

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE

PRÉSENTE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN (BIOPHYSIQUE)

PAR

ROBERT CARPENTIER

Caractérisation des vésicules de lipides extraits du chloroplaste avec et sans chlorophylle a et photodécoloration de la chlorophylle a dans ces vésicules.

(Novembre 1980)

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

**Résumé:**\*

Des vésicules de lipides extraits du chloroplaste (extrait pigmenté et dépigmenté) ont été fabriquées. Des interactions ioniques causant l'agrégation des particules ont été remarquées à des concentrations en lipides supérieures à  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$  dans le cas des lipides dépigmentés. La diminution du rapport lipides: chlorophylle a en poids amène l'apparition d'une forme d'agrégation de chlorophylle absorbant à 700 nm.

La photodécoloration oxydative de la chlorophylle a a été étudiée dans ces vésicules. On suggère la présence d'agrégats dynamiques et statiques servant de pièges dissipateurs d'énergie qui protègent la chlorophylle de l'oxydation. La décoloration dans les vésicules est comparée à celle qui se produit dans d'autres systèmes.

John Gaudreault

Signature du candidat

Date: 19 mai 1981

Roger Belanger

Signature du directeur de recherche

Date: 19 mai 1981

Signature du co-auteur (s'il y a lieu)

Date:

Signature du co-directeur (s'il y a lieu)

Date:

AVANT-PROPOS

Le but du scientifique est d'explorer l'inconnu afin de mettre à jour la nature humaine et son milieu de vie. Néanmoins, pour chaque incertitude levée, quantité de nouvelles questions se posent. C'est pourquoi la connaissance de notre univers ne sera jamais totale. René Descartes avait bien dit que tout ce dont il pourrait être certain, et ainsi assumer comme étant la réalité, c'est qu'il pensait et de ce fait, existait.

Avant que j'écrive ce texte, le professeur Jacques Aghion de l'Université de Liège m'a souligné que l'on ne faisait pas de poésie ni de théologie. C'est pourquoi, si le lecteur éventuel trouve dans le texte qui suit quelque chose qui ressemble à de la poésie ou à de la théologie, qu'il ne s'y méprenne pas, il s'agit plutôt de philosophie.

L'intérêt du scientifique est de partager sa connaissance avec d'autres. C'est au niveau de l'échange international du savoir qu'il faut chercher l'avenir de la science. Dans cette optique, le travail présenté ici a été effectué en Belgique. C'est grâce à une entente culturelle belgo-qubécoise que cela a été rendu possible.

A ce niveau, je désire exprimer toute ma gratitude au professeur Jacques Aghion pour m'avoir accepté dans ses laboratoires. Au cours de mon séjour à Liège, il a été d'une extrême courtoisie et m'a apporté une aide inestimable.

Le professeur Roger M. Leblanc a déjà été remercié à plusieurs reprises par une quantité d'étudiants. Je voudrais le faire à nouveau, autant en une phrase qu'on le pourrait en mille pages. Il s'agit du "godfather" des étudiants gradués !

C'est, de plus, avec beaucoup d'émotion que je tiens à souligner mon amitié pour toute l'équipe de biochimie du professeur Aghion qui m'a offert un accueil empressé. Cela spécialement pour les docteurs Huguette Dijkmans et Monique Dinant à cause de l'aide et des conseils qu'elles m'ont apportés.

C'est à tous ces gens que revient le mérite de l'enthousiasme et de l'intérêt que j'ai porté à cette recherche. Etant donné les circonstances tout à fait spéciales dans lesquelles s'est déroulé ce travail et son époque, il revêt une valeur personnelle autre que celle reliée à son contenu.

## TABLE DES MATIERES

	page
AVANT-PROPOS .....	ii
TABLE DES MATIERES .....	iv
LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES TABLEAUX .....	x
 I - INTRODUCTION .....	 1
 II - MATERIEL ET METHODES .....	 5
1) Extraction des membranes chloroplastiques .....	5
2) Extraction et purification des lipides totaux .....	5
3) Dépigmentation (séparation) des lipides totaux .....	6
4) Extraction et purification de la chlorophylle <u>a</u> .....	8
A - Extraction des pigments photosynthétiques .....	8
B - Purification de la chlorophylle .....	8
5) Analyse des pigments .....	10
6) Fabrication des vésicules .....	10
A - Préparation et sélection des vésicules .....	10
B - Calibration de la colonne .....	12
7) Dosage des lipides totaux .....	13
8) Dosage des galacto- <u>et</u> sulfolipides .....	13
9) Dosage des phospholipides .....	14

	page
10) Dosage des chlorophylles .....	15
A - Dans les extraits contenant la chlorophylle <u>a</u> et <u>b</u> ....	15
B - Dans les extraits contenant la chlorophylle <u>a</u> .....	16
11) Photodécoloration de la chlorophylle <u>a</u> .....	16
12) Calcul du rendement quantique de la décoloration de chlorophylle <u>a</u> .....	18
13) Matériel et conditions expérimentales .....	22
 III - RESULTATS .....	 24
1) Caractérisation des extraits .....	24
A - Membranes chloroplastiques .....	24
B - Lipides totaux .....	24
C - Lipides dépigmentés .....	30
D - Chlorophylle <u>a</u> .....	34
2) Vésicules de lipides dépigmentés .....	37
A - Calibration de la colonne .....	37
B - Caractérisation des vésicules .....	37
C - Ajout de chlorophylle <u>a</u> .....	51
D - Photodécoloration de la chlorophylle <u>a</u> .....	60
3) Vésicules de lipides totaux .....	66
A - Caractérisation des vésicules .....	66
B - Photodécoloration de la chlorophylle <u>a</u> .....	66
4) Photodécoloration de la chlorophylle <u>a</u> dans les membranes chloroplastiques .....	71
5) Comparaison de la photodécoloration de la chlorophylle <u>a</u> dans les différents milieux .....	71

	Page
IV - DISCUSSION .....	78
1) Méthodes expérimentales et caractérisation des extraits et des vésicules .....	78
2) Photodécoloration de la chlorophylle <u>a</u> .....	87
V - CONCLUSION .....	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	99

## LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1. Schéma du montage pour la décoloration de la chlorophylle .....	17
Figure 2. Illustration de la relation entre le % de décoloration en fonction de l'intensité de la lumière incidente; le temps d'illumination étant le même à chaque intensité de la lumière incidente .....	20
Figure 3. Spectre des membranes chloroplastiques dans le tampon Tris-HCl 50 mM, KCl 10 mM, pH = 8,0 .....	25
Figure 4. Spectre des lipides totaux dans le chloroforme .....	26
Figure 5. Spectre des lipides totaux dans l'acétone .....	27
Figure 6. Chromatogramme des pigments des lipides totaux obtenus par la phase tert-butanol: pentane: acétone (1:18:1, v/v/v) .....	28
Figure 7. Chromatogrammes de dépigmentation des lipides totaux ..	31
Figure 8. Spectre des lipides dépigmentés dans le chloroforme: méthanol (2:1, v/v) .....	33
Figure 9. Spectre de la chlorophylle <u>a</u> dans l'acétone .....	35
Figure 10. Spectre de la chlorophylle <u>a</u> additionnée des lipides dépigmentés dans un rapport L:Ca en poids de 4,2:1,0 dans l'acétone .....	36
Figure 11. Calibration de la colonne Sépharose CL-2B (28,0 x 1,1 cm) .....	38
Figure 12. Elution des vésicules fabriquées selon les critères de départ .....	41
Figure 13. Elution des vésicules fabriquées dans le tampon Tris-HCl 50 mM + KCl 50 mM .....	42
Figure 14. Elution des vésicules. Quantité de lipides utilisés: a = 2,0 mg; b = 2,8 mg; c = 3,1 mg; d = 5,2 mg. Dimensions de la colonne: a et b = 1,1 x 26,7 cm; c et d = 0,9 x 24,0 cm. Tampon Tris-HCl 50 mM .....	44

Figure 15. Elution des vésicules. Quantité de lipides utilisés: a = 2,8 mg; b et c = 3,3 mg; conditions: a = Tris-HCl 50 mM; b = Tris-HCl 10 mM; c = eau distillée .....	45
Figure 16. Elution des vésicules. Quantité de lipides utilisés: a = 1,3 mg; b = 1,6 mg; c = 1,9 mg; d = 2,7 mg. Tampon Tris-HCl 10 mM. ....	46
Figure 17. Elution des vésicules. Quantité de lipides utilisés: a = 3,3 mg; b = 8,9 mg; c = 9,9 mg; Tampon Tris-HCl 10 mM .....	47
Figure 18. Elution des vésicules dans les conditions idéales .....	50
Figure 19. Spectre des vésicules de lipides dépigmentés dans le tampon Tris-HCl 10 mM .....	52
Figure 20. Elution des vésicules. Rapport L:Ca en poids: a = 4,5:1,0; b = 10,7:1,0; c = 160,0:1,0 .....	53
Figure 21. Spectre des vésicules de lipides dépigmentés additionnés de chlorophylle <u>a</u> dans un rapport L: <u>Ca</u> en poids de 4,7:1,0 .....	55
Figure 22. Spectre de lipides dépigmentés additionnés de chlorophylle <u>a</u> dans un rapport L: <u>Ca</u> en poids de 23,0:1,0 .....	56
Figure 23. Bande dans le rouge des vésicules de lipides dépigmentés additionnés de chlorophylle <u>a</u> . Les spectres ont été normalisés à 669 nm. ....	57
Figure 24. Spectre de différence entre les figures 20 et 21. Les spectres ont d'abord été normalisés à 670 nm .....	58
Figure 25. Spectre des vésicules de lipides dépigmentés additionnés de chlorophylle <u>a</u> . La chlorophylle <u>a</u> a été oxydée au cours des procédures expérimentales; L: <u>Ca</u> (6,0:1,0) .....	59
Figure 26. Décoloration de la chlorophylle <u>a</u> dans les vésicules de lipides dépigmentés avec une variation du rapport L: <u>Ca</u> .....	62

Figure 27. Décoloration de la chlorophylle <u>a</u> dans les vésicules de lipides dépigmentés avec des dilutions différentes de la suspension; L: <u>Ca</u> (12,3:1,0) .....	64
Figure 28. Décoloration de la chlorophylle <u>a</u> en solution dans l'acétone en présence des lipides dépigmentés et avec des dilutions différentes de la solution; L: <u>Ca</u> (4,1:1,0), <u>Ca</u> = 0,0165 mg ml <sup>-1</sup> .....	65
Figure 29. Spectre de la chlorophylle <u>a</u> en solution dans l'acétone avec les lipides dépigmentés après 30 minutes d'exposition à la lumière; L: <u>Ca</u> (4,5:1,0) .....	67
Figure 30. Spectre des vésicules de lipides pigmentés .....	68
Figure 31. Elution des vésicules de lipides pigmentés .....	69
Figure 32. Décoloration de la chlorophylle <u>a</u> dans les vésicules de lipides totaux avec différentes dilutions de la suspension .....	70
Figure 33. Décoloration de la chlorophylle <u>a</u> des lipides pigmentés en solution dans l'acétone avec les lipides pigmentés et pour différentes dilutions de la solution, <u>Ca</u> = 0,0140 mg ml <sup>-1</sup> .....	72
Figure 34. Décoloration de la chlorophylle <u>a</u> dans les membranes chloroplastiques avec différentes dilutions de la suspension .....	73
Figure 35. Décoloration de la chlorophylle <u>a</u> dans différents milieux .....	74

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I.	Bandes d'absorption des lipides totaux ..... 29
Tableau II.	Contenu lipidique de l'extrait total ..... 30
Tableau III.	Proportions entre les lipides dépigmentés ..... 32
Tableau IV.	Caractéristiques spectrales de la chlorophylle <u>a</u> dans le benzène ..... 34
Tableau V.	Coefficient de partage ( $\sigma$ ) et diamètre (D) des particules éluées ..... 39
Tableau VI.	Caractéristiques des diagrammes d'élution dans le tampon Tris-HCl 10 mM ..... 48
Tableau VII.	Principaux maximums de la chlorophylle <u>a</u> ajoutée aux lipides dépigmentés dans les vésicules ..... 60
Tableau VIII.	Caractéristiques de la décoloration de la chlorophylle <u>a</u> dans les vésicules de lipides dépigmentés additionnés de chlorophylle <u>a</u> ..... 63
Tableau IX.	Caractéristiques de la décoloration de la chlorophylle <u>a</u> dans les différents milieux ..... 76
Tableau X.	Rendement quantique de la décoloration de la chlorophylle <u>a</u> dans différents milieux ..... 77
Tableau XI.	Tableau comparatif des pièges dissipateurs d'énergie ..... 92

## I - INTRODUCTION

Il est bien connu que les composantes de l'appareillage photosynthétique relié à la phase lumineuse sont regroupées dans les thylakoides du chloroplaste (pour une revue de ce sujet voir Barber, 1978). La caractérisation de vésicules contenant la chlorophylle a (Nicholls et al., 1974; Lee, 1975a; Ritt et Walz, 1976; Fragata, 1977b; DeKok et al., 1978; Walz, 1976, 1979; Dijkmans et al., 1979a, b) fut une étape importante pour la concrétisation d'un modèle simplifié visant à étudier les interrelations entre les unités moléculaires participant à la photosynthèse. La position de la chlorophylle a dans ces bicouches lipidiques a été suggérée. Le groupement porphyrine serait situé parmi les têtes polaires des lipides alors que la chaîne phytol se placerait parmi les chaînes carbonées (Oettmeier et al., 1976; Fragata, 1977a et Luisetti et al., 1977).

Il a été montré par Tomkiewicz et Corker (1975) que des réactions photochimiques pouvaient avoir lieu dans ce type de système. Les réactions photosensibilisées par la chlorophylle constituent d'ailleurs un point de mire pour les utilisateurs de vésicules pigmentées (Mangel, 1976; Chen et Berns, 1979; Téchy et Aghion, 1979 et Leblanc et al., 1980).

De plus, comme la notion de transfert d'énergie a été souvent démontrée dans les vésicules (Mehreteab et Strauss, 1978 et Luisetti et al., 1978) et les membranes lipidiques noires (Strauss et Tien, 1973), il convient d'accepter le fait que de tels transferts puissent avoir lieu. L'augmentation de concentration de la chlorophylle dans la bicoche lipidique rapproche

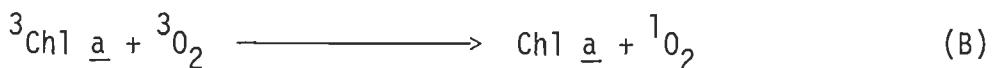
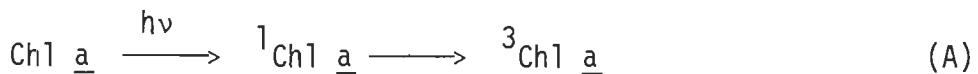
les molécules pigmentées et augmente la probabilité de transfert.

Par ailleurs, les propriétés spectroscopiques de la chlorophylle a ont été utilisées par Walz (1976, 1979) pour déceler les interactions entre la valinomycine et la lécithine dans les vésicules. De la même façon, il a aussi vérifié les états d'agrégation de la lécithine (Walz, 1977).

Fragata (1978) a utilisé la fluorescence chlorophyllienne pour se pencher sur les interactions entre la chlorophylle a et le  $\beta$ -carotène tandis que Colbow (1973) et Lee (1975b) ont utilisé cette technique pour observer les changements de phase des phospholipides dans les vésicules. D'un autre côté, plusieurs auteurs ont remarqué une diminution de l'intensité de fluorescence en augmentant la concentration chlorophyllienne (Lee, 1975a; Beddard et al., 1976; Fragata, 1977b; Mehreteab et Strauss, 1978; Dijkmans et al., 1979b; et Luisetti et al., 1979). Cet effet est interprété par la présence d'agrégats non fluorescents piégeant l'énergie émise par la forme monomérique fluorescente de la chlorophylle.

La photodécoloration de la chlorophylle dans les vésicules a été entreprise dernièrement par Stillwell et Tien (1977b), DeKok et al. (1978) et Dijkmans et al. (1979b). Elle avait été largement étudiée auparavant en solution dans les solvants organiques (Krasnovsky, 1960; Bellamy et Lynch, 1963; Stillwell et Tien, 1977b; et Koka et Song, 1978), sur des globules lipoprotéiques extraits du lait (Dinant et Aghion, 1975 et Widart et al., 1979), sur des globules de protéine grise du chloroplaste (Dinant et al., non publié), sur des quantasomes (Sauer et Calvin, 1962) et dans les chloroplastes (Thomas et Nijhuis, 1968).

Le mécanisme proposé pour cette photooxydation est le suivant :



où Chl a est la chlorophylle a à l'état fondamental,  ${}^1\text{Chl } \underline{\text{a}}$  à l'état singulet et  ${}^3\text{Chl } \underline{\text{a}}$  à l'état triplet;  ${}^1\text{O}_2$  et  ${}^3\text{O}_2$  sont respectivement l'oxygène à l'état singulet et triplet;  $\text{Chl } \underline{\text{a}} \cdot \text{O}_2$  est la chlorophylle a oxydée.

Ainsi, la chlorophylle a génère l'oxygène singulet (B) qui l'oxydera par la suite (C). Le rôle de la lumière se retrouve au niveau de l'excitation de la chlorophylle (A) dont l'énergie sera transférée à l'oxygène triplet (B) (voir Koka et Song, 1978).

L'intervention de l'oxygène pour ce processus se produisant dans les membranes lipidiques ne pose pas de problème. En effet, Kraljic et al. (1979) ont montré que l'oxygène singulet pouvait diffuser facilement à travers une paroi micellaire de Triton X-100 et McDonald et al. (1979) ont démontré avec des vésicules de L- $\alpha$ -dimyristoyl phosphatidylcholine que l'oxygène avait plus d'affinité pour la partie hydrophobe de la membrane que pour la partie polaire. On peut donc assumer que la diffusion de l'oxygène n'est pas un facteur limitatif.

Dijkmans et al. ont trouvé une diminution de décoloration avec l'augmentation de la concentration en chlorophylle dans les vésicules

de lécithine d'oeuf (Dijkmans et al., 1979b). Ils ont proposé qu'un mécanisme de dissipation d'énergie intervienne de façon similaire au cas présenté par Beddard et al.(1976) pour la fluorescence. La présente étude vise à vérifier si l'utilisation des lipides provenant des membranes chloroplastiques (extrait total et dépigmenté) dans la confection de vésicules contenant la chlorophylle a apportera des résultats semblables à ceux obtenus pour la lécithine. Cela sera vérifié au niveau de l'agrégation de la chlorophylle et de sa décoloration oxydative.

De plus, un des objectifs importants consiste à voir le niveau de protection en fonction de la présence des différents constituants membranaires des thylakoides. La progression de la "photopréservation" pour différents systèmes a été présentée comme suit par Stillwell et Tien (1977b):

Solution —————> Microvésicules —————> Quantasomes —————> Thylakoides .  
Chl a —————> + phospholipides —————> + lipoprotéines .  
+ caroténoides

D'autres environnements pour la chlorophylle seront étudiés afin de préciser les différents niveaux de protection. Par exemple, la décoloration chlorophyllienne sera suivie en solution dans les lipides dépigmentés et totaux, dans les vésicules de lipides totaux et dans les membranes chloroplastiques.

## II - MATERIEL ET METHODES

### 1) Extraction des membranes chloroplastiques

Les membranes du chloroplaste sont obtenues, selon Dinant et al. (non publié), à partir de 150 g de feuilles d'épinard broyées dans 250 ml de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, KCl 10 mM, saccharose 0,5 M (à 0°C) à l'aide d'un broyeur à hélice tranchante. Le broyat est sur 8 couches de gaze et une toile "blutex" à pores calibrés, puis il est centrifugé 15 min à 1 000 x g. Les culots sont remis en suspension dans 30 ml de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, KCl 0,15 M et centrifugé à 1 400 x g pendant 15 min. Ce lavage est répété 2 fois. Les culots résultants sont repris dans 30 ml de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, KCl 10 mM.

### 2) Extraction et purification des lipides totaux

Les lipides totaux s'obtiennent comme proposé par Dinant et al. (non publié). La suspension de membranes chloroplastiques est centrifugée 15 min à 34 000 x g. Les culots sont dispersés à l'aide d'un Potter dans 80 ml de mélange chloroforme:méthanol (2:1, v/v) saturé d'azote à 0°C.

La dispersion est filtrée sous vide sur un filtre en verre fritté 17D3 et répartie dans des tubes à centrifuger. Un cinquième de volume d'une solution aqueuse de  $MgCl_2$  0,4 mg ml<sup>-1</sup> est ajoutée. Après une vive agitation, les tubes sont centrifugés 10 min à 4 400 x g.

Deux phases sont ainsi séparées, la phase supérieure (aqueuse) est aspirée à l'aide d'une pipette Pasteur et éliminée. L'interface est alors lavée avec la phase supérieure du mélange chloroforme:méthanol:eau (8:4:3, v/v/v) décantée. Cet extrait est filtré sous vide sur un filtre en verre fritté 3D4 et évaporé à sec à l'aide d'un roto-évaporateur à 37<sup>0</sup>C, sous flux d'azote.

Le résidu lipidique est repris dans le chloroforme. Cet extrait est saturé d'azote et conservé à -14<sup>0</sup>C.

### 3) Dépigmentation (séparation) des lipides totaux

La dépigmentation s'effectue par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Les plaques sont préalablement lavées pour les débarrasser d'une impureté soluble dans les solvants organiques. Ce prélavage est fait par le mélange chloroforme:méthanol (2:1, v/v).

Les plaques sont activées dans une étuve à 100-110<sup>0</sup>C pendant 20 minutes et mises dans un dessicateur 10 min à 25<sup>0</sup>C et 10 min à 0<sup>0</sup>C. Une fraction aliquote de 100 µl (~ 4 mg de lipides) d'extrait total est déposée à 2 cm de la base des plaques. Les chromatogrammes sont développés dans des chambres à couche mince équilibrées à 0<sup>0</sup>C et dont l'atmosphère est en équilibre avec la phase de développement.

Méthode 1 : Une première migration est effectuée avec le mélange acétone:acide acétique:eau (100:2:1, v/v/v) jusqu'à 11,5 cm du trait de déposition (30 min). Les plaques sont ensuite coupées à 8,0 cm du point de départ.

La partie supérieure est développée par la phase chloroforme:méthanol:acide acétique:eau (170:25:25:6, v/v/v/v) jusqu'à 7,5 cm de la base (20 min).

Méthode 2 : Un développement est produit par la phase acétone:benzène:eau (90:30:8, v/v/v) comme proposé par Pohl et al. (1970). La migration est arrêtée à 9,0 cm du trait de déposition (30 min).

Les plaques sont révélées par l'acide phosphomolybdique ( $100 \text{ mg ml}^{-1}$  dans l'éthanol) qui permet de détecter toutes les substances organiques. Les zones contenant les lipides non pigmentés sont grattées et lavées avec le mélange chloroforme:méthanol (65:25, v/v) en filtrant sous vide sur un filtre en verre fritté 3D3. La solution lipidique résultante est évaporée à sec dans un roto-évaporateur à  $37^{\circ}\text{C}$ , sous flux d'azote. Le résidu est repris dans le chloroforme saturé d'azote et conservé à  $-14^{\circ}\text{C}$ .

#### 4) Extraction et purification de la chlorophylle a

La chlorophylle est extraite et purifiée selon la méthode présentée par Omata et Murata (1980). Toutes les opérations sont réalisées à 4°C.

##### A - Extraction des pigments photosynthétiques

50 g de feuilles d'épinard sont broyées dans 200 ml d'acétone. L'homogénat est filtré sur 8 couches de gaze et centrifugé 10 min à 6 000 x g. Un septième de volume de dioxane est ajouté au surnageant en agitant puis un tiers de volume d'eau goutte à goutte. La solution est entreposée 30 min à -13°C. Un volume de 10 à 20 ml d'eau est ensuite ajouté goutte à goutte et le tout est de nouveau laissé 30 min à -13°C.

Les cristaux de chl-dioxane qui sont ainsi formés sont centrifugés 30 min à 48 000 x g et dissous dans 50 ml d'acétone. Un volume de 10 ml de dioxane est ensuite ajouté en agitant et un autre de 20 à 25 ml d'eau goutte à goutte. Le mélange est entreposé 15 min à -13°C et centrifugé 30 min à 48 000 x g. Le culot de pigments recristallisés est alors séché sous vide pendant 2 à 3 heures.

##### B - Purification de la chlorophylle

Les cristaux de pigments sont dissous dans 1,5 à 2,0 ml d'acétone sèche et déposés sur une colonne de DEAE-sépharose CL-6B (2,5 x 2,5 cm)

préparée comme suit :

Le gel est placé dans un entonnoir Büchner et lavé sous vide avec les solvants suivants en succession: eau distillée, tampon acétate de sodium 1 M à pH 7,0, eau distillée, eau:acétone (2:1, v/v), eau:acétone (1:2, v/v) et acétone sèche. Le gel est alors introduit dans la colonne.

La colonne est lavée avec de l'acétone sèche qui éluie tous les caroténoides. Ensuite, les chlorophylles sont éluées avec un mélange acétone:méthanol (10:3, v/v).

Les fractions contenant les chlorophylles sont évaporées à sec au roto-évaporateur (sous flux d'azote à 37°C). Le résidu est repris dans 2 ml d'un mélange hexane:iso-propanol (40:1, v/v) sec et déposé sur une colonne de sépharose CL-6B (2,5 x 19,0 cm) préparée comme suit:

Le gel est placé dans un entonnoir Büchner et lavé sous vide avec les solvants suivants en succession: eau distillée, eau:acétone (2:1, v/v), eau:acétone (1:2, v/v) et acétone sèche. Le gel est alors introduit dans la colonne qui est ensuite lavée avec les solvants suivants qui doivent être secs: acétone:hexane (2:1, v/v), acétone:hexane (1:2, v/v), hexane, hexane:iso-propanol (50:1, v/v) et hexane:iso-propanol (40:1, v/v).

La colonne est développée avec le mélange hexane:iso-propanol (40:1, v/v). La chl a est ainsi éluée. La chlorophylle b peut être extraite par la suite avec le mélange hexane:iso-propanol (10:1, v/v). Les fractions de chlorophylle a sont évaporées et reprises dans un petit volume d'acétone.

Deux volumes d'iso-octane sont ajoutés à l'extrait puis environ dix volumes d'eau. La phase aqueuse est décantée et l'opération est répétée cinq fois. L'extrait est alors entreposé à -13°C pour une nuit puis centrifugé 30 min à 48 000 G. Les cristaux du culot sont séchés sous vide pendant 12 heures.

### 5) Analyse des pigments

Les pigments extraits sont séparés par chromatographie sur couche mince de gel de silice selon la méthode de Shiraki et al. (1978).

Une fraction aliquote est déposée à 1,5 cm de la base d'une plaque de 2,5 x 10,0 cm. L'élution est effectuée par la phase tert-butanol: pentane:acétone (1:18:1, v/v/v) pendant environ 10 min (7 cm).

### 6) Fabrication des vésicules

#### A- Préparation et sélection des vésicules

Les vésicules sont fabriquées selon la méthode de Batzi et Korn (1973). Une fraction aliquote de 1,2 à 1,8 mg d'extrait lipidique est évaporée sous flux d'azote et reprise dans 2 ml d'éthanol saturé d'azote.

La solution est concentrée jusqu'à 150 à 250 µl sous flux d'azote et injectée rapidement à l'aide d'une seringue (diamètre interne de l'aiguille = 0,25 mm) dans 20 ml de tampon Tris-HCl 10 mM à pH 8,0.

La suspension de vésicules ainsi formée est concentrée jusqu'à 2 ml dans un appareil d'ultra-filtration Amicon, modèle 12 (capacité = 10 ml) pourvu d'une membrane XM 100 A, sous une pression d'azote de 0,7 kg cm<sup>-2</sup>.

Le concentré est déposé sur une colonne de sépharose CL-2B (25,0-28,0 x 0,9-1,1 cm) préparée comme suit:

Le gel est dilué plusieurs fois dans l'eau distillée à température de la pièce. Il est ensuite introduit dans la colonne qui est alors lavée par plusieurs fois son volume de tampon Tris-HCl 10 mM à pH 8,0.

Les vésicules sont éluées avec le même tampon que celui qui sert à les faire. Des fractions de 1 ml sont recueillies. Le diagramme d'éolution est tracé soit en mesurant l'absorbance à 260 nm (pour l'absorption des lipides) pour les lipides dépigmentés et à 669 nm (pour l'absorption de la chl a) pour les lipides pigmentés, soit en dosant les galacto- et sulfolipides dans les différentes fractions.

Lorsque la chlorophylle doit être incorporée dans les vésicules de lipides dépigmentés, la quantité voulue est ajoutée aux lipides en solution dans 2 ml d'éthanol.

### B - Calibration de la colonne

La colonne est calibrée pour déterminer le diamètre des particules éluées (vésicules) dans chaque fraction.

A 1 ml de bleu dextran 25 mg ml<sup>-1</sup> est ajouté 1 ml de ferricyanure de potassium 20 mg ml<sup>-1</sup> (solutions aqueuses). Les 2 ml résultants sont déposés sur la colonne qui est éluée avec de l'eau distillée. L'absorbance des fractions de 1 ml recueillies est mesurée à 610 nm (absorption du bleu dextran) et à 420 nm (absorption du ferricyanure de potassium). Dans les mesures ultérieures, le volume déposé sur la colonne sera toujours de 2 ml.

Ackers (1967) définit un coefficient de partage (de distribution)  $\sigma$  :

$$\sigma = \frac{V_e - V_o}{V_s - V_o}$$

où  $V_o$  = volume d'exclusion (volume où s'éluent les particules de grosseur telle qu'elles sont exclues du gel) donné par les fractions contenant le bleu dextran (ml);

$V_s$  = volume de "sel" (correspondant à l'élution complète du contenu de la colonne) donné par les fractions contenant le ferricyanure de potassium (ml);

$V_e$  = volume d'élution (volume interne) des particules étudiées (ml).

La formule suivante calculée d'après Prestegard et Fellmeth (1974) permet de calculer le diamètre ( $D$ ) des particules s'éluant dans une fraction donnée :  $D$  (nm) =  $0,2(290;33 - 347,70 \sigma)$ .

7) Dosage des lipides totaux

Une fraction aliquote de l'extrait de lipides totaux est évaporée à sec dans un récipient taré et pesée.

8) Dosage des galacto- et sulfolipides

Un volume connu de l'extrait est évaporé dans un bain-marie bouillant. Dans le cas de vésicules en suspension aqueuse, les lipides sont extraits par un mélange de chloroforme:méthanol (2:1, v/v). La phase chloroformique est recueillie. Cette opération permet de réduire le volume à évaporer et facilite son évaporation.

Le résidu est dosé selon la méthode de Noviskaya et Rutskaya (1976) en ajoutant 1 ml d'eau distillée, 1 ml de phénol aqueux ( $50 \text{ mg ml}^{-1}$ ) et 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré (36 M). La solution est agitée au Vortex. Après une période d'incubation de 30 min à température de la pièce, l'absorbance est mesurée à 490 nm.

Le calcul de la concentration est fait à partir d'une courbe d'étalement établie avec du galactose:

$$\frac{A_{490}}{0,00525} = C$$

où C = concentration du galactose ( $\text{mg ml}^{-1}$ )  
 $A_{490}$  = absorbance à 490 nm.

Le dosage décèle les galactolipides et les sulfolipides.  
 En multipliant le poids de galactose obtenu par 3,5, on obtient le poids

des galacto- et sulfolipides; ce facteur tenant compte de la fraction molaire des différents constituants galactosiques dans l'extrait.

### 9) Dosage des phospholipides

Une fraction aliquote est évaporée comme pour le dosage du galactose. L'hydrolyse des phospholipides, selon Chen et al. (1956), est effectuée dans un tube à essais de Pyrex. Quatre gouttes de  $H_2SO_4$  concentré (36 M) sont ajoutées. L'extrait est chauffé sur bec Bunsen jusqu'à ce que le liquide soit carbonisé. Puis, 2 gouttes de peroxyde d'hydrogène:eau (3:7, v/v) sont ajoutées. Le tube est chauffé jusqu'à la décoloration du liquide et le volume est amené à 5 ml avec de l'eau distillée.

Le dosage proprement dit du phosphore est opéré selon Ames et Dubin (1960). A 0,6 ml de solution de phosphate est ajouté 1,4 ml du réactif suivant: 1 volume d'ascorbate aqueux à  $100\text{ mg ml}^{-1}$  plus 6 volumes de molybdate d'ammonium à  $4,2\text{ mg ml}^{-1}$  dans l'acide sulfurique 1 M. Le mélange est agité puis incubé pendant 20 min à  $45^{\circ}\text{C}$ . L'absorbance est alors mesurée à 820 nm.

Le poids de phosphate est calculé d'après une courbe d'étalonnage établie avec du phosphate :

$$\frac{A_{820(0,5 \text{ cm})}}{0,118} = C$$

où  $A_{820(0,5 \text{ cm})}$  = absorbance à 820 nm avec un parcours optique de 0,5 cm.  
 $C$  = concentration de phosphore ( $\text{mg ml}^{-1}$ )

Le poids de phospholipides est obtenu en multipliant la concentration obtenue par 25,3.

#### 10) Dosage des chlorophylles

##### A - Dans les extraits contenant de la chlorophylle a et b

Les chlorophylles a et b dans les extraits de lipides totaux sont dosées dans l'acétone:eau (8:2, v/v) en utilisant les formules suivantes tirées des coefficients de Vernon (Holden, 1976) :

$$\text{Chl } \underline{a} \quad (\text{mg ml}^{-1}) = 11,63 (A_{665}) - 2,39 (A_{649})$$

$$\text{Chl } \underline{b} \quad (\text{mg ml}^{-1}) = 20,11 (A_{649}) - 5,18 (A_{665})$$

$$\text{Chl totale } (\text{mg ml}^{-1}) = 6,45 (A_{665}) + 17,72 (A_{649})$$

où  $A_{649}$  = absorbance à 649 nm

$A_{665}$  = absorbance à 665 nm

Dans le cas des vésicules de lipides totaux, les lipides sont préalablement extraits par le mélange chloroforme:méthanol (2:1, v/v) de la façon suivante:

1,5 ml de solvant est ajouté à 0,5 ml de vésicules. Le mélange est centrifugé 10 min à 4 400 x g après une forte agitation. La phase inférieure est recueillie et évaporée à sec sous flux d'azote puis reprise dans l'acétone (8:2, v/v).

### B - Dans les extraits contenant la chlorophylle a

Une quantité donnée de chlorophylle a cristalline est pesée à  $\pm 0,005$  mg et mise en solution dans un volume connu de chloroforme. L'absorbance est mesurée au maximum d'absorption dans le rouge et le coefficient d'absorption spécifique ( $\alpha$ ) est alors calculé d'après la relation de Beer-Lambert:

$$\alpha = \frac{A}{dC}$$

où A = absorbance au maximum dans le rouge  
 d = longueur du parcours optique (cm)  
 C = concentration en chlorophylle ( $\text{mg ml}^{-1}$ )

Ce coefficient permet de calculer la concentration en chlorophylle de toute solution dans le chloroforme.

Dans le cas où la chlorophylle est incorporée dans des vésicules, elle est d'abord extraite de 0,5 ml de suspension de vésicules dans 1,5 ml du mélange chloroforme:méthanol (2:1, v/v). Après centrifugation (10 min à 4 400 x g), la phase chloroformique est recueillie et l'absorbance mesurée.

### 11) Photodécoloration de la chlorophylle a

Le dispositif utilisé pour étudier la décoloration de la chlorophylle est représenté sur la figure 1. La source lumineuse (A) est une lampe quartz halogène Sylvania de 250 W à laquelle est appliquée un voltage de 20 volts. Une cuve à eau à faces parallèles et de 5 cm d'épaisseur (B) est

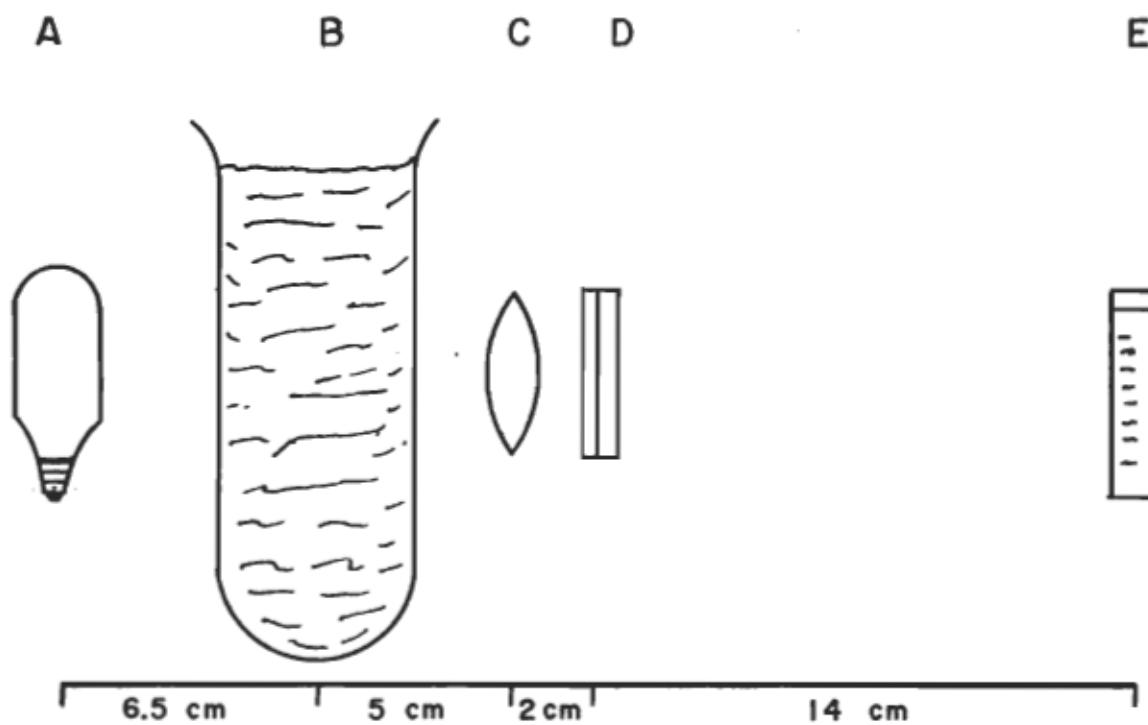


FIGURE 1. Schéma du montage pour la décoloration de la chlorophylle.

interposée pour refroidir le rayonnement. Elle est elle-même refroidie par un ventilateur. Une lentille convergente (C) amène le faisceau lumineux sur la cuvette de mesure. Une bande passante est délimitée entre 600 et 800 nm par un filtre rouge et un filtre infrarouge (Calflex) (D). La cellule de mesure est illustrée en E.

L'énergie incidente est mesurée grâce à une photopile (Kipp) placée à la place de la cellule de mesure lors de l'exposition à la lumière. Cette photopile est reliée à un voltmètre Servotrace Sefram de type PE.

La relation suivante permet de calculer l'intensité de la lumière incidente :

$$I_0 \text{ (W m}^{-2}\text{)} = \frac{V(\text{mV}) \times 10^2}{3,06}$$

où  $V(\text{mV})$  = voltage mesuré par le voltmètre relié à la photopile.  
Dans les cas présentés ici, elle est de  $600 \pm 50 \text{ W m}^{-2}$ .

La décoloration de la chlorophylle est suivie pendant 30 min. Elle est exprimée en pourcentage de chlorophylle décolorée à son maximum dans le rouge en fonction du temps.

## 12) Calcul du rendement quantique de la décoloration de chlorophylle a

Le rendement quantique de la décoloration est défini comme le nombre de molécules de chlorophylle a décolorées par photon absorbé par la chlorophylle a à une longueur d'onde déterminée. Pour calculer le nombre de photons

absorbés, l'ensemble filtre rouge et filtre Calflex est remplacé par un filtre interférentiel sur le dispositif de la figure 1. Ce filtre sélectionne à  $\pm 10$  nm la longueur d'onde choisie au maximum d'absorption de la chlorophylle a dans le système étudié.

La décoloration est tracée en fonction du temps. Un point est choisi sur la portion linéaire de cette courbe pour connaître le pourcentage de chlorophylle a décolorée pendant un temps d'illumination donné.

Les mesures doivent être faites à une intensité lumineuse non saturante pour que la décoloration de la chlorophylle soit proportionnelle à l'énergie incidente. Le pourcentage de décoloration, après un temps fixe déterminé d'illumination, varie selon l'intensité de la lumière incidente ( $I_0$ ) comme illustré d'une façon générale sur la figure 2. C'est dans la partie de la courbe où le pourcentage de décoloration varie linéairement avec  $I_0$  qu'il faut étudier le rendement quantique de photodécoloration de la chlorophylle. L'intensité de la lumière peut être réduite à volonté en interposant des négatifs de diapositive plus ou moins exposés.

Le rendement quantique de la décoloration ( $\phi$ ) est calculé comme suit :

A - Intensité incidente ( $I_0$ ) :

Elle est calculée comme précédemment.

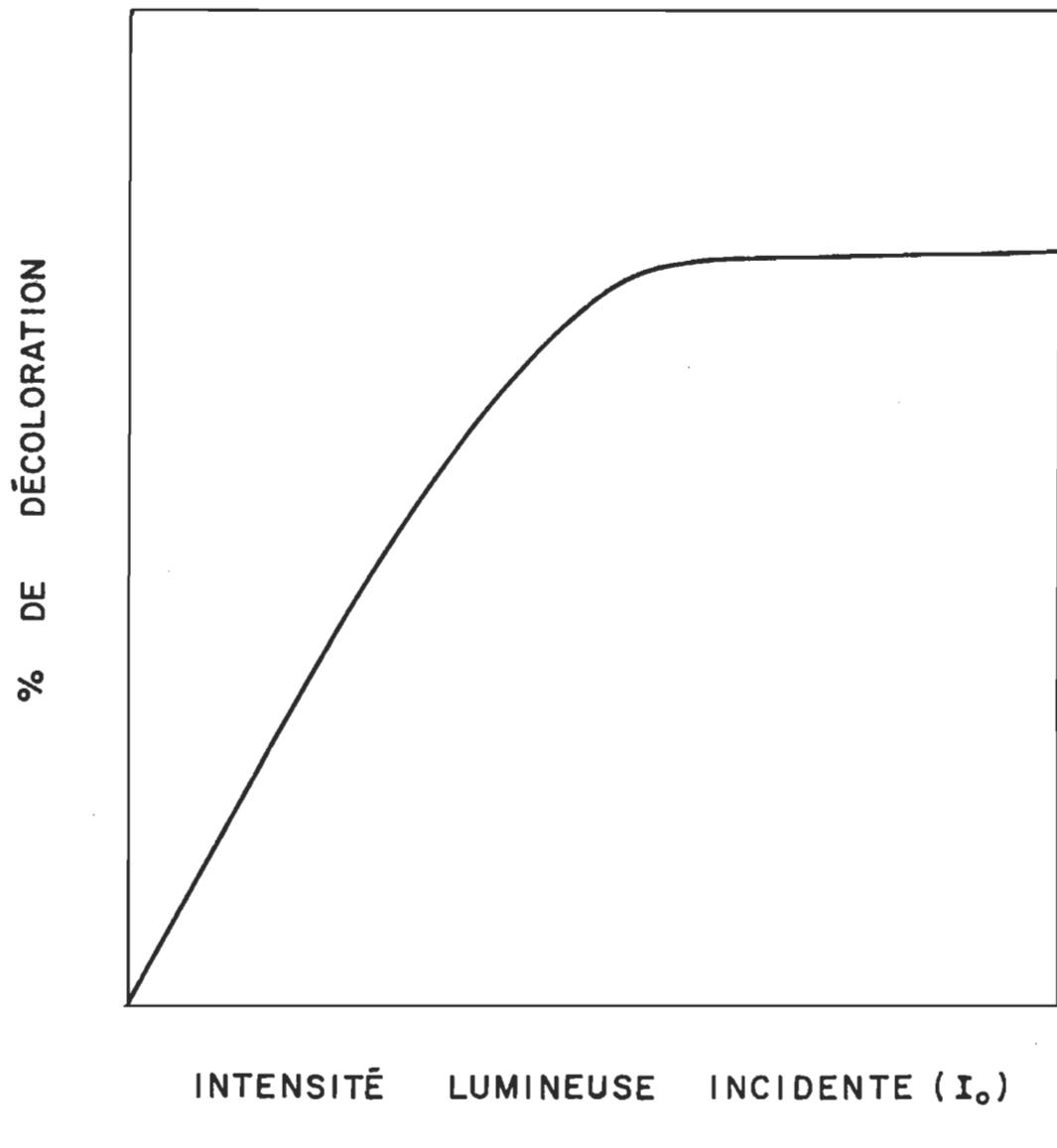


FIGURE 2. Illustration de la relation entre le % de décoloration en fonction de l'intensité de la lumière incidente; le temps d'illumination étant le même à chaque intensité de la lumière incidente.

B - Intensité incidente absorbée ( $I_A$ ) :

$$A_{\max} = \log \frac{I_0}{I_N}$$

$$\text{donc } \log I_0 - A_{\max} = \log I_N$$

où  $A_{\max}$  = absorbance de la chlorophylle a à son maximum d'absorption ayant la décoloration

$I_N$  = intensité lumineuse non absorbée

$$\text{et } I_0 - I_N = I_A' \text{ (W m}^{-2}\text{)}$$

L'intensité  $I_A'$  doit être multipliée par la surface de la cellule pour calculer l'intensité lumineuse absorbée par la chlorophylle a par seconde ( $I_A$ ),

$$I_A' \times 2,5 \times 10^{-4} \text{ m}^2 = I_A \text{ (W)}$$

C - Energie d'un quantum incident (Eq) :

$$Eq = h\nu \text{ où } h = \text{cste de Planck} = 6,625 \times 10^{-34} \text{ (J s)}$$

$$\nu = \frac{c}{\lambda} = \frac{\text{vitesse de la lumière}}{\text{longueur d'onde}} = \frac{3 \times 10^8 \text{ (m s}^{-1}\text{)}}{\lambda}$$

$$Eq = \frac{6,625 \times 10^{-34} \times 3 \times 10^8 \times 10^{-2}}{\lambda} = \frac{19,875 \times 10^{-27}}{\lambda} \text{ (J s)}$$

où  $\lambda$  est donné en mètre.

D - Nombre de quanta absorbé par seconde (Nq) :

$$Nq = \frac{I_A}{Eq}$$

E - Nombre de molécules de chlorophylle a dans le milieu (Nc) :

$$\frac{C}{P.M.} = z \text{ mol ml}^{-1}$$

où C concentration de chlorophylle a en  $\text{mg ml}^{-1}$

P.M. poids moléculaire de la chlorophylle a ( $893 \text{ mg mol}^{-1}$ )

$$z \text{ mol ml}^{-1} \times 6,024 \times 10^{23} = y \text{ molécules ml}^{-1}$$

Comme le volume standard utilisé est de 1,25 ml (cellule de d = 0,5 cm)

$$y \text{ molécules ml}^{-1} \times 1,25 \text{ ml} = Nc$$

F - Rendement quantique ( $\Phi$ ) :

Pour un pourcentage de décoloration D après un temps T (s)

$$\Phi = \frac{D}{T} \times \frac{Nc}{Nq}$$

### 13) Matériel et conditions expérimentales

Tous les réactifs et solvants proviennent de chez Merck (Darmstadt) sauf le peroxyde d'hydrogène, le chlorure de potassium et le ferricyanure de potassium qui sont des produits UCB (Union Chimique Belge). Ils sont de qualité "pro analysi".

Les gels et le bleu dextran sont achetés chez Pharmacia Fine Chemicals et les plaques de gel de silice chez Macherey-Nagel (Polygram). L'azote provient de l'Air Liquide Belge.

Les spectres d'absorption sont enregistrés sur un appareil Safas (Monaco) 1700. Les mesures d'absorbance ponctuelles sont réalisées avec un spectrophotomètre Zeiss PMQII ou Hitachi 101. Dans le cas des suspensions, la cellule de référence contient le tampon correspondant.

Une correction est faite pour la diffusion de la lumière dans les suspensions dans les cas des mesures ponctuelles d'absorbance. La diffusion est mesurée à 800 nm où l'absorption est nulle. Cette valeur est soustraite de l'absorbance obtenue à une longueur d'onde déterminée. Cette correction vise à éliminer la fraction de l'absorbance qui ne peut être diminuée par la décoloration de la chlorophylle a parce qu'il s'agit de diffusion de lumière. De la sorte, les pourcentages de décoloration chlorophyllienne sont plus près de la réalité. Une légère erreur est néanmoins introduite dans le calcul du rendement quantique et du pourcentage de décoloration par le fait que cette correction ne tienne pas compte de l'augmentation de la diffusion de la lumière lorsqu'on déplace la longueur d'onde vers le bleu.

Dans toutes les opérations, les lipides (pigmentés ou non) sont protégés de la lumière. Les expériences sont menées à température de la pièce et les centrifugations sont effectuées à 10<sup>0</sup>C.

### III - RESULTATS

#### 1) Caractérisation des extraits

##### A - Membranes chloroplastiques

Les membranes chloroplastiques en suspension dans le tampon Tris-HCl 50 mM, KCl 10 mM, pH 8,0, présentent le spectre de la figure 3. On remarque les principaux maximums de la chlorophylle a à 679 nm et 436 nm; la chlorophylle b se signale par un épaulement à 650 nm. La présence des caroténoides est soulignée par leur absorbance entre 460 et 510 nm.

##### B - Lipides totaux

L'extrait des lipides totaux contient essentiellement les lipides solubles dans le chloroforme-méthanol. Son spectre d'absorption dans le chloroforme est représenté sur la figure 4 et dans l'acétone sur la figure 5. L'attribution des différents maximums aux différents pigments est donnée dans le tableau I.

D'un autre côté, la chromatographie (Shiraki et al, 1978) permet de séparer les différents pigments (figure 6). On remarque la présence des xanthophylles (néoxanthine, violoxanthine et lutéine) en plus des carotènes. Il apparaît une faible quantité de phéophytine qui a pu se former lors de la déposition et du développement.

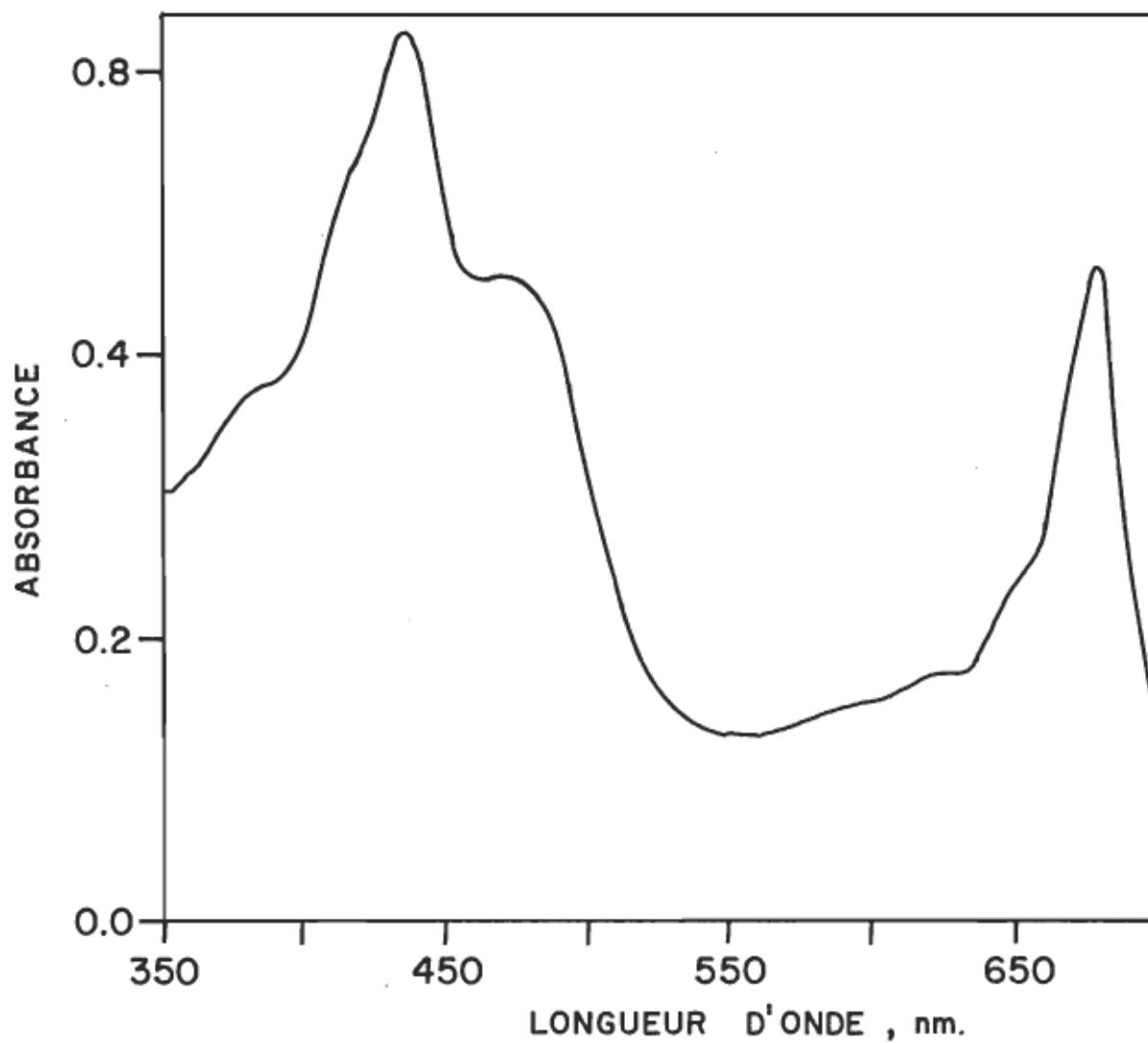


FIGURE 3. Spectre des membranes chloroplastiques dans le tampon Tris-HCl 50 mM, KCl 10 mM,  
pH = 8,0.

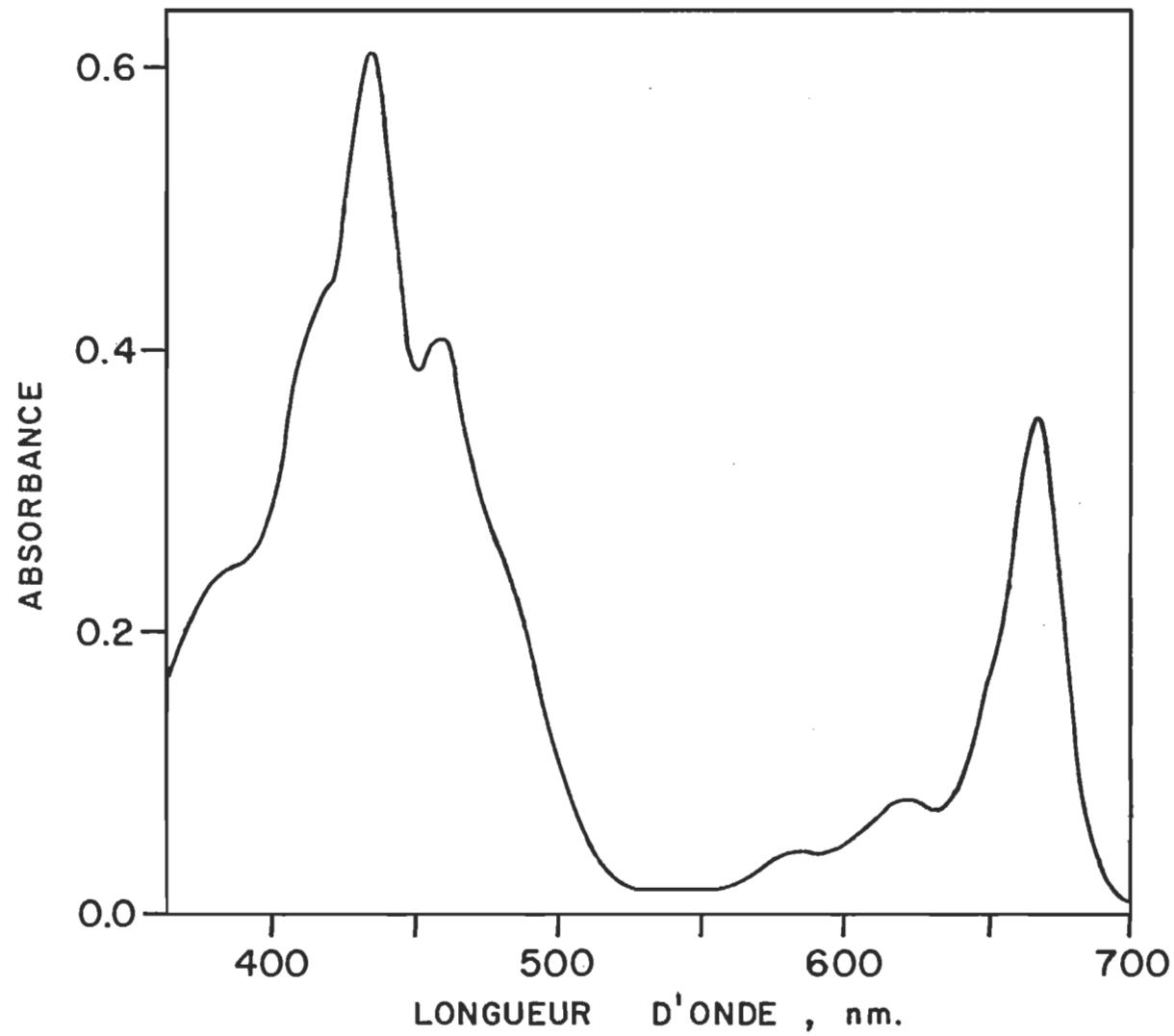


FIGURE 4. Spectre des lipides totaux dans le chloroforme.

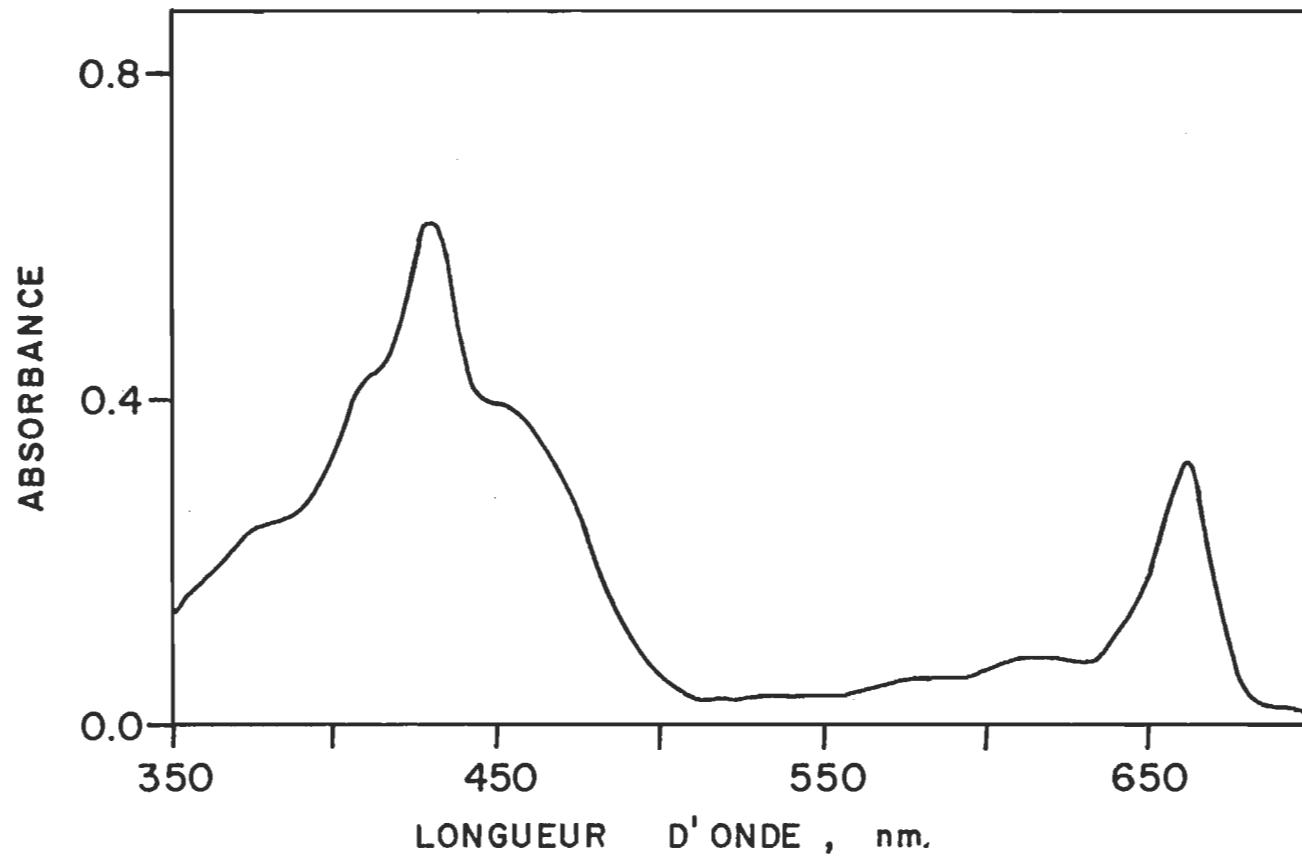


FIGURE 5. Spectre des lipides totaux dans l'acétone.

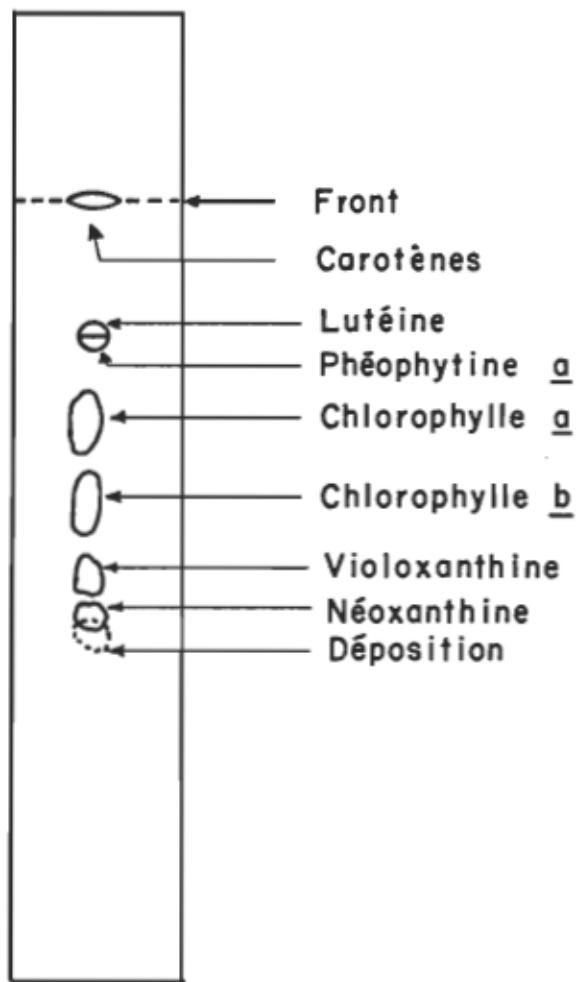


FIGURE 6. Chromatogramme des pigments des lipides totaux obtenus par la phase tert-butanol: pentane: acétone (1:18:1, v/v/v).

Tableau I : Bandes d'absorption des lipides totaux

Longueur d'onde (nm)		Pigment ***
Chloroforme	Acétone	
663 (P)*	661 (P)	Ca **
651 (E)	640 (E)	Cb
615 (P)	615 (P)	Ca
581 (P)	578 (P)	Ca (Cb)
478 (E)	480 (E)	Carot
	465 (E)	Carot
456 (P)	450 (P)	Carot (Cb)
431 (P)	430 (P)	Ca
412 (E)	410 (E)	Ca
381 (E)	380 (E)	Ca

\* (P) = pic ; (E) = épaulement

\*\* Abréviations : Ca = chlorophylle a; Cb = chlorophylle b;  
Carot = caroténoides.

\*\*\* French (1960); Davies (1976) et North et al. (1978).

Les dosages permettent d'évaluer la quantité relative de quelques lipides (moyenne d'une quinzaine d'extractions) (tableau II). Il faudrait ajouter à la liste du tableau II les caroténoides, les quinones, les stérols et d'autres lipides variés non dosés par les méthodes utilisées ici. Les données sont comparées à celles de Lichtenhaler et Park (1963).

Tableau II : Contenu lipidique de l'extrait total

Lipide	Poids total (mg)	%	% Référence
GSL*	68	34	45
PL	23	11	9
Ca	20	10	14
Lt	200	100	100
GSL:PL	-	3:1	5:1

\* Abréviations : GSL = galacto- et sulfolipides; PL = phospholipides;  
Lt = lipides totaux.

### C) Lipides dépigmentés

Les deux méthodes de dépigmentation de l'extrait total sont comparées sur la figure 7. La résolution est aussi bonne avec l'une comme l'autre des deux méthodes bien que la méthode I demande beaucoup plus de temps.

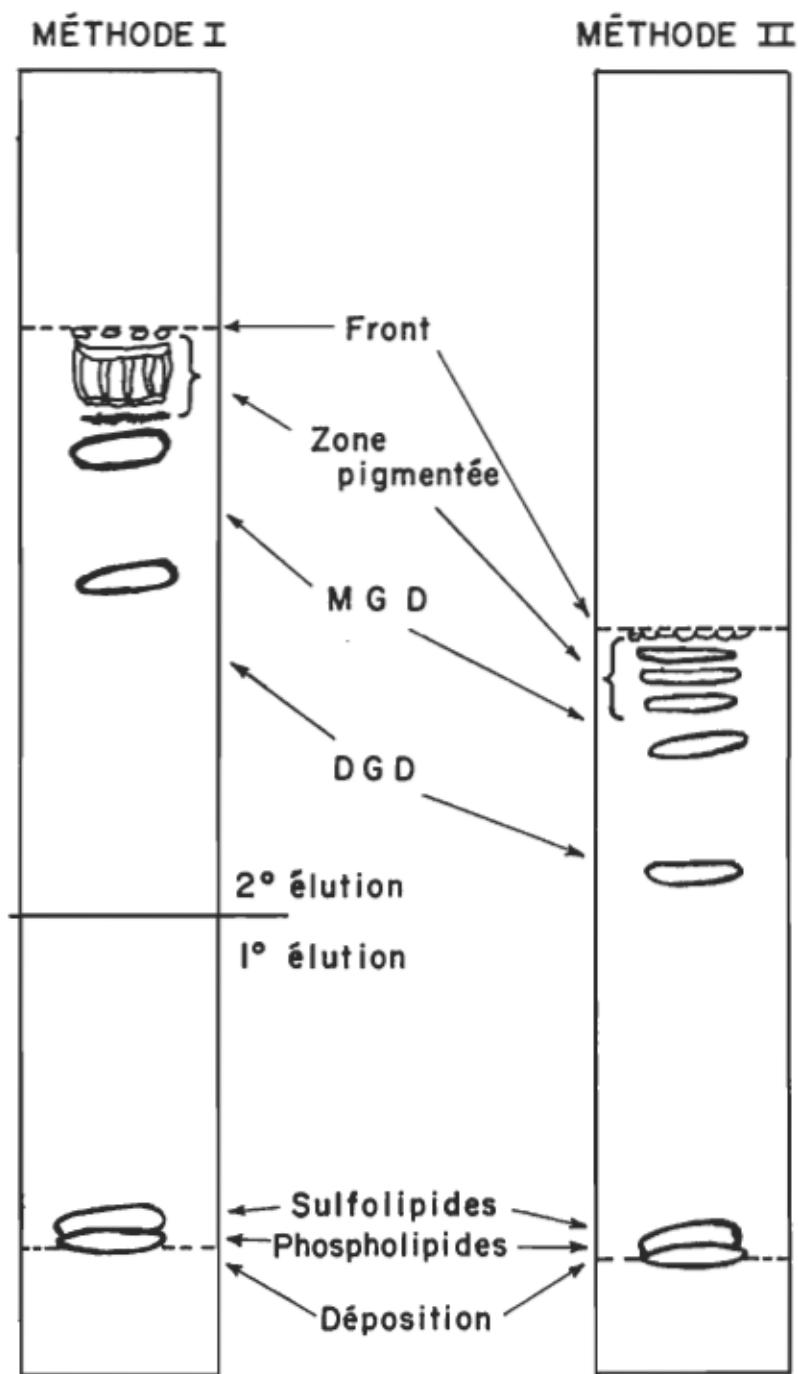


FIGURE 7. Chromatogrammes de dépigmentation des lipides totaux.

C'est donc la méthode II qui a été la plus utilisée. Ces chromatogrammes contiennent en plus quelques autres bandes non pigmentées, non montrées ici. Ces bandes, de bien moindre importance, sont celles des lipides présents en faible quantité dans les membranes chloroplastiques et/ou de produits de dégradation.

Les lipides obtenus présentent une faible coloration jaunâtre dont le spectre d'absorption amplifié dans le  $\text{CHCl}_3$ : méthanol (2:1, v/v) est montré sur la figure 8. Notons qu'il n'y a aucune absorption aux longueurs d'onde supérieures à 500 nm. Les principaux pics (428, 404 et 380 nm) correspondent au spectre d'absorption de l'auroxanthine dans ce même solvant. La quantité d'impureté est cependant très minime comparée aux autres lipides présents (moins de 1%). L'incapacité de débarrasser notre extrait de ce pigment provient du fait qu'il migre avec le MGD.

L'extrait dépigmenté à partir de 30 à 35 mg de lipides totaux contient de 10 à 15 mg de lipides dont le rapport GSL:PL en poids est d'environ 13:2. Le tableau III donne les proportions des différents lipides dosés par les méthodes utilisées ici (moyenne d'une quinzaine d'extraits).

Tableau III: Proportions entre les lipides dépigmentés

Quantité relative en poids (mg)	MGD*	3,5
	DGD	2,0
	SL	1,0
	PL	1,0

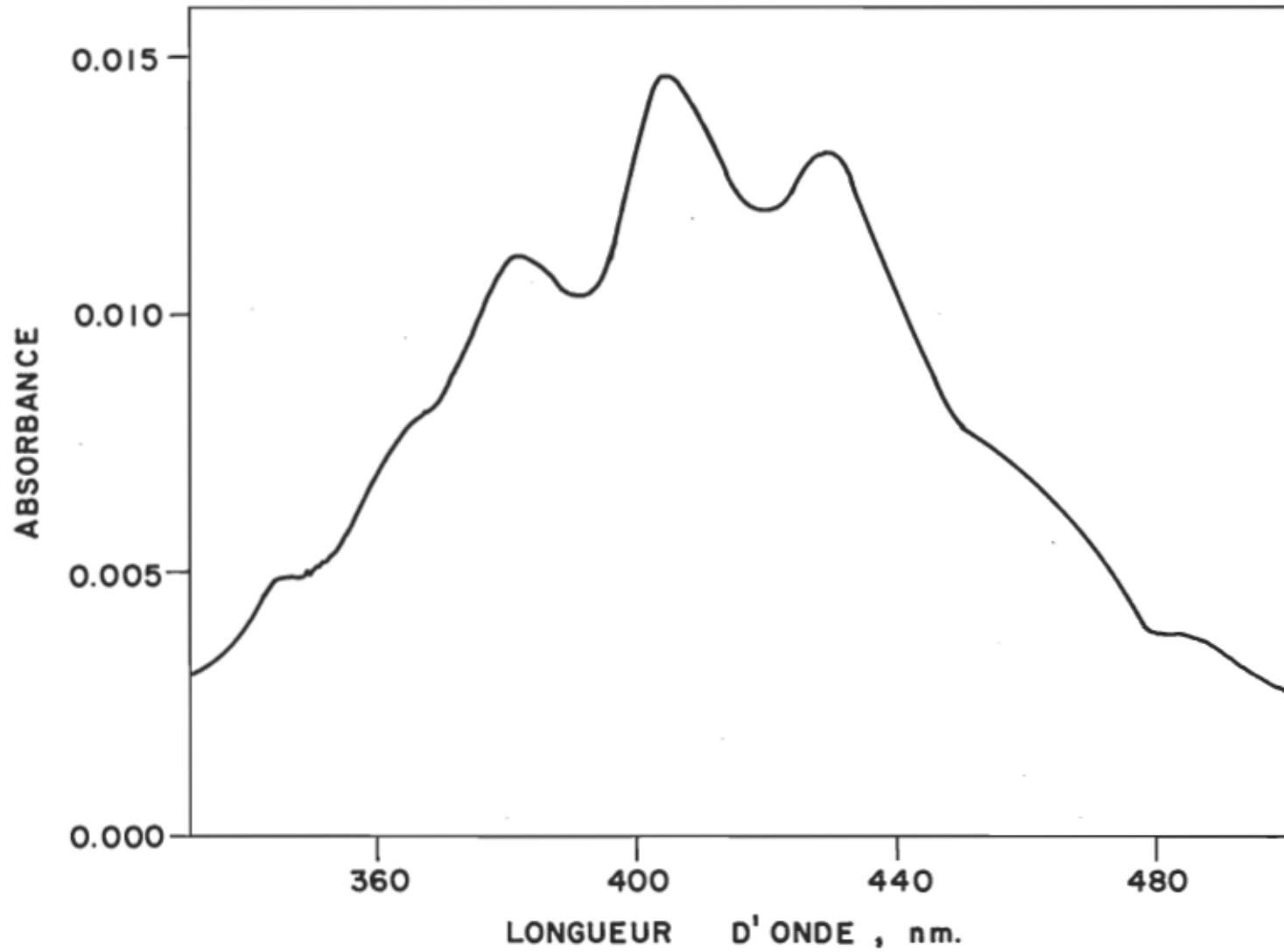


FIGURE 8. Spectre des lipides dépigmentés dans le chloroforme: méthanol (2:1, v/v).

### D) Chlorophylle a

Les maximums de chlorophylle a dans le benzène ont les caractéristiques présentées sur le tableau IV comparées à celles données par Bellamy et Lynch (1963). Le coefficient d'extinction molaire obtenu est de  $7,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  à 665 nm. Le chromatogramme de cette chlorophylle ne montre aucune trace de caroténoides. Cependant, une faible proportion d'isomère (chlorophylle a') est présente.

Tableau IV: Caractéristiques spectrales de la chlorophylle a dans le benzène.

	<u>Ca</u>	Référence
Maximum (nm)	(±1) 665 (±1) (±1) 432 (±1) (±1) 412 (±1)	664 432 412
Rapport des absorbances 432/665	1,28	1,28
432/412	1,60	1,57

Le spectre de la chlorophylle a dans l'acétone est donné sur la figure 9. Dans le cas de la figure 10, la chlorophylle a est accompagnée de lipides dépigmentés dans un rapport L\*:Ca en poids de 4,2:1,0. Il n'y a

\*Abréviation: L = Ensemble des MGD, DGD, SL et PL.

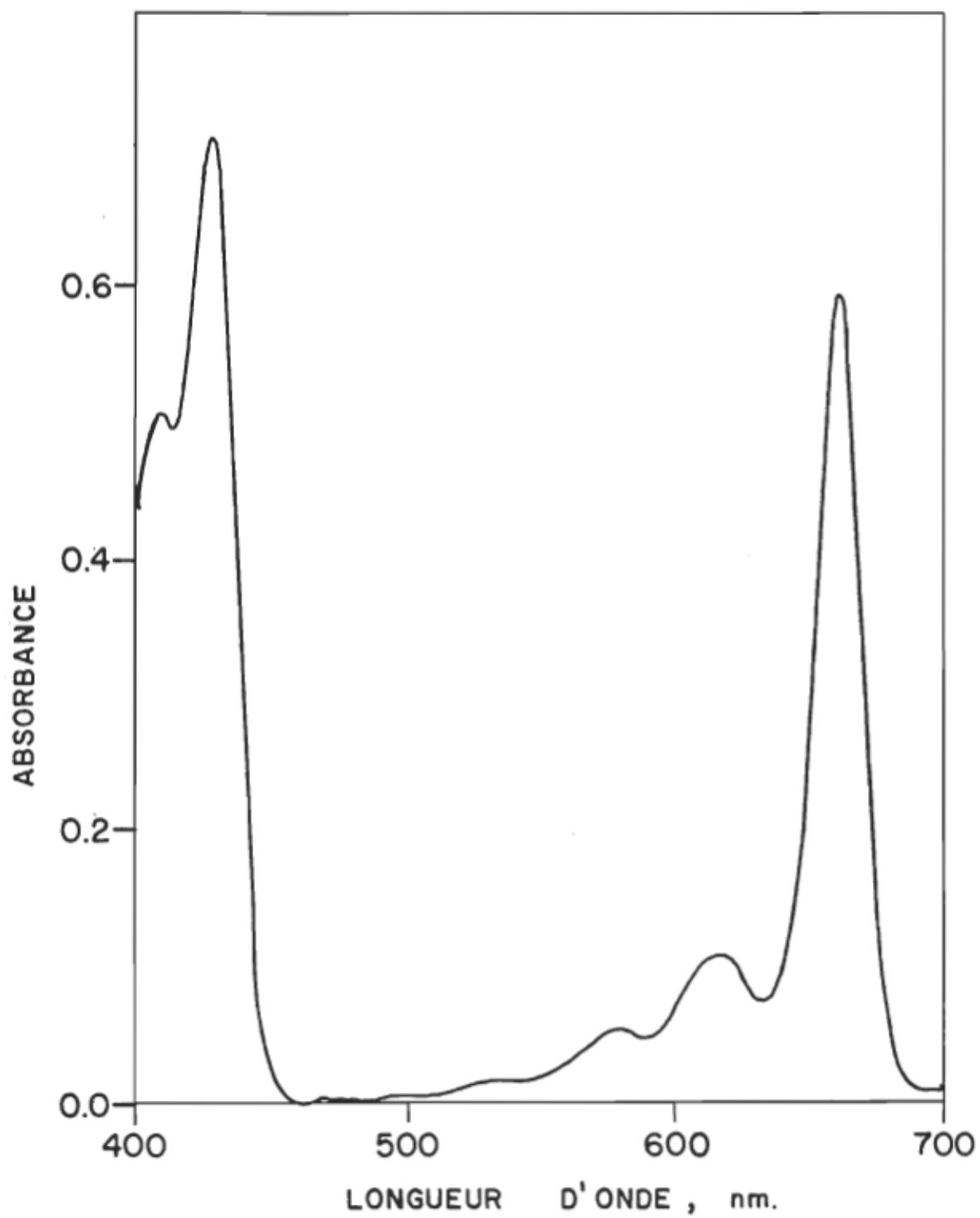


FIGURE 9. Spectre de la chlorophylle a dans l'acétone.

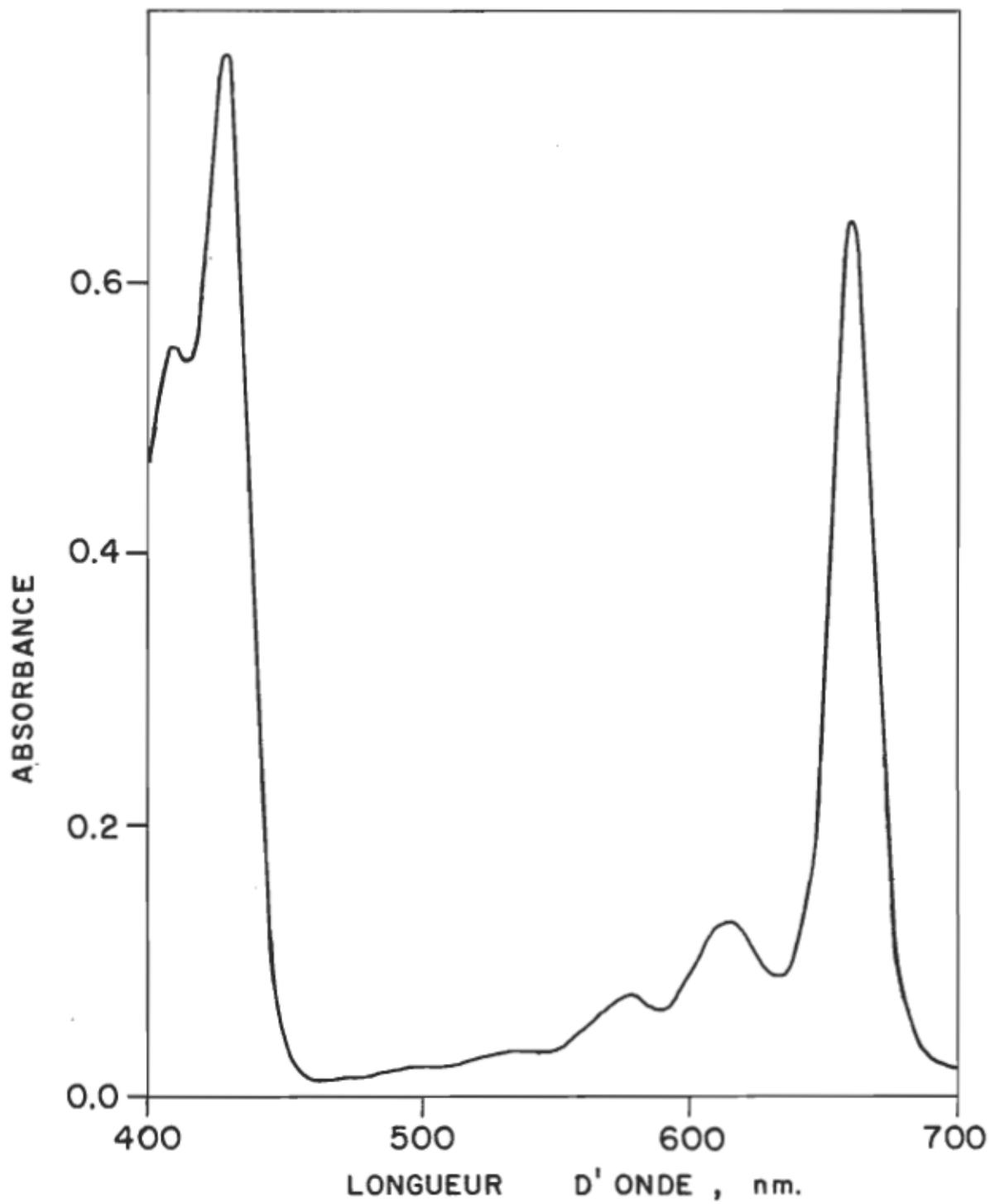


FIGURE 10. Spectre de la chlorophylle a additionnée des lipides  
dépigmentés dans un rapport L:Ca en poids de 4,2:1,0  
dans l'acétone.

aucune différence entre les deux spectres. Les principaux maximums sont à 661, 428 et 409 nm et les bandes accessoires se retrouvent à 615, 578, 530, 495 et 380 nm.

## 2) Vésicules de lipides dépigmentés

### A - Calibration de la colonne

La figure 11 nous montre le diagramme d'élution du bleu dextran et du ferricyanure de potassium sur une colonne de sépharose CL-2B (28,0 x 1,1 cm). C'est à l'aide de cette colonne que sont obtenus les diagrammes d'élution qui seront montrés ultérieurement sauf pour ceux de la figure 14 (voir plus loin).

Le tableau V donne le coefficient de partage ( $\sigma$ ) et le diamètre ( $D$ ) moyen des particules éluées dans les différentes fractions de 1 ml. Le volume d'exclusion ( $V_0$ ) considéré est 8,5 ml et le volume de "sel" ( $V_s$ ) est 23,5 ml.

### B - Caractérisation des vésicules

Les vésicules ont d'abord été fabriquées selon les conditions établies par Dijkmans et al. (1979b) pour des vésicules de lécithine (10 mg de lipides injectés dans 40 ml de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0, concentration dans un récipient Amicon de 50 ml, suspension déposée sur une colonne de 36,0 x 2,5 cm, fractions de 5 ml recueillies).

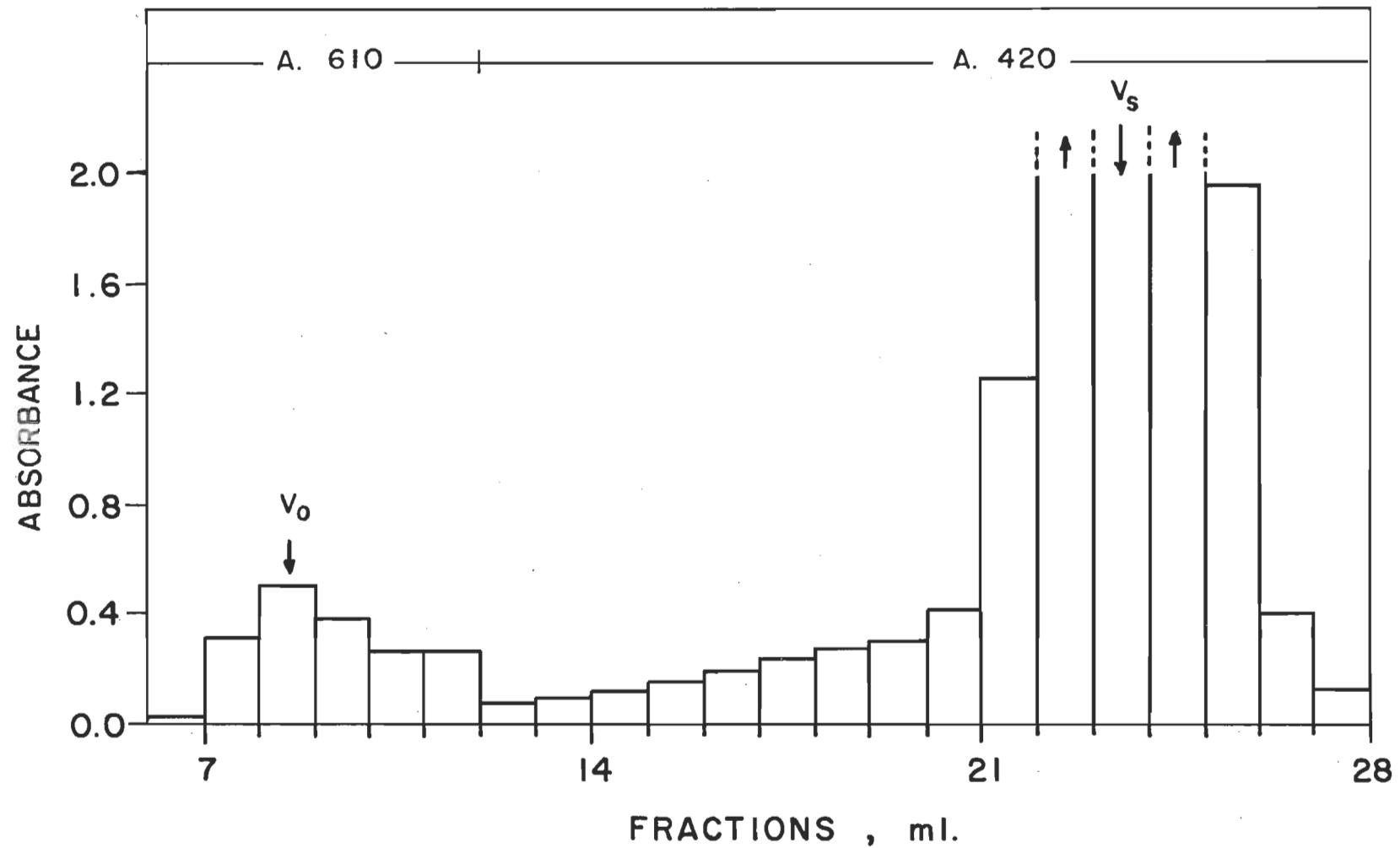


FIGURE 11. Calibration de la colonne Sépharose C1-2B (28,0 x 1,1 cm).

TABLEAU V: Coefficient de partage ( $\sigma$ ) et diamètre (D)  
des particules éluées.

Fraction (m1)	$\sigma$	D (nm)
10,5	0,133	48,8
11,5	0,200	44,2
12,5	0,267	39,5
13,5	0,333	34,9
14,5	0,400	30,3
15,5	0,467	25,6
16,5	0,533	21,0
17,5	0,600	16,3
18,5	0,667	11,9
19,5	0,733	7,1
20,5	0,800	2,4

Le diagramme d'élution de ces vésicules est montré sur la figure 12. En plus de l'absorbance à 260 nm, on y retrouve la concentration de GSL pour certaines fractions. On récupère environ 1,6 mg de lipides dosés\* dans les fractions 13 à 17 (25 ml). Les particules s'éluant dans le volume interne (fractions 13 à 17) sont bien séparées de celles s'éluant dans le volume d'exclusion (fractions 7, 8 et 9).

Ce procédé apporte une perte énorme de lipides dans l'appareil d'ultrafiltration, une grande dilution des vésicules et un volume mort de contenu lipidique élevé. C'est pourquoi par la suite les vésicules ont été faites et sélectionnées selon la méthode donnée antérieurement sauf dans les cas où les conditions qui diffèrent seront spécifiquement décrites. Les quantités de lipides utilisés indiquées ultérieurement sont celles des lipides dosés contenus dans le 2 ml d'éthanol injectés dans le tampon.

L'addition de KCl 50 mM au tampon Tris-HCl 50 mM donne l'histogramme de la figure 13 pour 9,9 mg de lipides utilisés. Comme toute les vésicules s'éluent dans le volume d'exclusion, la force ionique du tampon a été diminuée en omettant le KCl et en abaissant sensiblement la quantité de lipides utilisés.

---

\* Les lipides dosés sont le MGD, DGD, SL et PL.

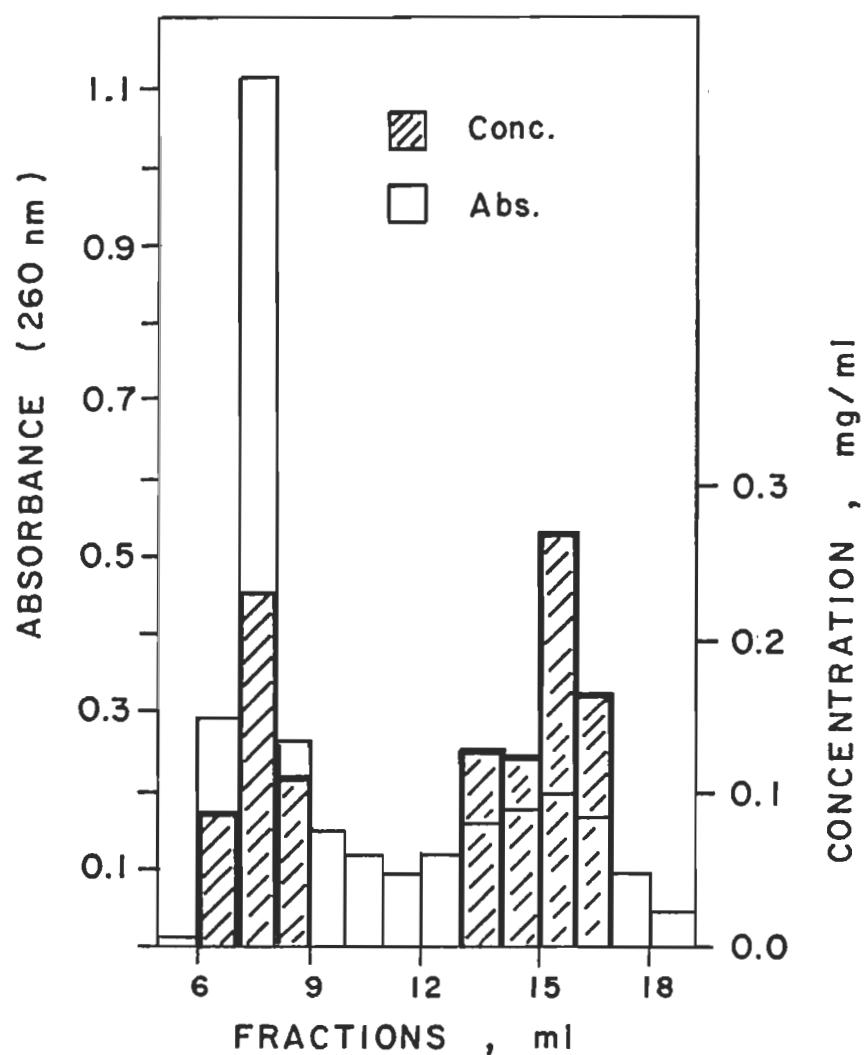


FIGURE 12. Elution des vésicules fabriquées selon les critères de départ.

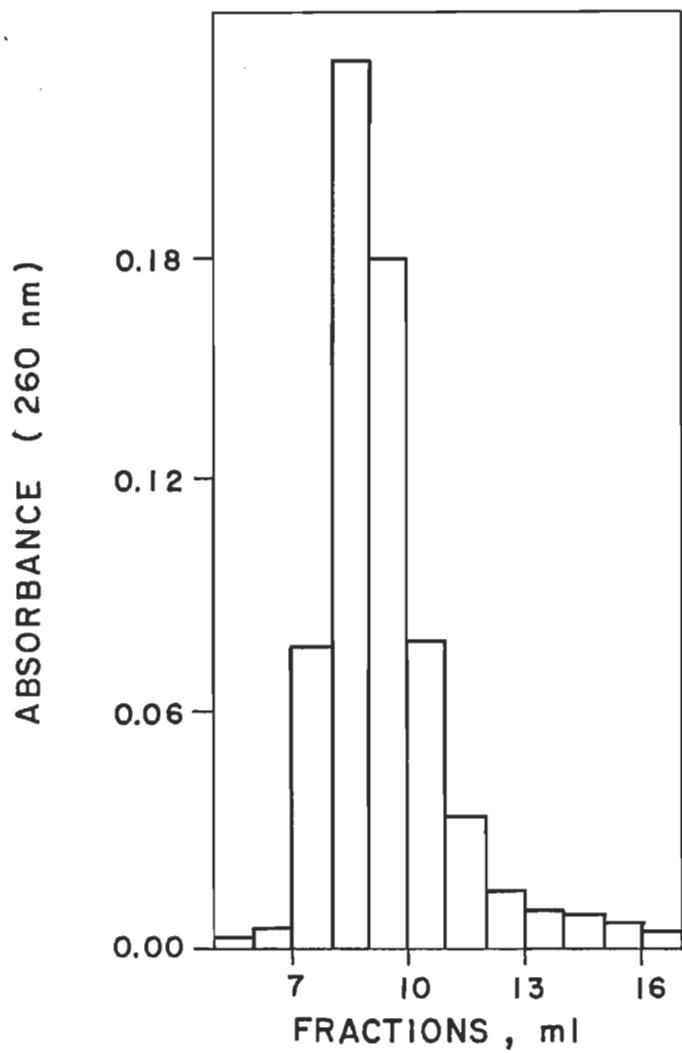


FIGURE 13. Elution des vésicules fabriquées dans le tampon  
Tris-HCl 50 mM + KCl 50 mM.

La figure 14 donne le diagramme d'élution des vésicules fabriquées dans le tampon Tris-HCl 50 mM sans KCl avec des quantités de lipides variant entre 2,0 et 5,2 mg (les dimensions des colonnes utilisées pour ces chromatographies, qui ne correspondent pas à celles utilisées pour les autres expériences, sont données sur cette même figure). On note, à l'allure générale des histogrammes, que les vésicules sont réparties sur un plus grand nombre de fractions en diminuant la quantité de lipides utilisés. Cependant, on ne parvient pas à séparer les vésicules s'éluant dans le volume interne des vésicules qui se présentent dans le volume d'exclusion.

Une étude à différentes forces ioniques est montrée sur la figure 15 en variant la concentration du tampon. Cette étude permettra de cerner une condition expérimentale plus favorable. On y retrouve ainsi le tampon Tris-HCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM et l'eau distillée. Les vésicules sont préparées à partir d'environ 3 mg de lipides dans chaque cas. On remarque principalement que dans le Tris-HCl 10 mM, la proportion de petites particules est beaucoup plus importante que dans le Tris-HCl 50 mM. Dans l'eau distillée, l'histogramme est très semblable à celui du Tris-HCl 10 mM sauf pour ce qui est de l'apparition d'un troisième pic d'élution (fractions 18, 19 et 20) bien caractérisé.

Sur les figures 16 et 17, les diagrammes d'élution sont donnés pour le tampon Tris-HCl 10 mM avec une quantité de lipides utilisés variant entre 1,3 et 9,9 mg. Une nette séparation de vésicules

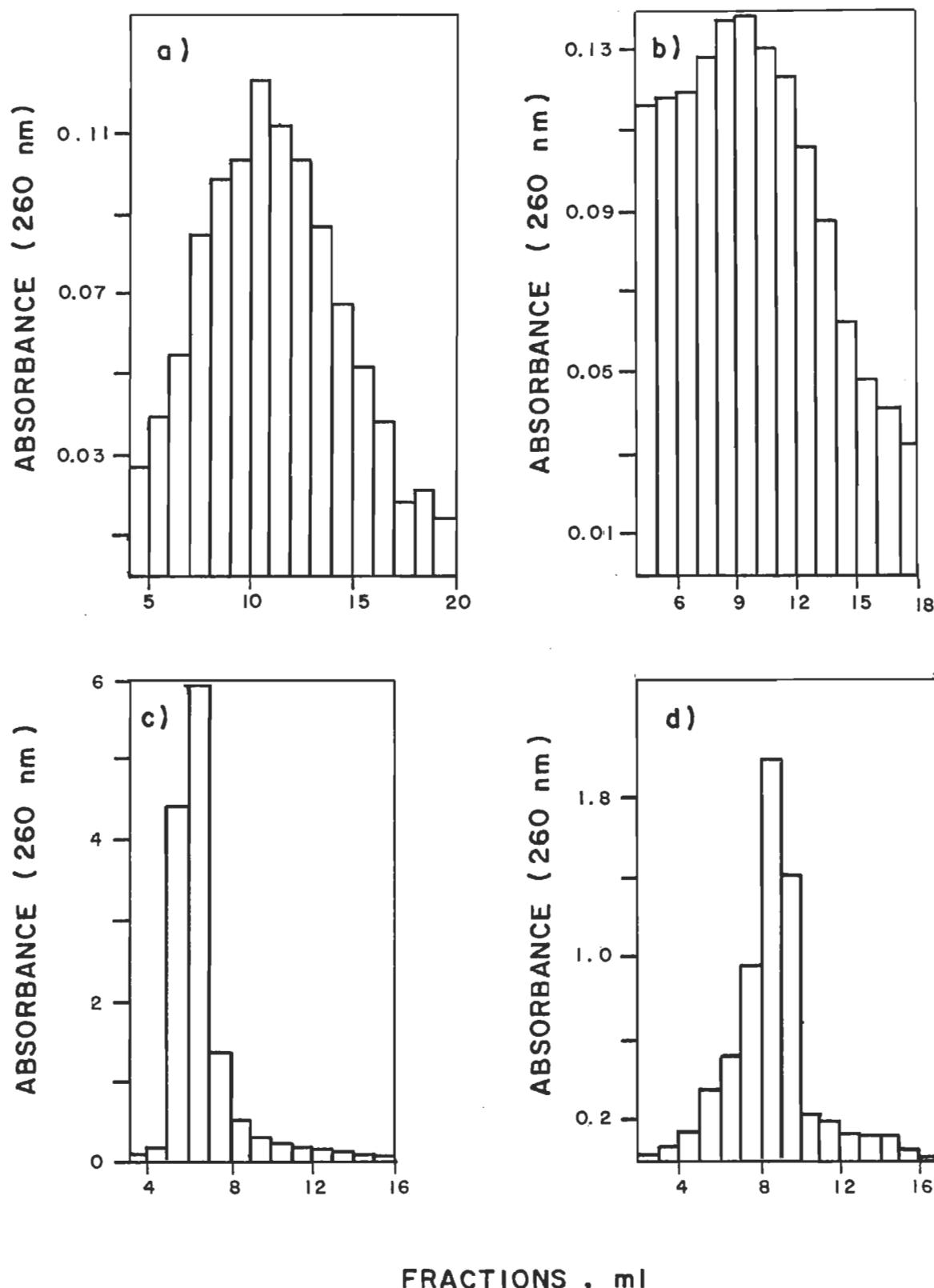


FIGURE 14. Elution des vésicules. Quantité de lipides utilisés:

a = 2,0 mg; b = 2,8 mg; c = 3,1 mg; d = 5,2 mg. Dimensions

de la colonne: a et b = 1,1 x 26,7 cm; c et d = 0,9 x 24,0 cm.

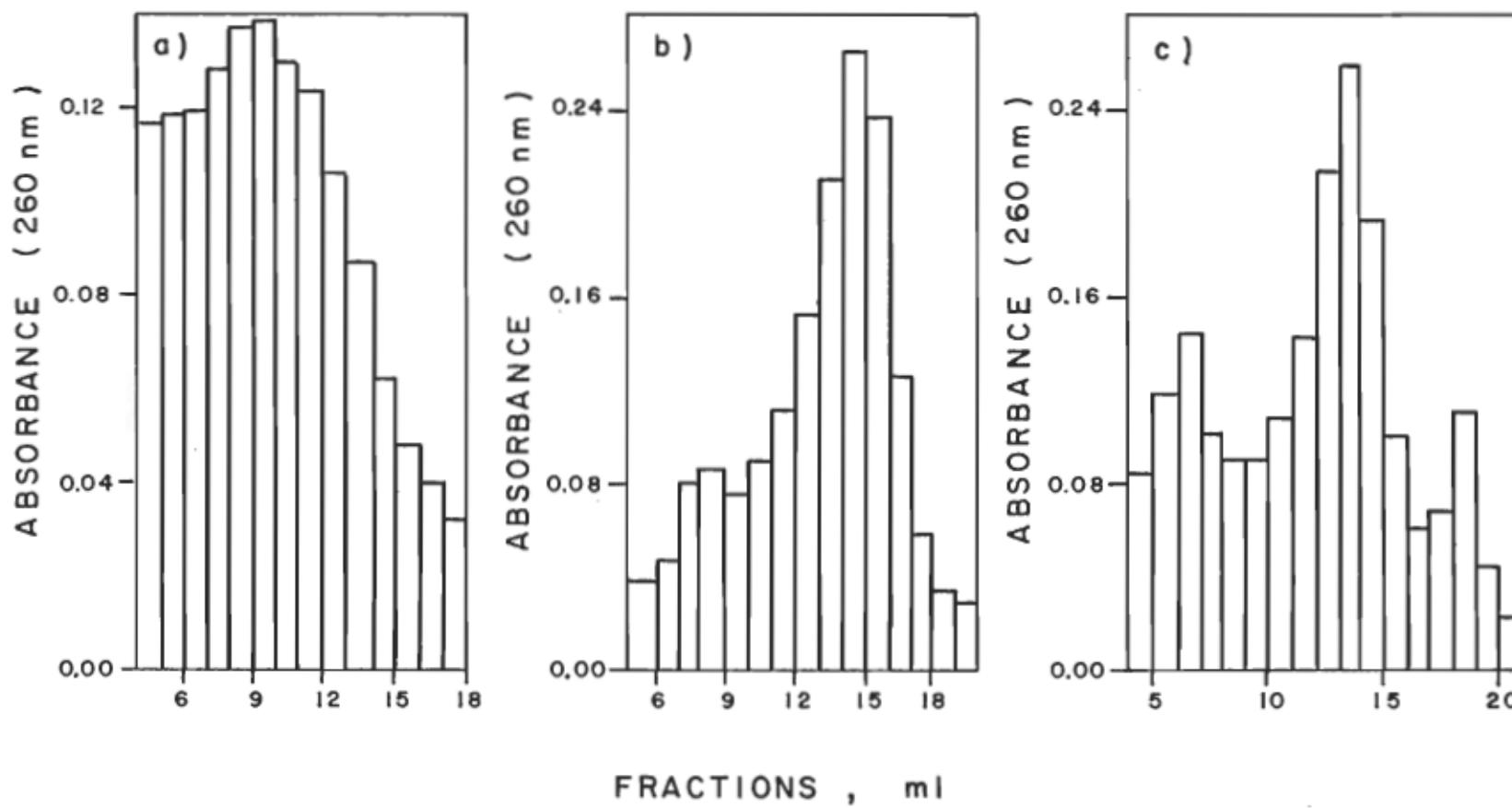


FIGURE 15. Elution des vésicules. Quantité de lipides utilisés: a = 2,8 mg; b et c = 3,3 mg;  
conditions: a = Tris-HCl 50 mM; b = Tris-HCl 10 mM; c = eau distillée.

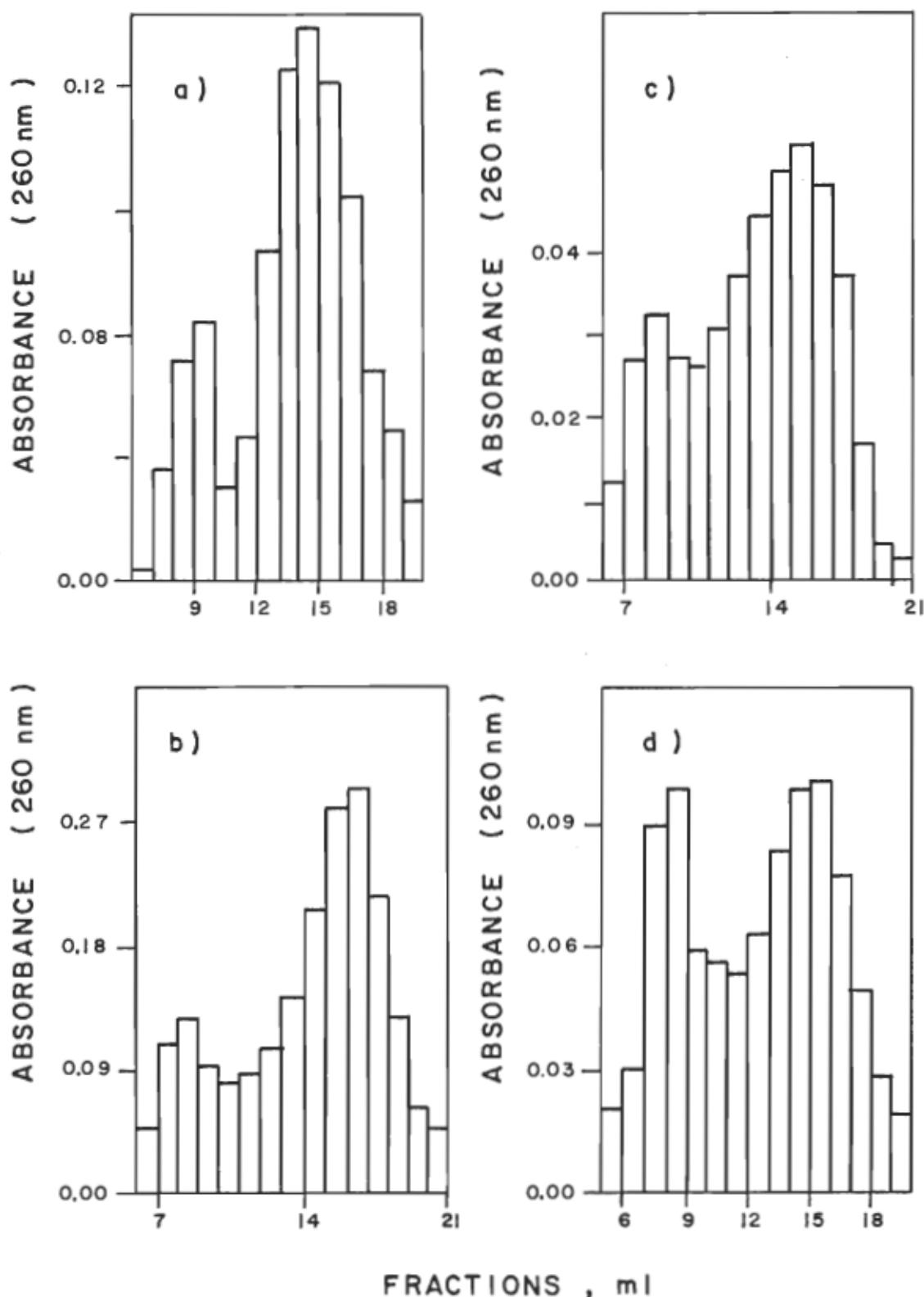


FIGURE 16. Elution des vésicules. Quantité de lipides utilisés:  
 a = 1,3 mg; b = 1,6 mg; c = 1,9 mg; d = 2,7 mg. Tampon  
 Tris-HCl 10 mM.

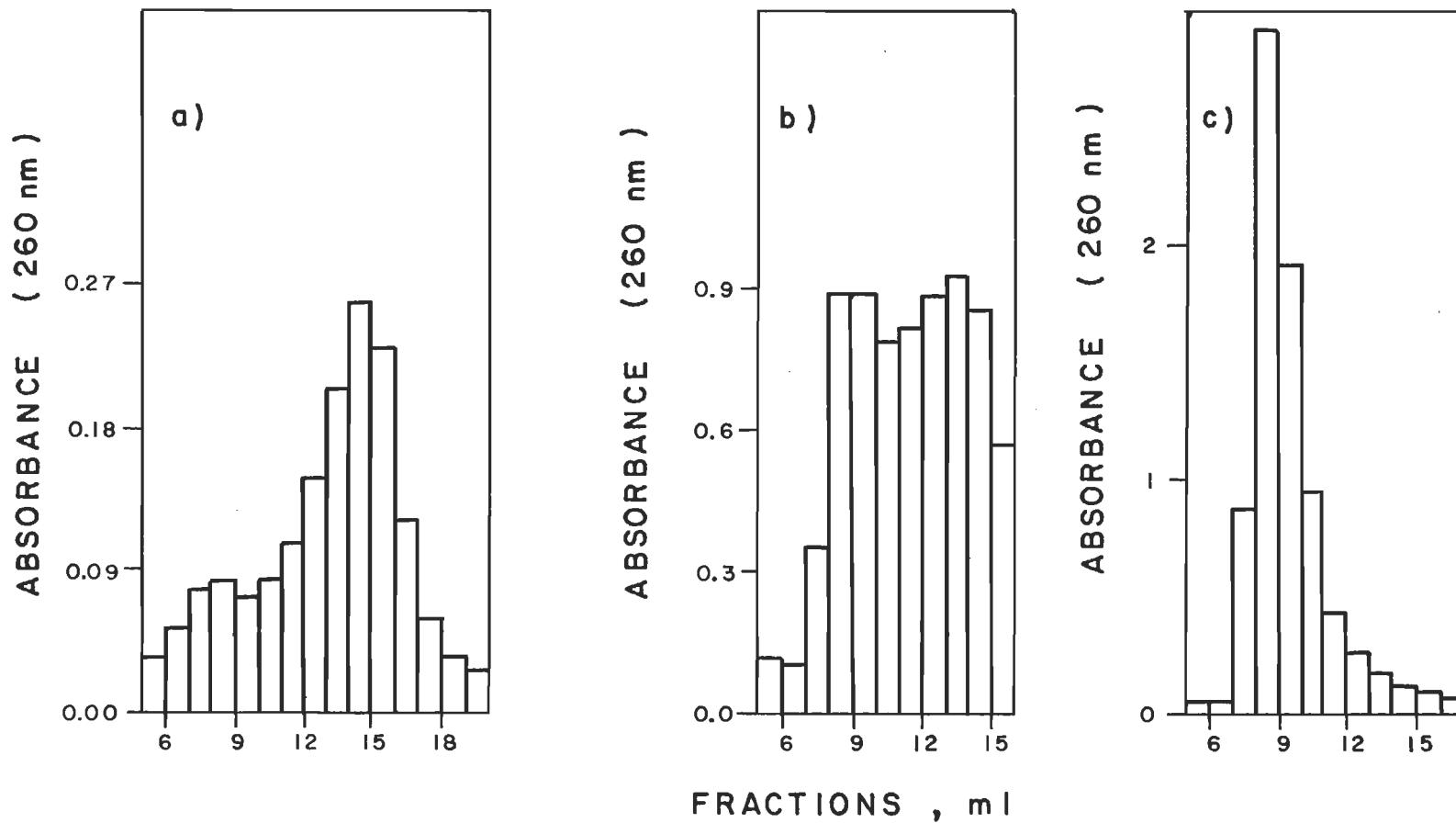


FIGURE 17. Elution des vésicules. Quantité de lipides utilisés: a = 3,3 mg; b = 8,9 mg; c = 9,9 mg; Tampon Tris-HCl 10 mM.

s'éluant dans le volume interne apparaît en diminuant la concentration des lipides. En même temps, la répartition des vésicules s'étend sur un nombre grandissant de fractions.

On retrouve dans le tableau VI, les caractéristiques principales des diagrammes d'élution avec Tris-HCl 10 mM à partir des figures 16 et 17. Dans une vue d'ensemble,  $DVe \cdot DVo^{-1}$  (rapport des absorbances à 260 nm pour la fraction dont la densité optique est maximum dans Ve et Vo où Ve et Vo sont définis comme dans la partie II - 6,B) augmente en diminuant la concentration de lipides de même que Ve - Vo (niveau de séparation entre les vésicules s'éluant dans le volume interne et celles se présentant dans le volume d'exclusion). En examinant ce tableau, il faut tenir compte que des effets de tassemement du gel suite à la pression hydrostatique peuvent amener des variations supplémentaires en diminuant les paramètres du tableau VI; c'est pourquoi il faut l'étudier dans une vue d'ensemble.

Tableau VI: Caractéristiques des diagrammes d'élution dans le tampon Tris-HCl 10 mM.

Quantité de lipides utilisés (mg)	$DVe \cdot DVo^{-1}$	Ve - Vo (ml)
9,90	0,00	-
8,90	1,04	4
3,33	3,11	6
2,66	1,01	7
1,90	1,60	7
1,60	2,29	8
1,33	2,11	5

Ajoutons à ce niveau que la suspension de vésicules déposée sur la colonne se révèle très trouble lorsque la sélection chromatographique de ces vésicules apporte un volume d'exclusion dont le contenu lipidique est important. Si du saccharose 1 M est ajouté au tampon dans un cas semblable, le temps nécessaire pour la concentration des vésicules devient alors trop long pour effectuer les expériences à cause de la viscosité du liquide. Néanmoins, la suspension concentrée n'est pas trouble.

Sur la figure 18, le diagramme d'élution est présenté pour des vésicules ayant 1,6 mg de lipides dans le tampon Tris-HCl 10 mM. En plus de l'absorbance à 260 nm, on y retrouve aussi le dosage des GSL dans quelques fractions. Le rapport  $D_{Ve} \cdot D_{Vo}^{-1}$  est de 2,3 alors que le rapport  $C_{Ve} \cdot C_{Vo}^{-1}$  (rapport de concentrations pour la fraction la plus concentrée de Ve et Vo) est de 8,5. La quantité de lipides présents dans le volume d'exclusion se révèle donc beaucoup plus faible que ne le laisserait prévoir l'absorbance. Cette dernière est influencée par la diffusion de lumière qui est plus importante pour les grosses particules que pour les petites à concentration égale de lipides (comme souligné par Huang et Charlton, 1972 et Ritt et Walz, 1976).

Si on se réfère au tableau V, le diamètre des vésicules du volume interne (fractions 13 à 19) se situe entre 12,0 et 35,0 nm avec une prédominance vers 32,5 nm. Il ressort donc de cette étude que les meilleures conditions apparaissent en utilisant moins de 1,6 mg de

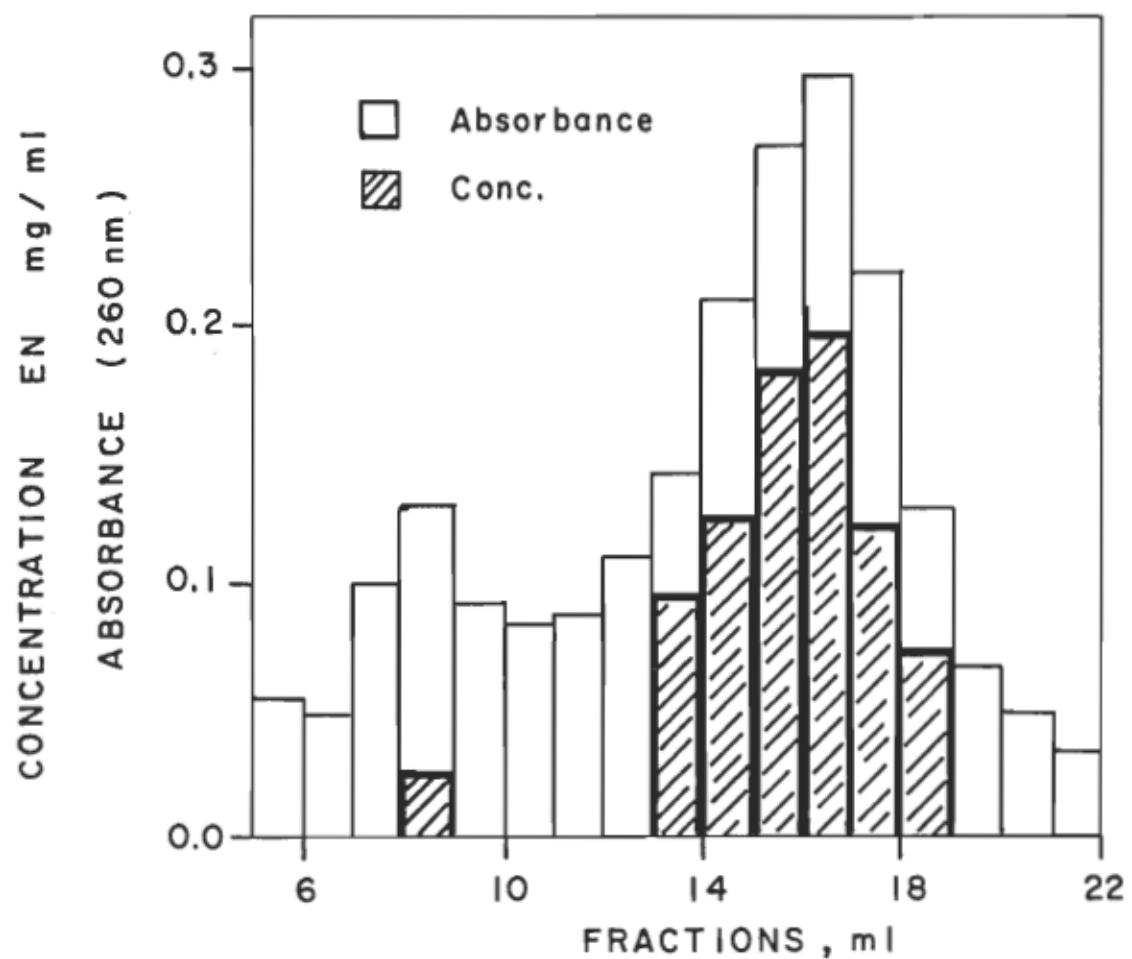


FIGURE 18. Elution des vésicules dans les conditions idéales.

lipides dosés dans le tampon Tris-HCl 10 mM. Seulement 50 % de ces lipides sont déposés sur la colonne (d'après les dosages effectués) vu les pertes lors de la concentration. La totalité des lipides déposés sur la colonne sont dosés dans les fractions éluées.

Le spectre des vésicules de lipides dépigmentés retrouvées dans les fractions du volume interne est donné sur la figure 19. Notons que l'absorbance augmente graduellement quand la longueur d'onde diminue à cause de la diffusion de la lumière par les vésicules. Aux longueurs d'ondes supérieures à 500 nm, il n'y a pas d'absorption. Les faibles épaulements distingués sur la figure 19 à 460, 432 et 405 nm correspondent aux bandes observées pour l'extrait des lipides dépigmentés dans le chloroforme (voir figure 8).

#### C - Ajout de chlorophylle a

Un exemple des diagrammes d'élution des vésicules de lipides dépigmentés avec l'ajout de chlorophylle a pour des rapports L:Ca en poids de 160,0:1,0, 10,7:1,0 et 4,7:1,0 est donné sur la figure 20. On remarque que dans tous les cas, le diagramme est sensiblement le même. Le diamètre des vésicules, si on se réfère au tableau V, varie entre 12,0 et 35,0 nm avec une prédominance vers 23,0 nm. La présence de pigments ne semble pas influencer l'agrégation des vésicules entre elles ni leur diamètre si on considère l'ensemble des expériences effectuées. En effet, le rapport  $DV_e \cdot DV_o^{-1}$  et  $V_e - V_o$  restent constants en variant le rapport L:Ca en poids.

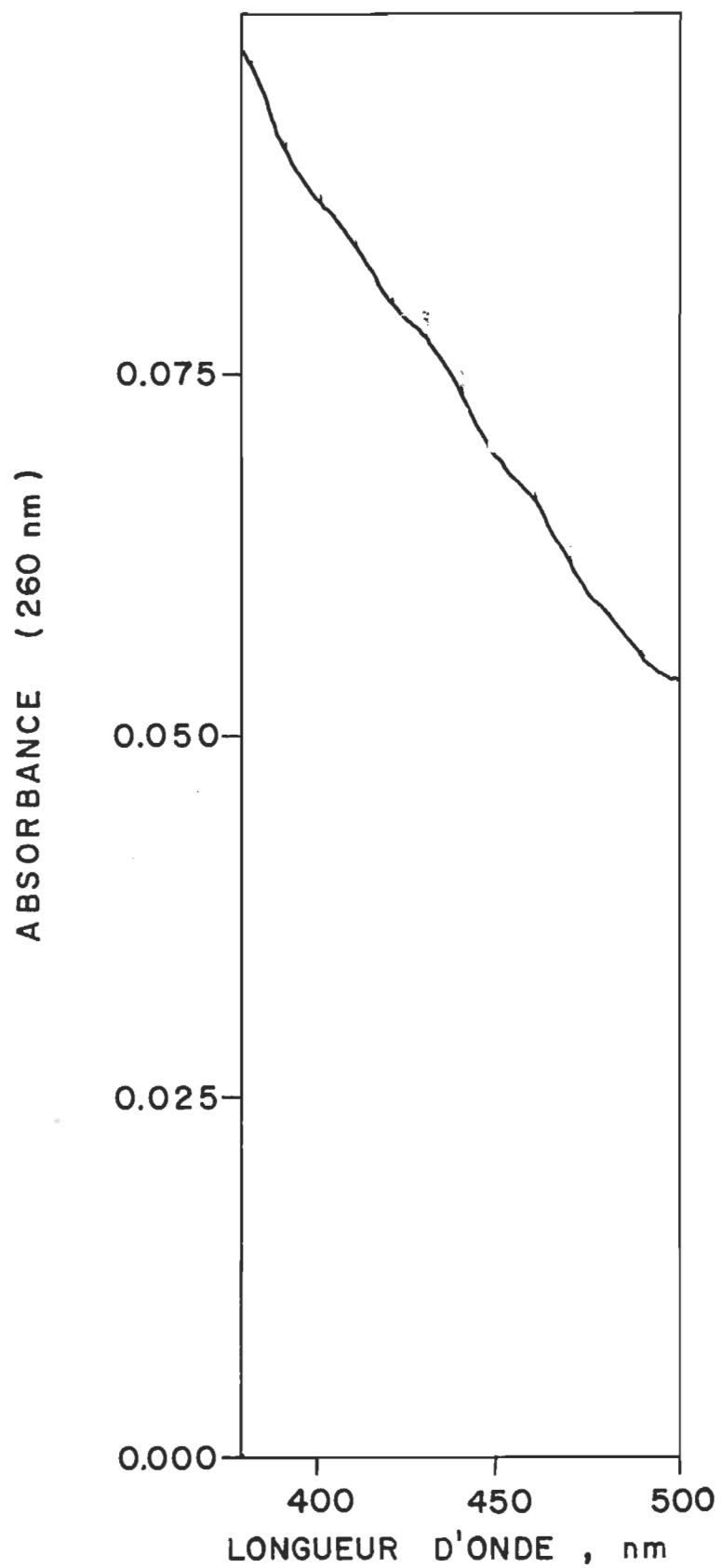


FIGURE 19. Spectre des vésicules de lipides dépigmentés dans le tampon Tris-HCl 10 mM .

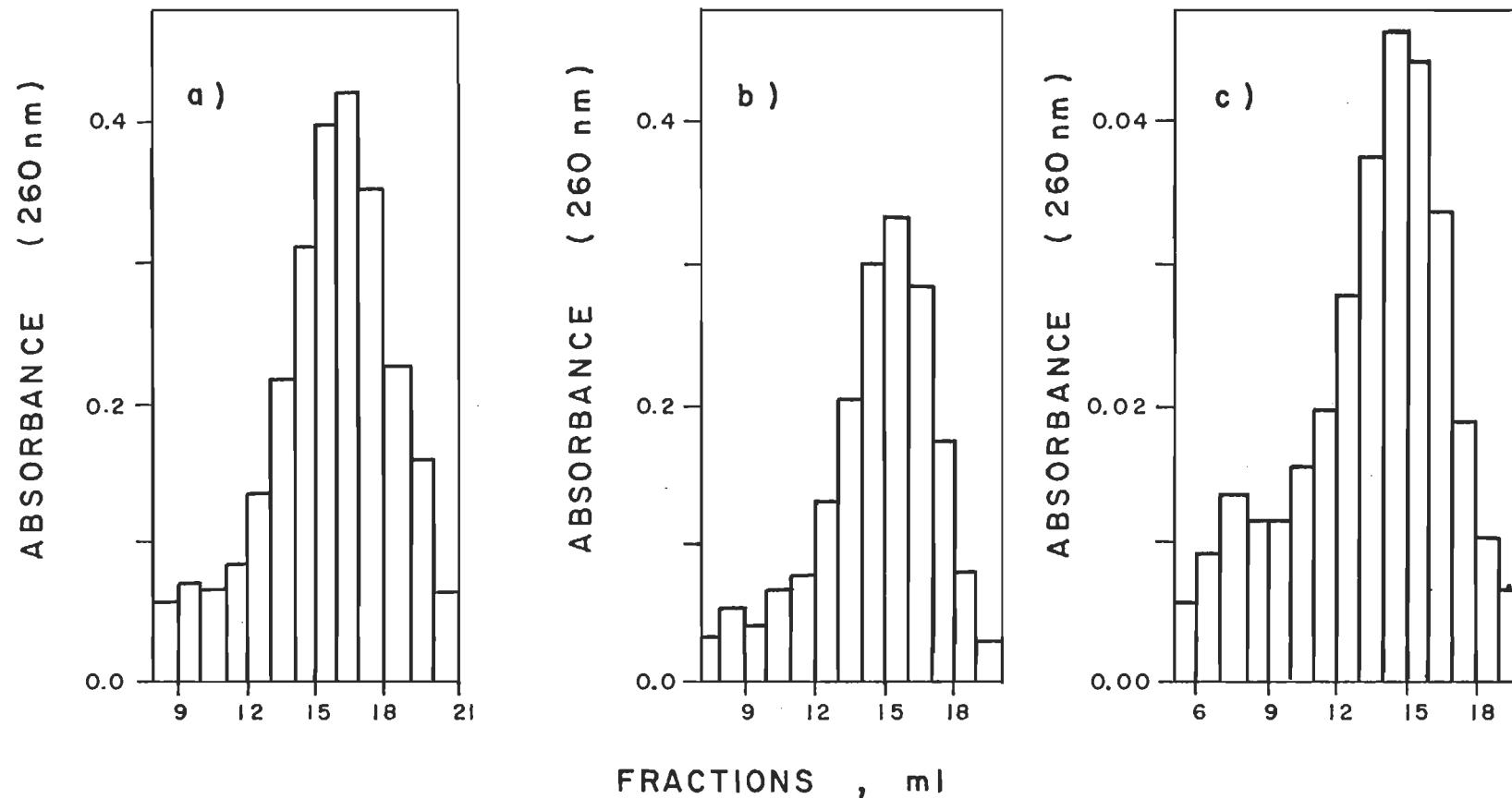


FIGURE 20. Elution des vésicules. Rapport L:Ca en poids: a = 4,5:1,0; b = 10,7:1,0;  
c = 160,0:1,0.

Les vésicules s'éluant dans les fractions 12 à 19 incluses sont réunies et utilisées pour les mesures de photooxydation.

Les spectres de ces vésicules pour des rapports L:Ca en poids de 4,7:1,0 et 23,0:1,0 sont montrés sur les figures 21 et 22. Ces vésicules présentent les mêmes maximums chlorophylliens à 416, 434 et 669 nm. Cependant, on remarque un élargissement progressif à mi-hauteur de la bande dans le rouge en diminuant le rapport L:Ca en poids avec l'apparition simultanée d'un épaulement à 700 nm.

La figure 23 nous montre la bande d'absorption dans le rouge des vésicules avec des rapports L:Ca différents. On y note cet élargissement asymétrique de la bande en diminuant le rapport L:Ca en poids et cela surtout pour les L:Ca de 11,0:1,0 et 4,7:1,0. Cet élargissement correspond à l'apparition d'une espèce absorbante à 700 nm. Sur la figure 24, la différence a été faite entre les spectres des figures 21 et 22. On obtient alors un maximum vers 697-700 nm qui confirme la position de l'épaulement observé sur la figure 21.

Sur le tableau VII, on peut comparer les maximums d'absorption de ces mêmes vésicules avec un cas où la chlorophylle a été oxydée accidentellement au cours des préparations (oxydation non photochimique). Le spectre de la figure 25 en montre le déplacement vers le bleu des différentes bandes et une nette augmentation du rapport des bandes à 434 nm et 416 nm. Cette modification du spectre nous procure un standard de vérification pour détecter si une oxydation non photochimique survient lors de l'expérimentation. Notons de plus que la largeur

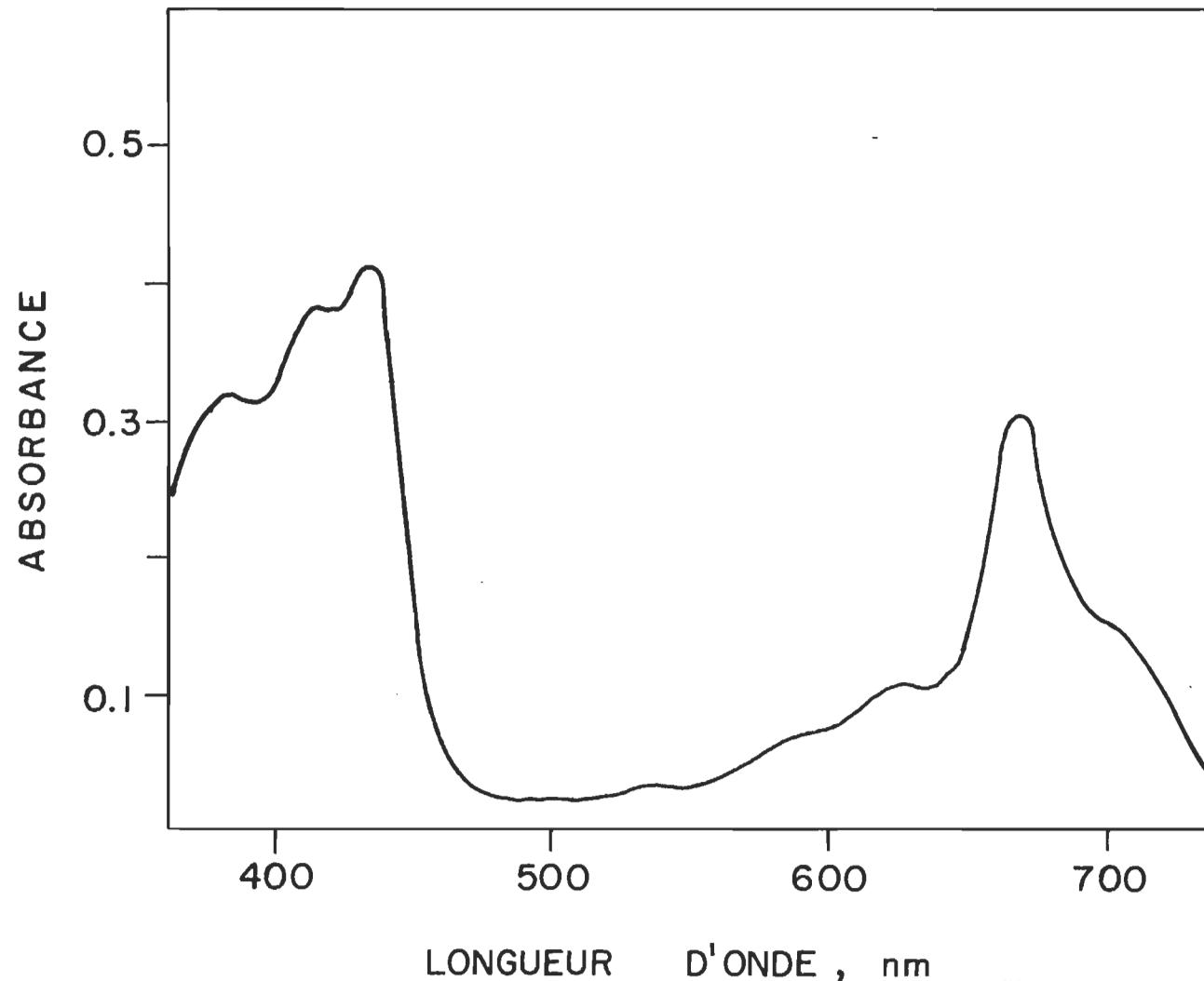


FIGURE 21. Spectre des vésicules de lipides dépigmentés additionnés <sup>de</sup> chlorophylle a dans un rapport L:Ca en poids de 4,7:1,0.

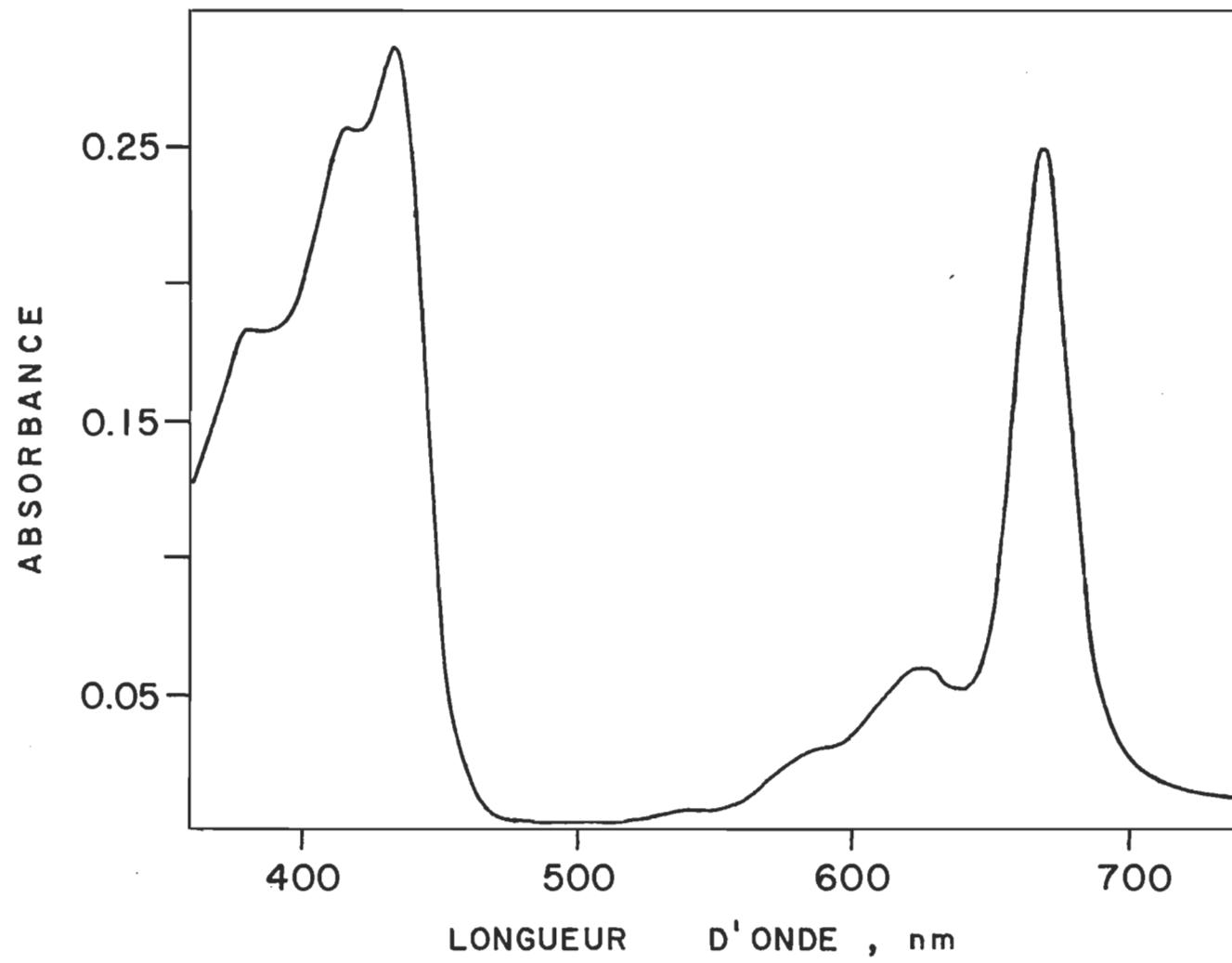


FIGURE 22. Spectre de lipides dépigmentés additionnés de chlorophylle *a* dans un rapport L:*C<sub>a</sub>* en poids de 23,0:1,0.

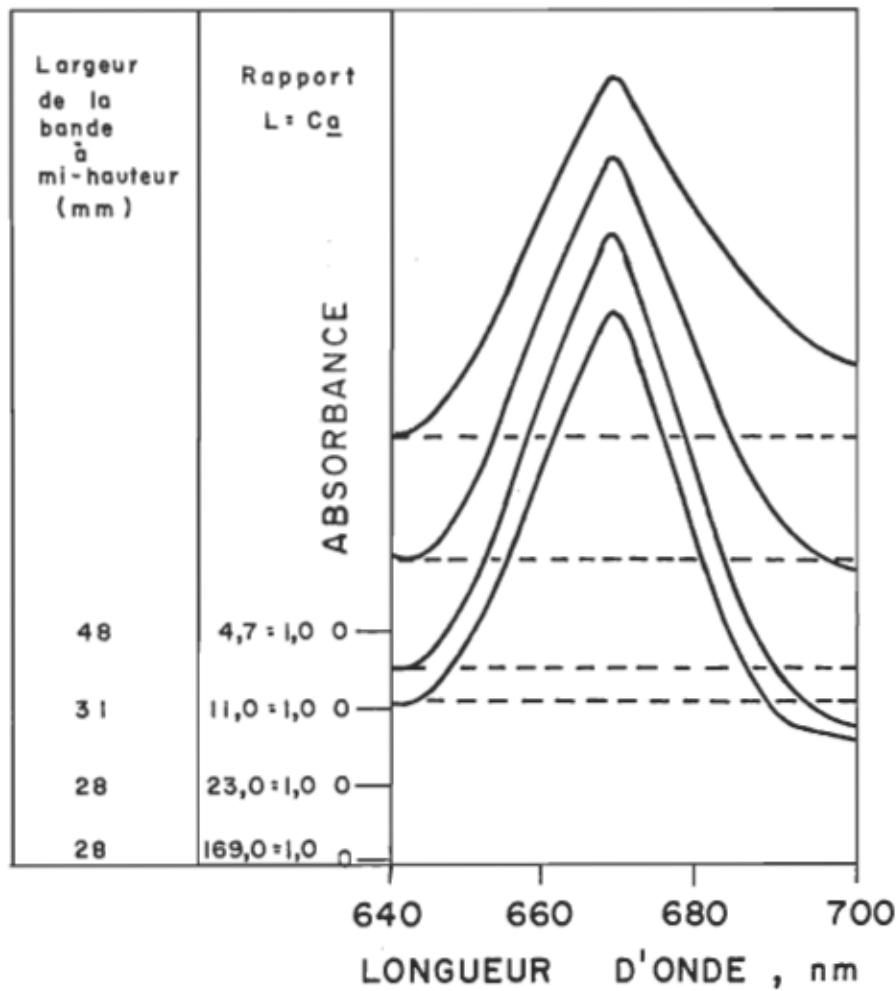


FIGURE 23. Bande dans le rouge des vésicules de lipides dépigmentés additionnés de chlorophylle a. Les spectres ont été normalisés à 669 nm.

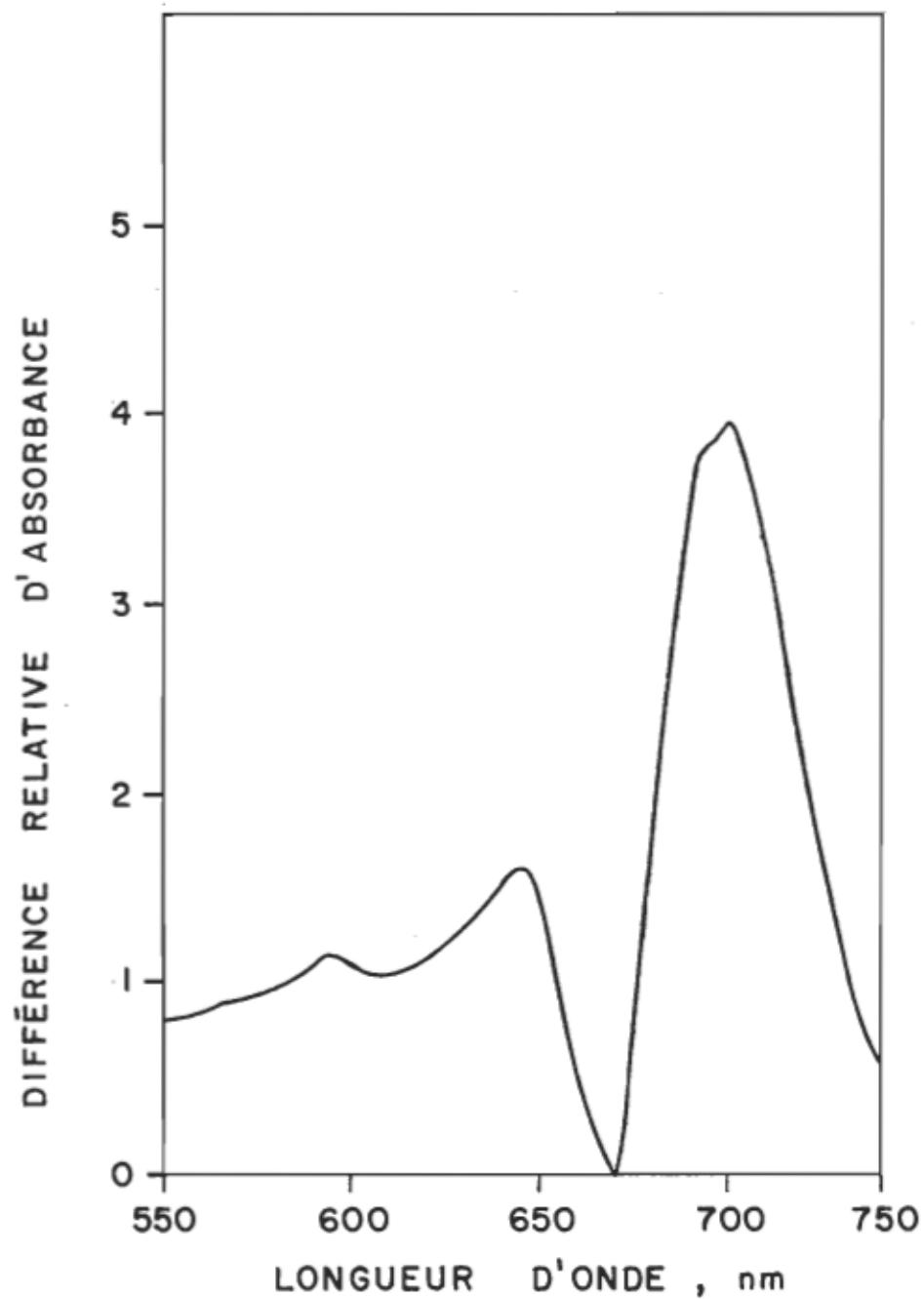


FIGURE 24. Spectre de différence entre les figures 21 et 22.

Les spectres ont d'abord été normalisés à 670 nm.

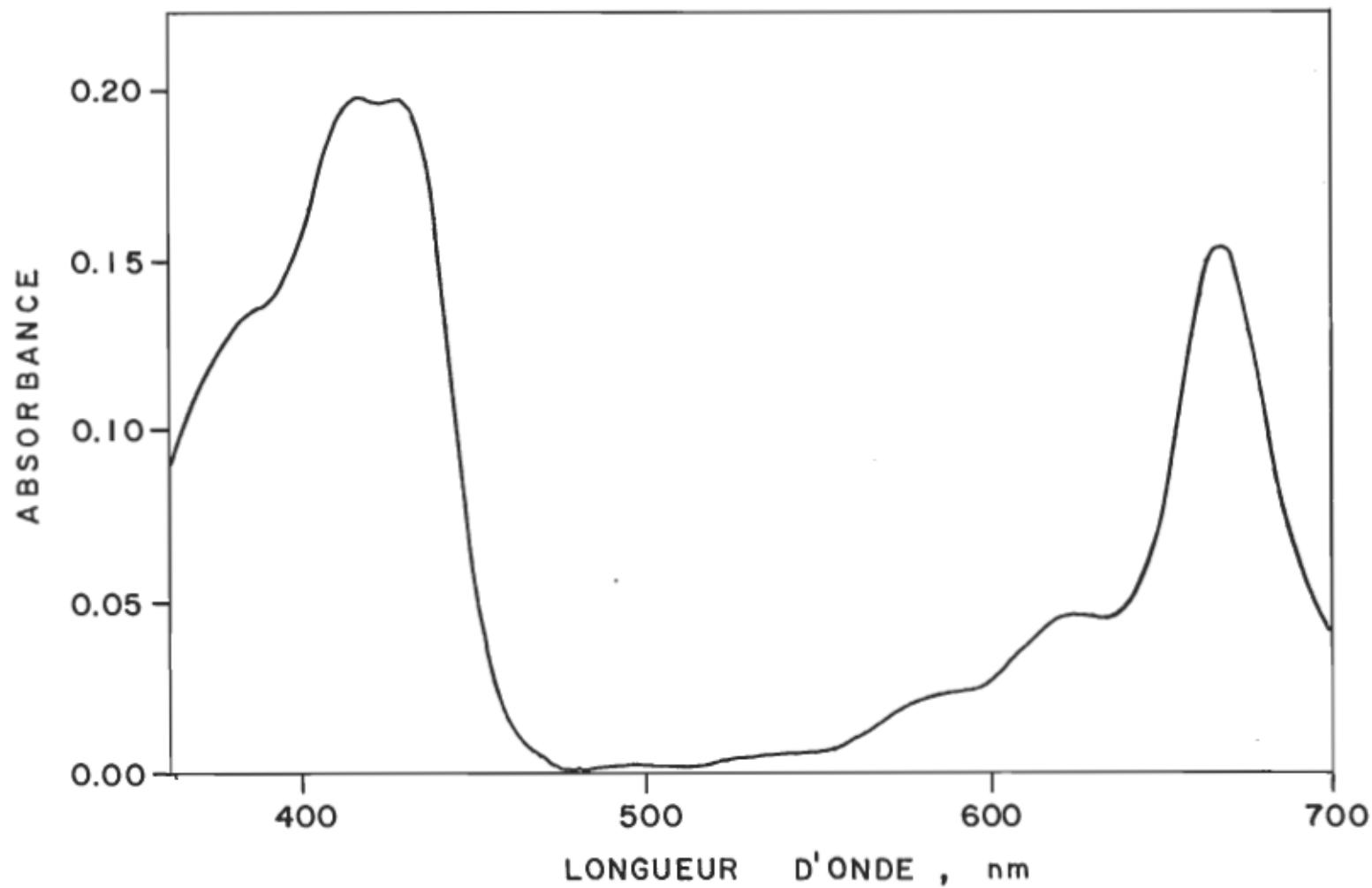


FIGURE 25. Spectre des vésicules de lipides dépigmentés additionnés de chlorophylle a.

La chlorophylle a été oxydée au cours des procédures expérimentales; L:Ca  
(6,0:1,0).

relative à mi-hauteur de la bande dans le rouge est de 35 nm. Cette mesure nous indique la présence de la forme absorbant à 700 nm même dans le cas où la chlorophylle a est oxydée (c.f. figure 23). Il faut néanmoins souligner que toute la chlorophylle n'est probablement pas oxydée et que ce résultat ne signifie pas que la chlorophylle oxydée peut donner naissance à la forme absorbant à 700 nm.

Tableau VII: Principaux maximums de la chlorophylle a  
ajoutée aux lipides dépigmentés dans les  
vésicules.

Rapports en poids <u>L:Ca</u>			
4,7:1,0	669 (P)*	434 (P)	416 (P)
23,0:1,0	669 (P)	434 (P)	416 (P)
6,0:1,0 (oxydés)	668 (P)	430 (P)	417 (P)

\* (P) = pic

#### D - Photodécoloration de la chlorophylle a

Ces vésicules se décolorent à la lumière. Aucune décoloration n'est détectable après 30 min à l'obscurité. De plus, il a été vérifié par saturation du milieu en azote que cette décoloration ne se produit qu'en présence d'oxygène. Après une expérience de décoloration, on

n'observe pas de changement du spectre d'absorption sauf évidemment, une diminution de l'absorbance. Ce résultat indique qu'il n'y a pas d'oxydation non photochimique apparente de la chlorophylle a qui donnerait le spectre montré antérieurement (figure 25). Les résultats présentant des photooxydations sont la moyenne d'au moins deux mesures expérimentales.

Les vésicules de lipides dépigmentés auxquels la chlorophylle a est ajoutée à des rapports L:Ca en poids de 160,0:1,0, 23,0:1,0, 12,0:1,0 et 4,7:1,0 présentent une décoloration illustrée sur la figure 26. Ces courbes montrent que plus le rapport L:Ca en poids est grand, plus la chlorophylle se décolore rapidement.

Le tableau VIII donne quelques caractéristiques de ces décolorations. On y voit que la vitesse initiale ( $V_I$ ) (i.e. la pente de la tangente à l'origine de la courbe de décoloration en % de chlorophylle décolorée par minute) est caractérisée par une augmentation drastique avec le rapport L:Ca en poids. Le nombre de molécules de chlorophylle a décolorées après 28 min augmente aussi avec le rapport L:Ca indépendamment de la concentration chlorophyllienne initiale dans le milieu. En effet, on remarque cette augmentation même dans les cas où la concentration initiale de chlorophylle a est semblable (c.f. rapports L:Ca de 12,0:1,0 et 23,0:1,0).

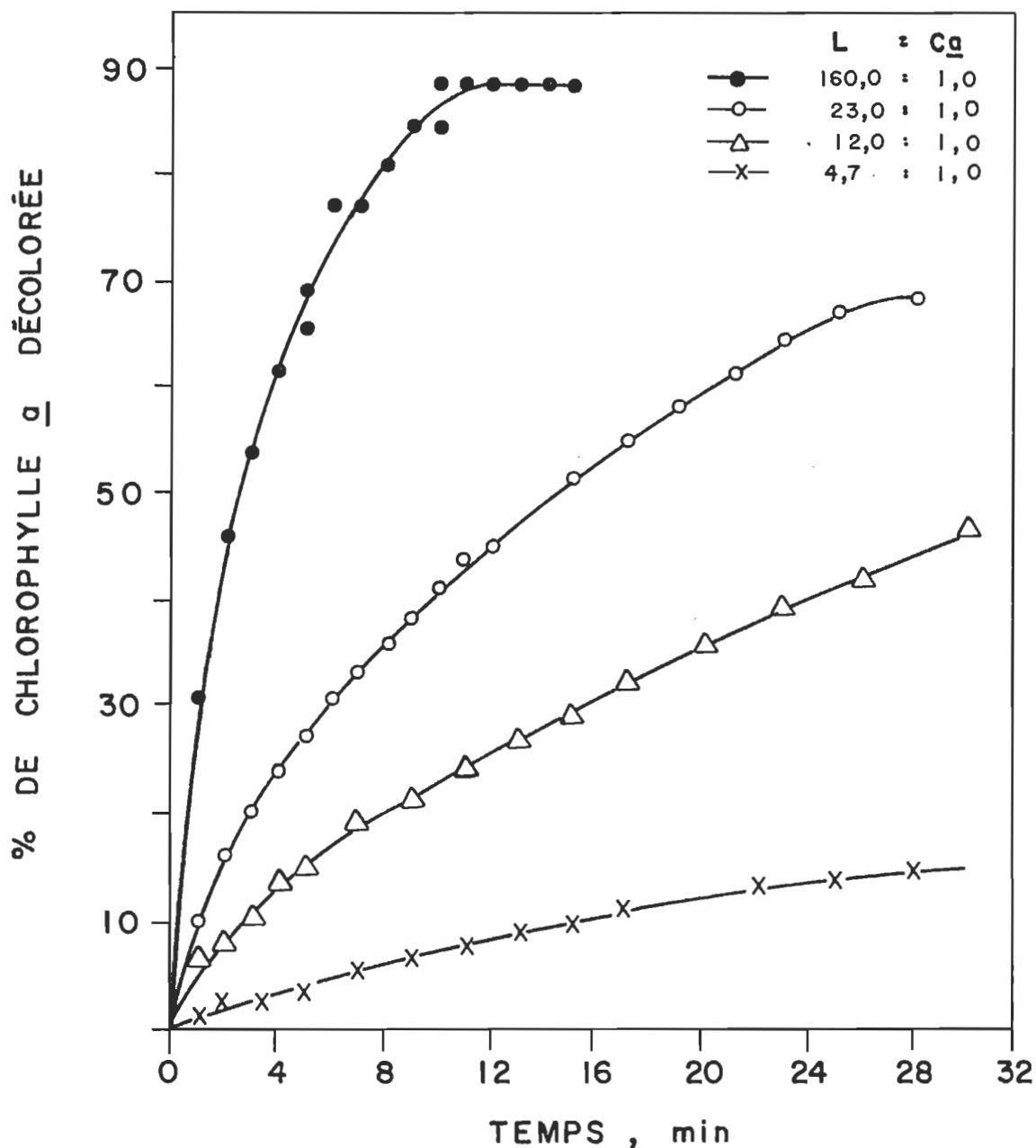


FIGURE 26. Décoloration de la chlorophylle a dans les vésicules de lipides dépigmentés avec une variation du rapport L:Ca.

Tableau VIII: Caractéristiques de la décoloration de la chlorophylle a dans les vésicules de lipides dépigmentés additionnés de chlorophylle a

Rapport en poids L: <u>Ca</u>	$\text{Ca}^*$ $\text{mg ml}^{-1}$	Nombre de molécules de chlorophylle décolorées	$v_I$
4,7:1,0	0,0130	$1,66 \times 10^{15}$ (28 min)	0,75
12,0:1,0	0,0050	$1,80 \times 10^{15}$ (28 min)	5,55
23,0:1,0	0,0060	$3,47 \times 10^{15}$ (28 min)	9,40
160,0:1,0	0,0008	$0,59 \times 10^{15}$ (12 min)	30,00

\* Concentration initiale de la chlorophylle a.

La figure 27 montre la décoloration des vésicules de lipides dépigmentés additionnés de chlorophylle a dans un rapport L:Ca en poids de 12,3:1,0. Trois dilutions des vésicules à partir de la suspension initiale sont expérimentées (1, 1,5 et 5 fois). On ne remarque pas de relation entre la vitesse de décoloration de la chlorophylle a et la dilution de ces vésicules.

En guise de comparaison, la décoloration de la chlorophylle a en solution avec les lipides dépigmentés dans l'acétone avec un rapport L:Ca en poids de 4,1:1,0 est montrée sur la figure 28. Les trois dilutions des lipides montrent que la vitesse de décoloration augmente avec la concentration. Il convient de noter qu'en solution la photodécoloration induit un changement spectral similaire à celui montré par Bellamy et Lynch (1963) dans le benzène. Cette modification se

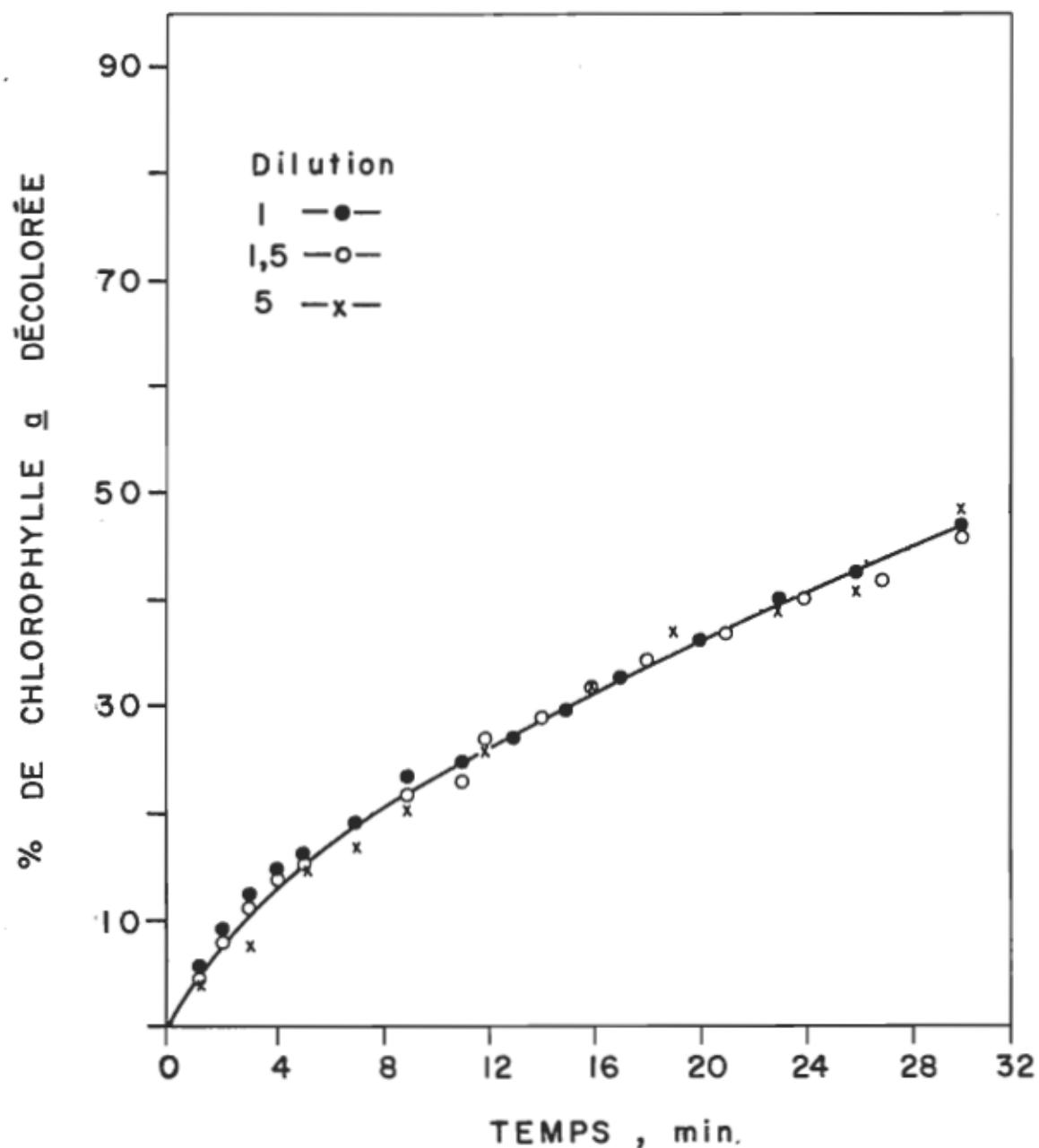


FIGURE 27. Décoloration de la chlorophylle a dans les vésicules de lipides dépigmentés avec des dilutions différentes de la suspension; L:Ca (12,3:1,0).

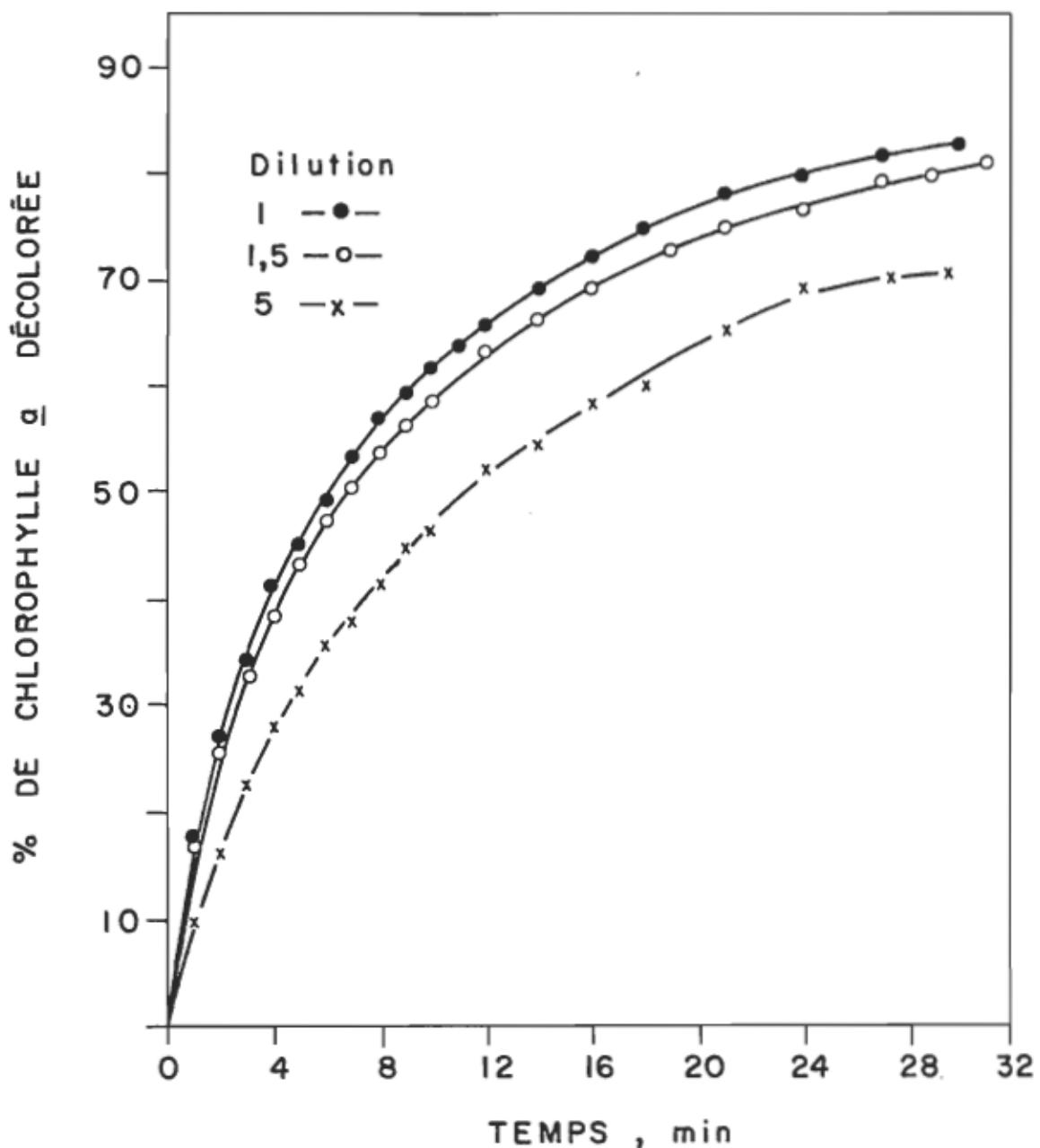


FIGURE 28. Décoloration de la chlorophylle a en solution dans l'acétone en présence des lipides dépigmentés et avec des dilutions différentes de la solution; L:C<sub>a</sub> (4,1:1,0), C<sub>a</sub> = 0,0165 mg ml<sup>-1</sup>.

signale par l'augmentation de l'absorption entre 460 et 510 nm de sorte que le minimum passe de 475 à 512 nm (figure 29).

### 3) Vésicules de lipides totaux

#### A - Caractéristiques des vésicules

Le spectre des vésicules de lipides totaux où le rapport L:C<sub>a</sub> est de 6,7:1,0 apparaît sur la figure 30. Il montre des maximums à 669 et 434 nm correspondant à ceux de la chlorophylle a ajoutée aux lipides dépigmentés dans les vésicules. La chlorophylle b manifeste sa présence notamment par l'élargissement asymétrique de la bande dans le rouge du côté des faibles longueurs d'ondes alors que les caroténoides sont bien signalés par un épaulement vers 480 nm.

L'histogramme d'élution de telles vésicules (figure 31) est similaire à ceux obtenus pour les vésicules de lipides dépigmentés additionnés de chlorophylle a.

#### B - Photodécoloration de la chlorophylle a

La décoloration de la chlorophylle a en fonction du temps d'exposition à la lumière dans ces vésicules est représentée sur la figure 32 avec un rapport L:C<sub>a</sub> en poids de 4,3:1,0. Les vésicules (chlorophylle) ont été diluées 1, 1,5 et 5 fois. On ne remarque pas d'effet de cette dilution sur la vitesse et la cinétique de décoloration.

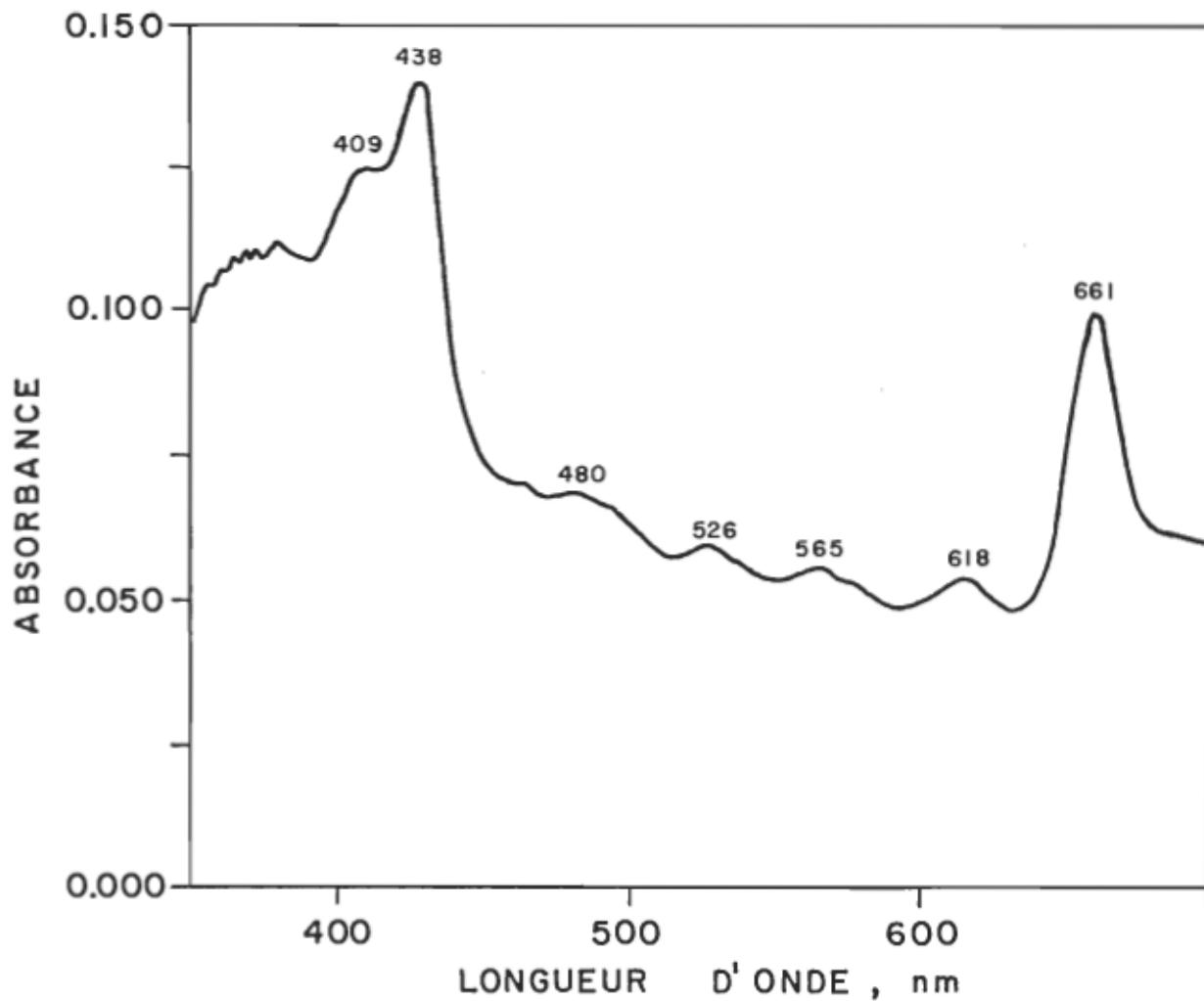


FIGURE 29. Spectre de la chlorophylle *a* en solution dans l'acétone avec les lipides dépigmentés après 30 minutes d'exposition à la lumière; L:Ca (4,5:1,0).

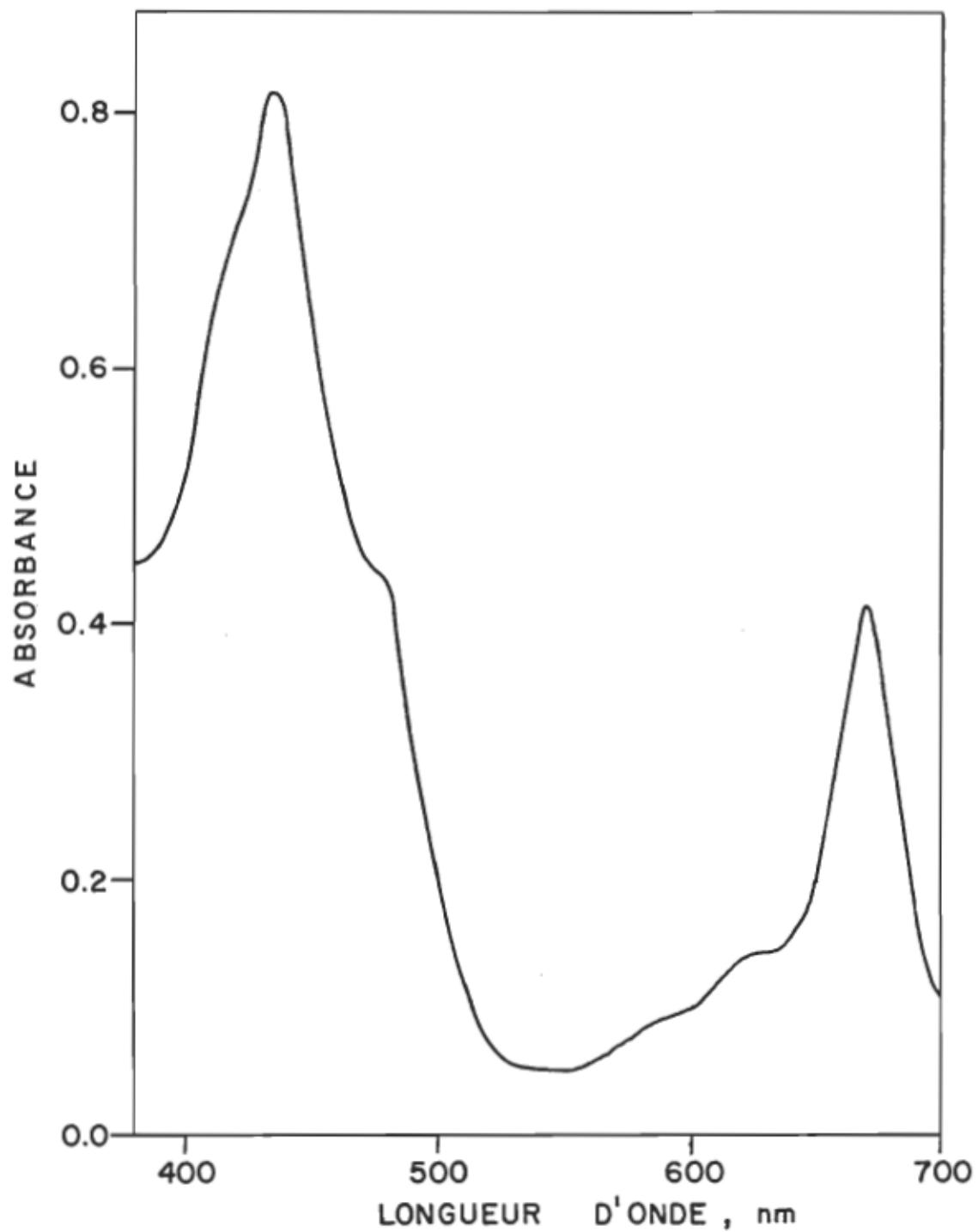


FIGURE 30. Spectre des vésicules de lipides pigmentés.

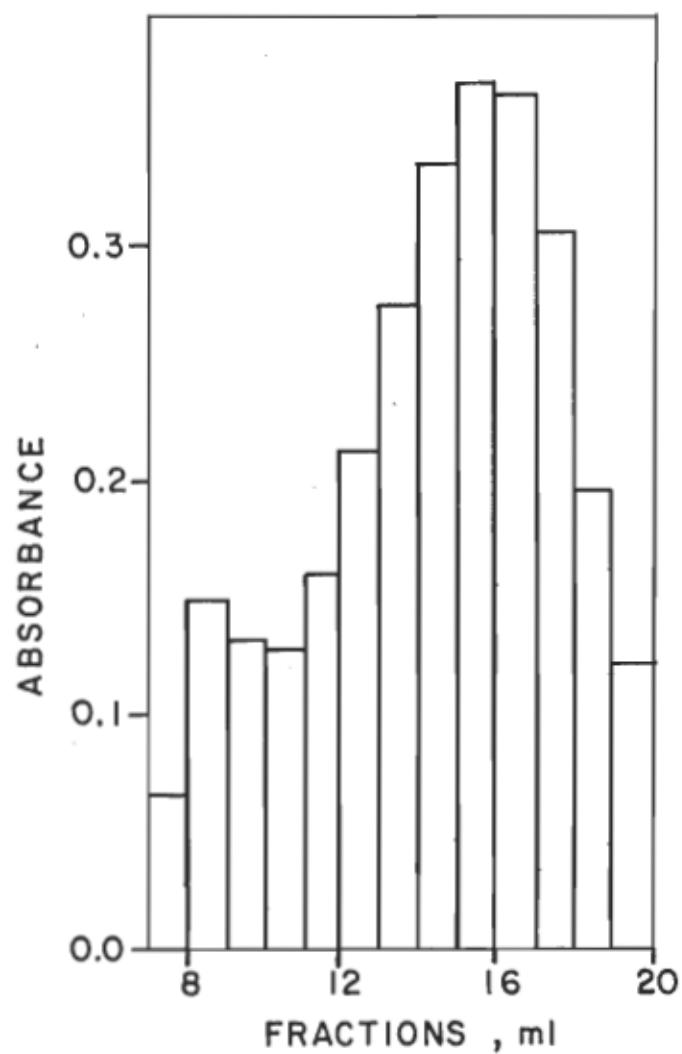


FIGURE 31. Elution des vésicules de lipides pigmentés.

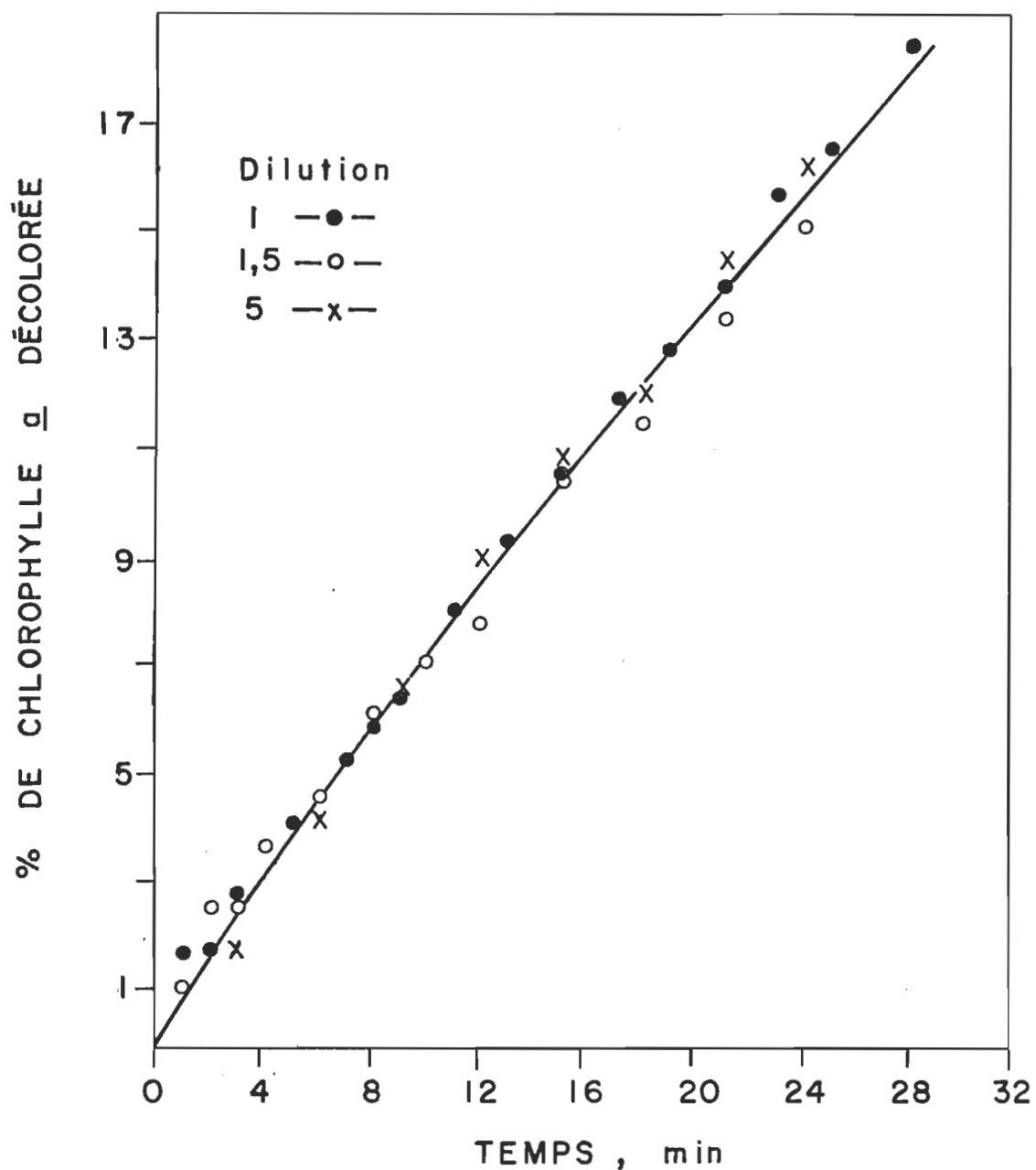


FIGURE 32. Décoloration de la chlorophylle a dans les vésicules de lipides totaux avec différentes dilutions de la suspension.

En guise de comparaison, la figure 33 illustre la décoloration de la chlorophylle a dans une solution acétonique des lipides totaux avec un rapport L:Ca en poids de 4,5:1,0. On note qu'une dilution de la solution réduit la vitesse d'oxydation.

4) Photodécoloration de la chlorophylle a dans les membranes chloroplastiques

Dans le présent travail, nous assumons que le rapport L:Ca des membranes chloroplastiques est le même que dans les lipides totaux. La figure 34 donne la cinétique de décoloration de la chlorophylle a dans une suspension de membranes chloroplastiques diluées 1, 1,5 et 5 fois. Cette dilution n'apporte pas de modification de la photooxydation chlorophyllienne.

5) Comparaison de la photodécoloration de la chlorophylle a dans les différents milieux.

La figure 35 nous donne un résumé de la décoloration de la chlorophylle a dans les cinq conditions déjà énumérées. On peut déjà remarquer que la photodécoloration est beaucoup plus rapide

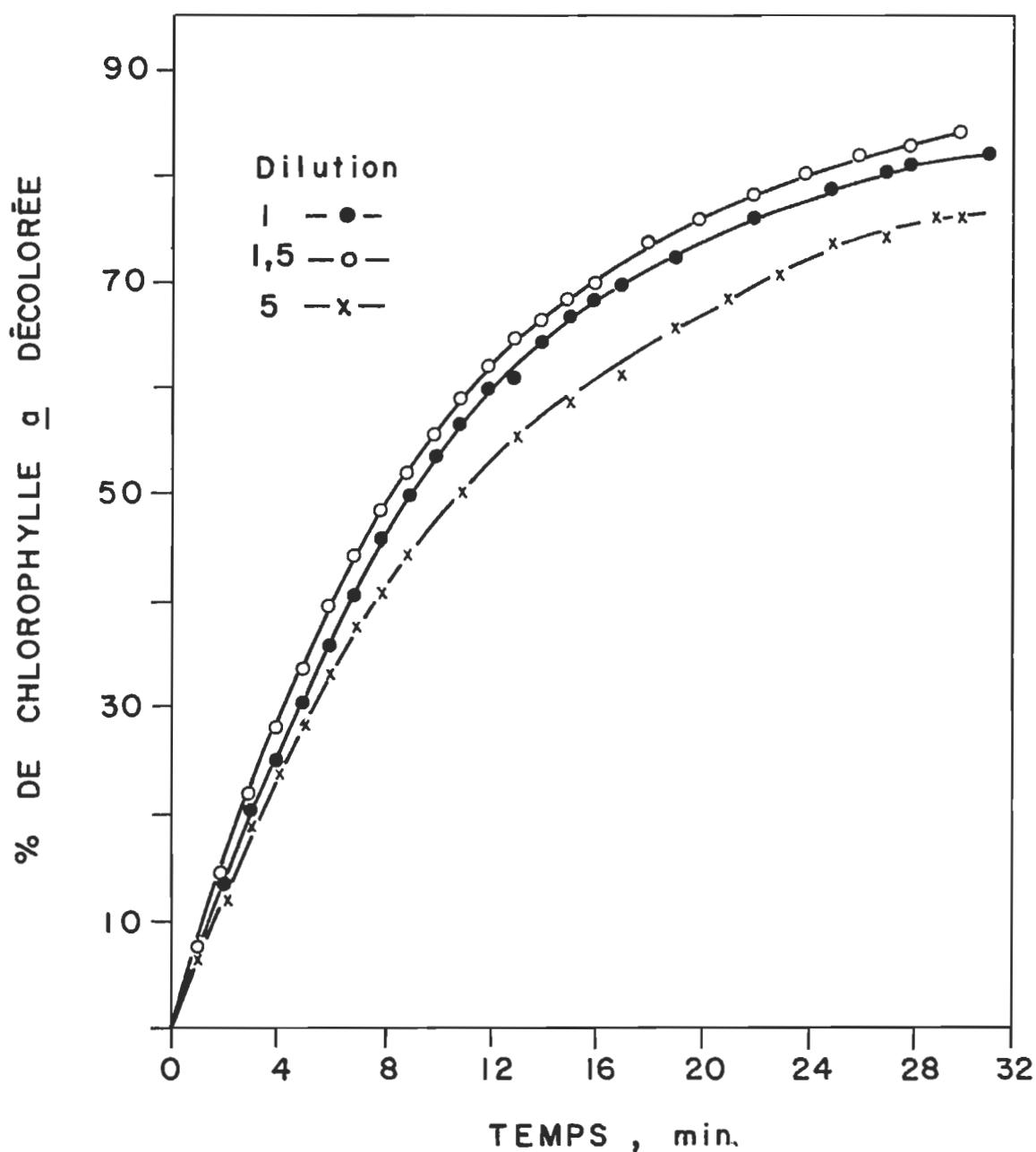


FIGURE 33. Décoloration de la chlorophylle a des lipides pigmentés en solution dans l'acétone avec les lipides pigmentés et pour différentes dilutions de la solution,  $C_a = 0,0140 \text{ mg ml}^{-1}$ .

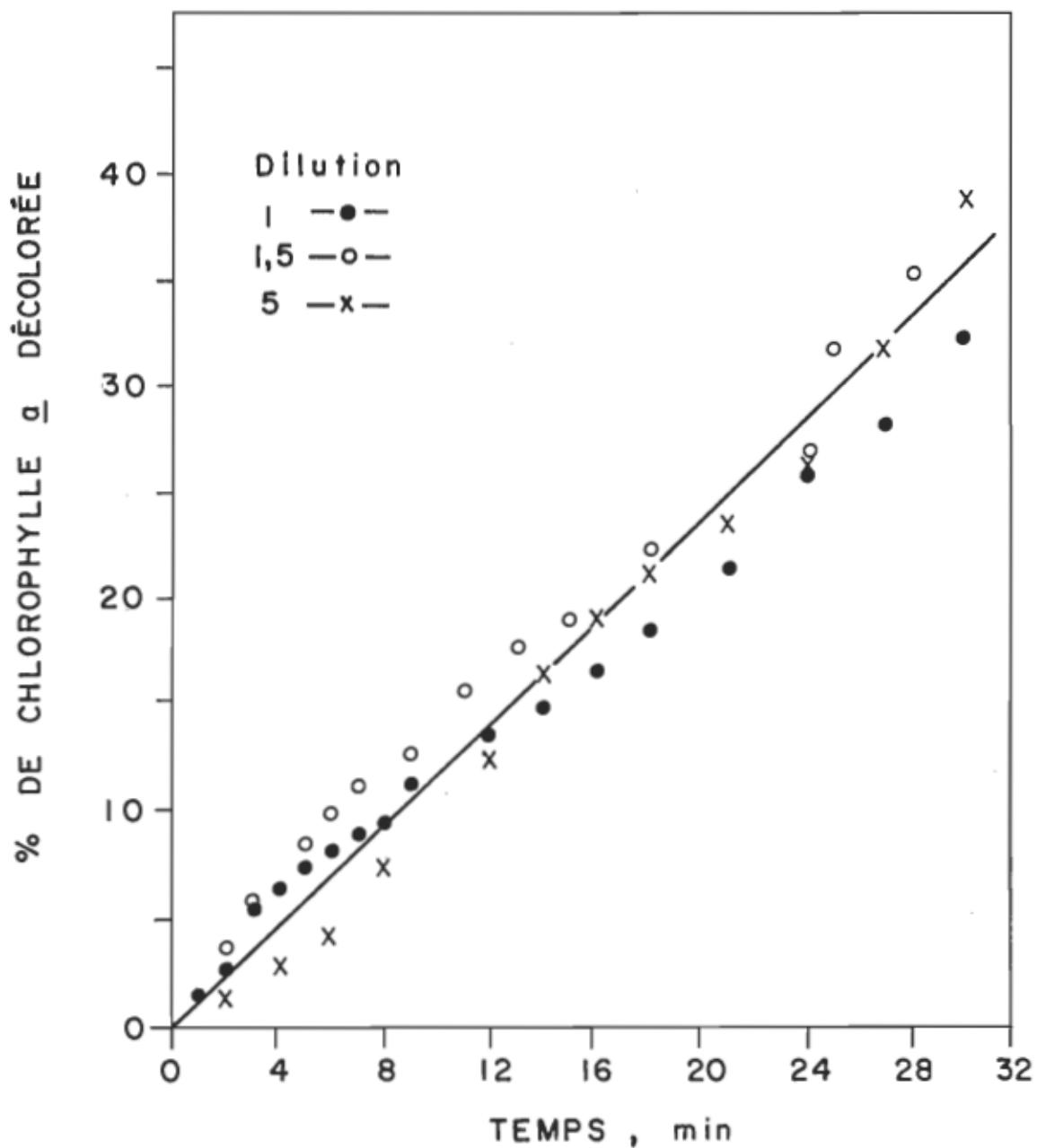


FIGURE 34. Décoloration de la chlorophylle  $a$  dans les membranes chloroplastiques avec différentes dilutions de la suspension.

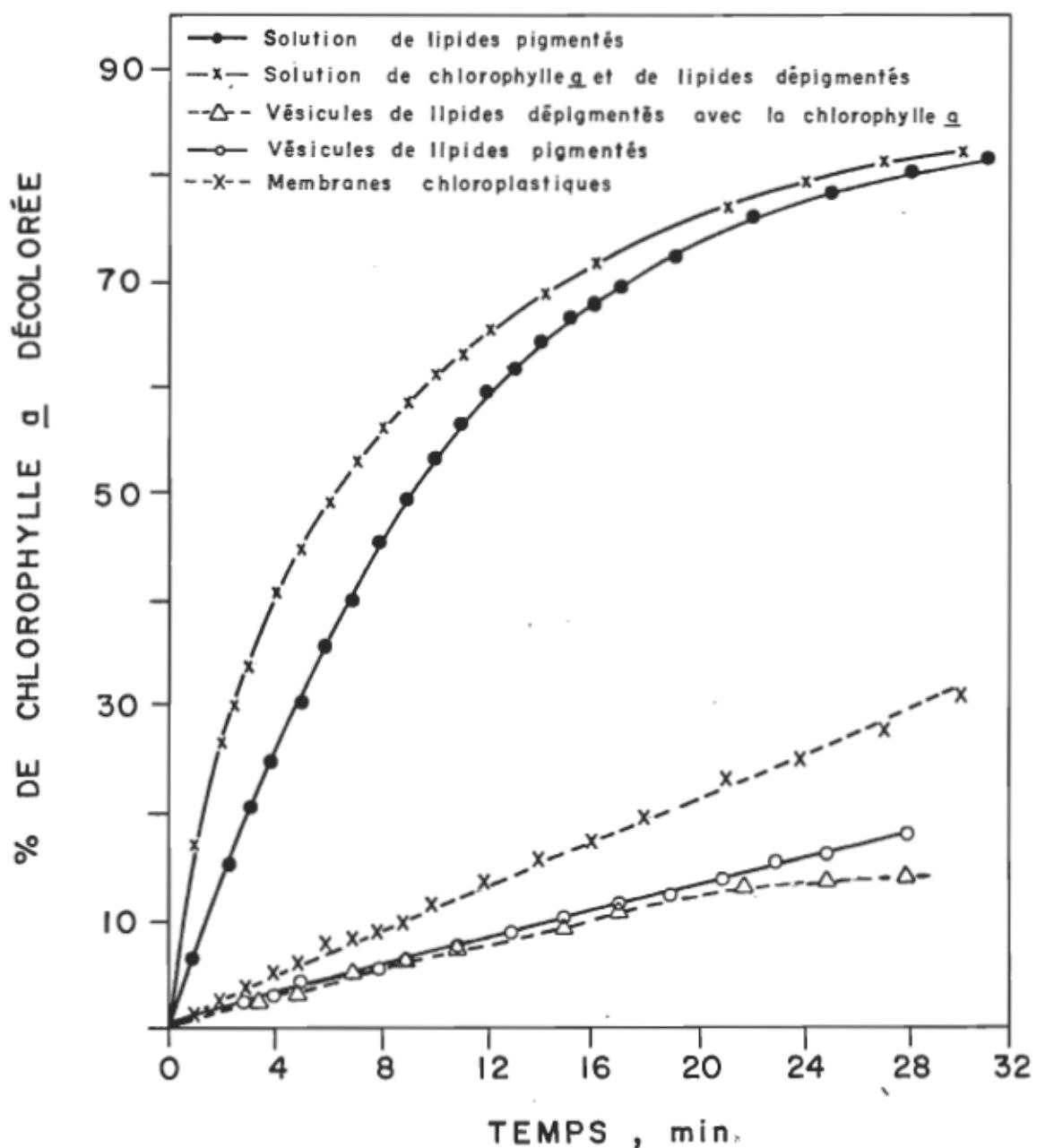


FIGURE 35. Décoloration de la chlorophylle a dans différents milieux où les rapports L:Ca sont semblables.

et complète dans les solutions que pour les cas de vésicules. La décoloration dans les membranes du chloroplaste est sensiblement plus active que dans les vésicules.

De plus, la cinétique de décoloration atteint un plateau sauf pour les vésicules de lipides totaux et les membranes du chloroplaste. Pour ces derniers cas, la cinétique semble être linéaire jusqu'à 28 min d'exposition à la lumière.

Le tableau IX quantifie comparativement les différentes courbes obtenues. Les cas étudiés ont un rapport L:C<sub>a</sub> en poids et une concentration de chlorophylle a initiaux très rapprochés. On peut remarquer que la vitesse initiale de la photodécoloration ( $V_I$ ) et le pourcentage de chlorophylle a décolorée après 28 min (%) diminuent en augmentant la dilution pour les solutions alors qu'ils restent inchangés dans les autres cas.

Tableau IX: Caractéristiques de la décoloration de la chlorophylle a  
dans les différents milieux

Système	$\underline{\text{Ca}}^*(\text{mg ml}^{-1})$ (dil =1)	$\underline{\text{L:Ca}}$	$\text{V}_I$			·%		
			dil:1	1,5	5	dil:1	1,5	5
Solution de lipides totaux	0,0140	4,5:1,0	7,70	7,60	6,10	80	80	74
Solution de lipides dépigmentés + <u>Ca</u>	0,0165	4,1:1,0	19,25	20,00	9,60	85	75	75
Vésicules de lipides totaux	0,0105	4,3:1,0	0,80	0,80	0,80	18	18	18
Vésicules de lipides dépigmentés + <u>Ca</u>	0,0130	4,7:1,0	1,05	1,05	1,05	17	17	17
Membranes chloroplastiques	0,0110	4,5:1,0	1,25	1,25	1,25	36	36	36

\*Concentration initiale de la chlorophylle a

Ces mêmes valeurs apportent plus d'éléments nouveaux si on les compare pour une même dilution. On note alors une hiérarchie quant à l'efficacité de la décoloration de la chlorophylle a qui va décroissante dans l'ordre suivant: solution des lipides dépigmentés + chlorophylle a, solution des lipides totaux, membranes chloroplastiques, vésicules de lipides dépigmentés + chlorophylle a et vésicules de lipides totaux. Ces deux derniers sont très rapprochés.

Enfin, le tableau X nous donne les rendements quantiques ( $\phi$ ) de la photodécoloration de la chlorophylle a dans différents milieux.

Tableau X: Rendement quantique de la décoloration de la chlorophylle a dans différents milieux.

Système	Nombre de mesures	Concentration initiale de Ca (mg ml <sup>-1</sup> )	Rapport L:Ca en poids	$\phi \times 10^3 \pm 30\%$
Ca en solution acétonique	3	0,012	-	0,23
Vésicules de lipides dépigmentés et de Ca	3	0,001	130,0:1,0	0,18
Lipides totaux en solution acétonique	8	0,006-0,013	4,4:1,0	0,06
Vésicules de lipides dépigmentés et de Ca	3	0,002	12,0:1,0	0,05
Membranes chloroplastiques	12	0,005-0,012	4,4:1,0	0,05
Vésicules de lipides totaux	7	0,006-0,013	4,4:1,0	0,008

## IV - DISCUSSION

## 1) Méthodes expérimentales et caractérisation des extraits et des vésicules

Quelques remarques relatives aux méthodes expérimentales méritent d'être soulignées. Notamment, au niveau des extraits, il faut signaler que les conditions d'extraction (i.e. 0°C, obscurité, azote) doivent permettre d'obtenir des lipides contenant peu ou pas de produits oxydés.

Le contenu lipidique de l'extrait de lipides totaux présenté sur le tableau II (c.f. page 30) nous apporte un rapport GSL:PL inférieur à celui donné par Lichtenhaller et Park (1963) mais les ordres de grandeur sont respectés pour la fraction des lipides représentant les phospholipides et la chlorophylle a. Néanmoins, le contenu lipidique peut varier selon les méthodes d'extraction et aussi selon la provenance du matériel. Les lipides dépigmentés dont les quantités relatives des différents constituants sont données sur le tableau III présentent à leur tour un rapport GSL:PL supérieur à celui des lipides totaux. Il semble qu'il y ait une perte de phospholipides probablement reliée à une mauvaise désorption de ces derniers du gel de silice employé pour la dépigmentation.

Par ailleurs, le spectre du pigment jaune qui apparaît en faible quantité dans l'extrait de lipides dépigmentés est présenté sur la figure 8 (c.f. page 33). Ce spectre est similaire à celui de l'auroxanthine. En fait, ce pigment n'est pas présent dans le

chloroplaste *in vivo*. Il pourrait plutôt provenir d'une dégradation de la violaxanthine (Karrer et Jucker, 1945) lors des procédures d'extraction. Il a été impossible de le séparer du monogalactosyldiglycéride par les méthodes chromatographiques utilisées.

Par contre, la chlorophylle a' accompagnant la chlorophylle a peut être séparée. Néanmoins, cette opération amène un rendement bien inférieur en chlorophylle et c'est pourquoi la forme a' a été conservée. De plus, il s'agit probablement, comme le signalent Omata et Murata (1980), de l'isomère étudié par Katz et al. (1968) qui a les mêmes propriétés spectrales que la chlorophylle a. Il proviendrait d'une inversion de la position des groupements -H et  $-CO_2CH_3$  sur le carbone 10 du macrocycle.

Ajoutons que la chlorophylle a (incluant la chlorophylle a') possède un très bon degré de pureté. De fait, l'étude spectrale montre des résultats très proches de ceux de Bellamy et Lynch (1963) nous informant ainsi de la bonne qualité de l'extrait. Ce résultat est d'ailleurs corroboré par l'analyse chromatographique.

L'utilisation de l'extrait de lipides dépigmentés pour la fabrication de vésiculés nous procure quelques surprises. On voit, par

exemple sur les figures 16 et 17 (c.f. page 46-47) que les trop fortes concentrations de lipides injectés dans le tampon amènent un très grand nombre de particules de diamètre imposant. Dans le cas de la lécithine, des concentrations finales de l'ordre de  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  sont permises dans le tampon (Dijkamns et al., 1979b). Ici il faut se restreindre à des concentrations inférieures à  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ . Une expérience (c.f. page 49) nous a indiqué que l'incorporation de saccharose dans le tampon servant à confectionner les vésicules permet d'obtenir une suspension limpide de vésicules à des concentrations lipidiques qui apportent normalement une suspension turbide. L'effet du saccharose peut être interprété si on considère qu'en augmentant la viscosité du milieu les possibilités de contact entre vésicules sont restreintes. Cette expérience nous indique alors qu'en absence de saccharose, de petites particules fusionnent et/ou s'agrègent en plus grosses de façon à donner une suspension turbide. Le même phénomène que l'effet du saccharose se produit en diminuant la concentration de lipides. La dilution des vésicules leur permet d'être plus éloignées les unes des autres et les interactions entre elles sont ainsi diminuées.

Comme cette situation n'a pas été notée pour les vésicules de lécithine, il existe donc une attraction plus forte entre les vésicules contenant des lipides extraits du chloroplaste qu'entre celles ne contenant que des lipides zwitterioniques (charge nulle). La présence du KCl n'a pas interrompu cette attraction et, de plus,

l'utilisation de tampons moins concentrés (force ionique plus faible) la diminue. Les ions du milieu viennent donc faciliter ou participer à l'union des particules.

Cette attraction semble reliée à la présence de charges à la surface des vésicules. La tête polaire de la phosphatidylcholine étant neutre, peu d'attraction doit s'exercer entre les vésicules formées exclusivement de ce lipide. Par contre, le tableau III nous indique que les lipides utilisés ici sont très variés. Les lipides qui possèdent une charge nette sur leur tête polaire sont surtout les phospholipides et les sulfolipides. Cette charge est négative dans la plupart des cas (Lehninger, 1970) conférant ainsi une charge négative aux vésicules étudiées qui sont formées en partie de ces lipides chargés (Lichtenthaler et Park, 1963).

Le dosage des fractions éluées dans les meilleures conditions (c.f. partie Matériel et Méthodes, 6-A) montre comme illustré sur la figure 18 que la quantité de lipides présents dans le volume d'exclusion est très faible. La fabrication des vésicules dans l'eau distillée n'améliore pas la situation mais amène plutôt une complication reliée au tamis moléculaire. En effet, un troisième pic apparaît dans le diagramme d'élution illustré sur la figure 15c. Il est probablement dû à des interactions avec la colonne. Dans le cas de substances chargées, des interactions ioniques ou de Van der Waals peuvent survenir avec la matrice du gel et retarder ainsi l'élution d'un certain nombre de particules qui sont ainsi retenues sur le gel (Pharmacia Fine Chemicals, 1979).

D'autre part, notons que Batzri et Korn (1973) et Dijkmans et al. (1979b) ont montré par microscopie électronique que la technique de confection des vésicules utilisées pour cette étude procure des vésicules unilamellaires. De plus, l'utilisation de la sonication peut provoquer l'oxydation ou le bris de liens covalents dans les chaînes lipidiques. Ces dégradations peuvent être atténuées par l'utilisation de conditions expérimentales très strictes ( $2^{\circ}\text{C}$ , azote) mais non pas éliminées (Huang et Charlton, 1972). Comme il a été démontré par Dobretsov et al. (1977) que la peroxydation des lipides amène une augmentation de la viscosité des membranes, il est de bon aloi d'éliminer ces inconvénients qui peuvent altérer le fonctionnement de la double couche. La méthode de sonication est, par surcroit, beaucoup plus longue que la simple injection des lipides dans le tampon (méthode utilisée ici). En effet, la sonication doit être suivie d'une centrifugation afin d'éliminer les lipides non dispersés et les fragments de titane perdus par l'appareil de sonication; le tout peut prendre plus de deux heures (Huang et Charlton, 1972).

Le diamètre moyen des vésicules déduit d'après la figure 18 et le tableau V (c.f. pages 50 et 39) est de 23,0 nm. Il est donc semblable à celui obtenu normalement par cette technique (sans sonication) avec la lécithine d'oeuf (Dijkmans, 1979b). L'ajout de la chlorophylle a ou même l'utilisation des lipides totaux amène des vésicules de dimensions inchangées d'après les figures 18, 20 et 31. Dans le cas des vésicules de

lécithine, l'ajout de la chlorophylle a ne modifie pas non plus le diamètre des particules. Nous avons donc une bonne indication que ce diamètre dépend de la nature des lipides utilisés. Notamment, Johson (1973) a montré que des têtes polaires-chargées amènent de plus grosses vésicules. Cette situation n'est donc pas reproduite ici.

Par ailleurs, Ritt et Walz (1976) ont obtenu avec une technique impliquant la sonication, des vésicules de diamètre semblable (22,0 nm) où l'ajout de la chlorophylle a diminue le diamètre des vésicules de 9 %. Comme une variation de 10 % dans le diamètre moyen des vésicules obtenues sans sonication (23,0 nm) constitue une mesure inférieur à la répartition du diamètre des particules dans une fraction d'élution donnée pour la méthode utilisée ici ( $\approx 4,0$  nm), cette variation n'a pas pu être détectée.

D'après la figure 20, le diamètre des vésicules ne change pas lorsqu'on diminue le rapport L:Ca. Cependant, on remarque sur la figure 23 (c.f. page 57) l'apparition d'une forme de chlorophylle absorbant vers 700 nm. Le maximum d'absorption dans le rouge demeure cependant à 669 nm dans les limites de sensibilité de l'appareil; il correspond à ce qui a été donné par d'autres auteurs (Lee, 1975a; Ritt et Walz, 1976; Fragata, 1977b et Dijkmans et al., 1979b).

Dans les vésicules de phosphatidylcholine, Fragata (1977b) a détecté une bande à 740 nm. Pour leur part, Murata et Sato (1978) ont observé des microcristaux de chlorophylle a absorbant à 745 nm

dans des membranes de galactolipides quand le rapport molaire L:Ca était inférieur à 5,0:1,0 alors que ces agrégats n'étaient pas formés en présence de phospho- ou sulfolipides. Lee (1975a) a remarqué une forme de chlorophylle a se manifestant par un épaulement à 685 nm dans les vésicules multilamellaires de dipalmitoylphosphatidylcholine. Il semble donc que l'environnement de la chlorophylle dans les vésicules permet l'apparition de formes détectées "in vivo".

Ces maximums correspondent à différents états d'agrégation ou d'hydratation de la chlorophylle a. En fait, Fetterman et al. (1977) présentent un modèle où la forme absorbant à 740 nm correspond au polymère de chlorophylle a dihydraté ( $\text{Chl } \underline{a} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )<sub>n</sub> et la forme à 695 nm au dimère monohydraté ( $\text{Chl } \underline{a} \cdot \text{H}_2\text{O}$ )<sub>2</sub>. L'absorption à 685 nm est assignée par Lee (1975a) à une autre forme d'agrégation qu'il n'a pas déterminée.

Il est à noter, comme le signalent Fragata (1977b) et Lee (1975b) que c'est l'état physico-chimique des vésicules qui influence l'agrégation de la chlorophylle. Warshel (1979) remarque que le déplacement de l'absorption vers le rouge est dû au niveau d'hydratation de la chlorophylle. Ainsi, Fong et Wassam (1977) ont observé que les dimères non hydratés de chlorophylle n'amènent pas de déplacement important. Si on considère que le macrocycle de la chlorophylle est placé parmi les têtes polaires des lipides, l'état d'hydratation chloro-

phyllienne dépendra du niveau d'hydratation de la partie polaire de la membrane. Cette dernière caractéristique dépendra à son tour du type de lipide employé. Les groupements polaires des galactolipides étant très gros et possédant beaucoup de groupements hydroxyles, leurs structure permet de former plusieurs liens hydrogènes avec l'eau. Cette situation amène une bonne hydratation de la partie hydrophile des vésicules étudiées et suggère que la forme agrégée de chlorophylle qu'on y trouve soit hydratée.

Le niveau d'agrégation (i.e. le nombre d'agrégats) dépendra de la facilité avec laquelle les molécules de chlorophylle peuvent se rencontrer. Ceci est en étroite relation avec le rapport L:Ca qui détermine les distances interchlorophylliennes dans la bicoche. Soulignons qu'une répartition non homogène de la chlorophylle a dans les vésicules peut amener des régions où la forte densité en chlorophylle favorise la formation d'agrégats. À ce niveau, Berden et al. (1975) ont montré à l'aide de vésicules mixtes que la lécithine se plaçait préférentiellement sur la face externe de la bicoche lorsqu'elle était en présence de phosphatidyléthanolamine, de phosphatidylsérine, de phosphatidylinositol ou d'acide phosphatidique; la situation inverse survient lorsque la lécithine est accompagnée de sphingomyéline (voir aussi Litman, 1973; Michaelson et al., 1973 et Mersel et al., 1980). Il faut donc considérer la possibilité d'une asymétrie dans la répartition des différents types de lipides constituant les présentes vésicules. Cette asymétrie pourrait amener des zones prédominantes en chlorophylle. Néanmoins, la figure

23 indique que la forme détectée à 700 nm n'apparaît que lorsque la chlorophylle est en concentration très importante.

Dijkmans et al. (1979b) ont démontré que l'aire moléculaire de la lécithine d'oeuf dans les vésicules était similaire à l'aire dans une monocouche à l'interface air-eau. Si nous assumons qu'il en est de même pour les autres constituants des vésicules étudiées, on peut considérer les aires moléculaires approximatives suivantes: PL, SL, MGD, DGD =  $0,8 \text{ nm}^2$  et  $\text{Ca} = 1,2 \text{ nm}^2$  (c.f. Bishop et al. 1980 et Chapados et al. 1980). Nous assumons que l'aire des lipides non dosés est de  $0,8 \text{ nm}^2$ .

La formule suivante permet de calculer approximativement la distance ( $\rho$ ) entre le centre des molécules de chlorophylle a (si on considère les surfaces disponibles pour chaque molécule de chl a comme des carrés contigus):

$$\rho = \sqrt{\sum_i X_i A_i}$$

où  $i$  = molécules d'aire moléculaire identique

$X_i$  = nombre de molécules  $i$  par molécule de chlorophylle a

(où dans le cas de la chlorophylle a,  $X_i = 1$ )

$A_i$  = aire moléculaire de la molécule  $i$

Cette formule est valable si on ne prend pas en considération l'influence des interactions entre les différentes molécules sur les aires moléculaires. De plus, la distance calculée représente une distribution homogène des constituants.

D'après les données de Lichtenhaler et Park (1963), les lipides dosés dont les proportions relatives en poids sont données sur le tableau III, représentent 70 % des lipides présents dans l'extrait dépigmenté. Les constituants non dosés seraient en majeure partie composés de lipides non identifiés. On doit transformer le rapport  $L:\underline{Ca}$  en poids en rapport  $Lt^*:\underline{Ca}$  molaire pour effectuer le calcul de  $\rho$ . Le rapport  $L:\underline{Ca}$  en poids de 4,4:1,0 correspond à un rapport molaire  $Lt:\underline{Ca}$  de 7,0:1,0. A cette concentration de chlorophylle, on obtient  $\rho = 2,6$  nm.

Ainsi, avec ce rapport  $L:\underline{Ca}$ , la proximité des molécules est telle que la formation d'agrégat n'a plus rien de surprenant et elle ne nécessite pas une hétérogénéité de répartition chlorophyllienne préalable. Chapados et al. (1980) présentent un modèle de dimère hydraté de chlorophylle a absorbant à 680 nm. La distance entre les deux atomes de magnésium impliqués est alors de 0,80 nm. En tenant compte des interactions moléculaires et de la diffusion latérale des molécules, la faible distance à franchir ne pose pas de problème majeur dans la formation d'agrégat.

## 2) Photodécoloration de la chlorophylle a

La photodécoloration apporte des résultats bien caractérisés. L'augmentation de la vitesse initiale de décoloration qui suit le rapport  $L:\underline{Ca}$  comme indiqué sur le tableau VIII (c.f. page 63) peut

---

\* Abréviation : Lt = lipides dosés + lipides non dosés

s'expliquer s'il y a un mécanisme de dissipation de l'énergie lumineuse absorbée qui intervient à forte concentration de chlorophylle. Cet effet a déjà été remarqué pour les vésicules de lécithine (Dijkmans et al., 1979b).

Une comparaison entre les résultats de Dijkmans et al. (1979b) et ceux présentés ici révèle que cet effet, au niveau de la vitesse initiale de décoloration, est deux fois plus important dans les vésicules de lécithine que dans celles utilisées ici avec des L:Ca semblables. Dans notre cas, si on se réfère au tableau III, les vésicules sont formées d'une grande part de galactolipides. Ces résultats coïncident donc avec les expériences de Beddard et al. (1976) (voir aussi partie I page 2) qui remarquent que la diminution de fluorescence est deux fois plus marquée dans les vésicules de lécithine que dans celles de mono et digalactosyldiglycéride (proportions molaires 3:1). La formation de pièges dissipateurs d'énergie est donc plus difficile avec la présence de galactolipides.

Comme Dijkmans et al. (1979b) n'ont pas noté la présence de l'agrégat à 700 nm (la largeur à mi-hauteur de la bande d'absorption de la chlorophylle dans le rouge restant constante en variant le rapport L:Ca), rien ne laisse penser que cette forme est responsable à elle seule de la dissipation d'énergie. Cette constatation implique la présence de pièges d'énergie autre que la forme d'agrégation absorbant à 700 nm.

Beddard et al. (1976) proposent l'intervention d'un piège d'énergie formé par l'interaction de deux molécules de chlorophylle s'approchant à moins de 1,0 nm. Lorsqu'une des molécules passe à l'état excité, le doublet formerait alors un complexe, non fluorescent, dissipateur d'énergie. Je suggère l'intervention de ce mécanisme pour expliquer les résultats du tableau VIII. La répartition de l'énergie sur un couple de molécules empêcherait la dégradation de la molécule qui a été excitée. Dans un tel mécanisme on peut suggérer que le complexe formé n'est pas une forme d'agrégation statique mais plutôt une association dynamique entre chlorophylles voisines. Cette situation expliquerait pourquoi le complexe ne peut être détecté en spectroscopie d'absorption conventionnelle.

Si ce type de dissipateur n'est pas un agrégat statique, sa formation implique la mobilité des molécules de chlorophylle qui doivent se rapprocher (momentanément) pour former le couple (ou triplet) dissipateur. Le fait que la formation de ces pièges est plus difficile dans les bicouches contenant une majeure partie de galactolipides peut maintenant s'expliquer.

En effet, comme le remarquent Beddard et al. (1976), les groupements galactose de ces lipides sont beaucoup plus gros que la choline de la lécithine et ils sont bien adaptés pour la formation de liens hydrogène avec les groupements carbonyl de la chlorophylle et pour la coordination avec l'atome de magnésium. Rosenberg (1967)

suggère de plus, un rôle pour la forte insaturation des chaînes carbonées de ces lipides. Alors que pour la plupart des phospholipides une seule des deux chaînes hydrophobes possède des liaisons doubles, les galactolipides présentent des insaturations dans les deux chaînes. Rosenberg propose que les groupements  $-\text{CH}_3$  latéraux de la chaîne phytol de la chlorophylle iraient s'imbriquer dans les replis des chaînes glycéridiques formés par les liaisons doubles. Ces deux considérations nous suggèrent fortement que les molécules de chlorophylle sont restreintes dans leurs mouvements en présence des galactolipides. De ce fait, la formation de dissipateurs dynamiques devient plus difficile.

Par ailleurs, le pourcentage de chlorophylle décolorée après 15 min d'exposition à la lumière (figure 26) est nettement inférieur à celui obtenu par Dijkmans et al. (1979b) pour des mêmes rapports L:Ca dans les vésicules de lécithine. Cette plus faible décoloration pourrait s'expliquer par une meilleure protection de la chlorophylle par les lipides utilisés ici vu que les interactions entre la porphyrine et les têtes polaires des galactolipides sont plus grandes qu'avec les têtes polaires de la lécithine. Stillwell et Tien (1977a) ont d'ailleurs montré en solution que la tête polaire des phospholipides est nécessaire pour la protection de la chlorophylle. Comme le soulignent Chen et Berns (1979) après une expérience avec des BLM de lécithine et d'autres de monogalactosyldiglycéride, les galactolipides ont des propriétés et une

structure moléculaire qui doivent jouer un rôle important dans les membranes photosynthétiques.

Cependant, Selstam (1978) n'a pas remarqué de protection de la chlorophylle a contre la lumière lorsqu'elle était en solution avec le monogalactosyl diglycéride. De Kok et al. (1978) a même montré que le monogalactosyldiglycéride stimule la photooxydation de la chlorophylle dans une dispersion liposomiale à basse température.

La meilleure protection de la chlorophylle dans les vésicules que nous étudions pourrait mieux s'expliquer par l'intervention de la forme chlorophyllienne absorbant à 700 nm dans la dissipation de l'énergie. Son action pourrait s'ajouter à celle des dissipateurs dynamiques. Sur le tableau XI, nous suggérons quelques facteurs comparatifs entre ces deux types de pièges dissipateurs d'énergie.

Par ailleurs, sur la figure 27 (c.f. page 64 ), on n'observe aucune différence de photodécoloration en diluant les suspensions de vésicules. Ce résultat indique qu'on n'obtient pas l'interaction entre les particules trouvées par Dijkmans et al. (1979b) pour les vésicules de lécithine d'oeuf.

Si on regarde la décoloration de la chlorophylle a dans différents environnements comme illustrée sur la figure 35 (c.f. page 74 ), on trouve des différences notables au niveau de la protection accordée à

Tableau XI : Tableau comparatif des pièges dissipateurs d'énergie

Absorption	—	700 nm
Type de dissipateur	Dynamique	Statique
Formation	Dépend de la concentration locale de chlorophylle et de la mobilité des molécules.	Dépend de la concentration locale de la chlorophylle et de la mobilité des molécules.
Durée	Momentanée	Jusqu'à sa propre oxydation
Type d'interaction impliquée	Electrostatique	Agrégation par des liaisons de Van der Waals (avec ou sans présence d'eau)
Mécanisme dissipatif	Une molécule excitée se désactive thermiquement avec la participation vibrationnelle d'une (ou plusieurs) autre(s) molécule(s)	Reçoit l'énergie d'une molécule excitée extérieure au piège (ou une des molécules du piège est excitée) et la dissipe thermiquement
Conditions	Contact entre les molécules. Le mécanisme de dissipation doit se produire avant l'action oxydative de l'oxygène	Transfert d'énergie par contact ou par résonance. Le mécanisme de dissipation doit se produire avant l'action oxydative de l'oxygène

la chlorophylle. Par exemple, la décoloration est beaucoup plus rapide en solution que sous forme vésiculaire pour les mêmes rapports L:Ca. Ce résultat indique que l'organisation sous forme de membrane est très importante pour favoriser les interactions protectrices de la chlorophylle avec les autres lipides et la formation de pièges d'énergie dissipatifs.

On remarque cependant sur le tableau X (c.f. page 77) que la décoloration est du même ordre de grandeur dans les vésicules où la chlorophylle est très diluée (L:Ca de 130,0:1,0) qu'en solution de chlorophylle pure. Cela laisse supposer que des systèmes dissipatifs se forment en faible quantité dans les solutions relativement concentrées en chlorophylle a par rapport aux vésicules susmentionnées. Dans ces vésicules, de tels systèmes ne peuvent pas se former à cause de l'éloignement des molécules de chlorophylle a et de leur plus faible mobilité qu'en solution.

De plus, on peut constater sur le tableau X qu'en solution avec les lipides totaux, le rendement quantique de décoloration est inférieur à celui de la solution pure de chlorophylle. Stillwell et Tien (1977a) ont d'ailleurs démontré la protection de la chlorophylle par différents types de phospholipides et de caroténoides en solution. On peut donc imaginer que certains types d'agrégats lipide-chlorophylle a peuvent survenir à cet effet.

Le rôle des caroténoïdes dans la protection de la chlorophylle a consiste à éliminer l'oxygène singulet comme suit (Foote et Denny, 1968):



où  $^1\text{O}_2$  et  $^3\text{O}_2$  sont respectivement l'oxygène à l'état singulet et triplet, Car et  $^3\text{Car}$  représentent les caroténoïdes à l'état fondamental et triplet. Ce mécanisme de protection a été souvent démontré en solution (Stillwell et Tien, 1977a; Koka et Song, 1978; voir aussi Krinsky, 1978 et Rodgers et Bates, 1980). Il est donc normal que nous le retrouvions dans les résultats présentés sur le tableau IX (c.f. page 76) en observant une vitesse initiale de décoloration légèrement plus élevée dans les lipides dépigmentés que dans les lipides totaux et cela autant pour les solutions que pour les vésicules.

Il faut cependant noter que dans le cas des lipides totaux, la présence de chlorophylle b pourrait modifier les résultats. En effet, il est bien connu que cette chlorophylle transfère son énergie à la chlorophylle a. Cet apport énergétique peut minimiser la protection apparente des caroténoïdes en apportant un effet inverse sur la décoloration de la chlorophylle a.

De plus, la chlorophylle b est connue pour être beaucoup plus résistante à la lumière que la chlorophylle a dans le chloroplaste (Thomas et Nijhuis, 1968). L'effet de la décoloration de la

chlorophylle b sur l'absorbance de la chlorophylle a n'a donc pas été pris en considération.

Par ailleurs, il est très surprenant de constater que la décoloration est beaucoup plus rapide dans les membranes chloroplastiques que dans les vésicules de lipides totaux. Comme le seul constituant qui différencie ces deux systèmes est l'ensemble des protéines membranaires, il faut s'interroger sur le rôle de ces dernières *in vivo*. En fait, il doit être très important car Markwell et al. (1979) ont démontré qu'il existe de fortes possibilités pour que toute la chlorophylle présente *in vivo* soit reliée à des complexes chlorophylle-protéine. Si ce rôle est d'influencer l'orientation ou la conformation de la chlorophylle de sorte que la lumière soit absorbée plus efficacement, il se peut, dans un cas où l'énergie n'est pas drainée par la photosynthèse que leur effet soit de stimuler la photooxydation de la chlorophylle.

A ce niveau, Widart et al. (1979) ont observé que la décoloration de chlorophylle a est très rapide sur des globules lipoprotéiques extraits du lait (i.e. plus rapide que pour une solution acétonique de chlorophylle pure). Dinant et al. (non publié) ont remarqué que c'est aussi le cas sur des globules de protéine grise extraits du chloroplaste, malgré que la décoloration s'arrête à 50% de chlorophylle intacte.

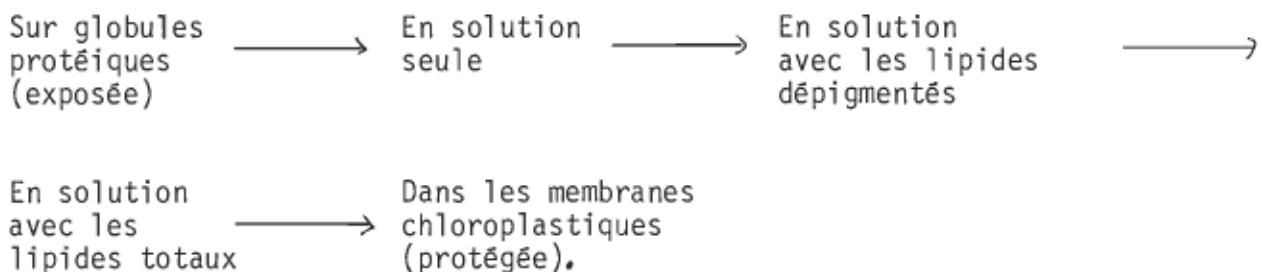
Ces résultats expliquent donc la décoloration relativement rapide des membranes chloroplastiques. Cette décoloration n'a cependant pas atteint plus de 35% de la chlorophylle après 30 minutes d'exposition à la lumière. Il ne faut pas exclure un rôle possible des protéines membranaires (ou de certaines d'entre elles) au niveau de la protection chlorophyllienne. Cependant, McDonald et al. (1979) ont déduit que l'oxygène pourrait être abondant à l'intérieur même des protéines et de ce fait, la décoloration chlorophyllienne peut s'y produire. Les protéines, tout comme les lipides, ne constituent pas en eux-mêmes un isolant contre l'oxygène.

Finalement, les possibilités d'interaction visant à former des pièges dissipateurs d'énergie dans les vésicules sont augmentées avec la hausse de concentration chlorophyllienne. La présence de ces interactions ne sont pas à exclure dans les vésicules de lipides totaux. Nonobstant, dans les membranes chloroplastiques, l'influence de protéines pourrait nuire à ce type d'interaction afin de favoriser les mécanismes photosynthétiques. On ne voit pas, *in vivo*, l'utilité de la présence abondante de pièges dissipateurs qui pourraient subtiliser l'énergie aux centres photochimiques.

## V - CONCLUSION

En conclusion, les points suivants ressortent de cette étude:

- la fabrication des vésicules avec les lipides dépigmentés amène des interactions ioniques qui causent l'agrégation des particules. Ceci n'était pas remarqué pour les vésicules de lécithine;
- en diminuant le rapport L:Ca, on assiste à l'apparition d'une forme de chlorophylle a absorbant à 700 nm qui n'a pas été détectée avec d'autres types de vésicules.
- on peut donner comme suit l'ordre de protection de la chlorophylle a contre la lumière:



Le cas des vésicules est plus complexe à cause de la formation de pièges dissipateurs d'énergie qui protègent la chlorophylle a. Pour des rapports L:Ca semblables, la protection est plus grande avec les

lipides chloroplastiques qu'avec la lécithine et semblable dans les lipides dépigmentés et totaux. Néanmoins, elle est plus importante dans les membranes chloroplastiques que dans les vésicules de lipides totaux. En variant le rapport L:Ca, la décoloration augmente avec le rapport L:Ca. Elle peut même devenir plus importante qu'en solution si le rapport L:Ca est élevé.

Néanmoins, une étude de la décoloration de la chlorophylle a dans les vésicules de lipides dépigmentés avec des conditions où les agrégats de chlorophylle sont détruits pourrait amener de nouvelles précisions sur ce phénomène. Par ailleurs, une caractérisation plus poussée de ces vésicules serait avantageuse en vérifiant les types de liaisons présentes dans les agrégats (par exemple, par spectroscopie Raman de résonance) et la mobilité des constitutants membranaires (par résonance magnétique nucléaire). L'introduction de la protéine grise du chloroplaste, de la chlorophylle b et des caroténoïdes dans de telles vésicules permettrait de voir l'effet de ces constituants sur la photooxydation de la chlorophylle a.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- o Ackers, G.K. (1967). A new calibration procedure for gel filtration columns. *J. Biol. Chem.* 242, 3237-3238.
- o Ames, B.N. et Dubin, D.T. (1960). The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 235, 769.
- o Barber, J. (1978). Biophysics of photosynthesis. *Rep. Prog. Phys.* 41, 1157-1199.
- o Batzri, S. et Korn, E.D. (1973). Single bilayer liposomes prepared without sonifications. *Biochim. Biophys. Acta* 298, 1015-1019.
- o Beddard, G.S., Carlin, S.E. et Porter, G. (1976). Concentration quenching of chlorophyll fluorescence in bilayer lipid vesicles and liposomes. *Chem. Phys. Lett.* 43, 27-32.
- o Bellamy, W.D. et Lynch, M.E. (1963). The preparation, preservation and properties of chlorophyll and some of its derivatives. Report No 63-RL-3469G, General Electric Research Laboratory, Schenectady, New York, 17 pp.
- o Berden, J.A., Barker, R.W. et Radda, G.K. (1975). N.M.R. studies on phospholipid bilayers, some factors affecting lipid distribution. *Biochim. Biophys. Acta* 375, 186-208.
- o Bishop, D.G., Kenrick, J.R., Bayston, J.H., Macpherson, A.S. et Johns, S.R. (1980). Monolayer properties of chloroplast lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 602, 248-259.

- o Chapados, C., Germain, D. et Leblanc, R.M. (1980). Aggregation of chlorophylls in monolayers. Part IV. The reorganisation of chlorophyll a in multilayer array. *Biophys. Chem.* 12, 189-198.
- o Chen, P.S., Toribara, T.Y. et Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 28, 1756-1758.
- o Chen, S.S. et Berns, D.S. (1979). Effect of plastocyanin and phycocyanin on the photosensitivity of chlorophyll-containing bilayer membranes. *J. Membrane Biol.* 47, 113-127.
- o Colbow, K. (1973). Chlorophyll in phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 318, 4-9.
- o Davies, B.H. (1976). Carotenoids. Dans: Chemistry and Biochemistry of plant pigments, Vol. 2 (T.W. Goodwin, ed.) Academic Press, New York, 38-165.
- o DeKok, L.J., VanHansselt, P.R. et Kwiper, P.J.C. (1978). Photo-oxydative degradation of chlorophyll-a and unsaturated lipids in liposomal dispersions at low-temperature. *Physiol. Plant* 43, 7-12.
- o Dijkmans, H., Cogniaux, F. et Aghion, J. (1979a).  $\beta$ -carotene or chlorophyll a incorporated in lecithin liposomes. Analysis by ultracentrifugation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 89, 1141-1145.
- o Dijkmans, H., Leblanc, R.M. Cogniaux, F. et Aghion, J. (1979b). Properties of chlorophyll-lecithin vesicles: ultracentrifugation, absorbance, emission and photobleaching. *Photochem. Photobiol.* 29, 367-372.

- o Dinant, M. et Aghion, J. (1975). Chlorophylls attached to lipid and protein globules, absorption and fluorescence spectra, photo-oxidation. *Eur. J. Biochem.* 52, 515-520.
- o Dobretsov, G.E., Borschanskaya, T.A., Petrov, V.A. et Vladimirov, Y.A. (1977). The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 84, 125-128.
- o Fetterman, L.M., Galloway, L., Winograd, N. et Fong, F.K. (1977). The role of water on the photoactivity of chlorophyll a. In vitro experimental characterization of the PSI light reaction in photosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 653-655.
- o Fong, F.K. et Wassam, W.A. (1977). Molecular origin of long-wavelength forms of hydrated chlorophyll a. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 2375-2377.
- o Foote, G.S. et Denny, R.W. (1968). Chemistry of singlet oxygen. VII Quenching by  $\beta$ -carotene. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 6233-6235.
- o Fragata, M. (1977a). On the location of the tetrapyrrole macrocycle of chlorophyll a in phospholipid vesicles and in hexadecane. *Experientia* 32, 177-179.
- o Fragata, M. (1977b). A far-red absorbing form of chlorophyll a detected in phosphatidylcholine vesicles. *Photosynthetica* 11, 296-301.
- o Fragata, M. (1978). Interaction of chlorophyll a with  $\beta$ -carotene in phosphatidylcholine bilayers. *J. Cell. Int. Sc.* 66, 470-474.

- o French, C.S. (1960). Dans: *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol V, Springer-Verlag, Heidelberg, 252. (Référence tirée de Sauer et Calvin, 1962)
- o Holden, M. (1976). Chlorophylls. Dans: *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*, Vol 2 (T.W. Goodwin, ed.) Academic Press, New York, 1-37.
- o Huang, C et Charlton, J.P. (1972). Studies on the state of phosphatidylcholine molecules before and after ultrasonic and gel-filtration treatments. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 46, 1660-1666.
- o Izawa, S. (1977). Inhibitors of electron transport. Dans: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol V (A. Trebst et M. Avron, eds.) Springer-Verlag, Heidelberg, 266-282.
- o Johnson, S.M. (1973). The effect of charge and cholesterol on the size and thickness of sonicated phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 307, 27-41.
- o Karrer, P. et Jucker, E. (1945). Partial-synthesen des flavoxanthins, chrysanthemaxanthin, antheraxanthins, violaxanthins, mutatoxanthins und auroxanthins, *Helv. Chim. Acta* 28, 300-315.
- o Katz, J.J., Norman, G.D., Svec, W.A. et Strain, H.H. (1968). Chlorophyll Diastereoisomers. The nature of chlorophylls a' and b' and evidence for bacteriochlorophyll epimers from proton magnetic resonance studies. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 6841-6845.

- o Koka, P. et Song, P.-S. (1978). Protection of chlorophyll a by carotenoid from photodynamic decomposition. *Photochem. Photobiol.* 28, 509-515.
- o Kraljic, I., Barboy, N. et Leciknam, J.-P. (1979). Photosensitized formation of singlet oxygen by chlorophyll a in neutral aqueous micellar solutions with Triton X-100. *Photochem. Photobiol.* 30, 631-633.
- o Krasnovsky, A.A. (1960). The primary processes of photosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 11, 363-410.
- o Krinsky, N.I. (1978). Non-photosynthetic functions of carotenoids. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 284, 581-590.
- o Leblanc, R.M., Du Pre Werson, B., Dijkmans, H. et Aghion, J. (1980). Photosensitization of the methyl red-ascorbate reaction by lecithin vesicles containing chlorophyll a, sous presse dans *Photosynthetica*.
- o Lee, A.G. (1975a). Segregation of chlorophyll a incorporated into lipid bilayers. *Biochemistry* 14, 4397-4402.
- o Lee, A.G. (1975b) Fluorescence studies of chlorophyll a incorporated into lipid mixtures, and the interpretation of "phase" diagrams. *Biochim. Biophys. Acta* 413, 11-23.
- o Lehninger, A.L. (1970). Lipids, lipoproteins, and membranes. Dans: *Biochemistry*, Worth Publishers, New York, 833 pp.
- o Lichtenthaler, H.K. et Park, R.B. (1963). Chemical composition of chloroplast lamellae from spinach. *Nature* 198, 1070-1072.

- o Litman, B.J. (1973). Lipid model membranes. Characterization of mixed phospholipid vesicles. *Biochem.* 12, 2545-2554.
- o Luisetti, J., Möhwald, H. et Galla, H.J. (1977). Paramagnetic fluorescence quenching in chlorophyll a containing vesicles: evidence for the localization of chlorophyll. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 78, 754-760.
- o Luisetti, J., Galla, H.J. et Mohwald, H. (1978). Energy transfer and fluorescence quenching in chlorophyll containing vesicles. *Ber Bunsenges. Phys. Chem.* 82, 911-916.
- o Luisetti, J. Molhwald, H. et Galla, H.J. (1979). Spectroscopic and thermodynamic studies of chlorophyll containing monolayers and vesicles. Part II. Chlorophyll a and pheophytin a aggregation on DMPC vesicles. *Z. Naturforsch.* 34C, 406-413.
- o Mangel, M. (1976). Properties of liposomes that contain chloroplast pigments; photosensitivity and efficiency of energy conversion. *Biochim. Biophys. Acta* 430, 459-466.
- o Markwell, J.P., Thornber, J.P. et Boggs, R.T. (1979). Higher plant chloroplasts: evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 1233-1235.
- o McDonald, G.G., Vanderkooi, J.M. et Oberholtzer, J.C. (1979). Oxygen diffusion in phospholipid artificial membranes studied by Fourier transform nuclear magnetic resonance. *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 281-283.

- o Mehreteab, A. et Strauss, G. (1978). Energy transfer and energy losses in bilayer membrane vesicles (liposomes). *Photochem. Photobiol.* 28, 369-375.
- o Mersel, M., Benenson, A., Pinson, A. et Heller, M. (1980). Phospholipid asymmetry in mixed liposomes detected by enzymatic radio-iodixation. *FEBS Lett.* 110, 69-72.
- o Michaelson, D.M., Horwitz, A.F. et Klein, M.P. (1973). Transbilayer asymmetry and surface homogeneity of mixed phospholipids in cosonicated vesicles. *Biochem.* 12, 2637-2645.
- o Murata, N. et Sato, N. (1978). Studies on the absorption spectra of chlorophyll a in aqueous dispersions of lipids from the photosynthetic membranes. *Plant. Cell. Physiol.* 19, 401-410.
- o Nicholls, P., West, J. et Brangham, A.D. (1974). Chlorophyll b containing liposomes: effect of thermal transitions on catalytic and spectral properties. *Biochem. Biophys. Acta* 363, 190-201.
- o North, A.M., Pethrick, R.A., Dryszewski, M. et Nadolski, B. (1978). Solvent effects on the lowest singlet-singlet transition in chlorophylls a and b. *Acta Phys. Polonica* A54, 797-803.
- o Noviskaya, G.V. et Rutskaya, L.A. (1976). Quantitative determination of lipids of the chloroplast membranes. *Fiziologiya Rastenii* 23, 899-905.

- o Oettmeier, W., Norris, J.R. et Katz, J.J. (1976). Evidence for the localization of chlorophyll in lipid vesicles: a spin label study. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 71, 445-451.
- o Omata, T. et Murata, N. (1980). A rapid and efficient method to prepare chlorophyll a and b from leaves. *Photochem. Photobiol.* 31, 183-185.
- o Pharmacia Fine Chemicals (1979). Gel filtration theory and practice, 64 pp.
- o Pohl, P., Glasl, H. et Wagner, H. (1970). Complete separation of plant glycolipids, phospholipids and neutral lipids. *J. Chromatog.* 49, 488-492.
- o Prestegard, J.H. et Fellmeth, B. (1974). Fusion of dimyristoyllecithin vesicles as studied by proton magnetic resonance spectroscopy. *Biochem.* 13, 1122-1126.
- o Ritt, E. et Walz, D. (1976). Pigment containing lipid vesicles. I. Preparation and characterization of chlorophyll a-lecithin vesicles. *J. Membrane Biol.* 27, 41-54.
- o Rodgers, M.A.J. et Bates, A.L. (1980). Kinetic and spectroscopic features of some carotenoid triplet states: sensitization by singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 31, 533-537.

- o Rosenberg, A. (1967). Galactosyl diglycerides: their possible function in Euglena chloroplasts. *Science* 157, 1191-1196.
- o Sauer, K. et Calvin, M. (1962). Absorption spectra of spinach quanta-somes and bleaching of the pigments. *Biochim. Biophys. Acta* 64, 324-339.
- o Selstam, E. (1978). Photodecomposition of monogalactosyl diglyceride mediated by chlorophyll. *Physiol. Plant.* 44, 26-30.
- o 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. Letts.*, 103-104.
- o Stillwell, W. et Tien, H.T. (1977a). Protection of chlorophyll by phospholipids from photooxidation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 76, 232-238.
- o Stillwell, W. et Tien, H.T. (1977b). Acidification, bleaching and oxygen consumption with chlorophyll-containing lipid microvesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 461, 239-252.
- o Strauss, G. et Tien, H.T. (1973). Energy transfer from carotenoids to chlorophyll a in black lipid membranes. *Photochem. Photobiol.* 17, 425-431.
- o Téchy, F. et Aghion, J. (1979). Réduction photosensibilisée de NAD par un sulfure à travers des membranes lipidiques contenant de la chlorophylle a et une quinone. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 289, 903-906D.

- o Thomas, J.B. et Nijhuis, H.H. (1968). Relative stability of chlorophyll complexes in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 153, 868-877.
- o Tomkiewicz, M. et Corker, G. (1975). Chlorophyll cation radical in phospholipid vesicles. Dans: Proceedings of the third international congress on photosynthesis (M. Avron, éditeur) Elsevier, Amsterdam, 265-272.
- o Walz, D. (1976). Pigment containing lipid vesicles. II. Interaction of valinomycin with lecithin as sensed by chlorophyll a. *J. Membrane Biol.* 27, 55-81.
- o Walz, D. (1977). Pigment containing lipid vesicles. III. Role of chlorophyll a as sensor for aggregational states of lecithin. *J. Membrane Biol.* 31, 31-64.
- o Walz, D. (1979). Change in aggregation of lecithin due to valinomycin-lipid interaction in vesicle membranes. *Chimia* 33, 45-50.
- o Warshel, A. (1979). On the origin of the red shift of the absorption spectra of aggregated chlorophylls. *J. Am. Chem. Soc.* 101, 744-746.
- o Widart, M., Dinant, M., Téchy, F. et Aghion, J. (1979). Interactions between photosynthetic pigments bound to lipid and protein particles. Photochemical properties. *Photobiochem. Photobiophys.* 1, 103-111.