compression : 1.80 à 2.15 cm/min (10 à 27  $\text{A}^2/\text{molécule/min}$ )

La figure 24 représente les différentes isothermes de pression de surface obtenues expérimentalement, soit les courbes A à E inclusivement, ainsi que les courbes théoriques correspondantes calculées à partir de la loi d'additivité, soit les courbes A<sup>1</sup> à E<sup>1</sup> inclusivement. La courbe 1 représente l'isotherme expérimentale moyenne de l'α-tocophérol et la courbe 2 celle de la chlorophylle a. Nous avons donc étudié successivement les mélanges chl a/α-tocophérol (0.90 : 0.10), (0.80 : 0.20), (0.50 : 0.50), (0.20 : 0.80) et (0.10 : 0.90),

L'α-tocophérol présente un collapse à une pression d'environ 23-24 mN.  $\text{m}^{-1}$  (voir section 6.3.3.5), soit un peu moins que la chlorophylle a. Comme pour le système chl a/α-TCPQ, on remarque que les différents mélanges étudiés ont tous un collapse à une pression inférieur à celle des deux composés purs.

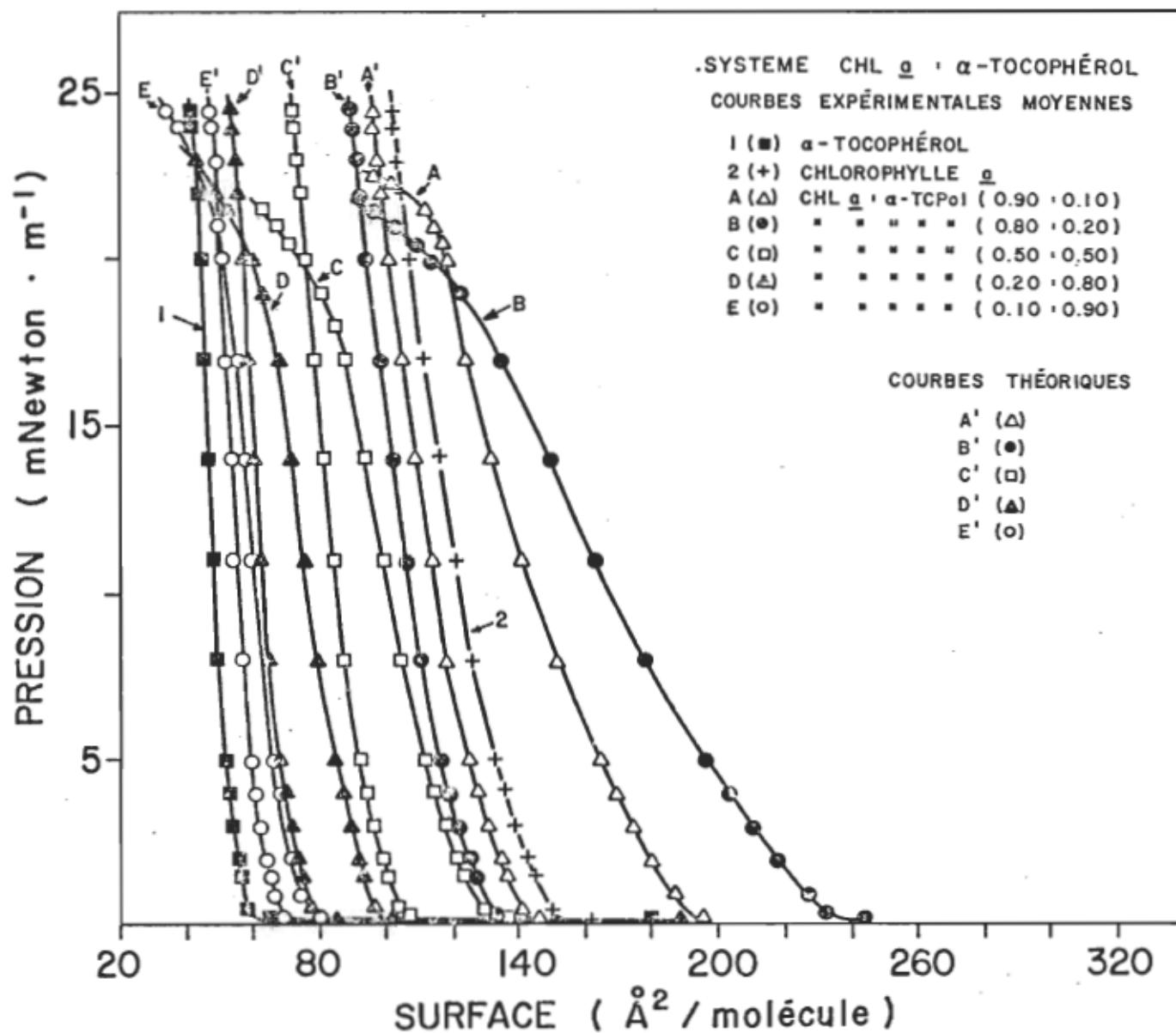


FIGURE 24. Isothermes de pression de surface du système chlorophylle  $\alpha$ / $\alpha$ -tocophérol.

Les courbes des mélanges n'ont pas une allure tellement évasée, sauf peut-être les courbes A et B qui possèdent une forte concentration en chlorophylle a.

#### 6.3.6.2 Examen de la loi d'additivité. Discussion

L'écart entre la courbe théorique et la courbe expérimentale sert à déterminer l'importance de l'interaction entre la chlorophylle a et l' $\alpha$ -tocophérol. Si nous examinons attentivement la figure 24, nous remarquons que l'interaction est très faible pour le mélange (0.10 : 0.90), soit les courbes E et E<sup>1</sup>, mais que l'interaction augmente graduellement à mesure que la concentration de chlorophylle a augmente dans le mélange. Le maximum d'interaction a lieu pour une fraction molaire de 0.80 en chlorophylle, soit la même concentration que pour le système chl/ $\alpha$ -TCPQ.

Maintenant, si nous portons sur graphique la valeur de  $\Delta\sigma$  en fonction des différentes fractions molaires de chl a étudiées, pour une même pression de 5 mN. m<sup>-1</sup>, cela nous permet de mieux visualiser cette interaction et son maximum à  $x=0.80$  (Figure 25). A cette fraction molaire, le  $\Delta\sigma$  est de 80  $\text{Å}^2/\text{molécule}$  et cette valeur se compare bien à la valeur obtenue pour le système chl a/ $\alpha$ -TCPQ qui était de 96.5  $\text{Å}^2/\text{molécule}$ .

L'affirmation que nous avons émise précédemment, à l'effet que la vitamine K<sub>1</sub> et l' $\alpha$ -tocophérylquinone causait l'affaissement de la molécule de chlorophylle a à l'interface air-eau lorsque celle-ci est présente dans une proportion supérieure à 80 %, tient toujours dans le cas du mélange chl a/ $\alpha$ -TCPol (0.80 : 0.20). En effet, pour ce mélange, si nous extrapolons à une pression nulle la portion linéaire de la courbe avant le

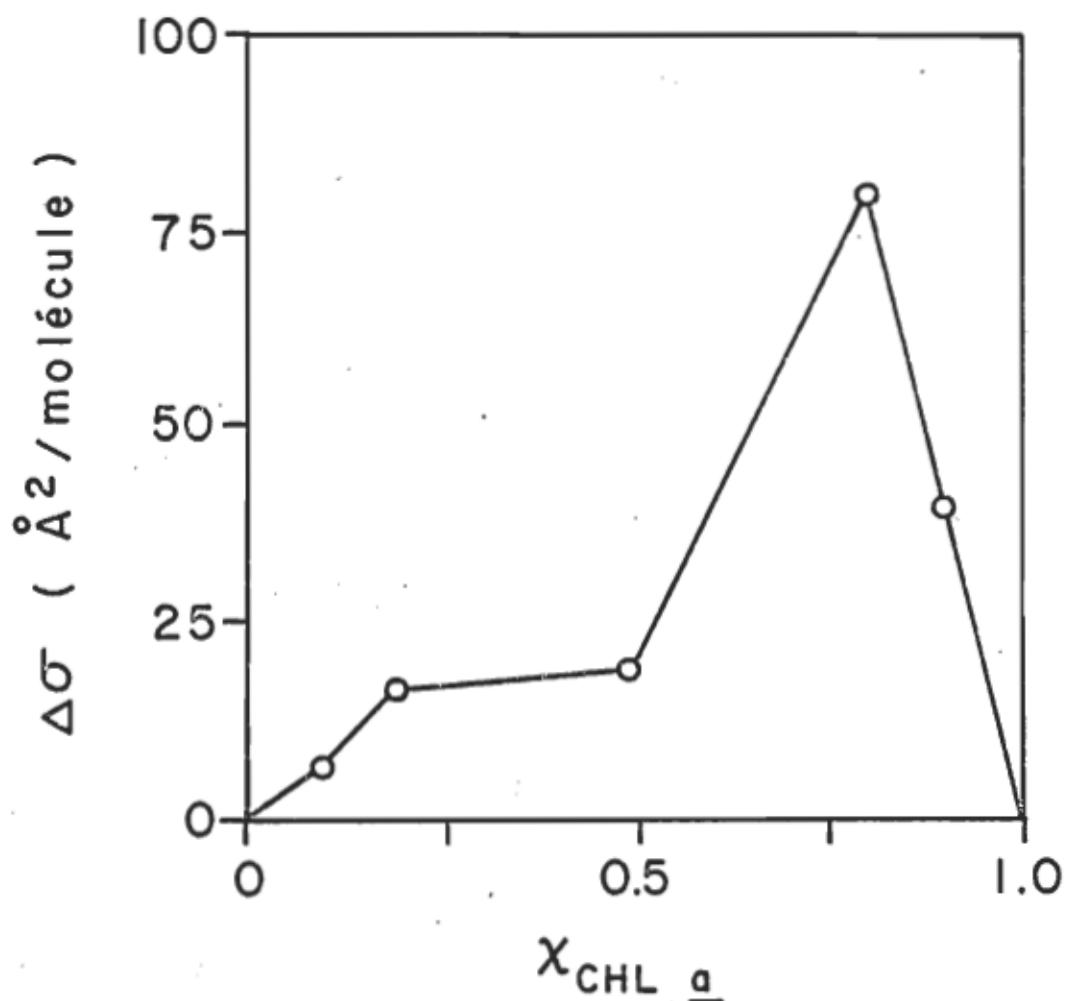


FIGURE 25. Relation entre le  $\Delta\sigma$  et la fraction molaire de chlorophylle a pour le système chlorophylle a/ $\alpha$ -tocophérol.

collapse, nous obtenons une aire moléculaire d'environ  $215 \text{ \AA}^2$ , soit presque la surface de la molécule de chlorophylle a lorsque l'anneau porphyrine est étendu à plat sur l'eau. Il semble donc que la liaison chlorophylle a/ $\alpha$ -tocophérol ressemble à la liaison chlorophylle a/ $\alpha$ -tocophérylquinone pour un même mélange (0.80 : 0.20). Pour en être certain, il faudrait utiliser différentes techniques spectroscopiques qui nous renseigneraient sur les liaisons intermoléculaires.

#### 6.3.7 Isothermes de pression de surface du système chlorophylle / phytol

Pour terminer cette étude, nous avons pensé examiner le système chlorophylle / phytol. Selon certains travaux déjà publiés (Gaines et coll., 1965; Gaines, 1966a), ce système ne devrait démontrer aucune interaction entre les deux constituants du mélange, puisque le phytol est une partie de la molécule de chlorophylle, soit la queue hydrophobe. Voyons maintenant les résultats obtenus.

##### 6.3.7.1 Système chlorophylle a / phytol

Nous avons étudié les mélanges chlorophylle a / phytol (0.20:0.80), (0.50:0.50), (0.75:0.25), (0.80:0.20) et (0.85:0.15) dans les conditions suivantes:

- Déposition : 0.150 à 0.250 ml (selon la concentration)
- Concentration :  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  M
- Solvant : éther éthylique
- Sous-phase : tampon phosphate ( $10^{-3}$  M) à pH = 7.6-8.0
- température : 292 - 293 K

- Vitesse de compression : 1.9 à 2.5 cm/min (11-30  $\text{A}^2/\text{molécule/min}$ )

Sur la figure 26, nous avons représenté les isothermes expérimentales moyennes obtenues. La courbe 1 représente l'isotherme de pression de surface du phytol pur et la courbe 2 celle de la chlorophylle a pure. Ces deux isothermes sont en accord avec celles déjà publiées (voir tableaux 8 et 13). Les courbes A, B, C, D et E représentent les isothermes des différents mélanges étudiés, tel que mentionné précédemment, et les courbes théoriques correspondantes, calculées selon la loi d'additivité, sont les courbes A<sup>1</sup> et E<sup>1</sup> inclusivement.

Le phytol atteint le collapse à une pression de 26.0 mN.  $\text{m}^{-1}$  tandis que la chlorophylle a ne l'atteint qu'à environ 24-25 mN.  $\text{m}^{-1}$ . Puisque le mélange chl a/phytol est un mélange non-miscible, on peut prévoir, selon la règle de phase (Crisp, 1949), que la pression de surface au collapse de l'isotherme mixte sera indépendante de la concentration des deux constituants. Ainsi, on voit que le collapse de chaque courbe expérimentale se produit à peu près à la même pression de surface. Examinons maintenant la loi d'additivité.

#### 6.3.7.2. Examen de la loi d'additivité. Discussion

Il a déjà été établi que, pour des films mixtes de chlorophylle a et de phytol, les courbes de pression de surface, pour des rapports molaires 2:1, 1:1 et 1:2, correspondaient aux courbes théoriques calculées selon la loi d'additivité avec une marge d'erreur acceptable de  $\pm 3\%$ .

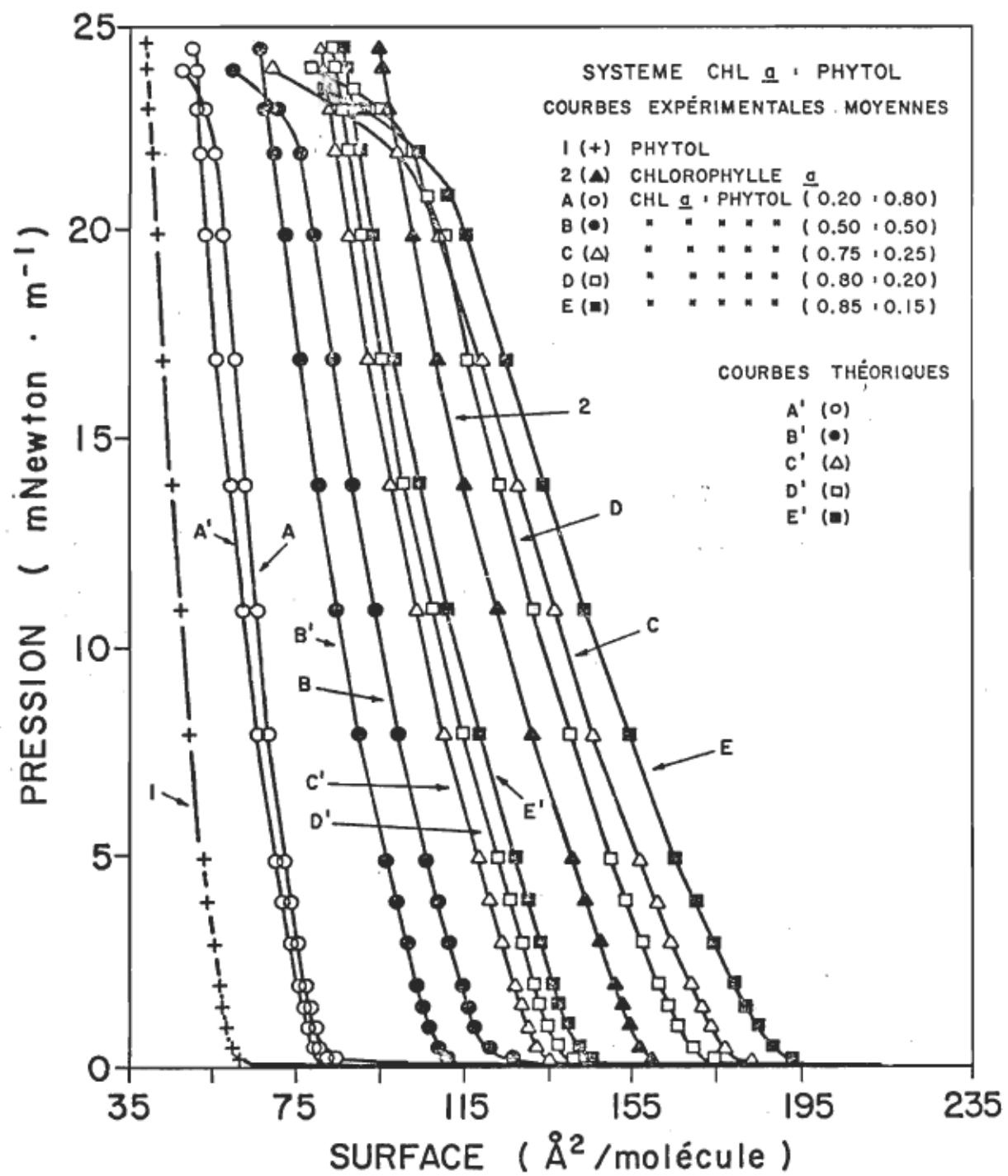


FIGURE 26. Isothermes de pression de surface du système chlorophylle  $\alpha$ /phytol.

sur la surface moléculaire (Gaines et coll. 1965).

En examinant nos résultats, on remarque que le mélange chl a/phytol (0.20 : 0.80) est un mélange idéal car la courbe expérimentale (courbe A) est presque superposée à la courbe théorique (courbe A<sup>1</sup>). Pour le mélange (0.50 : 0.50), la courbe expérimentale (courbe B) est légèrement déplacée à droite de la courbe théorique (courbe B<sup>1</sup>). Cependant, on peut considérer cette différence comme étant dans la limite de l'erreur expérimentale et, ainsi, considérer le mélange (0.50 : 0.50) comme étant idéal.

Toutefois, on ne peut en dire autant des mélanges (0.75 : 0.25), (0.80 : 0.20) et (0.85 : 0.15). En effet, pour ces trois mélanges, nous avons remarqué une interaction assez appréciable, et, de ce fait, nous n'avons plus de mélanges idéaux. La figure 27 représente la relation du  $\Delta\sigma$  en fonction de la fraction molaire de chlorophylle a, à une pression de 5 mN.  $\text{m}^{-1}$ , cette figure nous permet de mieux visualiser la non-idealité du système chl a / phytol à forte concentration de chlorophylle et l'idealité à faible concentration.

Comme ces expériences ont été répétées plusieurs fois avec toujours le même résultat, il est permis de se demander si la chlorophylle ne contenait pas une quelconque impureté qui aurait pu causer cette augmentation de surface. Cela pourrait être dû, aussi, à une réorientation des pigments à l'interface air-eau sous forme d'agrégats, par exemple. Il est assez difficile de déterminer la cause de ce phénomène anormal en regardant uniquement les isothermes de pression de surface. Pour en avoir la certitude, il faudrait peut-être utiliser certaines techniques de spectroscopie

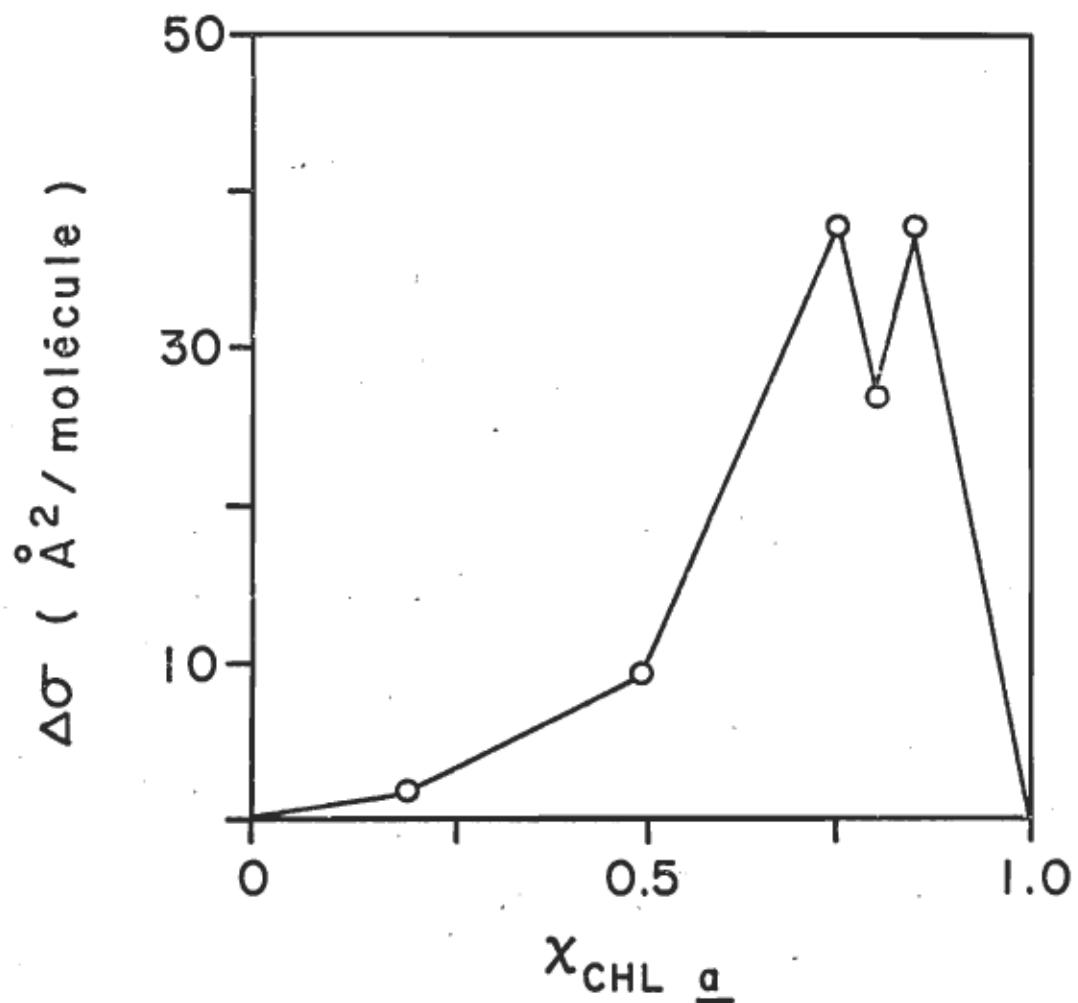


FIGURE 27. Relation entre le  $\Delta\sigma$  et la fraction molaire de chlorophylle a pour le système chlorophylle a/phytol.

qui nous permettraient d'examiner le complexe qui semble s'être formé aux fortes concentrations de chlorophylle entre la chlorophylle a et le phytol et d'en déterminer la nature.

#### 6.3.8 Vue d'ensemble des systèmes étudiés

Examinons maintenant l'ensemble des résultats obtenus. Sur la figure 28, nous avons représenté le  $\Delta\sigma$  ( $\text{à } 5 \text{ mN. m}^{-1}$ ) en fonction de la fraction molaire de chlorophylle pour les six systèmes étudiés. Il nous est ainsi plus facile de voir les différentes interactions obtenues et de comparer chacun des systèmes par rapport aux autres. Ainsi, pour le système chlorophylle /  $\alpha$ -tocophérylquinone, à faible concentration de chlorophylle dans le mélange ( $\chi_{\text{chl}}$  inférieur à 0.50), l'interaction est sensiblement la même avec la chlorophylle a qu'avec la chlorophylle b. Cependant, à forte concentration soit pour une fraction molaire supérieure à 0.50, il existe une très grande différence entre les deux systèmes puisque le  $\Delta\sigma$  est environ 4 fois plus grand avec la chlorophylle b qu'avec la chlorophylle a pour une même fraction molaire de 0.80. La même observation s'applique également aux systèmes chlorophylle a /vitamine  $K_1$  et chlorophylle b /vitamine  $K_1$ , sauf que la déviation positive maximale à la loi d'additivité se situe à une fraction molaire de 0.95, précédé d'une diminution du  $\Delta\sigma$  à 0.75 dans les deux cas.

A faible concentration de chlorophylle, les systèmes chl a/ $\alpha$ -TCPol et chl a/phytol ne présentent presque pas d'interaction, alors qu'à forte concentration de chlorophylle, le système chl a/ $\alpha$ -TCPol présente une interaction appréciable ( $\Delta\sigma \approx 80 \text{ A}^2/\text{molécule}$ ) et le système chl a/phytol présente,

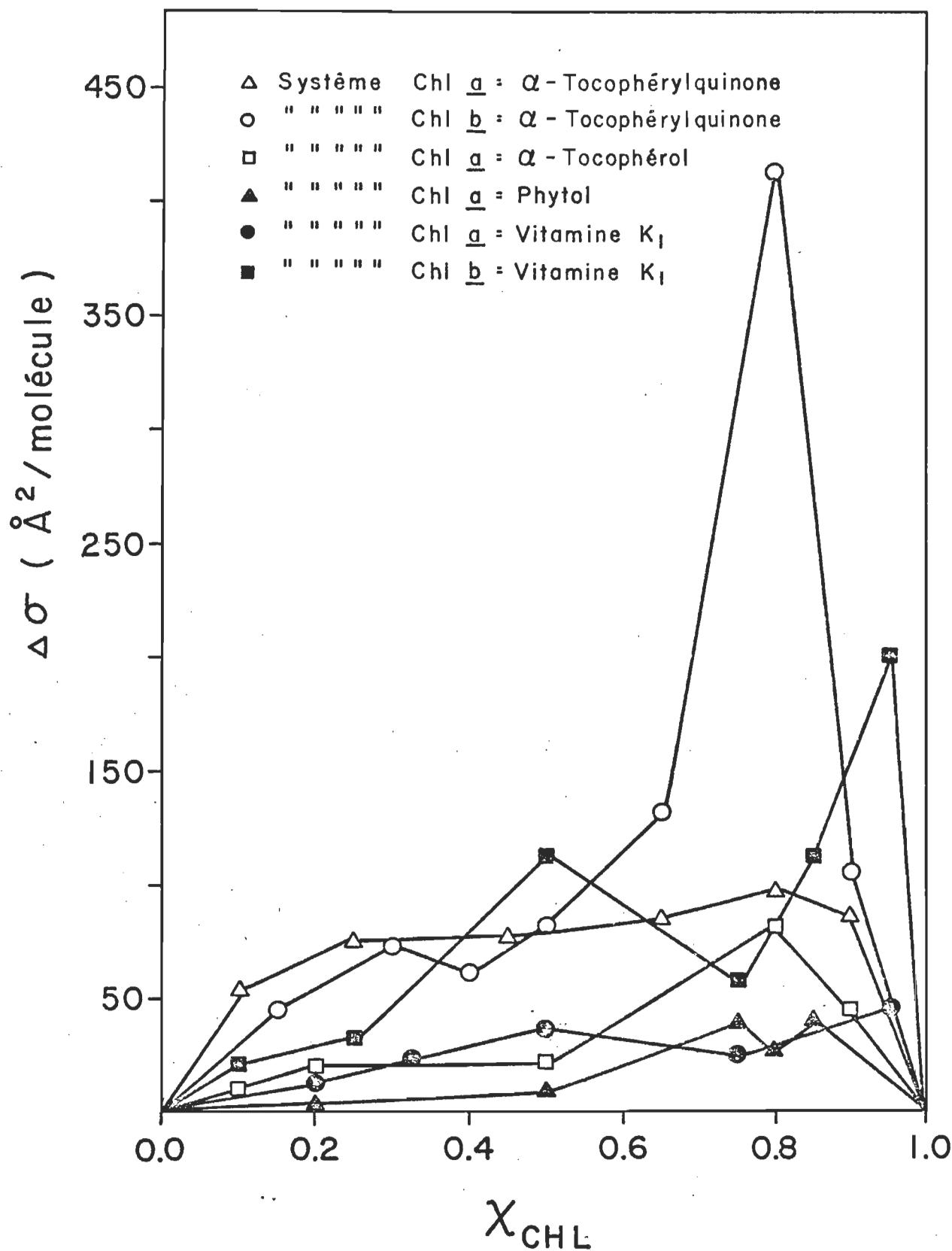


FIGURE 28. Relation entre le  $\Delta\sigma$  et la fraction molaire de chlorophylle pour les six systèmes étudiés.

lui aussi, une interaction.

Dans l'ensemble, également, on peut noter que l'importance de l'interaction semble plus grande entre la chlorophylle et l' $\alpha$ -tocophérylquinone qu'entre la chlorophylle et la vitamine K<sub>1</sub>.

Pour tenter d'apporter un peu de lumière sur tous ces résultats, nous avons pensé faire appel à certains principes de la thermodynamique.

#### 6.4 Interprétation thermodynamique des résultats des différents systèmes binaires

De nombreux travaux ont déjà traité des relations thermodynamiques de monocouches insolubles mixtes à l'interface air-eau. Parmi les plus importants, nous pouvons citer ceux de Crisp (1949), Goodrich (1957), Gaines et coll. (1964, 1965), Gaines (1966 a, 1966 b), Gabrielli et coll. (1971), Costin et Barnes (1975), Tajima et Gershfeld (1975) ainsi que Feher et coll. (1977).

Tous les travaux récents sont basés sur la théorie mise de l'avant par F.C. Goodrich en 1957. Maintenant que nous avons démontré la non-idealité des systèmes chlorophylle/quinone au moyen des isothermes de pression de surface, il serait intéressant d'étudier la stabilité thermodynamique de tels systèmes par le calcul de l'excès d'énergie libre de mélange. L'évaluation de cet excès d'énergie libre peut se faire directement à partir des isothermes de pression de surface des monocouches pures et mixtes, et se calcule selon la formule suivante établie par Goodrich (1957):

$$\Delta G_{xs}^{\pi} = \int_0^{\pi} (A_{12} - N_1 A_1 - N_2 A_2) d\pi \quad (\text{Eq. 2})$$

où	$\Delta G_{xs}^{\pi}$	=	Excès d'énergie libre de mélange
	$A_{12}$	=	Aire moléculaire du mélange à la pression $\pi$
	$A_1$	=	Aire moléculaire du composé 1 à la pression $\pi$
	$A_2$	=	Aire moléculaire du composé 2 à la pression $\pi$
	$N_1$	=	Fraction molaire du composé 1 dans le mélange
	$N_2$	=	Fraction molaire du composé 2 dans le mélange
	$\pi$	=	Pression de surface inférieure au collapse

La limite supérieure de l'intégration ( $\pi$ ) est choisie arbitrairement de telle façon qu'elle soit inférieure à la pression de surface au collapse mais dans la région des films condensés située juste avant le collapse puisque cette région du film a une plus grande stabilité que la région du film qui se trouve dans un état gazeux.

Nous utilisons, comme limite inférieure de l'intégration, la valeur  $\pi$  égale à 0 puisque nous supposons que la pression de vapeur de surface des films purs et mixtes est nulle ou négligeable. De plus, dans l'évaluation de l'intégration, nous supposons que l'excès d'énergie libre de mélange des vapeurs de monocouche est négligeable par rapport à ce qu'elle peut être dans les monocouches condensés, selon la théorie de Goodrich (1957). Le cheminement mathématique utilisé pour en arriver à l'équation 2 est décrit dans les travaux de Goodrich (1957) et ceux de Gaines (1966 a, 1966 b).

Nous avons donc calculé cet excès d'énergie libre de mélange pour chacun des quatre systèmes impliquant la chlorophylle a, soit les systèmes chl a/vit. K<sub>1</sub>, chl a/ $\alpha$ -TCPQ, chl a/ $\alpha$ -TCPol et chl a/phytol. Vu que les

pressions au collapse étaient assez différentes d'un système à l'autre et parfois d'un mélange à l'autre, nous n'avons pu utiliser la même pression limite pour l'intégration. Ainsi pour le système chl a/vitamine K<sub>1</sub>, nous avons utilisé une pression limite de 10 mN. m<sup>-1</sup>, pour les systèmes chl a/ $\alpha$ -TCPQ et chl a/ $\alpha$ -TCPol une pression limite de 17 mN. m<sup>-1</sup> et pour le système chl a/phytol une pression limite de 20 mN. m<sup>-1</sup>. La figure 29 représente le résultat de ces calculs.

En se basant sur le fait que le concept d'idéalité le plus souvent accepté est basé sur l'excès d'énergie libre de mélange (Costin et Barnes, 1975, p. 120), on peut conclure, en regardant les relations obtenues à la figure 29, que tous les systèmes démontrent une non-idéalité marquée par de fortes déviations positives à forte concentration en chlorophylle a et de faibles déviations positives à faible concentration en chlorophylle a, à l'exception du système chl a/ $\alpha$ -TCPQ qui présente une forte déviation positive à n'importe quelle concentration de chlorophylle a.

En examinant les figures 28 et 29, on se rend compte qu'elles présentent toutes les deux, pour un même système, des courbes ayant sensiblement la même allure. On peut ainsi faire un rapprochement entre l'excès d'énergie libre de mélange ( $\Delta G_{xs}^{\ddagger}$ ) et la différence d'aire moléculaire ( $\Delta\sigma$ ) entre la courbe expérimentale et la courbe théorique, puisque les deux donnent approximativement le même résultat.

Une autre façon de déterminer l'idéalité ou la non-idéalité d'un système binaire est de représenter graphiquement la relation entre l'aire moléculaire, à une pression donnée, et la fraction molaire d'un des constituants

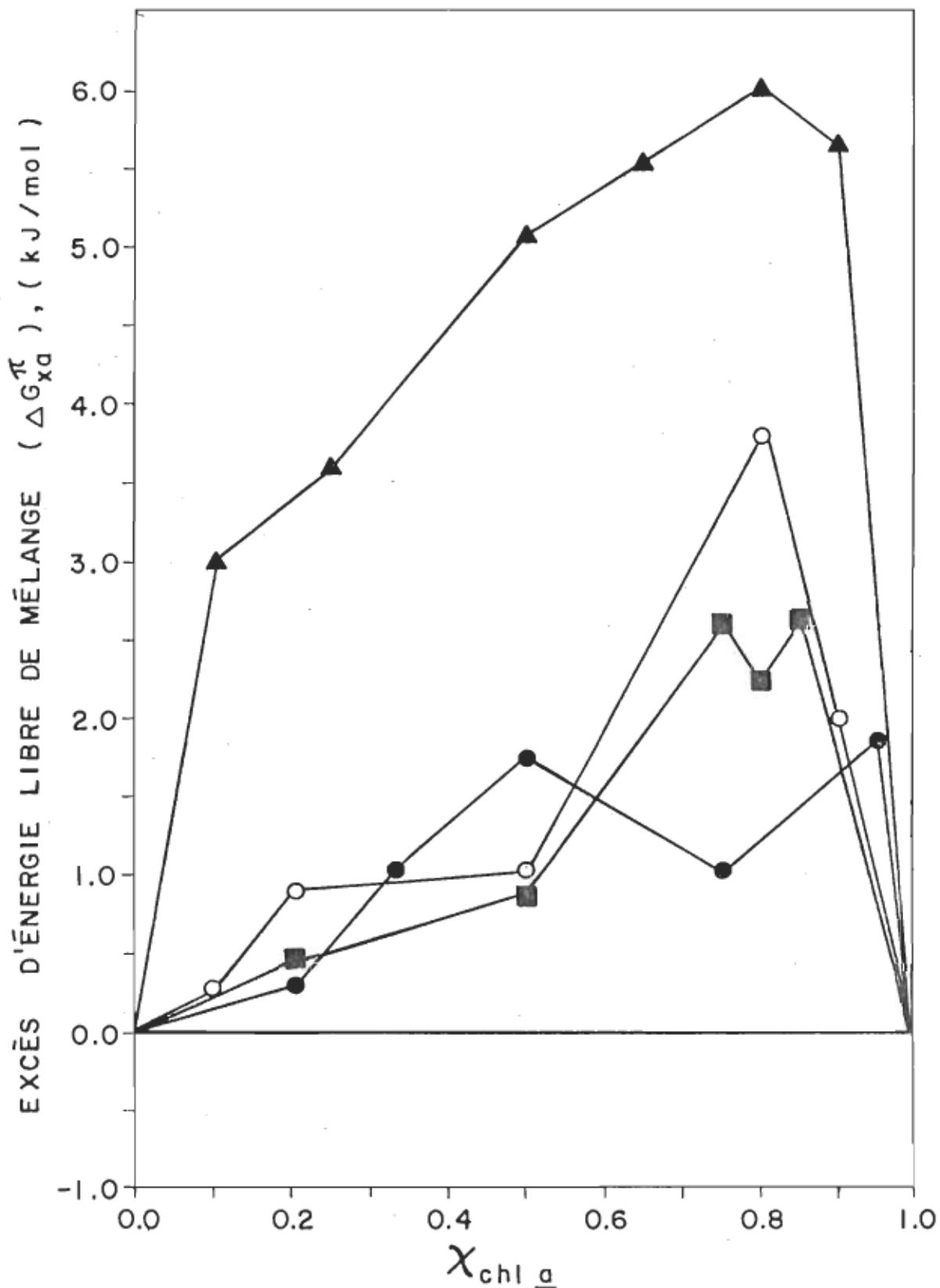


FIGURE 29: Diagramme de l'excès d'énergie libre de mélange en fonction de  $\chi_{\text{chl a}}$  pour les systèmes chlorophylle a/vitamine K<sub>1</sub> (●), chlorophylle a/α-tocophérylquinone (▲), chlorophylle a/α-tocophérol (○) et chlorophylle a/phytol (■).

du mélange. Ainsi, sur la figure 30, nous avons représenté cette relation pour les quatre mélanges, en prenant soin de l'exprimer en fonction de la fraction molaire de chlorophylle a et à la même pression limite que celle utilisée lors du calcul de l'excès d'énergie libre de mélange.

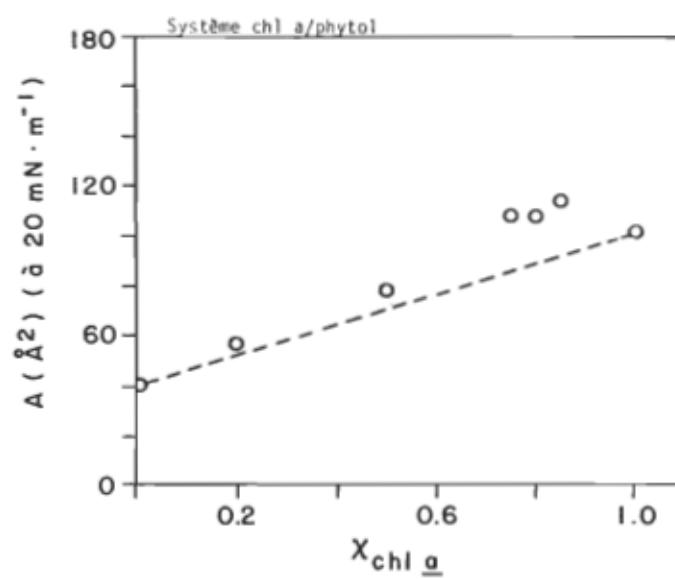
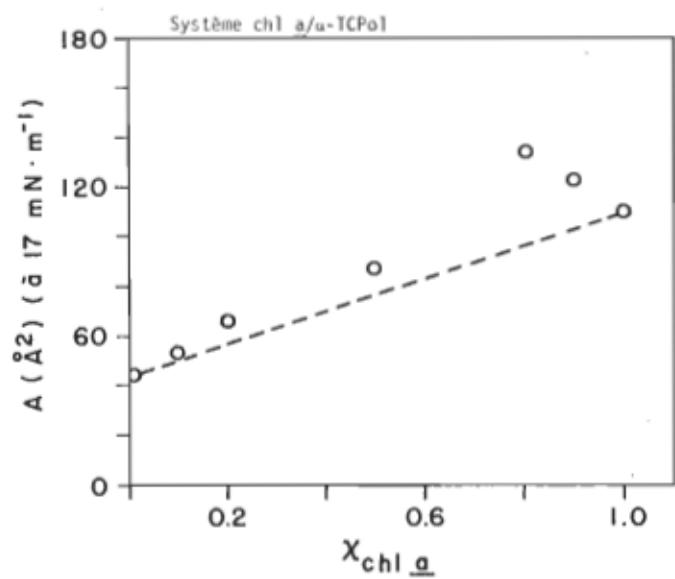
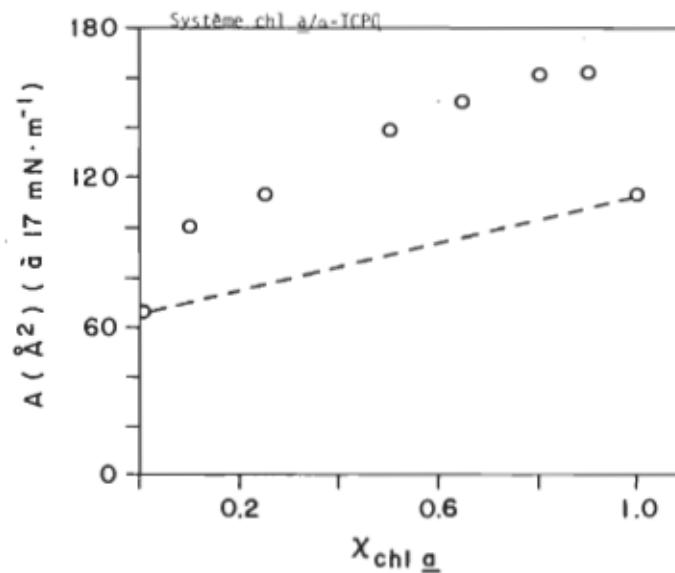
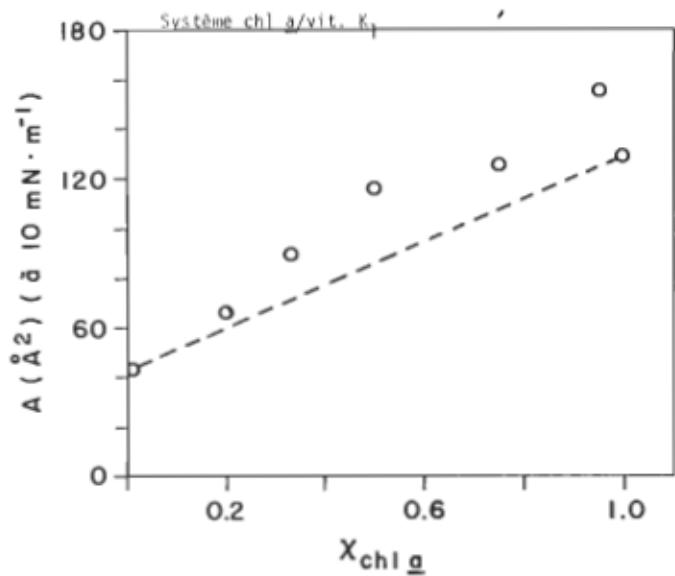
Cette méthode est beaucoup plus révélatrice de l'idéalité ou de la non idéalité d'un système binaire. Ainsi, nous voyons, qu'à faible concentration en chlorophylle a, les systèmes chl a/vit. K<sub>1</sub>, chl a/ $\alpha$ -TCPol et chl a/phytol sont presques idéaux et qu'à forte concentration en chlorophylle a, la non-idéalité est relativement faible. Cependant, le système chl a/ $\alpha$ -TCPQ contraste vraiment avec les 3 autres systèmes. En effet, ce système démontre une non-idéalité bien évidente à n'importe quelle concentration de chlorophylle a.

Puisque le système chlorophylle a/ $\alpha$ -tocophérylquinone présente la plus forte interaction, il serait intéressant d'en connaître la nature et la spectroscopie infrarouge pourrait nous donner des renseignements très intéressants sur cette interaction.

#### 6.5 Spectroscopie infrarouge du système chlorophylle a/ $\alpha$ -tocophérylquinone

Toutes ces expériences en monocouches nous ont permis de déterminer qu'il y avait interaction entre la chlorophylle a et l' $\alpha$ -tocophérylquinone ainsi que d'avoir une idée d'un ordre de grandeur approximatif. Cependant, ces études ne nous permettent pas de dire exactement quel type d'interaction il existe entre la chlorophylle a et l' $\alpha$ -tocophérylquinone, à savoir quels sont les groupements fonctionnels de chacune des

FIGURE 30: Diagramme de la variation de l'aire par molécule à une pression donnée pour des films mixtes en fonction de la fraction molaire de chlorophylle a.



deux molécules qui ont un rôle à jouer dans l'interaction. La spectroscopie infrarouge pourrait sûrement nous être d'une grande utilité dans cette détermination.

Notre choix d'un système à étudier s'est porté sur le système chl a/ $\alpha$ -TCPQ puisqu'il présente la plus forte interaction. A l'intérieur de ce système, nous avons choisi le mélange (0.80 : 0.20) qui présente l'interaction maximale.

#### 6.5.1 Spectroscopie de la chlorophylle a

La chlorophylle a a été étudiée sous forme de multicouche car l'intensité des bandes n'était pas suffisante avec une seule monocouche. Donc, en utilisant la technique de déposition préalablement décrite, nous avons déposé environ 40 monocouches sur une lamelle de germanium. Les rapports de déposition obtenus sont indiqués dans le tableau 14. Après une attente de 90 minutes dans un récipient fermé et à l'abri de la lumière, la lamelle est déposée dans le spectrophotomètre et le spectre est enregistré.

Le spectre obtenu est représenté sur la figure 31 et correspond bien avec les résultats déjà obtenus dans nos laboratoires au cours des dernières années (Leblanc et Chapados, 1976; Chapados et Leblanc, 1977). Pour chaque bande du spectre, nous pouvons attribuer une liaison de la molécule de chlorophylle a:

TABLEAU 14 : Rapports de déposition pour la multicoche de chlorophylle a

PLONGEE N°	RAPPORT	SORTIE N°	RAPPORT
1	-	1	1.17
2	0.68	2	0.89
3	0.89	3	1.00
4	0.84	4	1.00
5	0.84	5	1.00
6	0.89	6	1.00
7	1.05	7	1.05
8	0.95	8	1.42
9	0.84	9	1.26
10	0.95	10	1.63
11	0.84	11	0.84
12	0.95	12	0.84
13	0.95	13	0.84
14	0.89	14	1.47
15	0.95	15	1.52
16	0.89	16	0.79
17	0.95	17	0.79
18	0.95	18	0.95
19	0.89	19	0.95
20	0.95	20	0.37
21	1.00	21	0.47
22	1.00	22	0.37
23	1.00	23	0.73

REM. - lors des sorties N° 8, 10, 14 et 15, le support de la lamelle a touché à la surface de l'eau, d'où la valeur plus élevée du rapport de déposition.

- le rapport moyen de la plongée est de 0.92 et celui de la sortie est de 0.97.

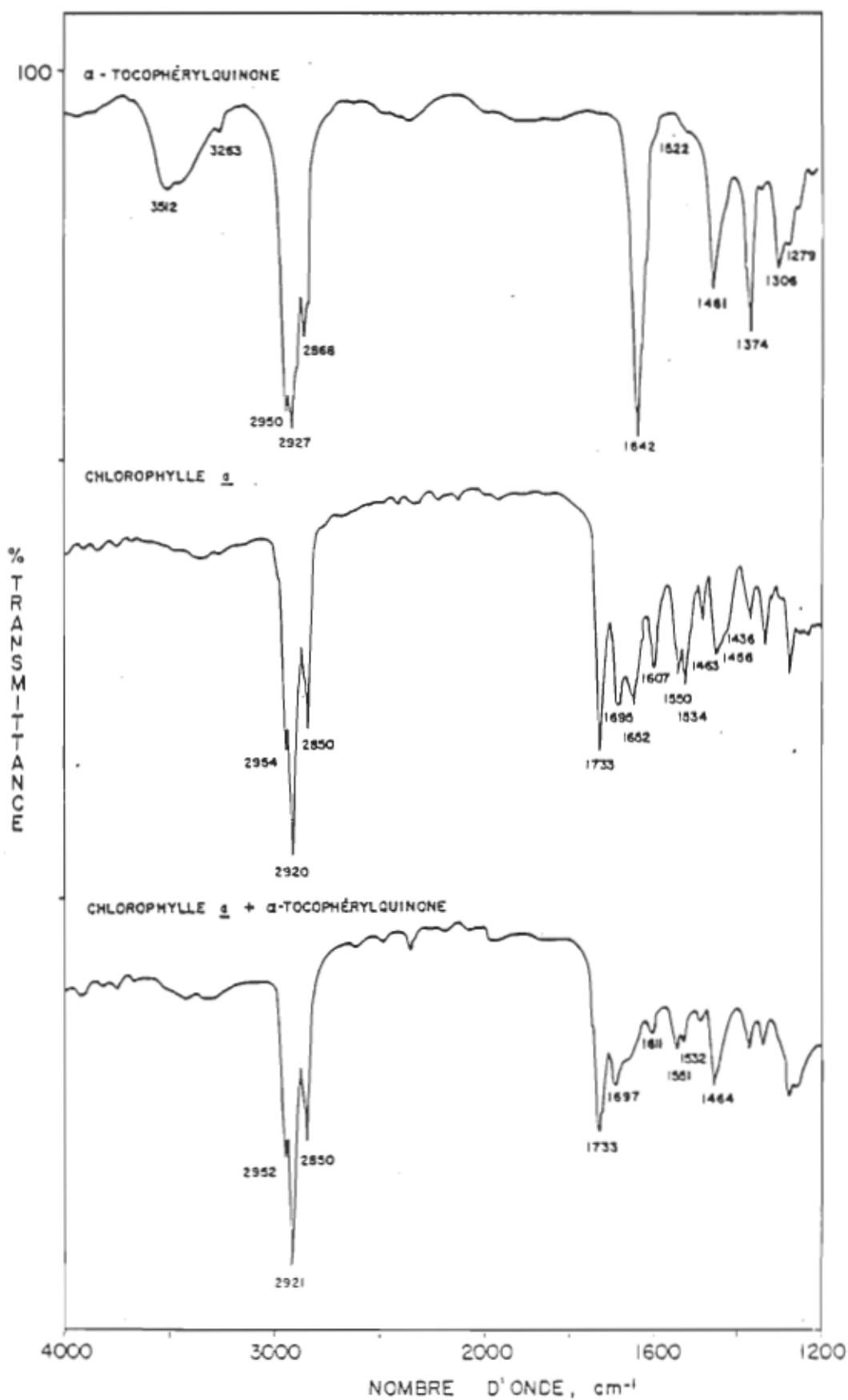


FIGURE 31. Spectres infrarouge de l' $\alpha$ -tocopherylquinone, de la chlorophylle a et du mélange chlorophylle a/ $\alpha$ -tocopherylquinone.

- $1436, 1456, 1463 \text{ cm}^{-1}$  : liaisons C-H de la chaîne phytol
- $1607 \text{ cm}^{-1}$  : liaisons C=C et C=N du squelette de l'anneau porphyrine
- $1652 \text{ cm}^{-1}$  : liaison de coordination C=O..... Mg
- $1695 \text{ cm}^{-1}$  : liaison cétone C=O libre
- $1733 \text{ cm}^{-1}$  : liaison ester C=O
- $2850, 2920 \text{ et } 2954 \text{ cm}^{-1}$  : liaisons C-H
- $3400 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  : liaison O-H (trace d'eau)

La bande à  $1652 \text{ cm}^{-1}$  est caractéristique d'un arrangement multimoléculaire. Elle correspond spécifiquement à la liaison de coordination entre le groupement cétone C=O d'une molécule de chlorophylle et le Mg de la molécule de chlorophylle voisine. Comme il y a beaucoup moins d'interaction entre molécules de chlorophylles adjacentes dans un arrangement monomoléculaire que dans un arrangement multimoléculaire, cette bande est presque inexistante dans le spectre d'une monocouche alors qu'elle est assez intense dans le spectre d'une multicoche (Chapados et Leblanc, 1977).

La bande à  $2850 \text{ cm}^{-1}$  est attribuée généralement à un recouvrement des modes de vibrations symétriques C - H des groupements  $-\text{CH}_3$  et des modes de vibrations symétriques C - H des groupements  $-\text{CH}_2$  de la molécule (Katz et coll., 1966). La bande à  $2920 \text{ cm}^{-1}$  est attribuée aux vibrations antisymétriques de la liaison C-H des groupements  $-\text{CH}_2$  (Katz et coll., 1966). Finalement, la bande à  $2954 \text{ cm}^{-1}$  est attribuée aux vibrations asymétriques de la liaison C-H des groupements  $-\text{CH}_3$  (Katz et coll., 1966).

La bande large et peu intense que l'on retrouve entre  $3400$  et  $3500 \text{ cm}^{-1}$  est attribuable à une trace d'eau dans la multicoche de chlorophylle a.

Cette eau provient des dépositions successives des 40 monocouches à l'interface air-eau.

#### 6.5.2 Spectroscopie de l' $\alpha$ -tocophérylquinone

Le spectre infrarouge de l' $\alpha$ -tocophérylquinone a été pris sous forme de film liquide puisqu'il nous a été impossible d'obtenir une multicouche de ce produit sur une lamelle de germanium selon la technique de déposition habituellement employée. De plus, avec une seule monocouche, l'intensité des bandes était nettement insuffisante pour pouvoir en tirer quelques renseignements valables. Le spectre obtenu est également représenté sur la figure 31. Les principales bandes sont attribuables aux groupements suivants:

- $1374 \text{ cm}^{-1}$  :  $\text{CH}_3$  aromatique ou aliphatique
- $1461 \text{ cm}^{-1}$  :  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ , et  $\text{CH}_3$  aliphatique ou aromatique
- $1642 \text{ cm}^{-1}$  :  $\text{C}=\text{O}$  et  $\text{C}=\text{C}$
- $2868$ ,  $2927$  et  $2950 \text{ cm}^{-1}$  :  $\text{C}-\text{H}$
- $3512 \text{ cm}^{-1}$  :  $\text{O}-\text{H}$

Selon les travaux de Rosenkrantz et Milhorat (1950), l' $\alpha$ -tocophérylquinone présente de fortes bandes d'absorption entre  $2900$  et  $3000 \text{ cm}^{-1}$  ainsi qu'entre  $1400$  et  $1550 \text{ cm}^{-1}$ . Ces bandes sont attribuables aux différentes vibrations C-H provenant des groupements C-H, C-H<sub>2</sub> et C-H<sub>3</sub> aromatiques et aliphatiques de la molécule. Cependant, une forte bande près de  $1380 \text{ cm}^{-1}$  (comme celle que nous avons à  $1374 \text{ cm}^{-1}$ ) peut être attribuée à la vibration des nombreux groupements CH<sub>3</sub> présents sur le noyau aromatique et la chaîne phytol aliphatique.

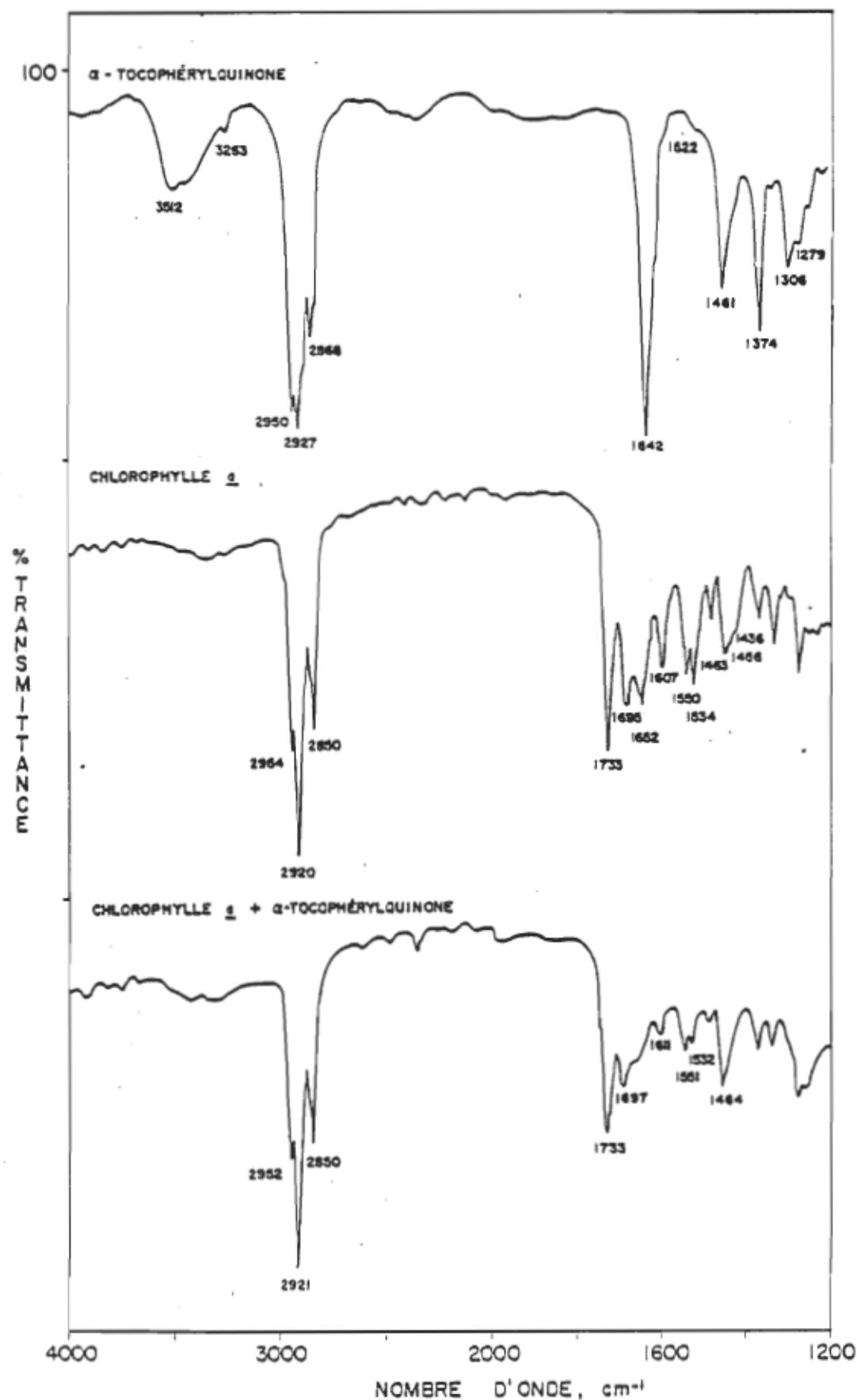


FIGURE 31. Spectres infrarouge de l' $\alpha$ -tocophérylquinone, de la chlorophylle  $a$  et du mélange chlorophylle  $a$ / $\alpha$ -tocophérylquinone.

Pour la plupart des quinones, les bandes d'absorption dues aux liaisons C=O et C=C se présentent comme étant deux bandes distinctes, soit vers  $1675\text{ cm}^{-1}$  pour le groupement C=O et vers  $1585\text{ cm}^{-1}$  pour le groupement C=C. Cependant, dans le cas de l' $\alpha$ -tocophérylquinone, ces deux bandes se confondent en une seule vers  $1645\text{ cm}^{-1}$ . Dans notre spectre, nous avons effectivement une seule bande intense située à  $1642\text{ cm}^{-1}$ .

La large bande à  $3512\text{ cm}^{-1}$  est évidemment attribuable au groupement alcool O-H situé sur la chaîne aliphatique de la molécule (voir figure 4). Cette bande est habituellement située vers  $3400\text{ cm}^{-1}$  pour l' $\alpha$ -tocophérylquinone. Dans notre cas, cette bande se situe à  $3512\text{ cm}^{-1}$ .

#### 6.5.3 Spectroscopie du mélange chl a / $\alpha$ -TCPQ (0.80 : 0.20)

Après avoir pris les spectres de chacun des constituants du mélange séparément, nous avons enregistré le spectre d'une multicouche du mélange chlorophylle a/ $\alpha$ -tocophérylquinone (0.80 : 0.20). Sur la lamelle de germanium, préalablement lavée, nous avons déposé 40 monocouches du mélange fraîchement préparé. Les rapports de déposition sont indiqués dans le tableau 15 et le spectre est représenté sur la figure 31. Comparons maintenant ce spectre du mélange avec les spectres des deux produits purs. Et de cette comparaison, nous pouvons en tirer plusieurs détails intéressants:

1<sup>o</sup> la bande à  $1642\text{ cm}^{-1}$  de l' $\alpha$ -TCPQ n'apparaît pas sur le spectre du mélange. On peut donc supposer que le groupement cétone C=O de l' $\alpha$ -TCPQ est probablement lié à un groupement quelconque de la chlorophylle a.

TABLEAU 15: Rapports de déposition pour la multicouche du mélange  
ch1  $\alpha$ -TCPQ (0.80 : 0.20)

PLONGEE E SORTIE N°	RAPPORT DE DEPO- SITION
1	1.25
2	1.15
3	1.20
4	1.20
5	1.35
6	1.20
7	1.35
8	1.56
9	1.93
10	1.93
11	1.35
12	1.25
13	1.20
14	1.15
15	1.20
16	1.04
17	0.99
18	1.04
19	1.10
20	1.20

REM. - lors des dépositions N° 8, 9 et 10, le support de la lamelle a touché à la surface de l'eau.  
- les mesures ont été prises lors de l'entrée de la lamelle dans l'eau et lors de sa sortie. Ainsi, le rapport est un rapport de déposition global pour la plongée et la sortie.  
- le rapport moyen est de 1.28.

- 2<sup>o</sup> le doublet des bandes à 1652 et 1695  $\text{cm}^{-1}$  de la chlorophylle a subit une importante modification dans le spectre du mélange. Ainsi, la bande à 1652  $\text{cm}^{-1}$  a presque complètement disparue dans le spectre du mélange. Puisque cette bande était attribuable à la liaison de coordination C=O.... Mg et que cette liaison a été brisée par l'introduction de l' $\alpha$ -TCPQ dans la multicoche, on peut supposer que le Mg est lié à un autre groupement du complexe.
- 3<sup>o</sup> la bande à 3512  $\text{cm}^{-1}$ , attribuable au groupement O-H de l' $\alpha$ -TCPQ n'apparaît pas sur le spectre du mélange. De plus, on note une très légère modification de la bande large située à 3400-3500  $\text{cm}^{-1}$  en comparant les spectres de la chlorophylle a pure et du mélange chl a/ $\alpha$ -TCPQ. On pourrait alors se demander quel rôle joue le groupement O-H dans la formation du complexe. Il pourrait peut-être s'agir de liaisons hydrogène entre ce groupement O-H et le groupement cétone C=O libéré de son lien avec le magnésium ou d'une autre liaison possible.
- 4<sup>o</sup> les autres bandes de la chl a, soit les bandes situées à 1463, 1534, 1550, 1607, 2850, 2920 et 2954  $\text{cm}^{-1}$  ne subissent aucune modification majeure sauf une diminution d'intensité et de très légers déplacements du maximum d'absorption pour les bandes situées entre 1400 et 1600  $\text{cm}^{-1}$ .

A partir de ces résultats, on peut tirer quelques points intéressants. Ainsi, on pourrait supposer que les groupements C=O et O-H de l' $\alpha$ -tocophérylquinone jouent un rôle important dans la formation du complexe chl a/ $\alpha$ -TCPQ. L'hypothèse la plus plausible serait que la liaison entre les deux molécules se ferait entre le groupement C=O de l' $\alpha$ -tocophérylquinone et le magnésium de la chlorophylle a, à cause justement de la disparition de cette bande à  $1652\text{ cm}^{-1}$  de la chlorophylle a dans le spectre du mélange.

## 7.0 CONCLUSION

Par ces travaux, nous avons démontré que certaines quinones du chloroplaste pouvaient avoir une interaction avec la chlorophylle. Au moyen de la méthode des monocouches, nous avons observé que la vitamine K<sub>1</sub> et surtout l' $\alpha$ -tocophérylquinone, lorsque lié à une concentration au moins 4 fois supérieure de chlorophylle, présentaient une interaction non négligeable avec celle-ci. Cette interaction se voyait par la différence entre l'isotherme expérimentale moyenne et l'isotherme théorique calculée à partir de la loi d'additivité. Cette déviation de la loi d'additivité était positive pour tous les systèmes étudiés, ce qui nous permet d'affirmer que la quinone, lorsqu'elle se complexait à la chlorophylle, provoquait un affaissement du plan porphyrine de cette dernière à l'interface air-eau.

La spectroscopie infrarouge du système chlorophylle  $\alpha$ / $\alpha$ -tocophérylquinone nous a démontré que la liaison pourrait avoir lieu entre l'oxygène du groupement cétone de la quinone et le magnésium de la chlorophylle. À la lumière de ces résultats, on pourrait émettre l'hypothèse que la quinone, à l'interface air-eau, pourrait se glisser entre deux molécules de chlorophylle. Comme l' $\alpha$ -TCPQ a deux groupements cétone sur son noyau aromatique en position para (voir figure 4), l'interaction se ferait entre une molécule d' $\alpha$ -TCPQ et deux molécules de chlorophylle par des liens de coordination C=O.... Mg.

Cette hypothèse rejoint le modèle déjà proposé par LeBrech, Leblanc et Antippa (1974) et repris plus tard par Leblanc et Chapados (1976). Ce modèle avait d'abord été proposé pour expliquer l'interaction d'un complexe

chlorophylle/p-dioxane puis d'un complexe chlorophylle/benzoquinone.

Comme l' $\alpha$ -TCPQ possède la même structure que le benzoquinone en ce qui concerne la position des groupements cétone sur le noyau aromatique, nous croyons qu'un tel modèle pourrait expliquer l'interaction entre la chlorophylle et l' $\alpha$ -tocophérylquinone.

Cependant, si nous enlevons le Mg de la chlorophylle a, c'est-à-dire si nous employons de la phéophytine a avec la quinone, est-ce que le modèle proposé est toujours valable ? A cette question, nous répondons non. En effet, pendant la rédaction de cette thèse, d'autres chercheurs, en l'occurrence le Professeur J. Aghion et Monsieur G. Munger, ont réalisé dans nos laboratoires une étude de pression de surface impliquant, entre autres, le système phéophytine a/ $\alpha$ -tocophérylquinone. Cette étude a révélé que le système phéo a/ $\alpha$ -TCPQ était idéal, donc qu'il ne présentait aucune forme d'interaction (Morin, Aghion et coll., en préparation). Ce résultat, est d'autant plus satisfaisant qu'il confirme notre hypothèse à l'effet que le Mg de la chlorophylle a un rôle important à jouer dans l'interaction avec une quinone. Il faut cependant être prudent avec ce modèle d'interaction puisque nous appliquons des résultats obtenus avec un état multimoléculaire (spectroscopie infrarouge) à un système monomoléculaire à l'interface air-eau.

Suite à ce travail, il serait intéressant de voir si la plastoquinone, présente en plus grande quantité que la vit. K<sub>1</sub> et l' $\alpha$ -TCPQ dans le chloroplaste, présenterait aussi cette interaction avec la chlorophylle à l'interface air-eau. De plus, l'addition d'un troisième composé au mélange, soit des phospholipides ou des protéines, permettrait peut-être de faire un pas de plus dans la direction de la découverte du piège d'énergie (P-700) de la

photosynthèse ou vers la fabrication éventuelle d'une membrane photosynthétique artificielle.

## 8.0 BIBLIOGRAPHIE

- ADAM, N.K. (1941). The physics and chemistry of surfaces. Third Edition, Oxford University Press, 436 p.
- AGHION, J., BROYDE, S.B. et BRODY, S.S. (1969). Surface reactions of chlorophyll a monolayers at an air-water interface. Photochemistry and complex formation. *Biochemistry*, 8 (7), 3120-6
- ALEXANDER, A.E. (1937). Monolayers of porphyrins and related compounds. *J. Chem. Soc.*, 1813-6
- ANDERSON, A.F.H. (1963). Some new molecular biology of chlorophyll a. Ph.D. Thesis, University of California at Berkeley, 145 p.
- ANDERSON, A.F.H. et CALVIN, M. (1962). An improved method for the separation and purification of chlorophyll a. *Nature*, 194 (4825), 285-6
- ANDERSON, P.A. et EVETT, A.A. (1952). Automatic recording of the pressure-area, pressure-time and area-time characteristics of monomolecular films. *Rev. Sci. Instrum.*, 23 (9), 485-8
- AOSHIMA, R., IRIYAMA, K. et ASAII, H. (1975). Fluorescence properties of chlorophyll a and b monomolecular films at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta*, 406 (3), 362-9
- ARNON, D.I. et CRANE, F.L. (1965). Role of quinones in photosynthetic reactions. *Biochemistry of Quinones* (Ed. R.A. Morton), Academic Press, N.Y., p.433-58
- BALLSCHMITER, K. et KATZ, J.J. (1972). Chlorophyll-chlorophyll and chlorophyll-water interactions in the solid state. *Biochim. Biophys. Acta*, 256, 307-27
- BEDDARD, G.S., PORTER, Sir G. et WEESE, G.M. (1975). Model system for photosynthesis. V. Electron transfer between chlorophyll and quinones in a lecithin matrix. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A*, 342, 317-25
- BELLAMY, W.D., GAINES, G.L. Jr. et TWEET, A.G. (1963). Preparation and properties of monomolecular films of chlorophyll a and pheophytin a. *J. Chem. Phys.*, 39 (10), 2528-38
- BERNS, D.S. (1976). Photosensitive bilayer membranes as model systems for photobiological processes. *Photochem. Photobiol.*, 24 (2), 117-39
- BISHOP, N.I. (1958). Vitamin K<sub>1</sub> an essential factor for the photochemical activity of isolated chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 44, 501-4
- BLODGETT, K.B. (1935). Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *J. Amer. Chem. Soc.*, 57, 1007-27

- BLODGETT, K.B. et LANGMUIR, I. (1937). Built-up films of barium stearate and their optical properties. *Phys. Rev.*, 51, 964-82
- BOARDMAN, N.K. (1968). The photochemical systems of photosynthesis. *Adv. Enzymol.*, 30, 1-79
- BOBROVSKII, A.P. et KHOLOMOGOROV, V.E. (1972). The nature of the primary photochemical event of interaction of chlorophyll with quinones. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 208 (6), 1472-5
- BOLLINGER, H.R. et KONIG, A. (1969). Vitamins, including carotenoids, chlorophylls of biologically active quinones. *Thin-Layer Chromatography, a laboratory handbook* (Ed. Egon Stahl), Springer-Verlag, New York, p. 259-311
- BRODY, S.S. (1971 a). Interactions of chlorophyll monolayers with electron donors and acceptors. *Z. Naturforsch.*, 26B (2), 134-41
- BRODY, S.S. (1971 b). Interaction between ferredoxin and chlorophyll in a monolayer system. *Z. Naturforsch.*, 26B (9), 922-9
- BRODY, S.S. (1975). Surface properties of monomolecular films of reduced plasto-cyanine at a nitrogen-water interface. *Z. Naturforsch.*, 30C, 318-22
- BRODY, S.S. et OWENS, N.F. (1976). Photosynthetic electron carriers at a heptane-water interface. *Z. Naturforsch.*, 31C, 569-74
- CHAPADOS, C. et LEBLANC, R.M. (1977). Aggregation of chlorophylls in monolayers. Infrared study of chlorophyll *a* in a mono-and multilayer arrays. *Chem. Phys. Lett.*, 49 (1), 180-2
- CHEN, C.-H. et BERNS, D.S. (1976). Photosensitivity of artificial bilayer membranes: lipid-chlorophyll interaction. *Photochem. Photobiol.*, 24 (3), 255-60
- CHERRY, R.J., HSU, K. et CHAPMAN, D. (1972). Polarised absorption spectroscopy of chlorophyll-lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 267 (3), 512-22
- CHIN, P. et BRODY, S.S. (1976). Mixed monomolecular films of chlorophyll and cytochromes. *Z. Naturforsch.*, 31C, 44-7
- COLMANO, G. (1961). The chemical stability of chlorophyll *a* in monolayers at a water-air interface. *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 454-7
- COLMANO, G. (1962). Visible absorption spectrum of chlorophyll *a*, *b* and  $\beta$ -carotene molecules mixed in monolayers at a water-air interface. *Nature*, 193, 1287-8

- COSTA, S.M. de B., FROINES, J.R., HARRIS, J.M., LEBLANC, R.M., ORGER, B.H. et PORTER, G. (1972). Model systems for photosynthesis. III. Primary photoprocesses of chloroplast pigments in monomolecular arrays on solid surfaces. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A*, 326, 503-19
- COSTA, S.M. de B. et PORTER, G. (1974). Model systems for photosynthesis IV. Photosensitization by chlorophyll a monolayers at a lipid-water interface. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A*, 341, 167-76
- COSTIN, I.S. et BARNES, G.T. (1975). Two-component monolayers. I, II and III. *J. Coll. Int. Sci.*, 51 (1), 94-132
- CRANE, F.L., HENNINGER, M.D., WOOD, P.M. et BARR, R. (1966). Quinones in chloroplasts. *Biochemistry of Chloroplasts* (Ed. T.W. Goodwin), Vol. 1, p. 133-51
- CRISP, D.J. (1949). A two dimensional phase rule .II. Some applications of a two-dimensional phase rule for a single surface. *Surface chemistry*, Suppl. Res. (London), p. 23-5
- DAVIES, J.T. et RIDEAL, E.K. (1961). *Interfacial phenomena*. Academic Press, New York, N.Y., 480 p.
- DEN ENGELSEN, D. et DE KONING, B. (1974). Ellipsometry of spread monolayers. Part 2. Coloured systems: chlorophyll a, carotenoic acid, rhodamine 6G and a cyanine dye. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, 70 (11), 2100-2112
- DEN ENGELSEN, D., HENGST, J.H.Th. et HONIG, E.P. (1976). An automated Langmuir trough for building monomolecular layers. *Philips Tech. Rev.*, 36 (2), 44-6
- DIJCKMANS, H. et LEMIEUX, L. (1973). Extraction et purification des chlorophylles a et b. Rapport non publié, UQTR.
- DILLEY, R.A. et CRANE, F.L. (1963). Light-induced changes of  $\alpha$ -tocopherylquinone in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 75, 142-3
- DILLEY, R.A., HENNINGER, M.D. et CRANE, F.L. (1963). Evidence for the role of several quinones in the electron transport system of chloroplasts. *Photosynthetic Mechanisms of Green Plants*, Publ. No. 1145 (Ed. B. Kok et A. T. Jagendorf), Natl. Acad. Sci., Washington, D.C., p. 273-7
- DILUNG, I.I. et CHERNYUK, I.N. (1961). The nature of the quenching of fluorescence of chlorophyll by nitro compounds. *Dokl Akad. Nauk SSSR*, 140, 162-4
- DOUCE, R. et JOYARD, J. (1977). Le chloroplaste. *La Recherche*, 8 (79), 527-37

- DROZDOVA, N.N. et KRASNOVSKII, A.A. (1972). Influence of the state of chlorophyll and its analog ont the photochemical interaction with quinones. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 207 (4), 988-91
- EMERSON, R. et ARNOLD, W. (1932). The photochemical reaction in photosynthesis. *J. Gen. Physiol.*, 16, 191-205
- FEHER, A.I. , COLLINS, F.D. et HEALY, T.W. (1977). Mixed monolayers of simple saturated and unsaturated fatty acids. *Austral. J. Chem.* 30, 511-9
- FROMHERZ, P. (1971). A new technique for investigating lipid protein films. *Biochim. Biophys. Acta*, 225 (2), 382-7
- FROMHERZ, P. (1973). A new method for inverstigation of lipid assemblies with a lipoid pH indicator in monomolecular films. *Biochim. Biophys. Acta*, 323 (2), 326-34
- FROMHERZ, P. (1975). Instrumentation for handling monomolecular films at an air-water interface. *Rev. Sci. Instrum.*, 46 (10), 1380-5
- FROMMER, M.A. et MILLER, I.R. (1965). Simply fully automatic recording surface balance. *Rev. Sci. Instrum.*, 36 (5), 707-8
- GABRIELLI, G., PUGGELLI, M. et FACCIOLO, R. (1971). Molecular interactions in mixed monolayers of polymers. *J. Coll. Int. Sci.*, 37 (1), 213-8
- GAINES, G.L. Jr. (1963). The design and operation of an automatic recording film balance. *Gen. Electr. Res. Labo. Rep.*, # 63-RL-3206 C, 1-15
- GAINES, G.L. Jr. (1966 a). Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. Interscience Publishers, New York, 386 p.
- GAINES, G.L. Jr. (1966 b). Thermodynamic relationships for mixed insoluble monolayers. *J. Coll. Int. Sci.*, 21, 315-9
- GAINES, G.L. Jr. (1968). Monolayers of some biologically important quinones. *J. Coll. Int. Sci.*, 28 (2), 334-6
- GAINES, G.L. Jr., BELLAMY, W.D. et TWEET, A.G. (1964). Interaction between chlorophyll a and fatty alcohol molecules in mixed monomolecular films *J. Chem. Phys.*, 41 (2), 538-42
- GAINES, G.L. Jr., TWEET, A.G. et BELLAMY, W.D. (1965). Interaction between chlorophyll a and vitamin K<sub>1</sub> in monomolecular films. *J. Chem. Phys.*, 42 (6), 2193-9

- GOODRICH, F.C. (1957). Molecular interactions in mixed monolayers. Proc. Intern. Congr. Surf. Activity, 2nd, London, 1, 85-91
- GORDEYEV, V.I., GORSHKOV, V.K., YEVSTIGNEYEV, V.B. et D'YACHENKO, A.P. (1973). Photo-oxidation of chlorophyll *a* in ethanol on flash illumination as a function of the pH of the medium. Biophysics, 18 (4), 672-8
- GOVINDJEE et GOVINDJEE, R. (1974). The primary events of photosynthesis. Scient. Amer., 231 (6), 68-82
- GOVINDJEE (Ed.) (1975). Bioenergetics of photosynthesis. Academic Press, New York, 698 p.
- GREGORY, R.P.F. (1977). Biochemistry of photosynthesis. 2nd Editon, J. Wiley and Sons, New York, 221 p.
- GUASTALA, J. (1939). Surface balance with a pendulous suspension. Compt. Rend. Acad. Sci., 208, 973-5
- GUDKOV, N.D., STOLOVITSKII, Yu. M. et YEVSTIGNEYEV, V.B. (1975). Pulse photoconductivity of solutions of chlorophyll and its analogs. III. Photoconductivity of hexanol solutions of chlorophyll *a* in the presence of *p*-benzoquinone. Kinetics and temperature measurements. Biophysics, 20 (5), 821-6
- HALES, B.J., BOLTON, J.R. (1972). Reversible photooxydation of chlorophyll. A study of the chlorophyll-benzoquinone system utilizing flash photolysis and electron spin resonance spectroscopy. J. Amer. Chem. Soc., 94 (10), 3314-20
- HANSON, E.A. (1939). Some properties of the chlorophyll in relation of its biological function. Rec. Trav. Bot. Neerl., 36, 180-267
- HARBOUR, J.R. et TOLLIN, G. (1972). In vitro photoreactions of chlorophyll and photosynthetic energy conversion: chlorophyll-quinone-ethanol at low temperature as an analog of photosystems I and II. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69 (8), 2066-8
- HARBOUR, J.R. et TOLLIN, G. (1974 a). Chlorophyll one-electron photochemistry. II. Photosensitization by chlorophyll, pheophytin and bacteriochlorophyll of a one-electron transfer reaction between ethanol and quinone. Photochem. Photobiol., 19 (2), 147-61
- HARBOUR, F.R. et TOLLIN, G. (1974 b). ESR evidence for chlorophyll-photosensitized one-electron oxidation of water by benzoquinone. Photochem. Photobiol., 20 (3), 271-7

- HARKINS, W.D. (1952). Physical chemistry of surface films. Reinhold Publishing Corp., New York, p. 154-72
- HEIKKILA, R.E., KWONG, C.N. et CORNWELL, D.G. (1970). Stability of fatty acids monolayers and the relationship between equilibrium spreading pressure, phase transformations and polymorphic crystal forms. *J. Lipid Res.*, 11 (3), 190-4
- HENNINGER, M.D. et CRANE, F.L. (1963 a). Restoration of photoreductase activities in acetone-extracted chloroplasts by plastoquinones and tocopherylquinones. *Biochemistry*, 2 (5), 1168-71
- HENNINGER, M.D. et CRANE, F.L. (1963 b). The role of  $\alpha$ -tocopherylquinone in the electron transport system of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 75, 144-5
- HIRSCH, R.E. (1977). Spectra studies of reactions between monomolecular films of chlorophyll and endogenous redox reagents. Ph.D. Thesis, New York University, 150 p.
- HOLT, A.S. (1963). Infrared spectroscopy of chlorophylls. Mechanism of Photosynthesis, Proc. 5th Intern. Congr. Biochem., Vol. 6 (Ed. H. Tamiya), Pergamon Press, London, p. 59-63
- HONIG, E.P., HENGST, J.H. Th. et DEN ENGELSEN, D. (1973). Langmuir-Blodgett deposition ratios. *J. Coll. Int. Sci.*, 45 (1), 92-102
- HOTCHANDANI, S., LEBLANC, R.M. et BOUCHER, F. (1975). Monolayer studies of retinyl polyenes. I. Spectroscopic properties. *Vision Res.*, 15 (5), 605-11
- HUGUES, A. (1936). Surface phenomena: films. *Proc Roy. Soc. London, Ser. A.*, 155, 710-1
- HUPPERT, D., RENTZEPIS, P.M. et TOLLIN, G. (1976). Picosecond kinetics of chlorophyll and chlorophyll/quinone solutions in ethanol. *Biochim. Biophys. Acta*, 440 (2), 356-64
- IRIYAMA, K., YOSHIURA, M. (1977). Absorption spectroscopy of chlorophylls a and b in methanol, dioxane and/or water. *Coll. Polym. Sci.*, 255, T33-9
- JACOBS, E.E.; HOLT, A.S. et RABINOWITCH, E. (1954). The absorption spectra of monomolecular layers of chlorophyll a and ethyl chlorophyllide a. *J. Chem. Phys.*, 22 (1), 142-3
- JEFFRY, S.W. (1968). Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochim. Biophys. Acta*, 162, 271-85

- JOLIOT, P. et JOLIOT, A. (1978). La photosynthèse. *La Recherche*, 9 (88), 331-8
- KARAN, J. et BRODY, S.S. (1974). Chlorophyll a and cytochrome c at a heptane-water interface. *Z. Naturforsch.* 29C, 506-9
- KATZ, J.J., DOUGHERTY, R.C. et BOUCHER, L.J. (1966). Infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy of chlorophyll. *The Chlorophylls* (Ed. L.P. Vernon et G.R. Seely), Acad. Press, N.Y., p. 185-251.
- KE, B. (1966). Some properties of chlorophyll monolayers and crystalline chlorophyll. *The Chlorophylls* (Ed. L.P. Vernon et G.R. Seely), Acad. Press, N.Y., p. 253-79
- KE, B. et SPERLING, W. (1966). Evidence for the presence of ordered aggregates in chlorophyll a monolayers. *Brookhaven Symp. Biol.*, 19 (Energy conversion by the photosynthetic apparatus), 319-27
- KELLY, J.M. et PORTER, G. (1970). The interaction of photoexcited chlorophyll a with duroquinone,  $\alpha$ -tocopherylquinone and vitamin K<sub>1</sub>. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A*, 319, 319-29
- KIM, V.A., VOZNYAK, V.M. et YEVSTIGNEYEV, V.B. (1974). Study by the EPR method of photochemical generation of the cation-radicals of bacteriochlorophyll and chlorophyll. *Biophysics*, 19 (6), 1010-15
- KLEUSER, D. et BUCHER, H. (1969). Electrochromic effects of a chlorophyll a and a chlorophyll b monolayer. *Z. Naturforsch.*, 24B, 1371-4
- KÖGL, F. et HAVINGA, E. (1940). Studies of unimolecular films. I. Apparatus for the continuous production of unimolecular layers. *Rec. Trav. Chim.*, 59, 249-59
- KOSSI, C.N. (1975). Propriétés physiques d'extraits purifiés de rhodopsine à l'état de monocouche. *Thèse de Maîtrise* (M. Sc. Energie), UQTR, 112 p.
- KOSTIKOV, A.P., SADOVNIKOVA, N.A. et YEVSTIGNEYEV, V.B. (1976). Investigation of the yield of cation radicals of the pigment in the reaction of photooxidation of chlorophyll by quinones. *Biophysics*, 21 (5), 825-30
- KROGMAN, D.W. (1961). A requirement for plastoquinone in photosynthetic phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 4, 275-7
- KUTYURIN, V.M., SLAVNOVA, T.D. et CHIBISOV, A.K. (1973). Effect of water on the yield of the cation-radical of chlorophyll in the photooxidation reaction. *Biophysics*, 18 (6), 1068-72

- LAMOLA, A.A., MANION, M.L., ROTH, H.D. et TOLLIN, G. (1975). Photooxidation of chlorins by quinones studied by NMR techniques. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72 (9), 3265-9
- LANGMUIR, I. (1917). Constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. J. Amer. Chem. Soc., 39, 1848-1906
- LANGMUIR, I. (1920). The mechanism of the surface phenomena of flotation. Trans. Far. Soc., 15, 62
- LANGMUIR, I. et SCHAEFER, V.J. (1937). Monolayers and multilayers of chlorophyll. J. Amer. Chem. Soc., 59, 2075-6
- LE BRECH, J., LEBLANC, R.M. et ANTIPPA, A.F. (1974). The absorption spectrum of chlorophyll a and the chlorophyll/dioxane and chlorophyll/benzoquinone interactions. Chem. Phys. Lett., 26 (1), 37-44
- LEBLANC, R.M. (1975). La bioénergétique. Cours internationaux post-universitaires, Université de Liège, Belgique, 88 p. (non-publié).
- LEBLANC, R.M. (1977). Les monocouches en tant que modèle membranaire. Annales de l'ACFAS, 44 (2), 67-70
- LEBLANC, R.M. et ORGER, B. (1970). An evaluation of monolayer techniques in this laboratory using a Langmuir-type surface pressure balance. Research report, Davy Faraday Res. Labo., Royal Institution, London (unpublished)
- LEBLANC, R.M., GALINIER, G., TESSIER, A. et LEMIEUX, L. (1974). Laser spectrofluorometry of chlorophylls. Can. J. Chem., 52 (22), 3723-7
- LEBLANC, R.M. et CHAPADOS, C. (1976). Aggregation of chlorophylls in monolayers. II. Chlorophyll-dioxane interactions. Biophys. Chem., 6 (1), 77-85
- LEVINE, R.P. (1969). The mechanism of photosynthesis. Scient. Amer., 221 (6), 58-70
- LICHTENTHALER, H.K. et CALVIN, M. (1964). Quinone and pigment composition of chloroplasts and quantosome aggregates from "spinacia oleracea". Biochim. Biophys. Acta, 79, 30-40
- LIVINGSTON, R. et KE, C.L. (1950). Quenching of the fluorescence of chlorophyll a solutions. J. Amer. Chem. Soc., 72, 909-15
- MANN, J.A. Jr. et HANSEN, R.S. (1960). A simple technique for the automatic recording of monolayer compression characteristics. Rev. Sci. Instrum., 31 (9), 961-3

- MANN, J.A. Jr. et HANSEN, R.S. (1963). Automatic recording surface balance. II. Rev. Sci. Instrum., 34, 702-3
- MASTERS, B.R. et MAUZERALL, D. (1978). Effects of quinones on the photoelectric properties of chlorophyll a containing lipid bilayers. J. Membr. Biol., 41 (4), 377-88
- MILLER, I.R. et SILVERSTEIN, T. (1977). Redox kinetics of quinones in lipid monolayers. Bioelectrochem. Bioenerg., 4, 263-74
- MORIN, M., AGHION, J., MUNGER, G., LEBLANC, R.M. En préparation
- MUNGER, G. (1978). Détermination des poids moléculaires de protéine à l'interface air-eau par un nouveau système à faible pression de surface. Thèse de Maîtrise (M. Sc. Sciences de l'Environnement), UQTR, 185 p.
- MUNGER, G. et LEBLANC, R.M.. En préparation
- McCREE, K.J. (1965). Photoconduction and photosynthesis. I. The photoconductivity of chlorophyll monolayers. Biochim. Biophys. Acta, 102, 90-5
- McPHEE, J., BRODY, S.S. (1973). Photophosphorylation by monomolecular films at an air-water interface. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70 (1), 50-3
- NEKRASOV, L.I. (1967). Lamellar structure of the grana of chloroplasts, spectral properties of monolayers of chlorophyll in vivo and in vitro and the absorption mechanism of their formation. Biophysics, 12 (2), 245-55
- NUTTING, G.C. et HARKINS, W.D. (1939). Pressure-area relations of fatty acid and alcohol monolayers. J. Amer. Chem. Soc., 61, 1180-7
- PAGANO, R.E. et GERSHFELD, N.L. (1972). A millidyne film balance for measuring intermolecular energies in lipid films. J. Coll. Int. Sci., 41 (2), 311-7
- PARK, R.B. (1966). Chloroplast structure. The Chlorophylls (Ed. L.P. Vernon et G.R. Seely), Acad. Press, New York, P. 283-311
- PATIL, G.S. et CORNWELL, D.G. (1978). Interfacial oxidation of  $\alpha$ -tocopherol and the surface properties of its oxidation products. J. Lipid Res., 19 (4), 416-22
- PERKINS, H.J. et ROBERTS, D.W.A. (1964). On the relative intensities of the blue and red absorption bands of chlorophyll a. Biochim. Biophys. Acta, 79, 20-9

- RABINOWITCH, E. et GOVINDJEE (1965). The role of chlorophyll in photosynthesis. *Scient. Amer.*, 213 (1), 74-83
- RABINOWITCH, E. et GOVINDJEE (1969). Photosynthesis. J. Wiley and Sons, New York, 273 p.
- RAMAN, R. et TOLLIN, G. (1971). Chlorophyll one-electron photochemistry: Flash photolysis studies of the chlorophyll-quinone reaction in pyridine. *Photochem. Photobiol.*, 13 (2), 135-45
- RODRIGO, F.A. (1953). Preliminary note on experiments concerning the state of chlorophyll in the plant. *Biochim. Biophys. Acta*, 10, 342
- ROSENKRANTZ, H. et MILHORAT, A.T. (1950). Infrared absorption spectra of tocopherols and some of their chemical products. *J. Biol. Chem.*, 187, 83-90
- ROSOFF, M. et ARON, C. (1965). Reaction kinetics of monomolecular films of chlorophyll a on aqueous substrates. *J. Phys. Chem.*, 69 (1), 21-4
- SAUER, K. (1978). Photosynthetic membranes. *Acc. Chem. Res.*, 11 (7), 257-64
- SEELY, G.R. (1978). Photochemistry of chlorophyll in solution: Modeling Photosystem II. *Curr. Top. Bioenerg.*, Vol. 7A, Acad. Press, N.Y., p. 3-37
- SEELY, G.R. et JENSEN, R.G. (1965). Effect of solvent on the spectrum of chlorophyll. *Spectrochimica Acta*, 21, 1835-45
- SESTAK, Z. (1967). Thin-layer chromatography of chlorophylls. *Photosynthesica*, 1 (3-4), 269-92
- SHIRAKI, M., YOSHIURA, M. et IRIYAMA, K. (1978). Rapid and easy separation of chlorophylls, their derivatives and plant yellow pigments by thin layer chromatography. *Chem. Lett.*, 103-4
- SIEVERS, G. et HYNNINEN, P.H. (1977). Thin-layer chromatography of chlorophylls and their derivatives on cellulose layers. *J. Chromat.*, 134 (2), 359-64.
- SINESCHEKOV, V.A., LITVIN, F.F. et DAS, M. (1972). Chlorophyll a and carotenoid aggregates and energy migration in monolayers and thin films. *Photochem. Photobiol.*, 15 (2), 187-97
- SJOERDSMA, W. (1936). Monomolecular layers of chlorophyll. *Nature*, 138, 405

- SMITH, J.H.C. et BENITEZ, A. (1955). Chlorophylls: Analysis in plant materials. Modern Methods of Plant Analysis (Ed. K. Paech et M. V. Tracey), Vol. 4, Springer-Verlag, p. 142-96
- SPERLING, W. et KE, B. (1966 a). Chlorophyll monolayers and multilayers. I. Methods of preparation and spectroscopic characterization. Photochem. Photobiol., 5, 857-63
- SPERLING, W. et KE, B. (1966 b). Chlorophyll monolayers and multilayers. II. Evidence for the presence of ordered aggregates. Photochem. Photobiol., 5, 865-76
- STRAIN, H.H. (1958). Chloroplast pigments and chromatographic analysis. 32 nd Annual Priestley Lectures, Penn State Univ., University Park, Pa., 180 p.
- STRAIN, H.H., THOMAS, M.R. et KATZ, J.J. (1963). Spectral absorption properties of ordinary and fully deuterated chlorophylls a and b. Biochim. Biophys. Acta, 75, 306-11
- STRAIN, H.H. et SVEC, W.A. (1966). Extraction, separation estimation and isolation of chlorophylls. The Chlorophylls (Ed. L.P. Vernon et G. R. Seely), Acad. Press, N.Y., p. 21-55
- STRAIN, H.H. et SVEC, W.A. (1969). Some procedures for the chromatography of the fat-soluble chloroplast pigments. Adv. Chromat., 8, 119-76
- STRAIN, H.H. et SVEC, W.A. (1975). Chromatography of chlorophylls and related porphyrins. Chromatography, 3rd Ed., Van Nostrand Reinhold Publ., p. 744-58
- STRAIN, H.H. et SHERMA, J. (1969). Modifications of solution chromatography illustrated with chloroplast pigments. J. Chem. Educ., 46 (8), 476-83
- SUZUKI, A., IKEDA, S. et ISEMURA, T. (1967). Automatic recording systems for monolayer study. Ann. Rep. Biol. Works, Fac. Sci., Osaka Univ., 15, 83-96
- TABAK, S.A. et NOTTER, R.H. (1977). Modified technique for dynamic surface pressure and relaxation measurements at the air-water interface. Rev. Sci. Instrum., 48 (9), 1196-1201
- TAJIMA, K. et GERSHFELD, N.L. (1975). Thermodynamics of monolayer solutions of lecithin and cholesterol mixtures by the surface vapor pressure method. Adv. Chem. Ser., 144, 165-76
- TANG, C.W. et ALBRECHT, A.C. (1974). The electrodeposition of films of chlorophyll a microcrystals and their spectroscopic properties. Molec. Cryst. Liq. Cryst., 25 (1-2), 53-62

- TANG, C.W., DOUGLAS, F. et ALBRECHT, A.C. (1975). Pulse photoconductivity of chlorophyll a films in contact with a nonpolar solution. *J. Phys. Chem.*, 79 (25), 2723-8
- THORNBER, J.P., ALBERTE, R.S., HUNTER, F.A., SHIOZAWA, J.A. et KAN, K.S. (1976). The organization of chlorophyll in the plant photosynthetic unit. *Brookhaven Symp. Biol.*, 28 (Chlorophyll-proteins, reaction centers and photosynthetic membranes), 132-48
- TIEN, H.T. (1974). *Bilayer Lipid Membranes (BLM), Theory and Practice.* M. Dekker, New York, 655 p.
- TOLLIN, G. (1974). In vitro models for photosynthetic energy conversion. *J. Bioenerg.*, 6 (2), 69-87
- TOLLIN, G. (1976). Model systems for photosynthetic energy conversion. *J. Phys. Chem.*, 80 (20), 2274-7
- TOLLIN, G. et GREEN, G. (1962). Light-induced single electron transfer reactions between chlorophyll a and quinones in solution. I. Some general features of kinetics and mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, 60, 524-38
- TOLLIN, G. et RIZZUTO, F. (1978). Effect of chloride ion on chlorophyll photochemistry in solution: enhancement of cation radical and semi-quinone yields. *Photochem. Photobiol.*, 27 (4), 487-90
- TOMKIEWICZ, M. et KLEIN, M.P. (1973). Photooxidation of chlorophyll b by quinones studied by chemically-induced dynamic nuclear polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70 (1), 143-6
- TROSPER, T. et SAUER, K. (1968). Chlorophyll a interactions with chloroplast lipids *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta*, 162, 97-105
- TRURNIT, H.J. et COLMANO, G. (1959). Chloroplast studies. I. Absorption spectra of chlorophyll monolayers at liquid interfaces. *Biochim. Biophys. Acta*, 31, 434-47
- TRURNIT, H.J. et LAUER W.E. (1959). Automatic recording film balance system. *Rev. Sci. Instrum.*, 30 (11), 975-81
- TWEET, A.G., GAINES, G.L. et BELLAMY, W.D. (1964 a). Fluorescence of chlorophyll a monolayers. *J. Chem. Phys.*, 40 (9), 2596-2600
- TWEET, A.G., GAINES, G.L. et BELLAMY, W.D. (1964 b). Angular dependence of fluorescence from chlorophyll a in monolayers. *J. Chem. Phys.*, 41 (4), 1008-10

- VILLAR, J.G. (1976). Photoelectrochemical effects in the electrolyte-pigment-metal system. III. Chlorophyll films short circuit photocurrent transients light energy conversion efficiency. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 8 (4), 199-208
- WATANABE, T., MIYASAKA, T., FUJISHIMA, A. et HONDA, K. (1978). Photoelectrochemical study on chlorophyll monolayer electrodes. *Chem. Lett.*, 443-6
- WEIGL, J.W. et LIVINGSTON, R. (1953). Infrared spectra of chlorophyll and related compounds. *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 2173-6
- WEITZEL, G., FRETZDORFF, A.M. et HELLER, S. (1956). Examination of interface in tocopherol bonds and in vitamin K<sub>1</sub>. *H.-S. Z. Physiol. Chem.*, 303, 14-26
- WHITE, R.A. et TOLLIN, G. (1971 a). Chlorophyll one-electron photochemistry: Light-induced absorbance changes and ESR signals for various porphyrin-quinone and hydroquinone systems in alcohol solvents. *Photochem. Photobiol.*, 14 (1), 15-42
- WHITE, R.A. et TOLLIN, G. (1971 b). Chlorophyll one-electron photochemistry: Flash photolysis studies of the chlorophyll-quinone reaction in alcohol solvents. *Photochem. Photobiol.*, 14 (1), 43-63
- WITT, H.T. (1967). dans Nobel Symposium 5-Fast reactions and primary processes in chemical reactions (Ed. S. Claesson). Interscience Publ., New York, P. 81
- YEVSTIGNEYEV, V.B., SADOVNIKOVA, N.A. et OLOVYA NISHNIKOVA, G.D. (1968). Photochemical interaction of chlorophyll with plastoquinone. *Molec. Biol.*, 2 (1), 21-8
- YEVSTIGNEYEV, V.B., SADOVNIKOVA, N.A., KOSTIKOV, A.P., GRIBOVA, Z.P. et KAYUSHIN, L.P. (1971). Dependence of the electron paramagnetic resonance signal during photooxidation of chlorophyll by quinone on the acidity of the medium. *Biophysics*, 16 (3), 446-51
- YEVSTIGNEYEV, V.B. et CHUDAR, V.S. (1974 a). Change in the pH of the medium on photooxidation and photoreduction of chlorophylls a and b and their pheophytins in different solvents. *Biophysics*, 19 (3), 428-33
- YEVSTIGNEYEV, V.B. et CHUDAR, V.S. (1974 b). Dependence of the change in the pH of the medium on the concentration of the reagents on photooxidation and photoreduction of chlorophyll. *Biophysics*, 19 (6), 1015-9

YEVSTIGNEYEV, V.B. et GAVRILOVA, V.A. (1975 a). Photopotential on photochemical interaction of chlorophyll and duroquinone. *Biophysics*, 20 (6), 1008-13

YEVSTIGNEYEV, V.B. et GAVRILOVA, V.A. (1975 b). Effect of the dielectric constant of the medium on the photooxidation of chlorophyll a by p-benzoquinone. *Biophysics*, 20 (6), 1013-5

ZSCHEILE, F.P. Jr. (1934). Absorption spectra of chlorophylls a and b at room and liquid nitrogen temperatures. *Nature*, 133, 569