

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE MAITRISE ES SCIENCES (PHYSIQUE)

PAR

RENE LE SAGE

BACHELIER ES SCIENCES (BIOPHYSIQUE)

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA LUMINESCENCE DES CHLOROPHYLLES

JUILLET 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

Contribution à l'étude de la luminescence des chlorophylles

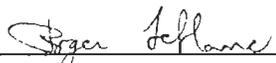
Un spectrofluorimètre et un spectrophosphorimètre de haute sensibilité ont été construits dans nos laboratoires. Nous rapportons les caractéristiques et l'efficacité des différentes composantes éprouvées lors de la construction de ces montages.

Nous avons examiné l'effet de la température (77-300 K) et de la polarité du solvant, sur l'état d'agrégation des chlorophylles en solution diluée (10^{-6} - 10^{-10} M).

Nous signalons une nouvelle bande d'émission chez la chlorophylle a et b que nous interprétons comme la symétrie miroir de l'absorption.

Un spectre de phosphorescence de la chlorophylle b dans l'éthanol est présenté.


RENE LE SAGE


ROGER M. LEBLANC

A Ludovic, mon père

REMERCIEMENTS

Cet ouvrage a été accompli grâce à la collaboration de toute une équipe. Je tiens à remercier spécialement : le Dr Roger Leblanc pour les nombreuses discussions qui ont orienté le sens de ce travail, monsieur Alain Tessier pour toutes les compétences en instrumentation qu'il a su si bien démontrer ainsi que messieurs Gaston Gagné et Pierre Brasseur pour leur travail en atelier mécanique.

TABLE DES MATIERES

	Pages
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIERES	iv
LISTE DES FIGURES	vi
1. INTRODUCTION	1
2. SPECTROSCOPIE D'EMISSION DANS LA REGION SPECTRALE UV-VISIBLE	6
2.1 Améliorations apportées	6
2.2 Résultats	9
3. SPECTROSCOPIE D'EMISSION DANS LA REGION SPECTRALE PROCHE INFRAROUGE	19
3.A Introduction	19
3.B Spectrofluorimétrie à température ambiante	19
3.B.1 Description générale	20
3.B.2 Résultats	25
3.B.3 Dérivée première et dérivée seconde.....	28
3.B.4 Filtre électronique	31
3.C Spectrofluorimétrie à basse température	34
3.C.1 Description générale	34
3.C.2 Enceinte	37
3.C.3 Pièces axiales	38
3.C.4 Pièces latérales	43
3.C.5 Support du cryostat	47
3.C.6 Fibre optique et gaine	47
3.C.7 Excitation	52
3.C.8 Emission	55

	Pages
3.C.9 Laser	58
3.C.10 Monochromateur	58
3.C.11 Photodiode	61
3.C.12 Amplificateur différentiel (Lock-in)	64
3.C.13 Enregistreur	65
3.C.14 Thermocouple	65
3.C.15 Résultats à basse température	68
3.D Spectrophosphorimètre	78
3.D.1 Description générale	78
3.D.2 Circuit de déclenchement	81
3.D.3 Phototube	88
3.D.4 Laser au colorant	89
3.D.5 Pré-amplificateur	89
3.D.6 Photomultiplicateur	91
3.D.7 Oscilloscope	93
3.D.8 Résultats	93
4. CONCLUSION	97
5. BIBLIOGRAPHIE	98
6. ANNEXES	102
6.1 Méthodes expérimentales	103
6.1.1 Préparation des solutions de chlorophylle <u>a</u>	103
6.1.2 Calibration de l'appareillage	103
6.1.3 Purification de la chlorophylle <u>a</u>	104

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 2.1.1	Diagramme schématique du spectrofluorimètre laser opérant dans l'uv-visible 7
Figure 2.1.2	Spectres comparatifs du bruit de fond, en absence (a) et en présence (b) de filtre 8
Figure 2.1.3	Spectres d'émission du laser He-Cd, en absence (a) et en présence (b) de filtre 10
Figure 2.1.4	Spectre de transmission du filtre Oriel RG 441.6 11
Figure 2.1.5	Spectre de transmission du filtre Oriel RG 632.8 12
Figure 2.2.1	Intensité relative de la fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> en fonction de la concentration de chlorophylle <u>a</u> . Système uv-visible ($\lambda_{\text{exct}} = 632.8 \text{ nm}$) 14
Figure 2.2.2	Intensité relative de la fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> en fonction de la concentration de chlorophylle <u>a</u> . Système uv-visible ($\lambda_{\text{exct}} = 441.6 \text{ nm}$) 15
Figure 2.2.3	Spectres normalisés de fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> 16
Figure 3.B.1	Diagramme schématique du spectrofluorimètre laser opérant dans le visible - proche infrarouge 21
Figure 3.B.2	Optique des lentilles cylindriques 23
Figure 3.B.3	Optique du monochromateur 24
Figure 3.B.4	Intensité relative de la fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> en fonction de la concentration de la chlorophylle <u>a</u> . Système visible - proche infrarouge ($\lambda_{\text{exct}} = 441.6 \text{ nm}$) 26
Figure 3.B.5	Circuit de dérivées première et seconde 29
Figure 3.B.6	Spectres de fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> dans le diéthy l éther (a), Spectre de la dérivée première (b), Spectre de la dérivée seconde (c)..... 30
Figure 3.B.7	Filtre passe-bas (deux pôles) 32
Figure 3.B.8	Effet du filtre électronique sur les spectres de fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> dans le diéthy l éther ($3.7 \times 10^{11} \text{ mol l}^{-1}$)..... 33

Figure 3.C.1	Schéma général du cryostat	35
Figure 3.C.2	Pièces axiales	40
Figure 3.C.3	Pièces latérales	45
Figure 3.C.4	Support du cryostat	48
Figure 3.C.5	Transmission de la lumière dans une fibre optique	51
Figure 3.C.6	Système optique servant à l'excitation	53
Figure 3.C.7	Spectre de transmission du filtre RG 475	60
Figure 3.C.8	Circuit de l'amplificateur et de la photocathode	62
Figure 3.C.9	Spectre de réponse de la cellule photo-voltaïque au silicium	63
Figure 3.C.10	Système de mesure de la basse température	66
Figure 3.C.11	Courbe de réponse du thermocouple cuivre/constantin ...	67
Figure 3.C.12	Spectres de fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> dans l'éthanol (9.3×10^{-6} mol l ⁻¹) à 77 K	70
Figure 3.C.13	Spectres de fluorescence de la chlorophylle <u>b</u> dans l'EPA (1×10^{-6} mol l ⁻¹) à 77 K	71
Figure 3.C.14	Effets de la température sur les spectres de fluo- rescence de la chlorophylle <u>a</u> dans l'hexane; (a) 3.5×10^{-6} mol l ⁻¹ , (b) 3.5×10^{-5} mol l ⁻¹	73
Figure 3.C.15	Effet de l'agrégation de la chlorophylle <u>a</u> sur les spectres de fluorescence dans l'hexane	75
Figure 3.D.1	Spectre d'émission de la chlorophylle <u>b</u> dans l'éthanol (3×10^{-8} mol l ⁻¹) à 77 K	79
Figure 3.D.2	Diagramme schématique du spectrophosphorimètre	80
Figure 3.D.3	Circuit de déclenchement de l'oscilloscope	83
Figure 3.D.4	Schéma du circuit de déclenchement de l'oscilloscope...	86
Figure 3.D.5	Période du pulse en fonction de la capacité du con- densateur	87
Figure 3.D.6	Spectre d'absorption (Σ) et spectres d'émission singulet- singulet (ϵ_{ss}) et triplet-triplet (ϵ_{tt}) pour la rhodamine <u>B</u> dans l'éthanol	90

Figure 3.D.7	Réponse spectrale du préamplificateur modèle 181 en fonction de la sensibilité.....	92
Figure 3.D.8	Sensibilité du phototube EMI-9684B en fonction du voltage d'alimentation	94
Figure 3.D.9	Réponse spectrale du phototube EMI-9684B	94

1. INTRODUCTION

En 1951, Duysens¹ ainsi que French et Young² signalent la fluorescence à 720 nm d'un pigment inconnu chez une algue rouge Porphyridium Cruentum. L'émission fut attribuée par les chercheurs à la chlorophylle d. Plus tard, en 1958, Brody³ observe la même bande en solution polaire chez la chlorophylle a in vitro et l'attribue à une forme agrégée (dimère⁴) de la chlorophylle a.

Entre 1960 et 1968, bon nombre de chercheurs⁵⁻⁹ examinent cette agrégation in vitro, mais l'étude demeure ardue. La chlorophylle est connue depuis longtemps pour former des monosolvates et des disolvates¹⁰⁻¹⁴ dans des solvants polaires tels que pyridines, cétones, eau, alcools, bases de Lewis. En effet, il semble que l'atome de magnésium central, responsable de la dimérisation ne se contente pas de la formation de dimère dans un solvant polaire, on note que le Mg participe à la formation de disolvates^{15,16}.

Broyde et Brody¹⁷ dans une étude exhaustive des propriétés de fluorescence de la chlorophylle a proposent que: a) toutes les bandes de fluorescence en solution diluée (10^{-6} M) à 25 °C proviennent d'un monomère solvaté; b) en solution polaire (éthanol), la chlorophylle est sous forme solvatée, la dimérisation se produit par une interaction π - π , cette forme est très peu fluorescente à 300 K; c) les dimères sont majoritaires en solution concentrée dans les solvants non polaires. L'abaissement de la température favorise l'agrégation.

Dans cette étude, peu d'informations nous sont données quant au type d'interaction ou sur la quantité de dimères formés en solution polaire. Ainsi, en 1968, Broyde et Brody¹⁸ font remarquer que l'intensité de la bande à 730 nm croît en augmentant la concentration et en diminuant la température. Ils supposent l'existence d'agrégation en solvant polaire mais ils admettent qu'ils ne peuvent en faire la preuve. Deux années plus tard, Kawabe¹⁹ arrive aux mêmes conclusions.

Singhal et coll.^{12,20,21} trouvent que dans l'EPA à 77 K, le spectre de fluorescence est indépendant de la longueur d'onde d'excitation et ils concluent que la bande à 730 nm serait due à une forme solvatée de la chlorophylle. En 1972, Vacek²² reprend l'hypothèse de Kawski²³ selon laquelle il y aurait la possibilité d'une interaction entre deux molécules adjacentes dont l'une serait excitée.

Jusqu'en 1972, on en est toujours au même point: Est-ce que la bande dans le proche infrarouge ($\lambda_{\text{max}} \sim 730$ nm) en solution polaire provient d'un dimère ou d'une forme solvatée de la chlorophylle ?

En 1974, Singhal et coll.²⁴ examinent l'absorption et la fluorescence de la chlorophylle a dans 22 solvants. Ils tentent, sans grand succès, d'appliquer la théorie des effets de champs internes (théorie d'Onsager) pour expliquer le déplacement (Stoke shift) et la largeur de bande (force de l'oscillateur). En 1973²⁵, il admet l'hypothèse de dimères en petite quantité jusqu'à des concentrations de 10^{-7} M.

Dans la même année, trois études de Vacek, deux ne seront publiées qu'en 1974. Dans la première²⁶, il réitère ce qu'il avait dit l'année

précédente sauf que dans ce travail, il abandonne l'hypothèse selon laquelle la bande à 730 nm provient du même état électronique que la bande principale. En juin 1973²⁷, il publie les résultats d'une étude de la fluorescence de la chlorophylle a insérée dans des matrices de polymère. Il mentionne que lorsqu'il passe de la température de la pièce à celle de l'hélium liquide, il observe (il ne présente pas de spectre à cet effet) la présence d'une troisième bande de fluorescence qu'il attribue au second état vibronique de l'état fondamental tandis que celle à 730 nm proviendrait de l'état agrégé. Dans le troisième travail²⁸, il présente une troisième bande (~ 716 nm) chez la chlorophylle a dans l'éthanol (1.7×10^{-5} M), le n-propanol (1.9×10^{-5} M) et pour un mélange d'éthanol:méthanol (4:1) (2.5×10^{-5} M). S'il croit toujours que la bande à 730 nm soit due à une dimérisation, il croit improbable que la bande intermédiaire soit une bande vibronique satellite de la bande principale.

En 1974, dans une publication qui ne sera publiée qu'en 1976²⁹, il propose que les bandes à 670 nm et 720 nm, à la température de la pièce, (concentration de la chlorophylle a, $\sim 10^{-6}$ M) soient l'image miroir des bandes d'absorption à 660 nm et 630 nm. Il trouve une bonne relation pour 13 solvants et il mentionne que les différences observées pour la seconde bande seraient dues au recouvrement de cette dernière par la transition $S_0 \rightarrow S_2$ ou à une agrégation.

En 1976, Mau³⁰ démontre que le rapport des intensités des bandes, I_{730}/I_{680} , dans l'EPA en fonction de la concentration ne serait pas dû à la dimérisation mais plutôt à un phénomène de réabsorption. Cette hypothèse avait déjà été proposée par Singhal et coll.¹², cependant elle ne fut pas

retenue pour les concentrations diluées de chlorophylle a ($\sim 10^{-7}$ M).

S'il semble y avoir de la confusion au sujet de la bande à 730 nm en solution polaire, cela n'est rien comparativement aux études de la phosphorescence de la chlorophylle. Les premiers à signaler la présence de phosphorescence chez ce pigment furent Calvin et Dorough en 1947^{31,32}, cependant leurs résultats ne furent pas reproduits. Kasha et coll.³³, quelques années plus tard, ont rapporté une bande de phosphorescence chez la chlorophylle b à 865 nm.

Par la suite, de nouvelles bandes de phosphorescence ont été proposées, en particulier Becker et Fernandez³⁴ trouvent une bande à 733 nm pour la chlorophylle b et 755 nm pour la chlorophylle a. Ensuite Singh et Becker³⁵ n'observent plus ces mêmes bandes mais rapportent des bandes à 875 nm et 915 nm chez la chlorophylle b, 885 nm et 925 nm chez la chlorophylle a. Amster³⁶ n'observe pas les bandes de phosphorescence telles que décrites par Singh et Becker³⁵. Il faut attendre Brody et coll.¹⁷ qui observent bien une bande à 755 nm dans le dichloroéthane mais ne peuvent en préciser le type d'émission. Dans les années 70, des chercheurs tentèrent de reproduire la phosphorescence in vivo^{37,38,39} mais sans succès.

Krasnovskii Jr. et coll. ont publié depuis 1971⁴⁰⁻⁴³, la présence de phosphorescence et de fluorescence retardée de plusieurs pigments*, dont la chlorophylle a et b. En 1977, leurs résultats de phosphorescence des chlorophylles furent confirmés par Mau et Puza⁴⁵.

* En annexe 1, nous présentons une table résumant les différentes bandes publiées par Krasnovskii et celles confirmées par Mau.

Comme on a pu le constater, le sujet de la luminescence des chlorophylles fut fort controversé au cours des années. Toutes ces contradictions, incertitudes ou tout simplement imprécisions semblent provenir de la pureté des pigments étudiés et de la fiabilité de l'instrumentation.

Nous avons par conséquent porté une attention particulière à la pureté de nos chlorophylles, toutefois nos efforts ont été orientés vers l'instrumentation. Le but du présent travail est la mise au point de l'appareillage nécessaire à l'étude de la luminescence des chlorophylles. Au chapitre 3, nous décrivons en premier lieu les améliorations apportées à un système spectrofluorimètre déjà existant. Le chapitre 3 est, de plus, consacré à la description de la construction d'un nouveau spectrofluorimètre utilisé dans la région spectrale du proche infrarouge, d'un cryostat pour l'étude de la luminescence aux basses températures ainsi que de la construction d'un spectrophosphorimètre.

A la fin de chaque section, nous présentons les résultats et les hypothèses pouvant apporter un peu de lumière, nous l'espérons, sur le sujet fort controversé que constitue la luminescence des chlorophylles.

2. SPECTROSCOPIE D'EMISSION DANS LA REGION SPECTRALE UV-VISIBLE

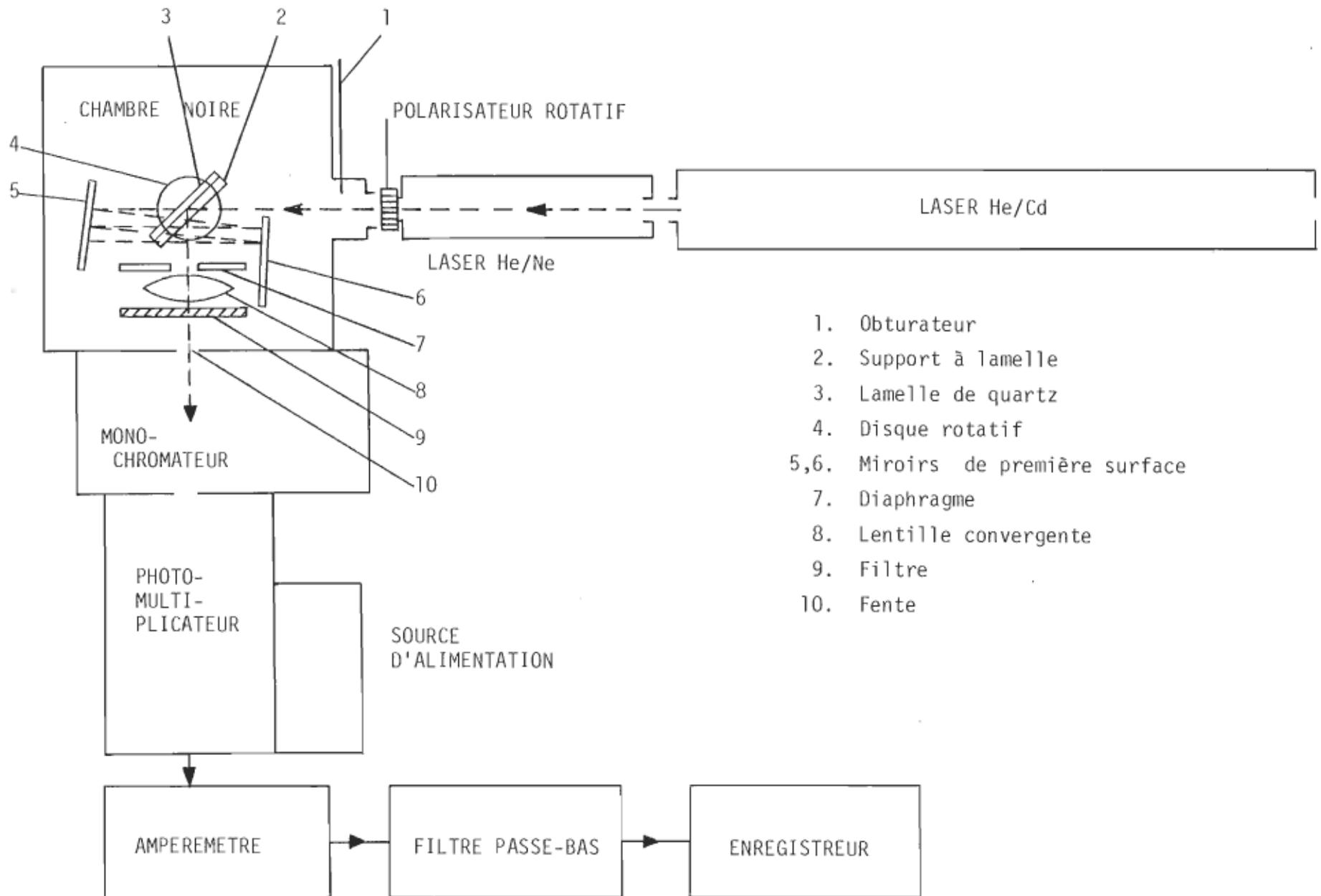
2.1 Améliorations apportées

En 1974, l'équipe de recherche en biophysique de l'Université du Québec à Trois-Rivières utilise un spectrofluorimètre très sensible⁴⁶. Une détection de fluorescence de chlorophylles a et b est signalée jusqu'à des concentrations de 10^{-12} M.

L'originalité du système (Figure 2.1.1) est sa source d'excitation: un laser hélium-cadmium de 75 mW à 441.6 nm ou un laser hélium-néon de 5 mW à 632.8 nm. L'idée avait déjà été appliquée auparavant¹⁹, mais jamais autant d'efforts n'avaient été déployés dans un même but, maximiser la sensibilité. Un photomultiplicateur très sensible EMI-9558QB; type S20) couplé à un nanoampèremètre (Gencom, modèle 911) complétait la course aux faibles signaux.

Malgré ces succès, le système était encore jeune, beaucoup d'améliorations restaient à venir, surtout dans l'élimination du bruit. A faible signal, 10 nA pour une transformation sur 100 mW, le rapport signal sur bruit prenait de l'importance, même après refroidissement du photomultiplicateur. L'achat d'un filtre électronique (Spectrum, modèle 1020) agissant comme filtre passe-bas eut vite fait de résoudre ce problème (Figure 2.1.2).

Une seconde amélioration apportée au système fut l'emploi de filtres spéciaux pour laser. Lorsqu'on travaillait avec de faibles signaux,



1. Obturateur
2. Support à lamelle
3. Lamelle de quartz
4. Disque rotatif
- 5,6. Miroirs de première surface
7. Diaphragme
8. Lentille convergente
9. Filtre
10. Fente

FIGURE 2.1.1 : Diagramme schématique du spectrofluorimètre laser opérant dans l'uv-visible.

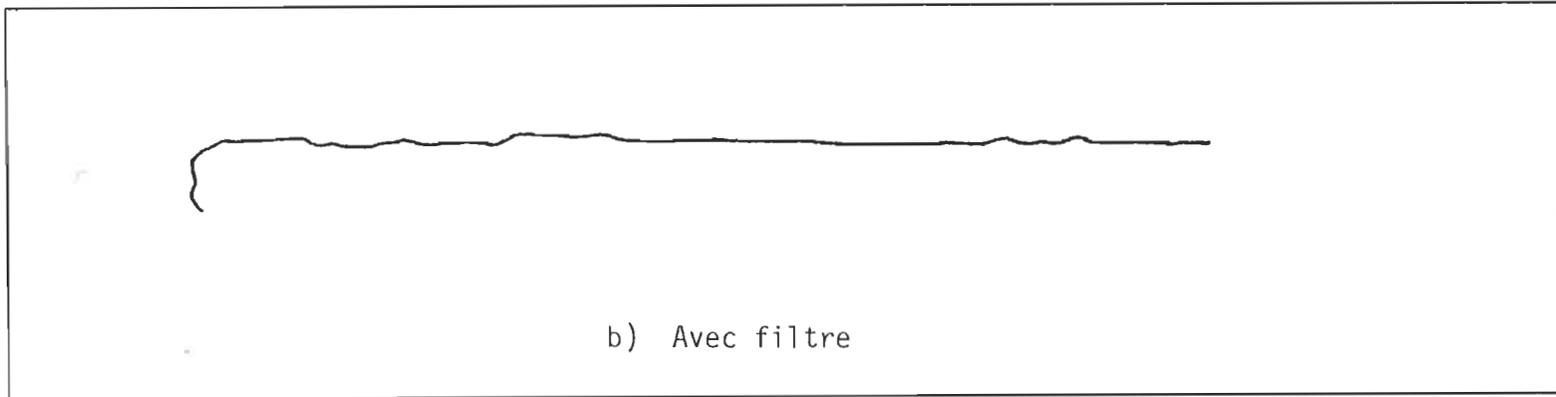
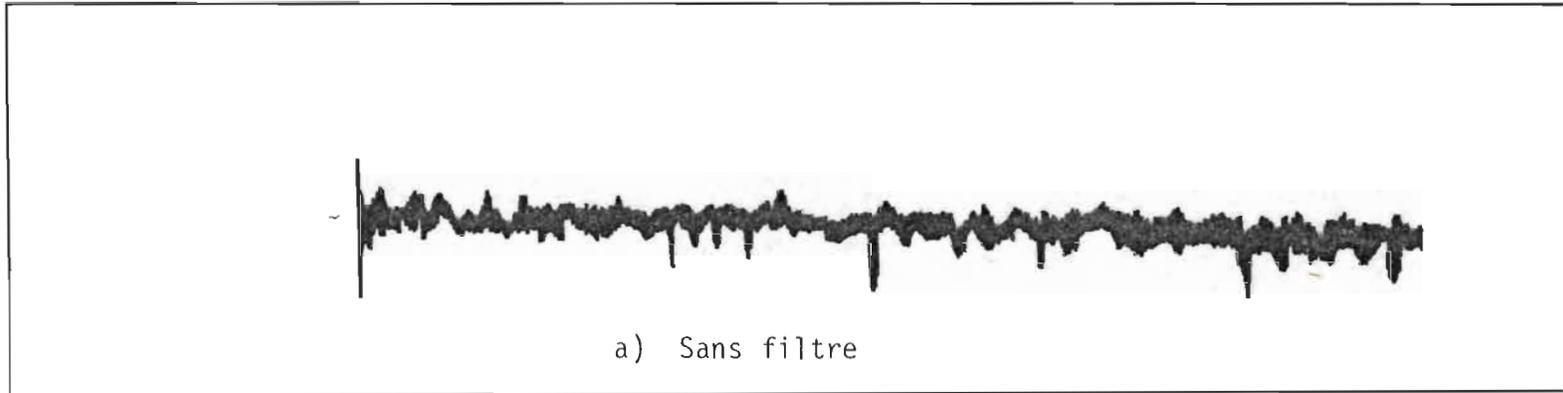


FIGURE 2.1.2 a) et b) : Spectres comparatifs du bruit de fond, en absence (a) et en présence (b) de filtre.

on voyait apparaître certaines bandes ne provenant ni de l'échantillon, ni du solvant (Figure 2.1.3 a). Ces bandes qui se trouvaient dans la même région de fluorescence de la chlorophylle provenaient d'impuretés dans le tube plasma du laser. L'importance de ces bandes devenait tellement grande qu'elle finissait par masquer complètement les faibles intensités d'émission de l'échantillon. L'emploi de filtres (Oriel, numéros RG 441.6 et RG 632.8) ne laissant passer que la raie excitatrice du laser utilisé permet l'élimination de ces parasites. Les figures 2.1.4 et 2.1.5 donnent le spectre de transmission de ces filtres.

Il arrive aussi que dans la région d'intérêt, on trouve certaines bandes Raman du solvant. L'utilisation d'un autre solvant ou un changement de longueur d'onde d'excitation permet ordinairement de les éliminer.

Suite à ces améliorations, il nous a été possible de refaire les courbes de calibration pour le spectrofluorimètre laser. Ces courbes qui nous donnent l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration de l'échantillon nous renseignent sur la sensibilité de l'appareillage. La technique expérimentale est donnée dans la partie qui suit.

2.2 Résultats

Nous avons effectué nos courbes de calibration avec de la chlorophylle a (Sigma Chemical Co.) dans du diéther (Baker, Analar). Le standard employé fut de la chlorophylle b (Sigma Chemical Co.) à une concentration de 1.5×10^{-8} M dans le même solvant. Les intensités de fluorescence utilisées furent celles de leurs maxima d'émission, soit 667.5 nm (chl a) et 655 nm (chl b).

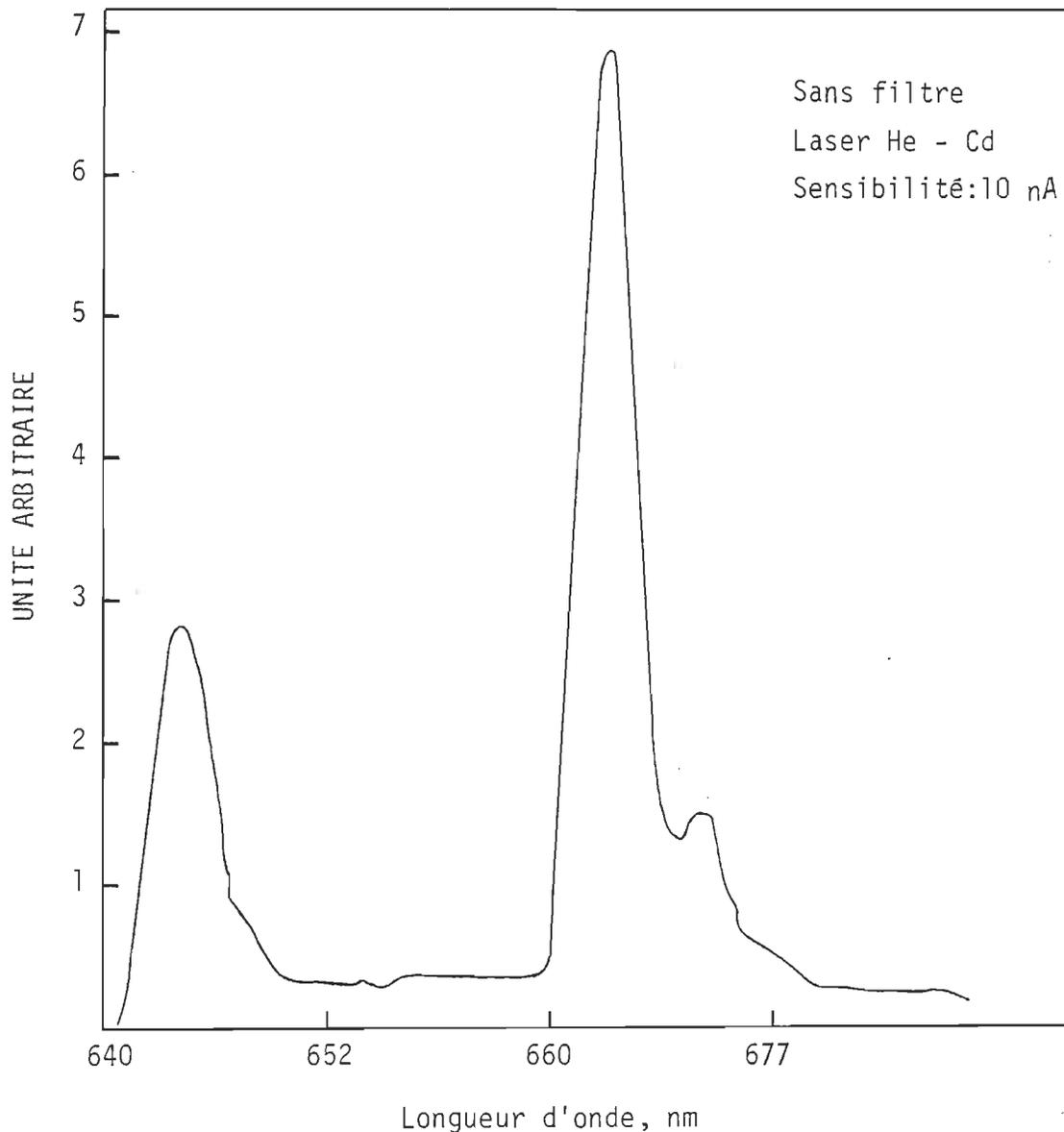


FIGURE 2.1.3 a): Spectres d'émission du laser He-Cd en absence de filtre.

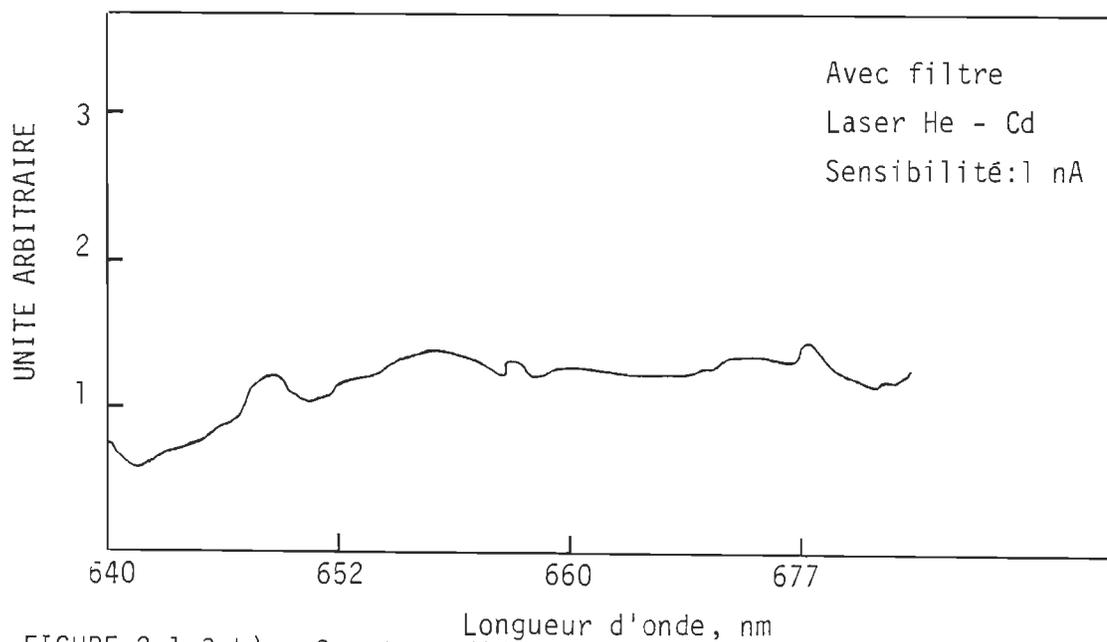


FIGURE 2.1.3 b): Spectres d'émission du laser He-Cd en présence de filtre.

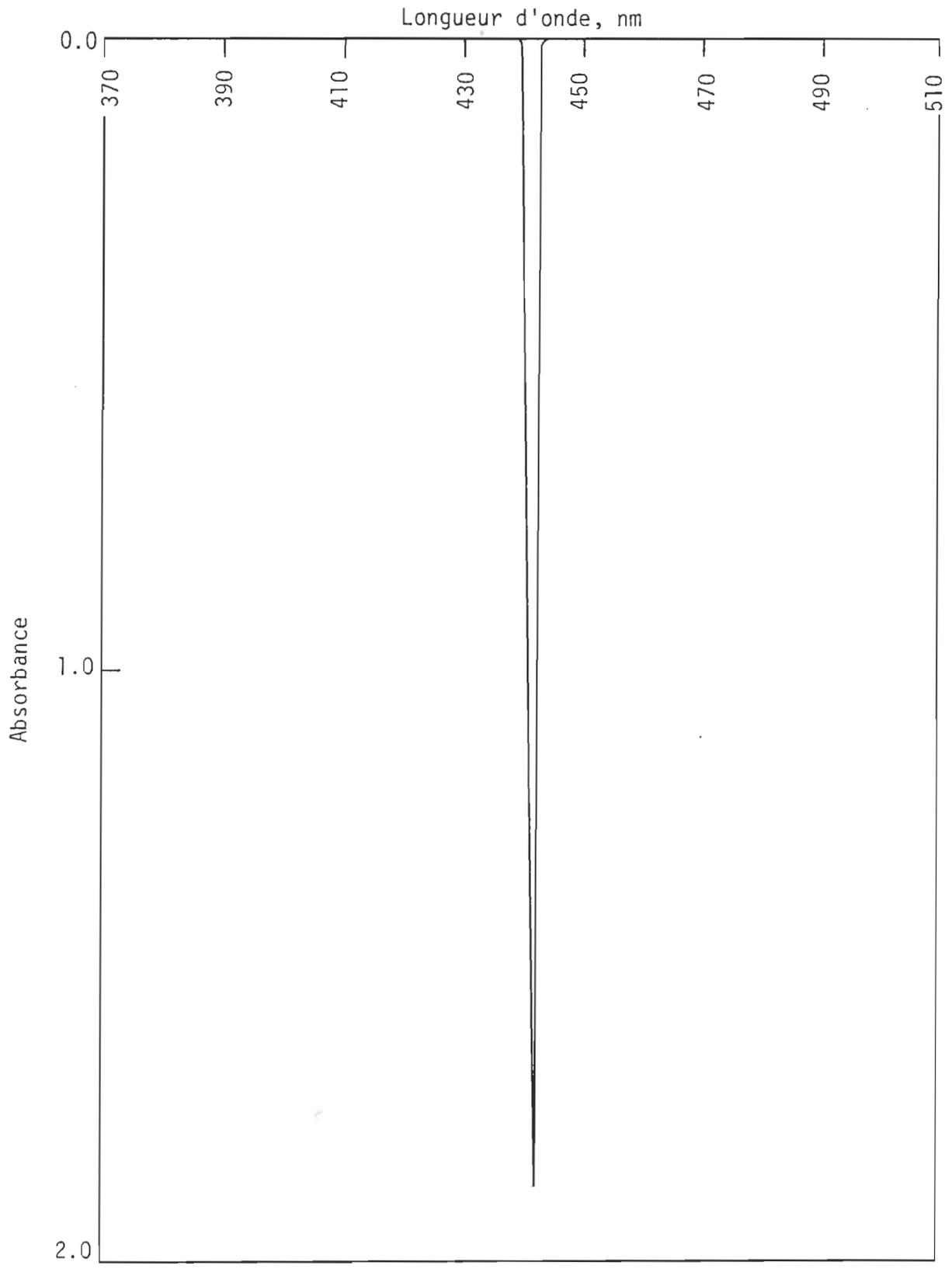


FIGURE 2.1.4: Spectre de transmission du filtre Oriel RG 441.6

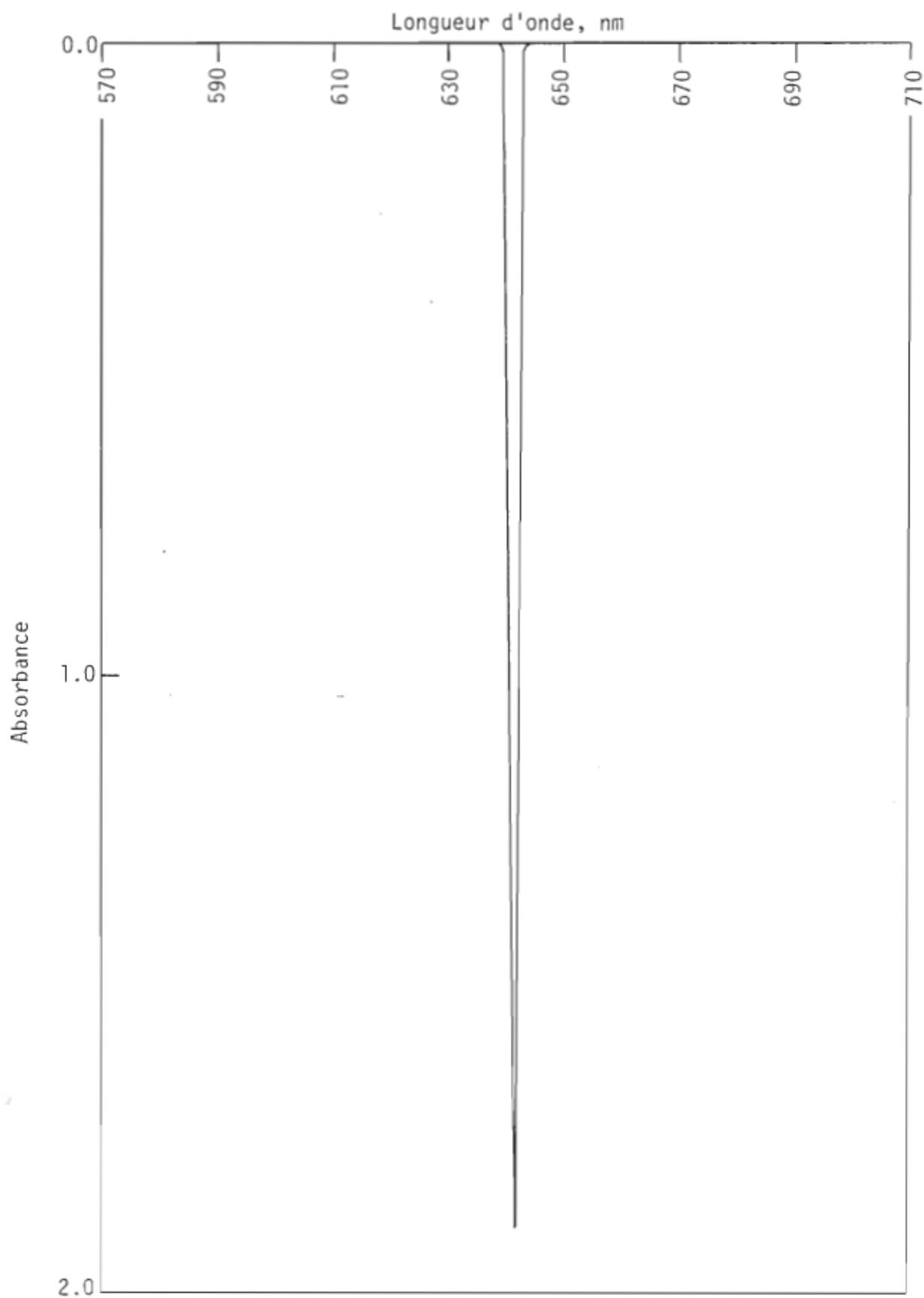


FIGURE 2.1.5: Spectre de transmission du filtre Oriel RG 632.8

On note que la courbe (figure 2.2.1) obtenue en utilisant le laser hélium-néon comme source d'excitation présente une réponse linéaire jusqu'à 10^{-11} M, par la suite il y a déviation tendant vers la stabilité de la fluorescence en fonction de la concentration.

Pour ce qui est des courbes avec le laser hélium-cadmium comme source excitatrice, les concentrations limites atteintes sont de 10^{-12} M. On est limité dans ce cas-ci par des bandes parasites provenant, soit de la fluorescence d'impuretés dans le diéthy l éther, soit des bandes Raman du solvant. La relation linéaire est présentée à la figure 2.2.2.

L'examen des spectres de fluorescence de chlorophylle a permet de dégager deux caractéristiques: premièrement, la non-linéarité des courbes pour des concentrations inférieures à 10^{-11} M; deuxièmement, le déplacement de la longueur d'onde du maximum de fluorescence vers le bleu lorsqu'on abaisse la concentration comme le montre la figure 2.2.3.

La première explication au sujet de la non-linéarité de la fluorescence peut être rattachée au fait que nous prenons notre intensité à la valeur de 667.5 nm ce qui correspond au maximum de fluorescence pour des solutions concentrées (10^{-8} M - 10^{-7} M). Par contre, en solutions très diluées, nous ne sommes plus au maximum dû au déplacement des bandes. Nous avons donc refait nos courbes de calibration, mais cette fois-ci en prenant toujours l'intensité de fluorescence à son maximum. Cette modification n'apporte pas un changement important dans l'allure générale des courbes, il faut chercher une autre explication.

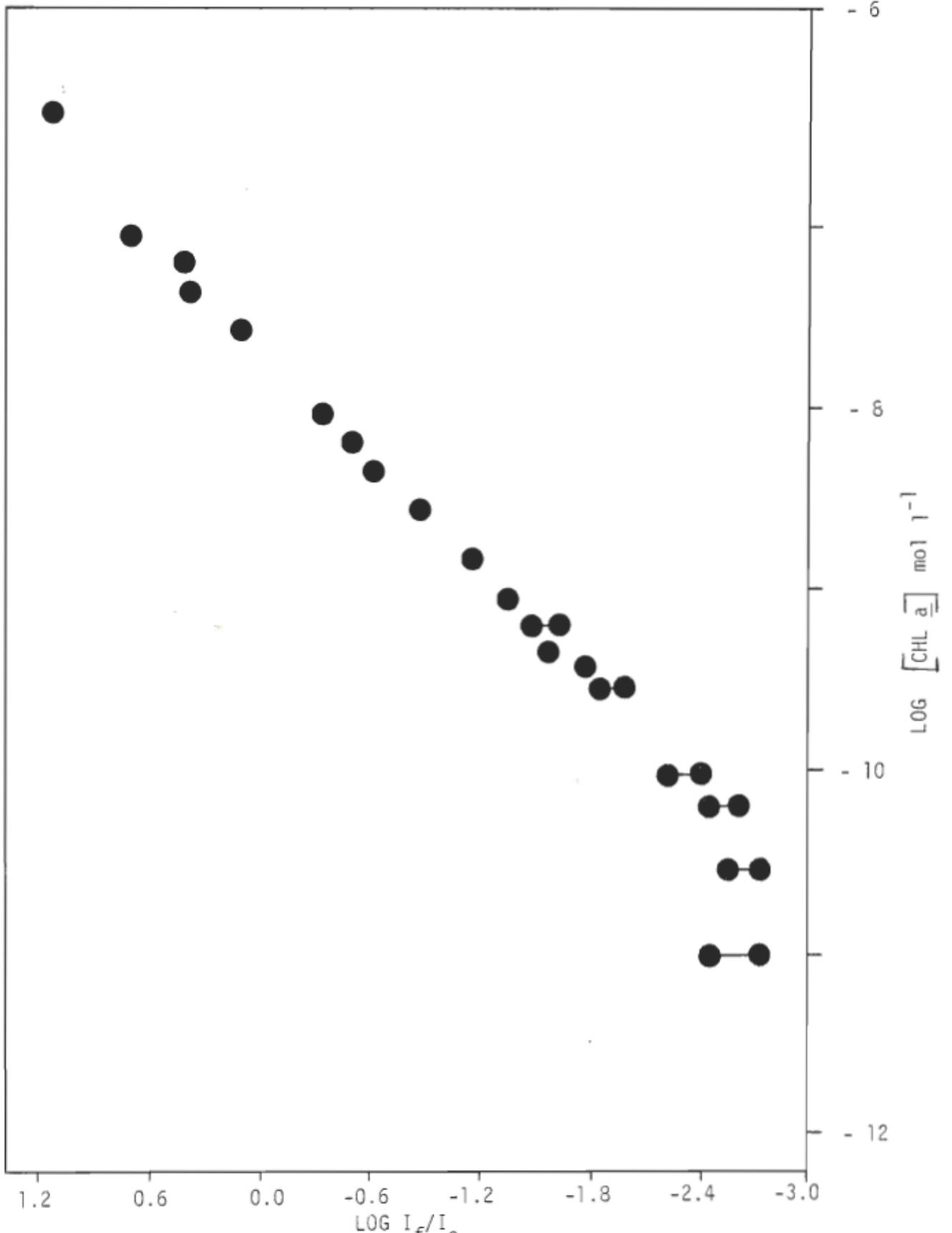


FIGURE 2.2.1: Intensité relative de la fluorescence de la chlorophylle a en fonction de la concentration de la chlorophylle a. Système uv-visible ($\lambda_{\text{exct}} = 632.8 \text{ nm}$)

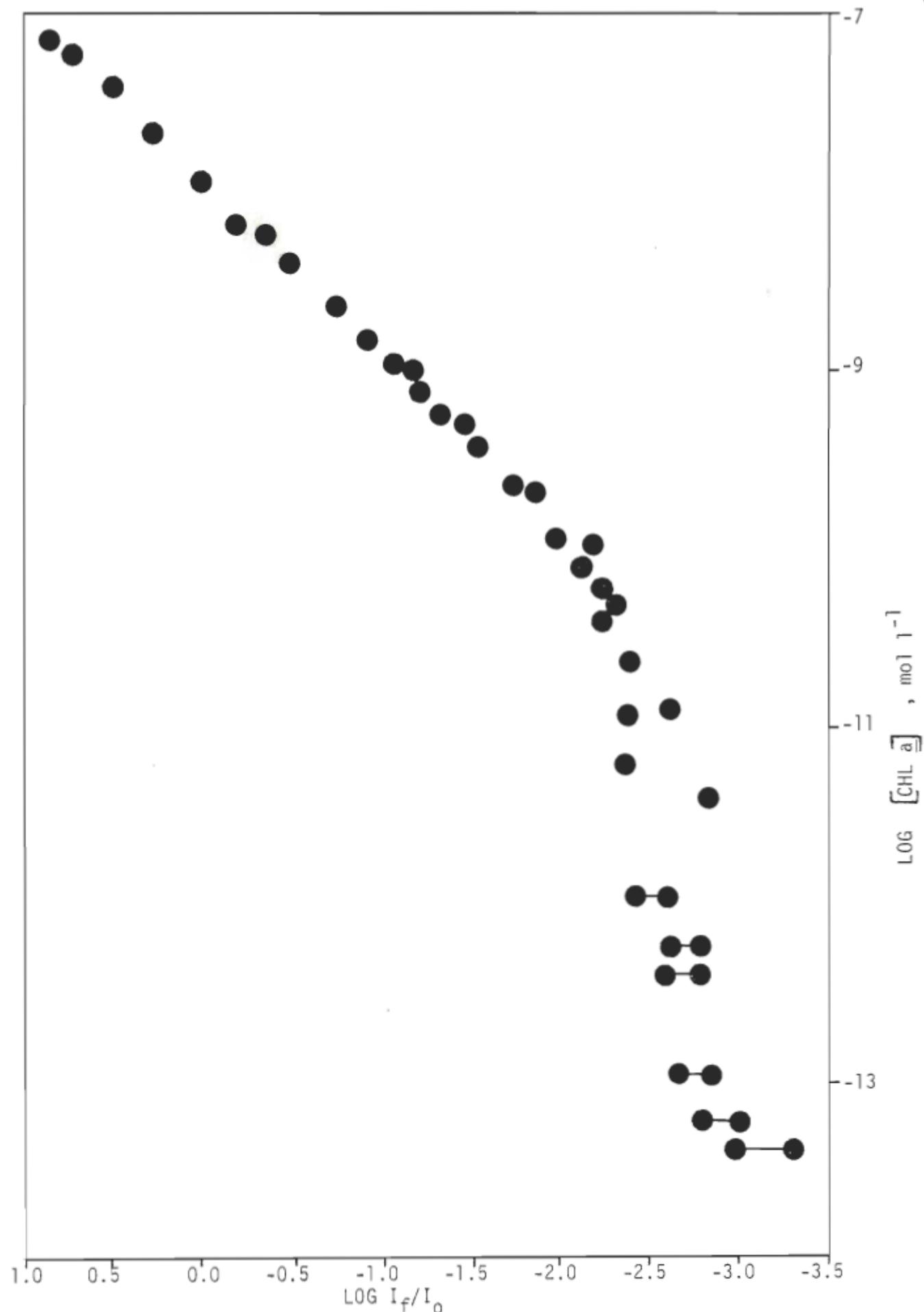


FIGURE 2.2.2: Intensité relative de la fluorescence de la chlorophylle a en fonction de la concentration de la chlorophylle a. Système uv-visible ($\lambda_{\text{exct}} = 441.6 \text{ nm}$)

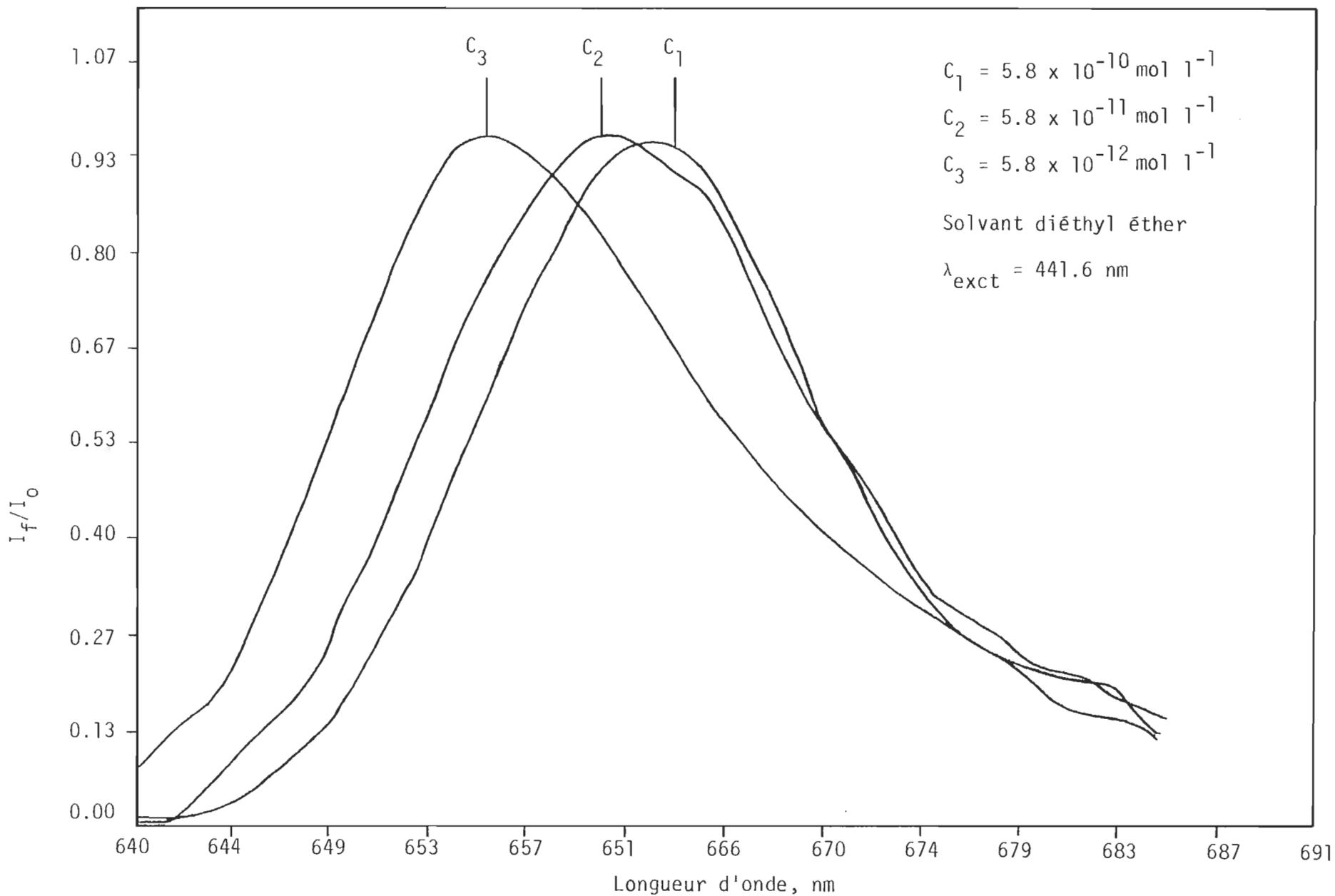


FIGURE 2.2.3: Spectres normalisés de fluorescence de la chlorophylle a.

Un tel comportement chez une substance se retrouve surtout chez des composés formant agrégation. Il serait possible que l'émission à 667.5 nm provienne d'un dimère de chlorophylle a, la dilution ayant pour effet de déplacer l'équilibre vers le monomère, c'est-à-dire vers l'émission à 661.0 nm. Ainsi, la première linéarité de la fluorescence en fonction de la concentration proviendrait du dimère, ensuite à une certaine concentration ($< 10^{-8}$ M), on ne retrouve plus de dimères mais des monomères avec un nouveau rendement quantique et une concentration double, donc une nouvelle linéarité de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration.

Szalay et coll.²⁵ ont fait mention de la présence de dimères de chlorophylle a jusqu'à des concentrations de 10^{-7} M, mais l'émission du dimère est attribuée à la bande 720 nm. Il est à noter que même en solution très diluée ($\sim 10^{-12}$ M), nous n'avons pas observé d'atténuation de la bande à 720 nm.

Dans la littérature scientifique, très peu de chercheurs sinon aucun, ne font état de recherches en solutions très diluées de la chlorophylle a. Pourtant la chlorophylle a, dans la photosynthèse, est tributaire de son environnement; au niveau de la membrane interne du chloroplaste, des complexes (oligomères, dimères, etc.) occupent une grande importance (voir à titre d'exemple (47) et (48)). Afin d'examiner soigneusement l'état d'agrégation, il serait souhaitable de travailler aux faibles concentrations de chlorophylle a, donc en présence de monomères. Les molécules se comportent comme si elles sont à l'état gazeux. La distance entre chaque molécule devient tellement grande que leur interaction mutuelle est négligeable.

Nous nous sommes posés la question suivante: est-ce qu'il ne serait pas possible que le phénomène de changement de pente dans les courbes de calibration soit dû à un certain type d'interaction à courte ou moyenne distance ? On sait que l'énergie d'excitation peut être transférée entre les chromophores appropriés. Ce transfert d'excitation nécessite un recouvrement du spectre de fluorescence du donneur et du spectre d'absorption de l'accepteur.

Le premier type d'interaction que l'on peut supposer est celui du dipôle-dipôle (interaction Förster). On sait que pour certaines molécules cela est possible pour des distances allant jusqu'à plusieurs fois leurs longueurs. Dans notre cas, le changement de pente et le déplacement vers le bleu débutent à une concentration de 10^{-8} M. En terme de volume d'occupation, cela équivaut à 1.6×10^8 nm pour chaque molécule soit une distance d'environ 540 nm séparant chacune d'elles. Cette distance est trop considérable pour une interaction de type Förster.

La deuxième hypothèse est celle de la réabsorption. On sait qu'à forte concentration ($> 10^{-6}$ M), un effet de réabsorption est présent et peut même masquer la majorité de la fluorescence. En concentration plus diluée, l'effet sur les spectres se traduit par un des deux effets suivants: soit de filtre interne, soit de fluorescence secondaire ou de réabsorption. Même si ces facteurs sont habituellement négligeables^{49,50}, il est possible, en considérant le type d'excitation, qu'un des deux effets soit responsable du phénomène observé. La réabsorption agirait comme un filtre à la fluorescence.

3. SPECTROSCOPIE D'EMISSION DANS LA REGION SPECTRALE PROCHE INFRAROUGE

3.A Introduction

L'étude de la chlorophylle par spectrofluorimétrie est restreinte à la région uv-visible. En effet, le détecteur EMI-9558QB n'est pas idéal pour les études de fluorescence des chlorophylles. Sa région d'utilisation est dans l'uv et le visible (300 nm - 700 nm). Dans le cas de la fluorescence de la chlorophylle a située à 670 nm, on se trouve à la limite du spectre de réponse du détecteur. Un changement de ce dernier et/ou une modification (assez coûteuse) d'un système fonctionnant déjà bien ne semblaient pas appropriés.

Dans le but de détecter la luminescence de la chlorophylle à basse température, nous avons construit un nouveau système ayant les caractéristiques suivantes: détecter la luminescence dans le proche infrarouge, soit 700 à 1200 nm (chapitre 3.B); permettre cette détection à basse température, 77 K, (chapitre 3.C); déterminer la nature de la luminescence (chapitre 3.D).

3.B Spectrofluorimétrie à température ambiante

Chacune des étapes ajoute une complexité à la précédente. Notre procédure a été de résoudre chacune d'elles séparément. Il en résulte ainsi la construction de trois sous-systèmes indépendants. Dans les sections subséquentes, nous décrirons ces sous-systèmes.

3.B.1 Description générale

Comme première étape, nous voulions modifier le système (spectrofluorimètre laser) de façon à pouvoir travailler dans le proche infrarouge. Cette modification impliquait l'utilisation d'un nouveau monochromateur et d'un nouveau détecteur. Il nous était par contre impossible de changer le monochromateur sans modifier l'optique interne de la chambre à cellules. Nous avons donc refait une autre chambre à cellules avec l'optique appropriée. De cette façon nous avons un ensemble: chambre à cellules, monochromateur et détecteur pour travailler dans l'uv-visible et un ensemble comportant les mêmes éléments pour travailler dans le proche infrarouge.

De façon à simplifier l'alignement et l'assemblage lorsqu'on changeait de région spectrale, nous avons procédé comme suit: opposé au système uv-visible, nous avons assemblé l'optique permettant la détection dans le proche infrarouge (figure 3.B.1). Ainsi, lors d'un changement de région spectrale, il suffit de découpler la chambre à cellule du monochromateur, changer la position d'alignement latéral des rails de soutien, remettre la nouvelle chambre et refaire le couplage en sens opposé.

La nouvelle chambre à cellules a été conçue de façon à permettre un raccord éventuel avec la partie uv-visible. Le support à cellules construit en conséquence n'obstrue aucune des faces d'une cellule positionnée. L'optique à l'intérieur de la chambre est ajusté grâce à un système de coulisse ce qui permet de modifier la position des lentilles simplement en desserrant deux écrous.

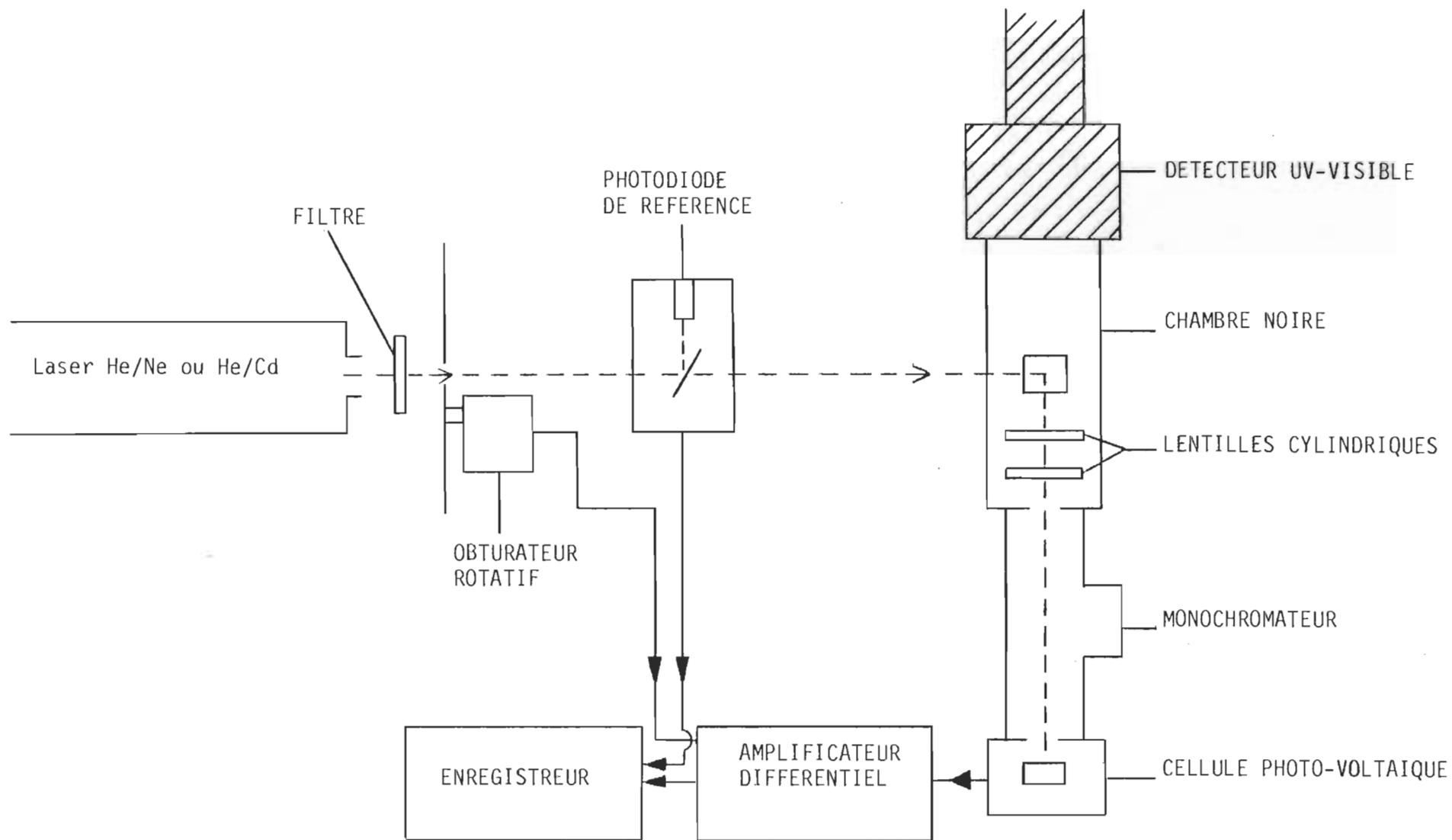


FIGURE 3.B.1: Diagramme schématique du spectrofluorimètre laser opérant dans le visible-proche infrarouge.

Nous utilisons des lentilles cylindriques pour capter la luminescence émise. Lorsque le faisceau du laser traverse la cellule de 1 cm de parcours optique, on observe une émission de lumière tout le long du trajet lumineux. En employant une lentille circulaire, on capte un point d'émission sur le pinceau de lumière émise, laissant tout le reste se perdre. L'idée d'utiliser les lentilles cylindriques est d'aller chercher tout le centimètre d'émission que produit le parcours du faisceau laser. La première lentille sert de collimateur tandis que la deuxième focalise à l'entrée du monochromateur (figure 3.B.2).

Le principe bien que simple comportait une difficulté; il faut se rappeler que l'optique et les fentes des monochromateurs sont verticales. Notre pinceau lumineux se présentait horizontalement. Pour remédier à cette difficulté, nous avons couché le monochromateur sur le côté afin de laisser libre passage et parfaite séparation de toute la lumière focalisée à son entrée (figure 3.B.3). Le monochromateur utilisé, le modèle S-20 de la compagnie Jobin-Yvon, se prêtait bien à cet usage dû à sa grande maniabilité.

A la sortie du monochromateur, il nous fallait un système de détection dont la réponse serait maximum dans le proche infrarouge. Nous avons utilisé une cellule photo-voltaïque au silicone HUV-4 000 de la compagnie Optikon. Son maximum de sensibilité se situe à 950 nm ce qui correspond tout à fait à ce que nous désirions. Fixée dans une boîte noire servant

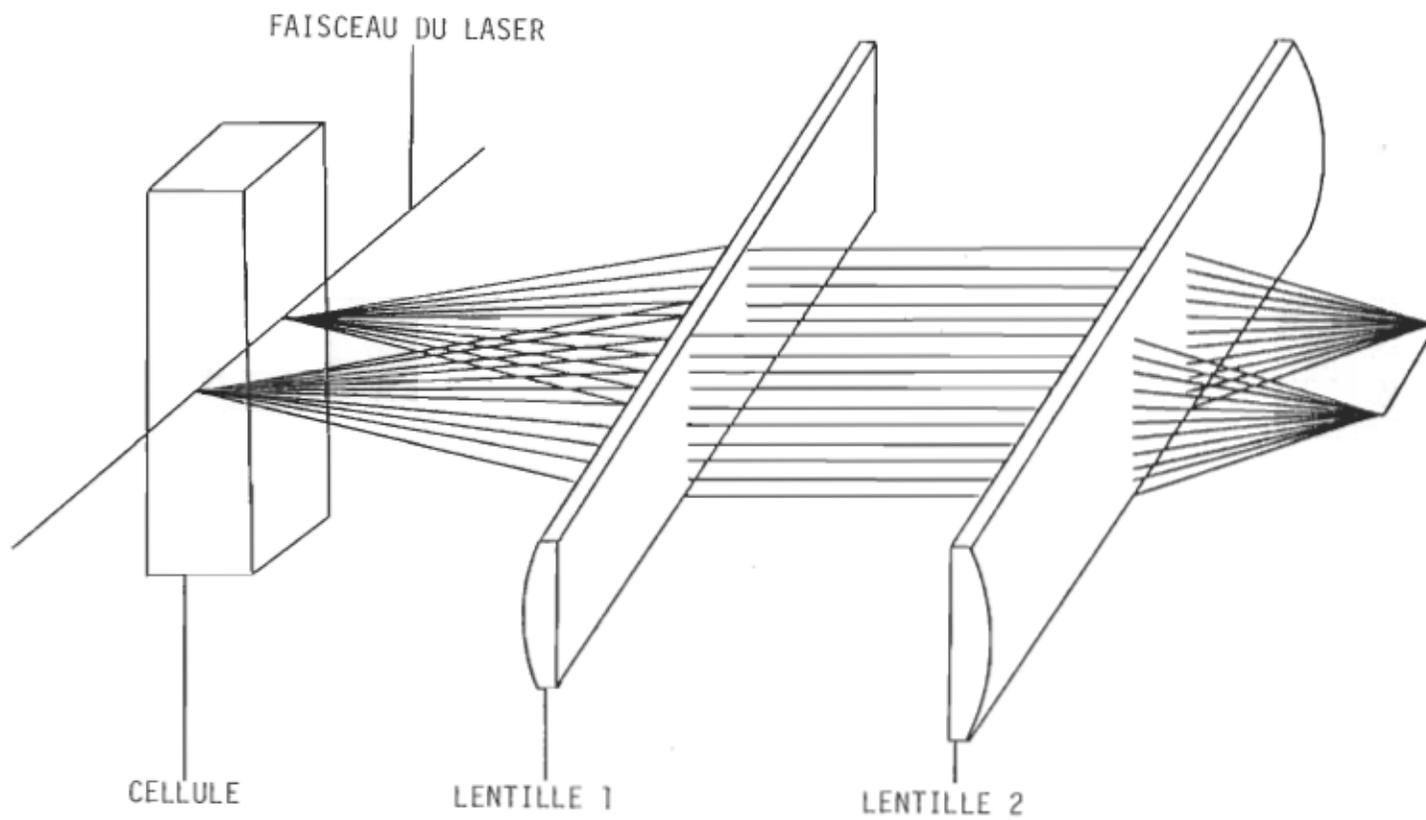


FIGURE 3.B.2: Optique des lentilles cylindriques

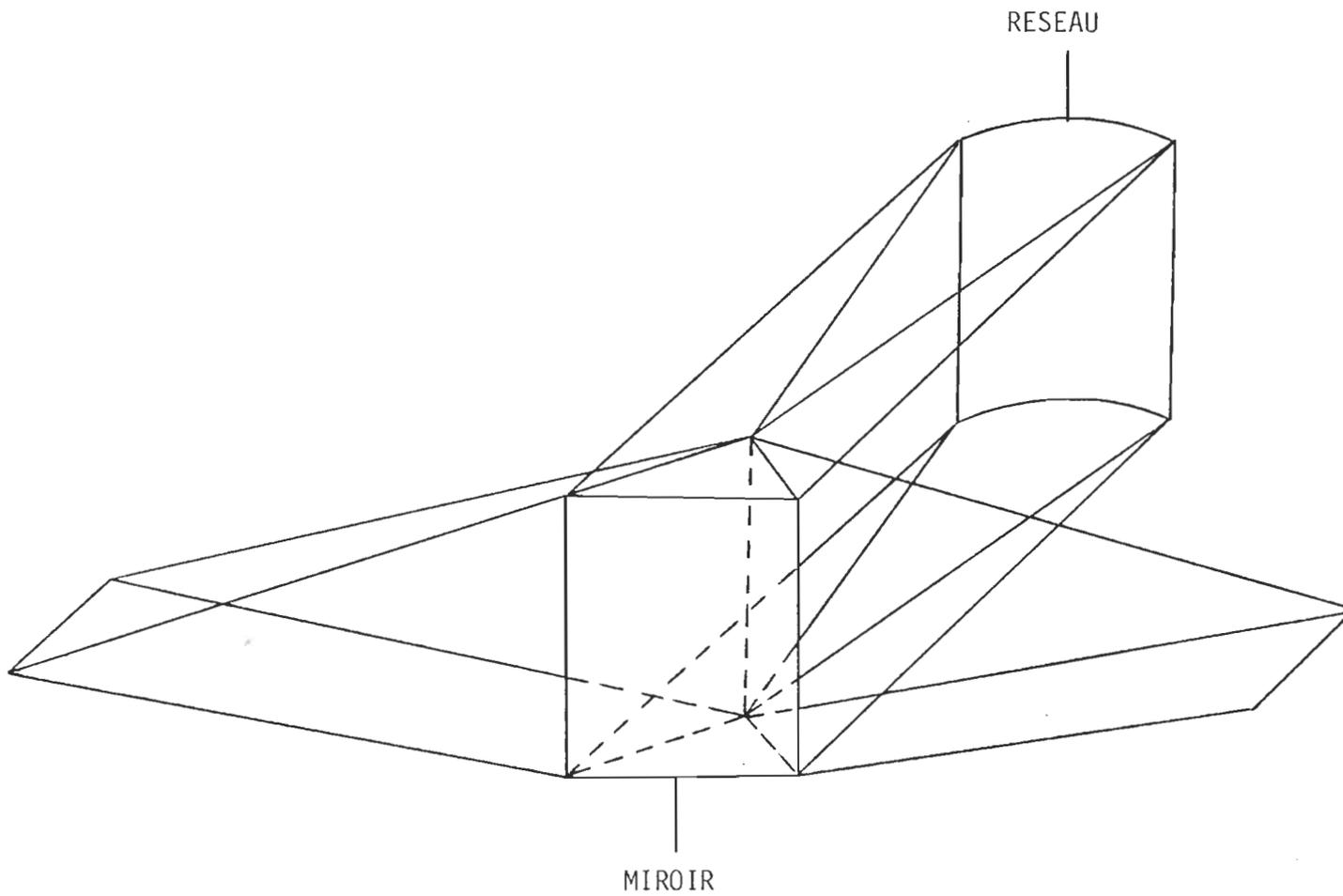


FIGURE 3.B.3 Optique du monochromateur.

d'enceinte, la photodiode est à 1 cm de la sortie du monochromateur. Le signal produit est pré-amplifié par un amplificateur opérationnel (voir page 89). Par la suite, nous utilisons la technique d'amplification différentielle comme dernière amplification du signal avant d'être enregistré.

3.B.2 Résultats

En comparant les courbes de calibration des deux systèmes, uv-visible (figure 2.2.2) et visible-proche infrarouge (figure 3.B.4), on note une perte de sensibilité pour ce dernier. Cette différence est attribuable à une plus grande sensibilité du photomultiplicateur comparé à une photodiode.

Nous avons comparé les sensibilités théoriques des deux détecteurs pour un rapport signal sur bruit (S/N) équivalent. La sensibilité de la photodiode à 650 nm, en se basant sur la courbe de réponse à la figure 3.C.9, est de 0.33 A/W. Comme l'amplificateur opérationnel couplé à la photodiode possède une résistance de feedback de 200 M Ω , on calcule une sensibilité de 6.6×10^7 V/W pour l'ensemble photodiode-amplificateur. Notre comparaison du signal sur bruit au niveau du lock-in se situe à 100 mV ce qui équivaut à un S/N de 20. Nous avons donc une sensibilité de :

$$\begin{array}{l} 6.6 \times 10^7 \text{ V} \longrightarrow 1 \text{ W} \\ 100 \times 10^{-6} \text{ V} \longrightarrow 1.5 \times 10^{-12} \text{ W.} \end{array}$$

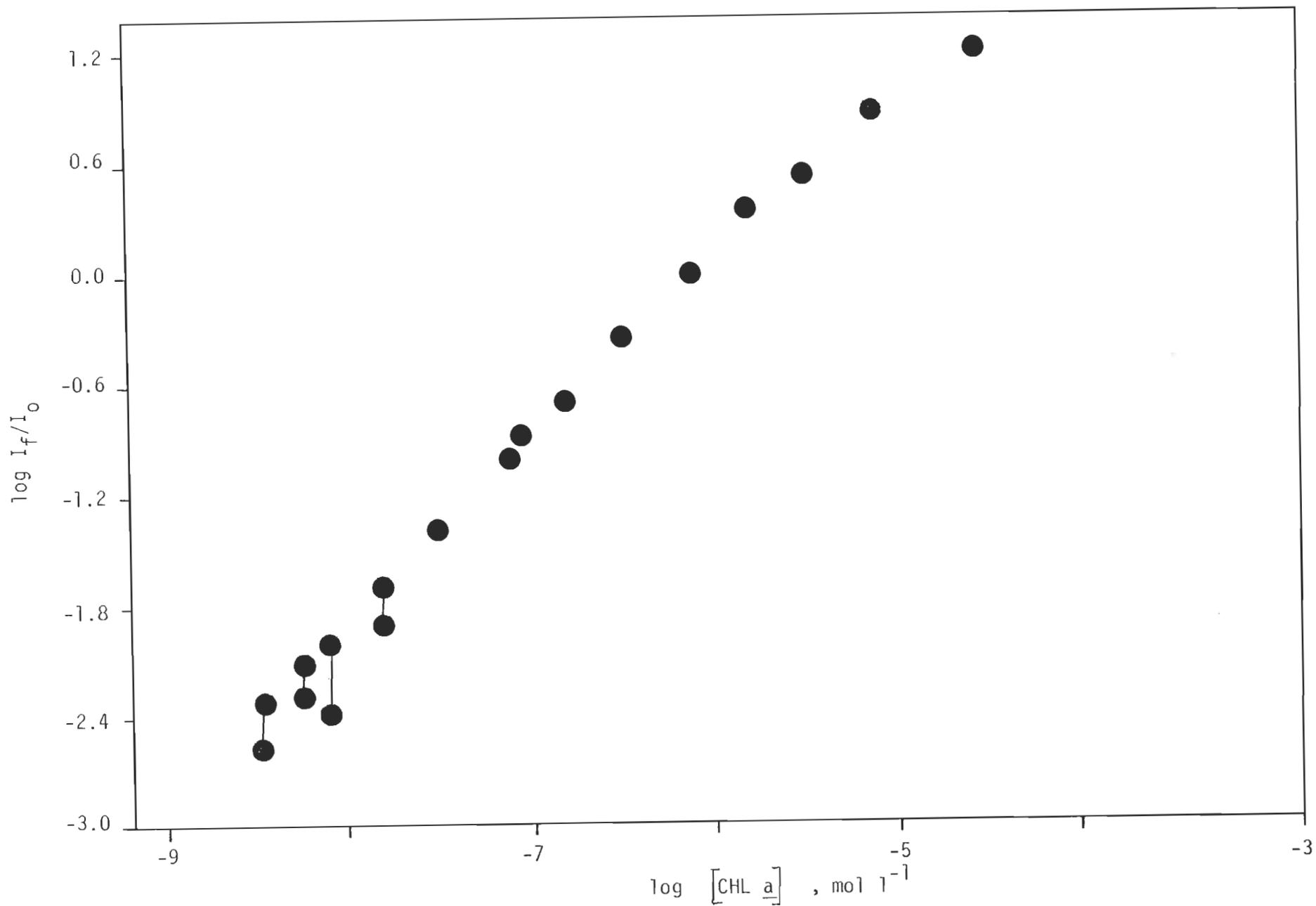


FIGURE 3.B.4 Intensité relative de la fluorescence de la chlorophylle a en fonction de la concentration de la chlorophylle a. Système visible-proche infrarouge ($\lambda_{\text{exct}} = 441.6 \text{ nm}$)

Avec le photomultiplicateur, le gain est le quotient de la valeur de la sensibilité de l'anode sur celle de la cathode. La sensibilité de l'anode est de 200 A/lm et celle de la cathode 190 μ A/lm pour donner un gain de :

$$\frac{200 \text{ A/lm}}{190 \times 10^{-6} \text{ A/lm}} \longrightarrow 1.05 \times 10^6 .$$

La photocathode du photomultiplicateur présente une sensibilité à 670 nm de 21 mA/W pour donner un signal après la dernière dynode de

$$(1.05 \times 10^6) \times (2.1 \times 10^{-2} \text{ A/W}) = 2.2 \times 10^4 \text{ A/W}.$$

Pour un même signal sur bruit ($S/N = 20$) au niveau du couplage nano-ampèremètre-filtre électronique cela correspond à une échelle de 1 nano-ampère.

$$\begin{array}{l} 2.2 \times 10^4 \text{ A} \longrightarrow 1 \text{ W} \\ 1.0 \times 10^{-9} \text{ A} \longrightarrow 4.5 \times 10^{-4} \text{ W} \end{array}$$

Ce calcul grossier permet d'évaluer approximativement les sensibilités de chacun des systèmes. Pour évaluer expérimentalement ces valeurs, le moyen le plus efficace serait l'utilisation d'un radio-mètre. Ceci n'a pas été expérimenté, nous avons par contre remplacé la photodiode par le photomultiplicateur pour vérifier le gain obtenu par l'utilisation des lentilles cylindriques. On détermine un facteur de 5 ce qui est une valeur raisonnable étant donné la géométrie de capture.

Du fait que la photodiode augmente en sensibilité lorsqu'on se dirige vers les grandes longueurs d'onde, on a une meilleure résolution de la bande à 730 nm chez les chlorophylles.

3.B.3 Dérivée première et dérivée seconde

Il arrive fréquemment que deux bandes de fluorescence soient tellement rapprochées l'une de l'autre, qu'il devient impossible de les différencier. Quelque fois, une bande plus faible qu'une autre apparaît comme un épaulement. C'est ce qui se produit avec la chlorophylle a; l'émission à 720 nm est un épaulement de la bande à 675 nm. Il devient ainsi difficile de déterminer le maximum exact de fluorescence.

Pour faciliter la différenciation des bandes, nous avons construit un circuit de dérivé première et seconde (figure 3.B.5). Des amplificateurs FET (modèle 41J) de la compagnie "Analog Devices" servent d'unité de base. Ce type d'amplificateur a été choisi à cause de son faible courant de polarisation (350FA) et de sa grande impédance d'entrée ($10^{13} \Omega$). Etant donné sa très grande sensibilité, il faut éviter d'avoir des variations rapides ou vibrations à l'entrée, c'est pourquoi nous l'utilisons à la sortie du filtre électronique.

A la figure 3.B.5, la résistance R_1 couplée à C_1 sert à limiter le gain à hautes fréquences et ainsi assurer une stabilité dynamique. Le signal de sortie est proportionnel à la dérivée du signal d'entrée tel que décrit par l'équation

$$V_{\text{sortie}} = -R_2 C_1 \frac{dV_1}{dt} \quad (\text{Equation 2.1})$$

Cette équation permet de lire les spectres de dérivé première et seconde (figure 3.B.6). Un signal positif devient négatif en dérivé première et

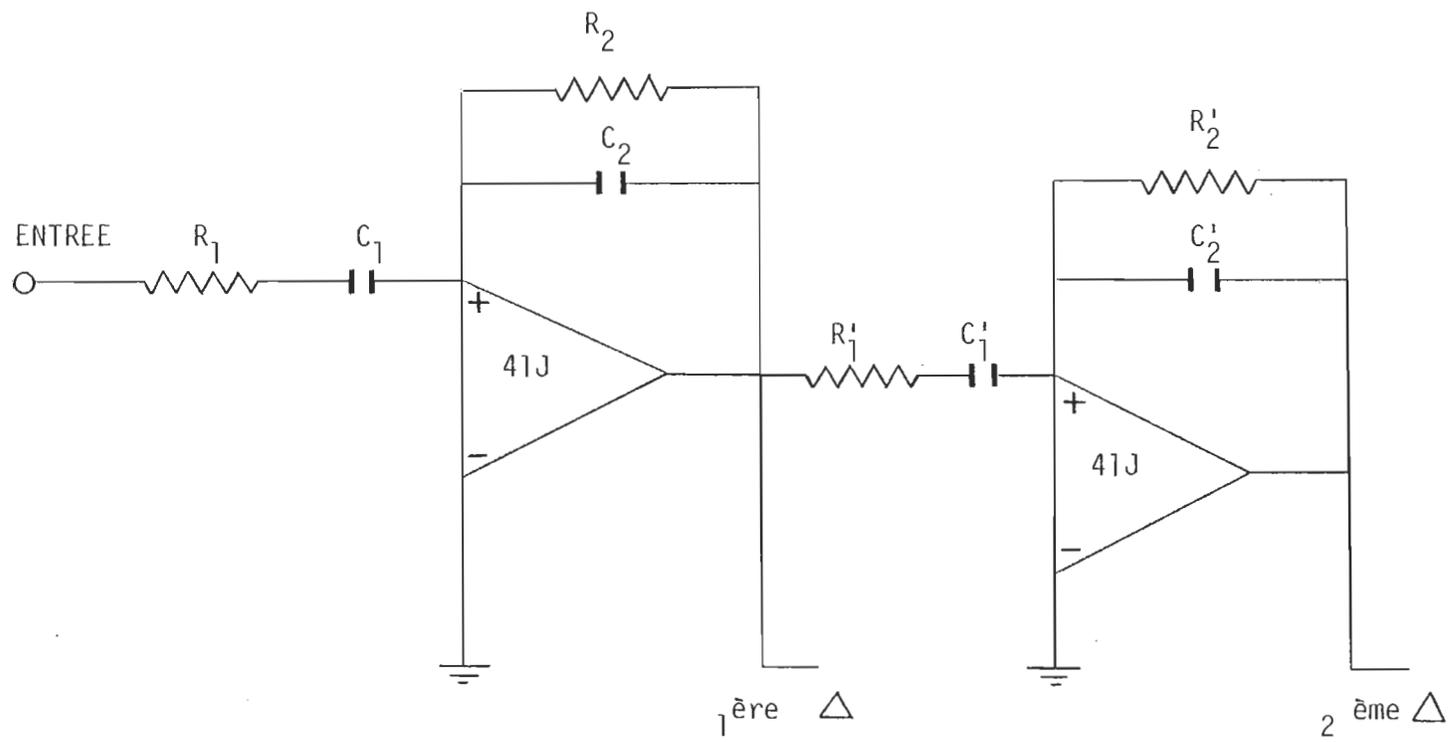


FIGURE 3.B.5 Circuit de dérivées première et seconde

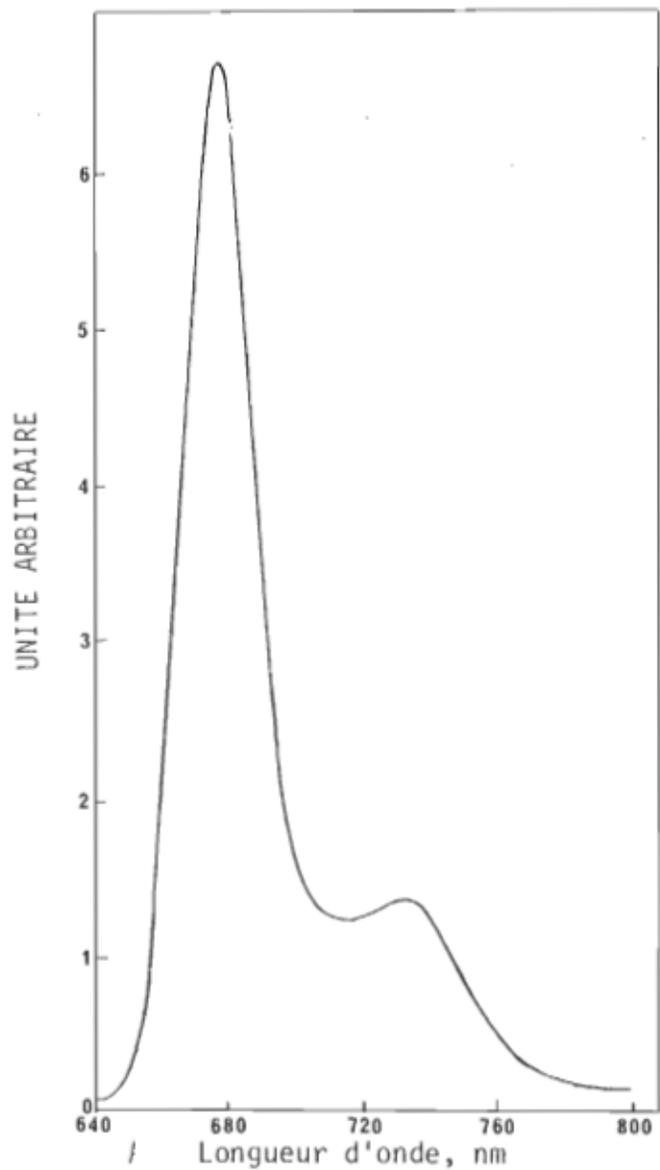


FIGURE 3.B.6 a) Spectre de fluorescence de la chlorophylle a dans le diéthyl éther.

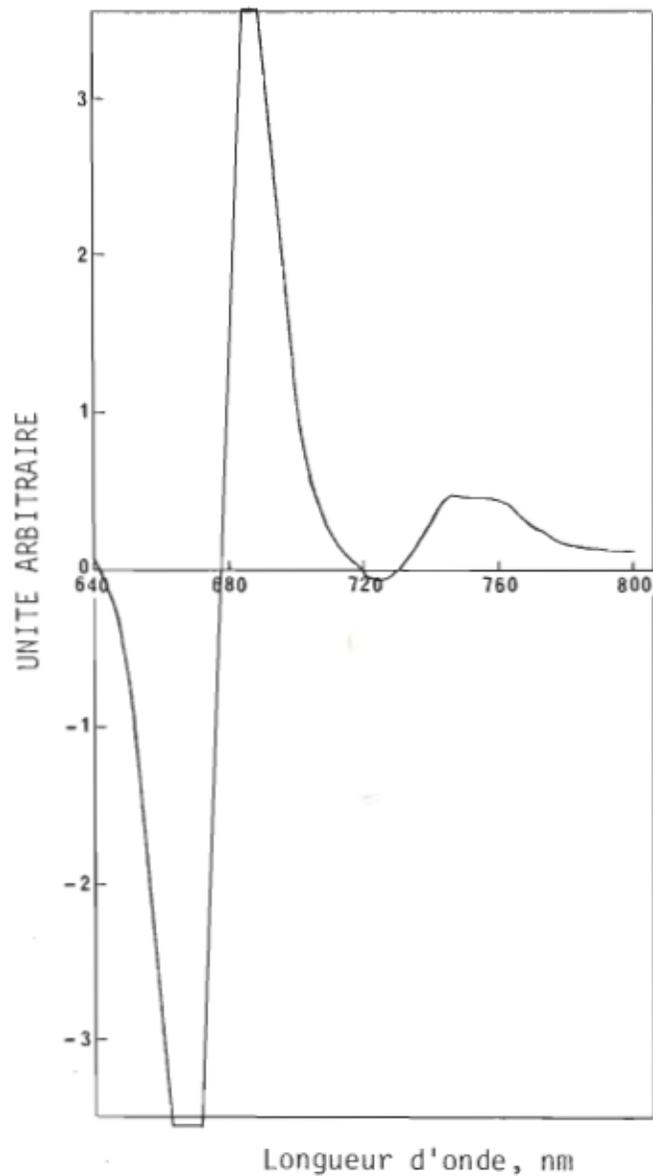


FIGURE 3.B.6 b) Spectre de la dérivée première.

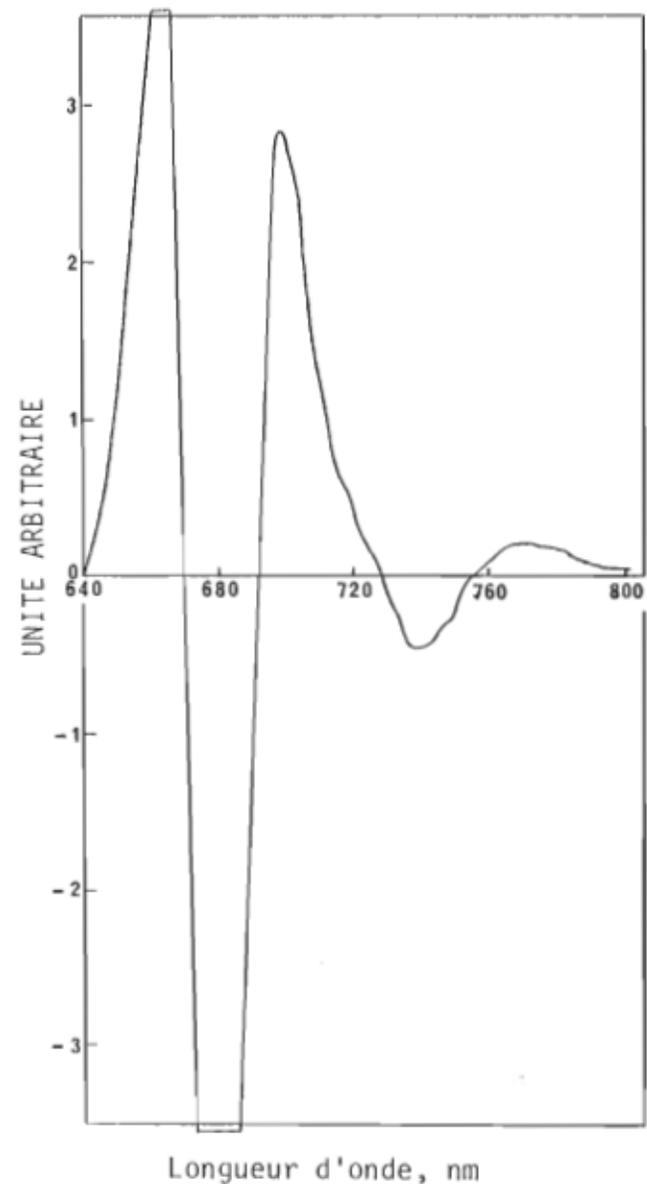


FIGURE 3.B.6 c) Spectre de la dérivée seconde.

positif en seconde. Les points d'inflexions seront lus comme des passages à zéro en dérivé première, tandis qu'en seconde ils deviendront des maxima ou minima.

3.B.4 Filtre électronique

Nous avons mentionné précédemment (page 6) que l'achat d'un filtre électronique a amélioré nos résultats. Suite à son utilisation, nous avons constaté qu'un tel type de filtre était relativement simple à construire et beaucoup moins coûteux. Nous avons donc décidé de fabriquer notre propre filtre actif en choisissant nos propres caractéristiques.

Nous avons pris un circuit imprimé (modèle UAF-31) de la compagnie "Burr-Brown" (pointillé de la figure 3.B.7) et nous l'avons monté en filtre passe-bas, deux pôles. Le choix des résistances R_{f_1} et R_{f_2} permet d'ajuster la fréquence de coupure. Comme nous travaillons sur un signal DC avec fréquence de coupure très basse, 0.05 hertz, des condensateurs C_{f_1} et C_{f_2} ont dû être ajoutés en parallèle pour diminuer la valeur des impédances. Le potentiomètre R_2 nous permet de choisir le gain à la sortie, tandis que les autres composantes sont conformes aux spécifications du manufacturier.

La figure 3.B.8 montre l'amélioration apportée à un spectre de chlorophylle a dans le diéthyloxy à une concentration de 3.7×10^{-11} M.

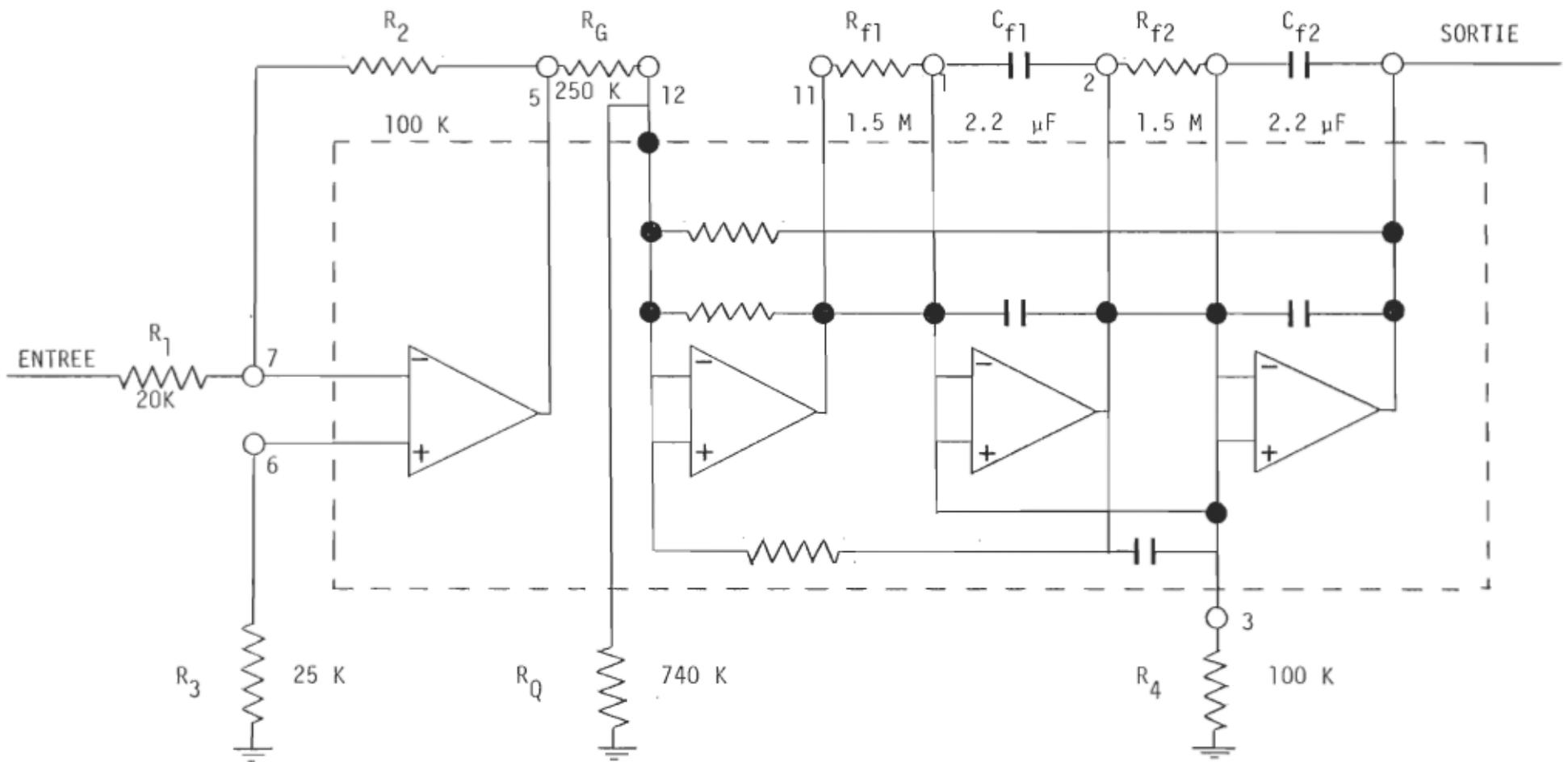


FIGURE 3.B.7 Filtre passe-bas (deux pôles).

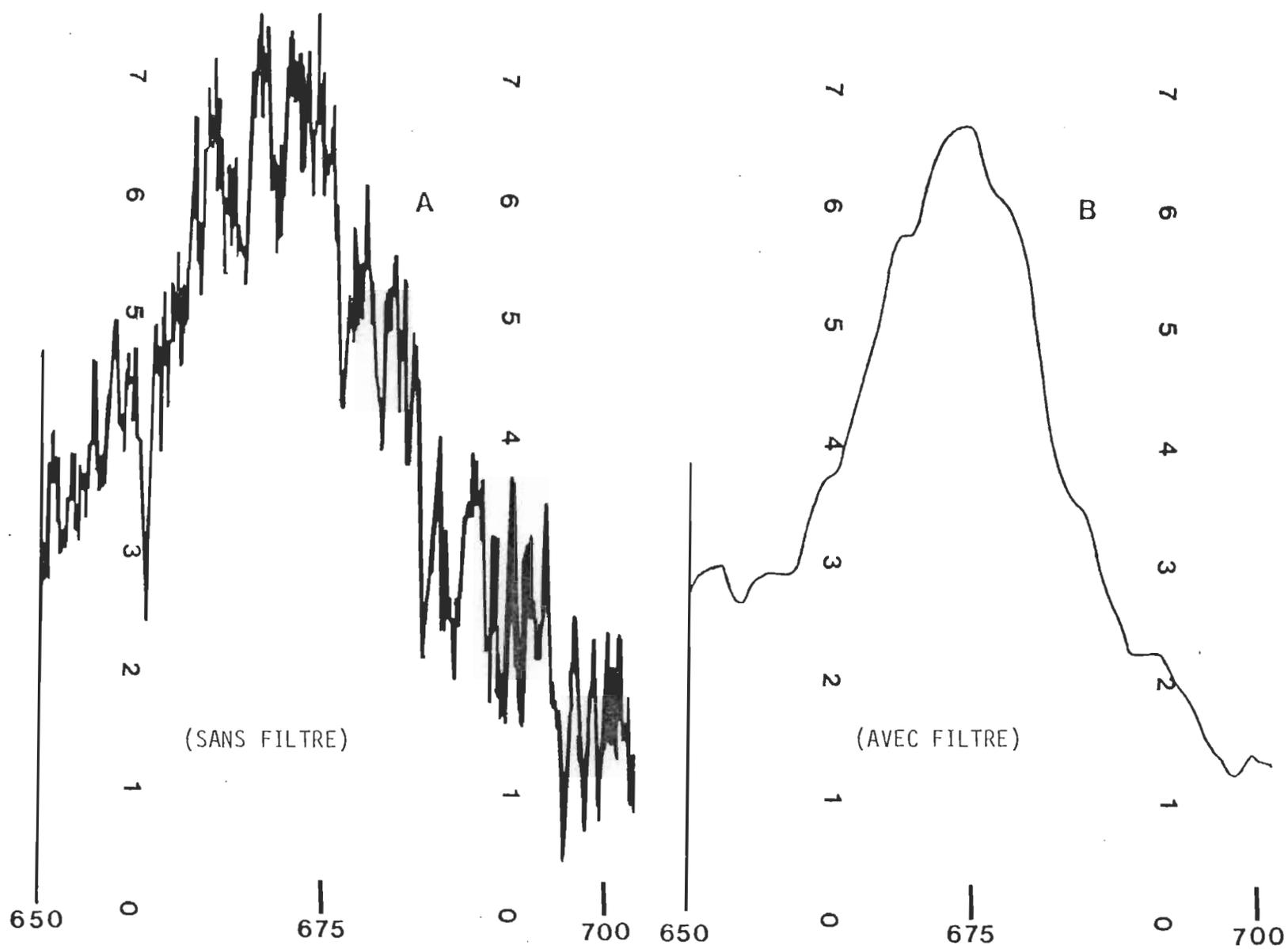


FIGURE 3.B.8 Effet du filtre électronique sur les spectres de fluorescence de la chlorophylle a dans le diéthyl éther (3.7×10^{11} mol l⁻¹).

3.C Spectrofluorimétrie à basse température

Notre deuxième étape consiste à descendre à basse température (77 K). Dans le présent chapitre, nous ferons les descriptions générales et détaillées du cryostat.

Nous avons inséré dans le texte quelques illustrations pour en faciliter la compréhension. Chaque constituant du système à basse température est numéroté sur les figures et dans le texte. Le premier chiffre est celui du chapitre, le deuxième celui de la pièce, lorsqu'il y a un troisième chiffre, il représente une pièce invisible sur le schéma général et qui est compris dans la pièce représentée par le deuxième chiffre.

Nous donnons en fin de chapitre une description des autres éléments (appareil commercial ou autre) du montage. Il est à signaler que les appareils utilisés sont souvent les mêmes que ceux employés en spectrofluorimétrie visible-proche infrarouge. Il n'y a que le compartiment à cellule et l'optique qui soient différents (figure 3.C.1, page 35).

3.C.1 Description générale

L'enceinte du cryostat a été construite par le pliage de deux tôles d'acier inoxydable, auxquelles fut soudé un double fond bombé. L'extrémité supérieure fut refermée de façon à garder une étanchéité au vide. Une valve (3.1) munie d'un manomètre mécanique (3.2) permet d'identifier le vide à l'intérieur de la double paroi. Les interstices des joints furent remplis avec du ruban de téflon.

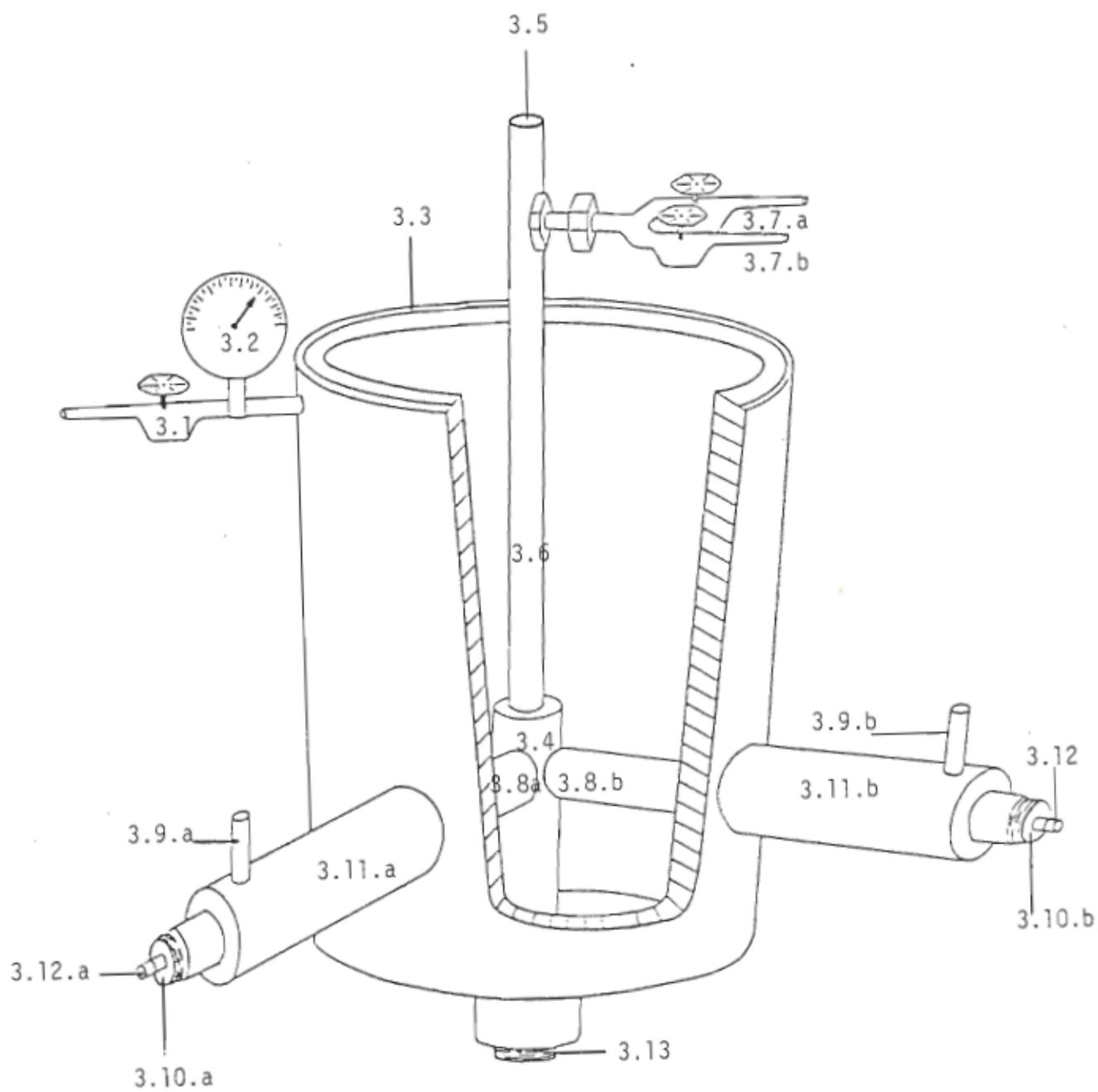


FIGURE 3.C.1 Schéma général du cryostat.

Pour éviter la formation de givre, nous avons posé des bandes isolantes pré-encollées (3.3) sur la paroi extérieure. Pour en assurer l'adhésion et pour éviter les réflexions dangereuses, le tout fut recouvert de ruban adhésif pour électricien.

Les solutions qu'on veut refroidir sont mises dans des cellules de type rectangulaire et descendues dans la chambre de refroidissement (3.4) par l'orifice du tube de descente (3.5). Cet orifice est ensuite refermé par un bouchon de caoutchouc dans lequel est inséré la sonde thermocouple permettant de mesurer la température au milieu de l'échantillon.

Lorsqu'on travaille à basse température, le givre sur l'optique du système en réduit l'efficacité, c'est pourquoi au tube de descente (3.6) est reliée une double valve en "Y" (3.7) permettant l'alternative suivante:

(i) soit de faire circuler un courant d'hélium; le gaz pénètre par une des entrées (3.7 a ou b), l'autre restant close, passe par le tube de descente (3.6), se glisse sur les parois extérieures de la cellule pour s'engouffrer dans les tubes de support de l'optique (3.8 a et b) par une voie dégivrante fibres et lentilles au passage. L'hélium sort ensuite par les bouches d'évacuation (3.9) dont le débit peut être réglé par un robinet.

(ii) l'autre éventualité consiste à faire le vide à l'aide d'une pompe mécanique branchée à l'une des entrées (3.7 a ou b), l'autre étant reliée à un manomètre. Les deux bouches d'évacuation (3.9 a et b) sont alors reliées par un tube de caoutchouc.

Les tuyaux (3.8 a) et (3.8 b) servent comme supports aux tubes (3.10 a et 3.10 b) contenant l'optique du système. Comme ils forment un contact direct avec les parois du cryostat, ils nécessitent une bonne isolation. Nous les avons recouverts avec de l'armaflex (3.11 a et 3.11 b), produit dont on se sert pour isoler la tuyauterie de la condensation, le résultat est excellent.

Les tubes optiques (3.10 a et 3.10 b) contiennent les lentilles, les fibres optiques (3.12 a et 3.12 b) et peuvent contenir les fenêtres d'entrées et de sorties. Les fibres optiques ont pour fonction (i) de transporter la lumière de l'extérieur à la cellule dans le cas de l'excitation; (ii) de la cellule au monochromateur dans le cas de l'émission. Une ouverture est aménagée dans le fond du cryostat de façon à pouvoir ajuster la position du support à cellule. Cette ouverture peut être refermée de façon à garantir l'étanchéité au vide.

3.C.2 Enceinte

L'enceinte du cryostat est le cylindre servant à contenir l'azote liquide. Ses caractéristiques physiques sont les suivantes :

matériau	:	2 tôles d'acier inoxydable d'une épaisseur de 0.062 " (0.157 cm)
diamètre externe	:	7 pouces (17.780 cm)
diamètre interne	:	6 pouces (15.240 cm)
hauteur externe	:	9½ pouces (24.130 cm)
hauteur interne	:	9 pouces (22.860 cm)

L'isolation du cryostat est assurée par :

- a) un vide entre la double paroi. Ce vide de l'ordre de 100 Pa est mesuré grâce à un manomètre mécanique (3.2);
- b) deux épaisseurs de bandes d'isolation (3.3) de type Mortell.
Ces bandes d'une épaisseur de 1/8 " (0.318 cm) sont constituées de mousse de vinyl à l'intérieur et d'aluminium à l'extérieur.
- c) un couvercle de polystyrène (Stearofoam) qui ferme le dessus du cryostat.

3.C.3 Pièces axiales

Les pièces axiales ne comprennent aucun élément d'optique (figure 3.C.2, page 40). Leur rôle se situe au niveau de la cellule et de son refroidissement. Si nous procédons de haut en bas, nous trouvons :

- a) Le tuyau de descente (3.6)

Comme son nom l'indique, le tuyau de descente sert à descendre la cellule dans la chambre à cellule.

matériau	:	acier inoxydable
hauteur	:	8 pouces (20.320 cm)
diamètre externe :		3/8 pouces (0.953 cm)
diamètre interne :		½ pouce (1.270 cm)

Un bouchon de caoutchouc de numéro 8 ferme l'orifice du tuyau de descente. Traversant de part en part ce bouchon, une sonde thermocouple avec sa gaine métallique descend à l'intérieur de la cellule. Une valve

en "Y" est reliée au tuyau de descente et permet l'entrée du gaz ou du vide servant au dégivrage de l'optique interne.

b) Chambre à cellule (3.4)

La chambre à cellule a deux fonctions :
 premièrement, le refroidissement de la cellule sans contact direct avec le réfrigérant;
 deuxièmement, le positionnement du support à cellule.

matériau	:	acier inoxydable
hauteur	:	4 pouces (10.160 cm)
diamètre externe	:	1 pouce (2.540 cm)
diamètre interne	:	5/8 pouce fileté (1.588 cm)

A angle droit, deux ouvertures de 3/4 pouce (1.905 cm) furent percées de façon à permettre l'entrée des tuyaux de support.

c) Support à cellule

Le support à cellule (figure 3.C.2, partie 3.4.1) situé à l'intérieur de la chambre à cellule, permet de positionner la cellule en hauteur et selon l'angle d'entrée du faisceau laser. Des repères gravés sur la partie non filetée du support indiquent la hauteur de la cellule dans sa chambre. En cas de bris de cellule, le support peut être enlevé par le bas de façon à pouvoir en faire le nettoyage.

matériau	:	laiton
longueur	:	4½ pouces (11.430 cm)
filet	:	2 3/4 pouces (6.985 cm)

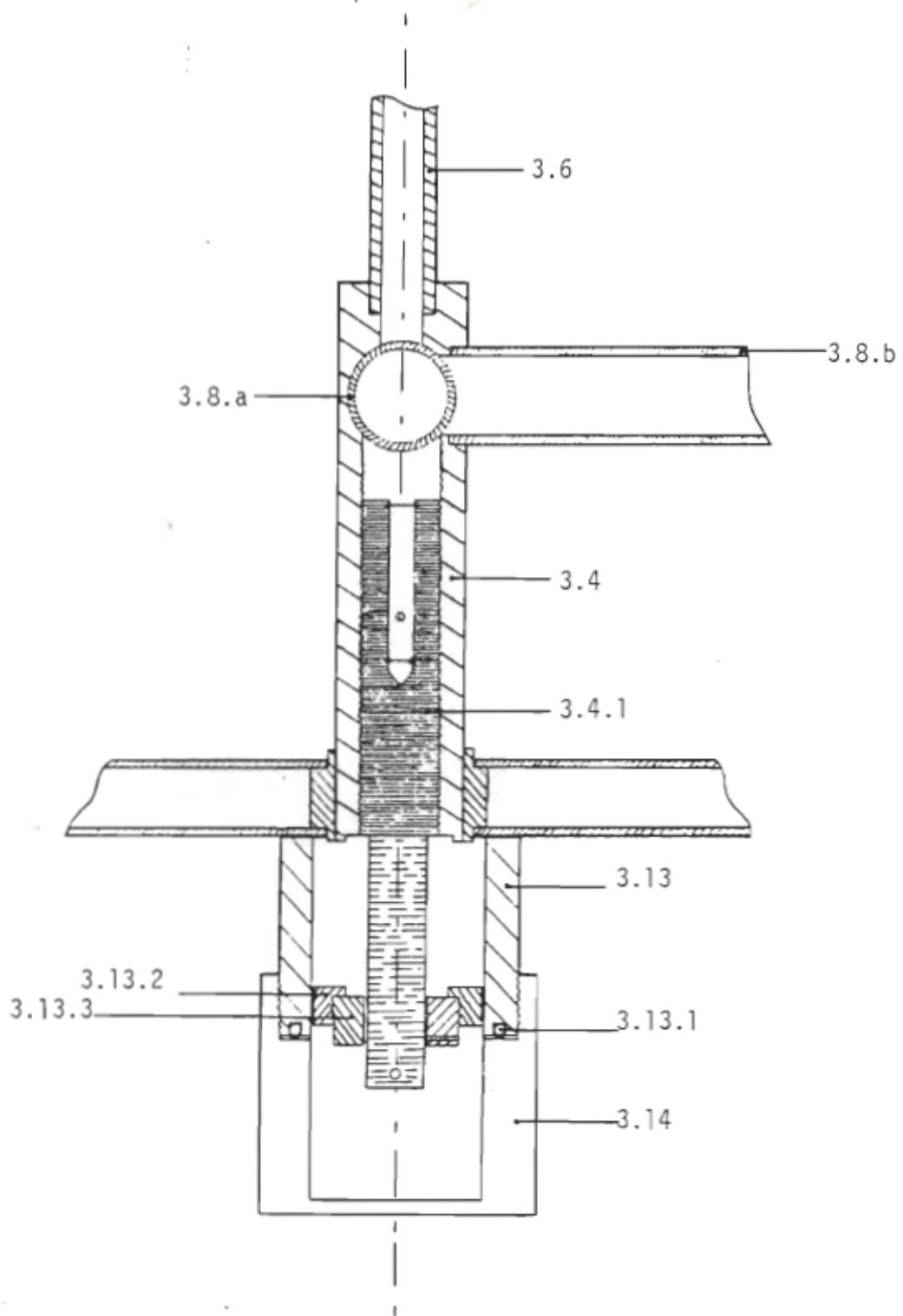


FIGURE 3.C.2 Pièces axiales.

diamètre supérieur : 5/8 pouce (1.588 cm)
 diamètre inférieur : 7/16 pouce (1.111 cm)
 rainure de la cellule: 2 types

type A : profondeur: 0.382 " (0.970 cm); largeur: 0.292"
 (0.742 cm); longueur: 1.5" (3.810 cm).

type B : profondeur: 0.382 " (0.970 cm); largeur: 0.227"
 (0.577 cm); longueur: 1.5" (3.810 cm).

Le type A est utilisé pour les cellules de verre plus larges que les cellules de quartz qui nécessitent le support de type B. Des rainures sillonnent les côtés des supports servant à l'écoulement du gaz de dégivrage ou au dégazage.

d) Cellules

Les cellules de verre ont été fabriquées par la jonction d'un tube rectangulaire à un tube de Pyrex standard.

matériau	:	Pyrex
longueur totale	:	11 pouces (27.940 cm)
partie rectangulaire	:	longueur : 4 pouces (10.160 cm)
	:	épaisseur extérieur : 1/8 pouce (0.318 cm)
	:	épaisseur intérieur : 0.075 pouce (0.191 cm)
	:	largeur extérieure : 0.300 pouce (0.762 cm)
	:	largeur intérieure : 0.250 pouce (0.635 cm)
partie tubulaire	:	longueur : 7 pouces (17.780 cm)
	:	diamètre intérieur : 1/8 pouce (0.318 cm)
	:	diamètre extérieur : 1/4 pouce (0.635 cm)

Les tubes de quartz sont employés tel quel, il suffit de fermer une extrémité.

longueur	:	4 pouces (10.160 cm)
épaisseur extérieure	:	3/32 pouce (0.238 cm)
épaisseur intérieure	:	1/32 pouce (0.079 cm)
largeur	:	0.235 pouce (0.597 cm)

e) Cylindre d'éloignement (3.13)

Pour étancher l'endroit où l'on positionne le support à cellule, sans employer d'"O-ring" métallique, il faut nous éloigner de l'enceinte du cryostat où la température est trop basse. Pour ce faire, nous avons intercalé entre l'enceinte et le chapeau de fermeture (3.14) un cylindre qui nous permet l'utilisation de "O-ring" de caoutchouc (3.13.1).

matériau	:	acier inoxydable
longueur	:	1½ pouce (3.810 cm)
diamètre extérieur	:	1 3/8 pouce (3.493 cm)
diamètre intérieur	:	1 7/8 pouce (4.763 cm)
filets extérieurs	:	3/8 pouce (0.953 cm)
filets intérieurs	:	3/16 pouce (0.476 cm)

Un anneau de raccord avec filets internes (3.13.2) est inséré dans la partie basse pour permettre le vissage de l'anneau de serrage (3.13.3).

f) Anneau de serrage (3.13.3)

L'anneau de serrage est muni de trois vis latérales permettant de verrouiller la position optimale de la cellule.

matériau	:	laiton
longueur	:	15/32 pouce (1.191 cm)
diamètre extérieur	:	1 pouce (2.540 cm)
diamètre intérieur	:	29/64 pouce (1.151 cm)
filets extérieurs	:	3/16 pouce (0.476 cm)

g) Chapeau de fermeture (3.14)

Le chapeau de fermeture appuie sur le "O-ring" de façon à former un joint étanche au vide.

matériau	:	laiton
hauteur extérieure	:	1 3/4 pouce (3.175 cm)
hauteur intérieure	:	1 1/4 pouce (4.445 cm)
diamètre extérieur	:	2 5/16 pouces (5.874 cm)
diamètre intérieur	:	1 3/8 pouce (3.493 cm)
filets	:	3/8 pouce (0.953 cm)

3.C.4 Pièces latérales

Perpendiculairement aux pièces axiales, à la hauteur de la chambre à cellule, se trouvent les deux tuyaux dans lesquels l'optique du cryostat est contenue. Si nous procédons de l'extérieur vers l'intérieur, en négligeant l'isolation, nous trouvons à la figure 3.C.3 :

a) tuyaux de support (3.8)

Une des extrémités est reliée à la chambre à cellule, tandis que l'autre comprend des filets à l'intérieur permettant de visser les tubes de transport.

matériau	:	acier inoxydable
quantité	:	deux (un à l'excitation, l'autre à l'émission)
longueur	:	10 pouces (25.400 cm)
diamètre extérieur	:	3/4 pouce (1.905 cm)
diamètre intérieur	:	5/8 pouce (1.588 cm)
filets intérieurs	:	1/2 pouce (1.270 cm)

Au niveau des trous d'évacuation (3.8.1), on a soudé des bouches d'évacuation (3.9) ayant les caractéristiques suivantes :

matériau	:	acier inoxydable
longueur	:	2 pouces (5.080 cm)
diamètre extérieur	:	1/4 pouce (0.635 cm)
diamètre intérieur	:	1/8 pouce (0.318 cm)

Ces bouches d'évacuation sont reliées à un robinet ajustant le débit de sortie du gaz de dégivrage. Lorsque l'optique est dégivrée par le vide, ces deux bouches sont reliées par un tube de caoutchouc.

b) Tube de transport (3.10)

Les tubes de transport qui comprennent l'optique du système sont situés à l'intérieur des tuyaux de support.

matériau	:	laiton
longueur totale	:	11 3/32 pouces (28.178 cm), lentille seulement: 1 1/2 pouce (3.810 cm)
diamètre extérieur	:	1/2 pouce (0.953 cm)
diamètre intérieur	:	3/8 pouce (1.970 cm)

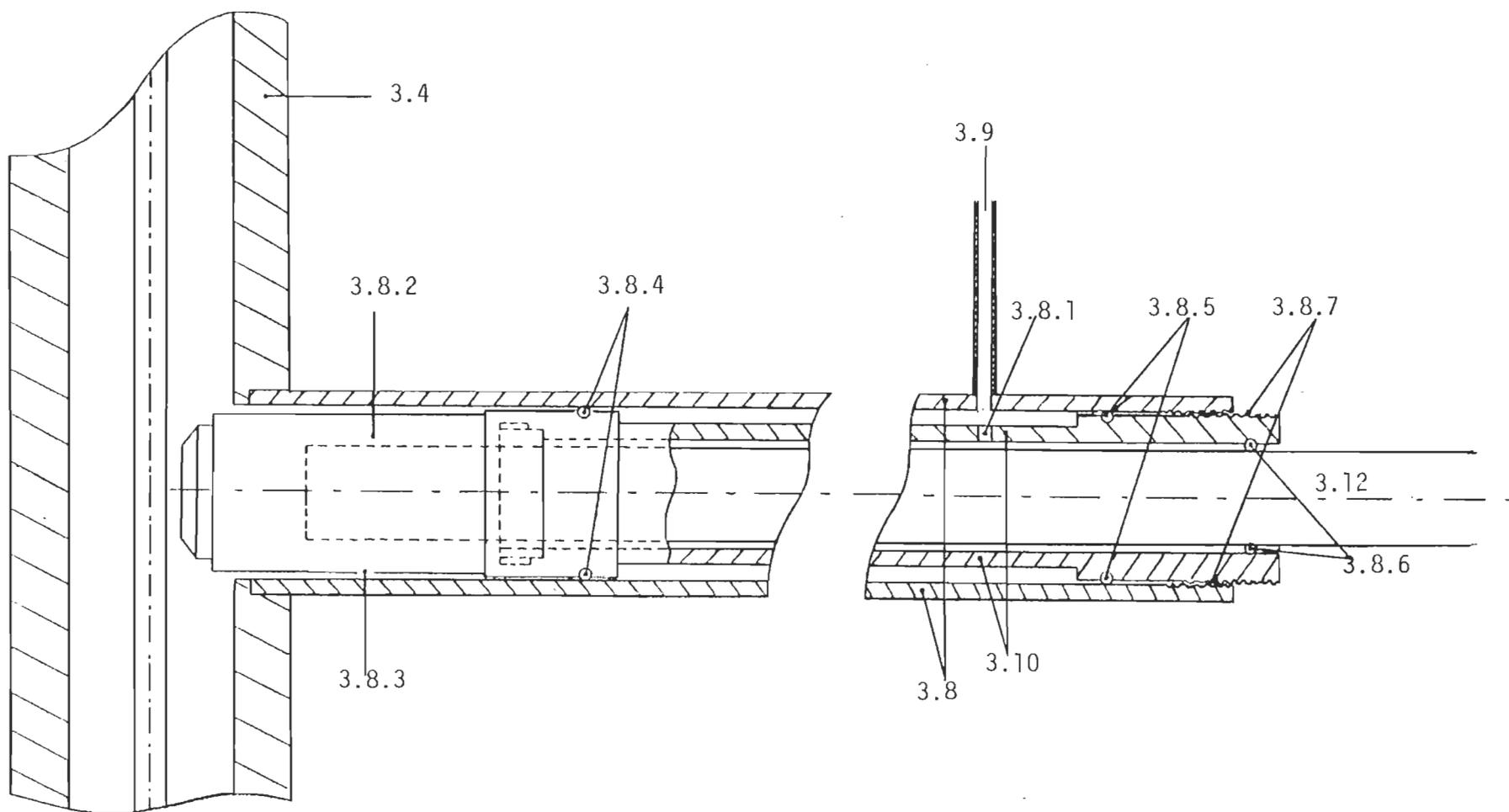


FIGURE 3.C.3 Piēces latērales.

La monture des lentilles (3.8.2) est vissée à l'extrémité du tube de transport. Cette monture fut machinée de telle façon que son diamètre soit le même que celui du tube.

Quatre ouvertures (3.8.3) percées dans la monture permettent à notre système de dégivrage de nettoyer la surface interne des lentilles et des fibres optiques. D'autres ouvertures (3.8.1), à l'autre extrémité, furent aménagées pour permettre la sortie du gaz. Ces ouvertures donnent sur les bouches d'évacuation.

La surface externe des tubes de transport comprend deux rainures munies de "O-ring". Le premier "C-ring" (3.8.4) assure que le gaz circule bien par les ouvertures appropriées, tandis que le deuxième (3.8.5) sert plus spécialement lors de la mise sous vide. Il joue aussi le rôle d'assurer la sortie du gaz par les bouches d'évacuations en l'empêchant de sortir directement par le tuyau de support.

Un troisième "O-ring" (3.8.6) a été aménagé à l'intérieur du tube de transport afin de centrer le tube de verre qui contient la fibre optique. Ce "O-ring" permet aussi de maintenir le vide.

Les tubes de transport sont vissés dans les tuyaux de support. Il est possible de remplacer la fibre optique (3.12) à l'excitation par une fenêtre qui se visse directement sur les filets du tube de transport. L'expérience démontre cependant qu'il est alors difficile de faire les ajustements lorsqu'il n'y a plus de fibre optique pour guider le faisceau du laser.

3.C.5 Support du cryostat (3.14)

Le support du cryostat (figure 3.C.4) est constitué de deux plaques métalliques (3.14.1) épousant la forme du cryostat. La hauteur est ajustée grâce à 4 tiges filetées (3.14.2). Les boulons (3.14.3) permettent, lorsqu'ils sont libérés, de faire une rotation du cryostat. Tandis que les écrous (3.14.4), situés sur le dessus du support du cryostat, servent au déplacement latéral des plaques métalliques sur les rails de soutien (3.14.5). Le tout formant un ajustement complet et indépendant selon les trois axes.

3.C.6 Fibre optique et gaine

La fibre optique est glissée à l'intérieur d'un tube de verre et elle est maintenue en position avec de la colle "epoxy". Les tubes de verre sont glissés sur les "O-ring" (figure 3.C.3, voir 3.8.6) du tube de transport. Il est nécessaire d'ajuster la distance entre la fibre et la cellule ou entre la fibre et la lentille.

Fibre optique :

longueur	:	12 pouces (30.480 cm)
diamètre	:	3/16 pouce (0.476 cm)

Gaine :

matériau	:	Pyrex
longueur	:	11 ½ pouces (29.210 cm)
diamètre extérieur	:	3/8 pouce (1.970 cm)
diamètre intérieur	:	9/32 pouce (0.900 cm)

Il est à noter que pour un meilleur vide, les "O-ring" et la gaine de verre de la fibre optique doivent être induites de graisse de silicone.

Fibre optique

La particularité du cryostat que nous avons construit vient de l'utilisation de fibres optiques à l'excitation et à l'émission. Avant de discuter les raisons d'un tel choix, il serait opportun de caractériser les propriétés de transmission de la lumière dans une fibre optique.

Une fibre optique est un assemblage de minuscules conducteurs de verre* dans lesquelles voyagent les ondes lumineuses. Chacun des conducteurs est enduit d'une substance ayant un indice de réfraction différent de celui du verre. La lumière est transmise par réflexion sur les parois internes, tel qu'indiqué à la figure 3.C.5, page 51. Les éléments sont définis comme suit :

N_1 : indice de réfraction de l'air

N_2 : indice de réfraction de la fibre

N_3 : indice de réfraction de la gaine

I : angle d'incidence : Angle formé par le rayon incident et la normale à la surface au point incident.

R : Angle de réfraction: Angle formé par le rayon réfracté et émergeant la normale à la surface au point d'émergence $N_1 \sin I = N_2 \sin R$

ϕ : Angle de réflexion: Angle formé par le rayon réfléchi émergeant et la normale à la surface au point d'émergence $\phi = \pi/2 - R$

* verre ou substance apparentée.

L'angle de réflexion ϕ possède une valeur limite telle que si $\phi \geq \phi_{1im}$. Le rayon incident ne sera pas transmis par la fibre optique. La valeur maximum de l'angle d'incidence nous est donnée par la relation⁶³:

$$N_1 \sin I_{\max} = (N_2^2 - N_3^2)^{\frac{1}{2}}$$

où $N_1 \sin I_{\max}$ est l'ouverture numérique (NA) de la fibre optique. L'ouverture numérique mesure la capacité que possède une fibre de capter les rayons lumineux.

L'ouverture numérique d'une fibre optique et le nombre f d'une lentille définissent la même qualité d'une composante optique, c'est-à-dire l'angle maximum de capture des rayons lumineux. A de grandes distances, ils sont reliés par l'équation suivante :

$$NA = 0.5/\text{nombre } f$$

Les fibres optiques utilisées proviennent de la compagnie Dolan Jenner. Elles ont un cône d'acceptance tel que $I_{\max} = 36.50$ ($N_2 = 1.60$, $N_3 = 1.49$). L'ouverture numérique est de 0.60 ce qui nous donne une ouverture relative de 0.83.

Quant à la transmission de la lumière dans une fibre optique, elle est affectée par des pertes dues à la réflexion (i), aux interstices entre les conducteurs (ii), à l'absorption et à la dispersion (iii).

- (i) les pertes par réflexion à l'entrée et à la sortie des conducteurs se calculent à l'aide des indices de réfraction,⁶⁴

$$\text{Perte par réflexion} = (N_2 - N_1) / (N_2 + N_1)^2$$

(entrée ou sortie)

Cette perte est de 6% donc la transmission à l'entrée est de 94%. 94%.

(ii) La perte due aux interstices est de l'ordre de 15% par conséquent, la transmission dans la fibre est de $0.85 \times 0.94 = 0.80$.

(iii) L'absorption et la dispersion aux interfaces conducteur/gaine sont responsables d'une perte de transmission de 5.4%/pied. En considérant une longueur de fibre de 1 pied, la transmission est de $0.80 \times (1.0 - 0.054) = 0.757$.

La transmission totale à l'extrémité de la fibre est de $0.757 \times (1.0 - 0.060) = 0.714$, soit 71.4%.

Il est à remarquer que ce calcul est approximatif et nous donne seulement un aperçu de la perte de transmission lumineuse dans la fibre.

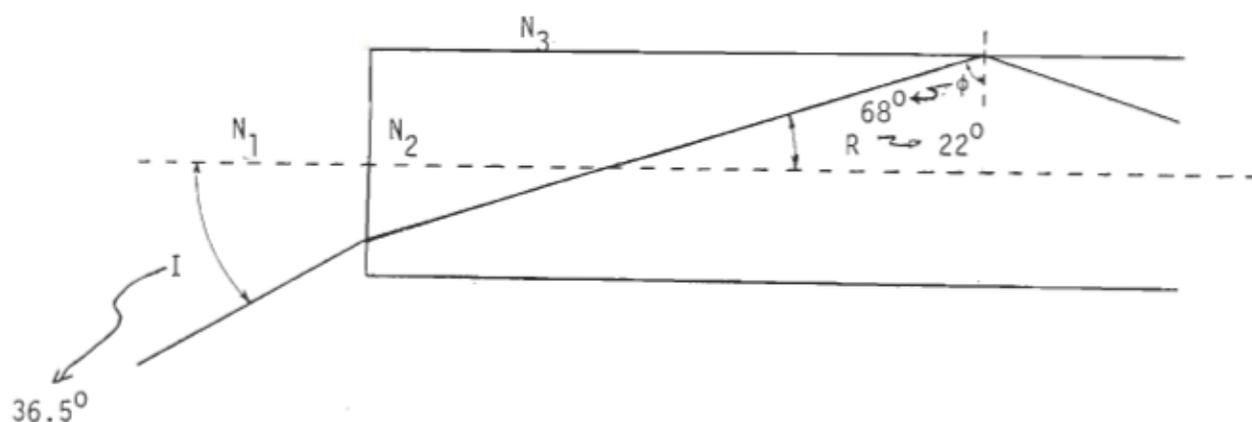


FIGURE 3.C.5 Transmission de la lumière dans une fibre optique

3.C.7 Excitation

Suite à la fibre optique, nous passons par le système de lentilles qui a un pouvoir de transmission de $\sim 70\%$. Cette évaluation est faite selon l'hypothèse que chaque lentille réfléchit 10 % de la lumière incidente. Si l'on ajoute un autre 10 % de réflexion sur la paroi de la cellule, on peut compter que seulement le 1/3 de la lumière provenant du laser sert à exciter l'échantillon. Cette approximation ne tient pas compte de l'utilisation possible d'un filtre à l'excitation; les filtres Oriel employés pour isoler la longueur d'onde du laser, atténuent par réflexion environ 40% de l'intensité lumineuse. Donc, dans ce cas ce n'est plus le 1/3 mais le 1/8 de l'intensité incidente qui sert aux fins d'excitation.

On peut se poser les questions suivantes: est-ce qu'il ne serait pas mieux d'augmenter l'intensité de l'excitation pour accroître la sensibilité ? Jusqu'à quel point peut-on pousser la relation intensité-sensibilité ?

Pour répondre à ces questions, il faut examiner le système optique servant à l'excitation (figure 3.C.6).

L'excitation se produit dans la cellule à l'intérieur d'une section de cône ayant $\frac{1}{4}$ pouce (0.635 cm) de base (B) par $\frac{1}{4}$ pouce (0.635 cm) de hauteur (H). La largeur (L) est celle de la cellule, soit 0.075 pouce (0.191 cm). Ceci nous permet de calculer le volume irradié :

$$\frac{B \times H}{2} \times L = 0.038 \text{ cm}^3$$

Un photon à 441.6 nm possède une énergie de 4.5×10^{-18} joule. Il en résulte que pour une puissance d'excitation de 10 mW, notre volume reçoit

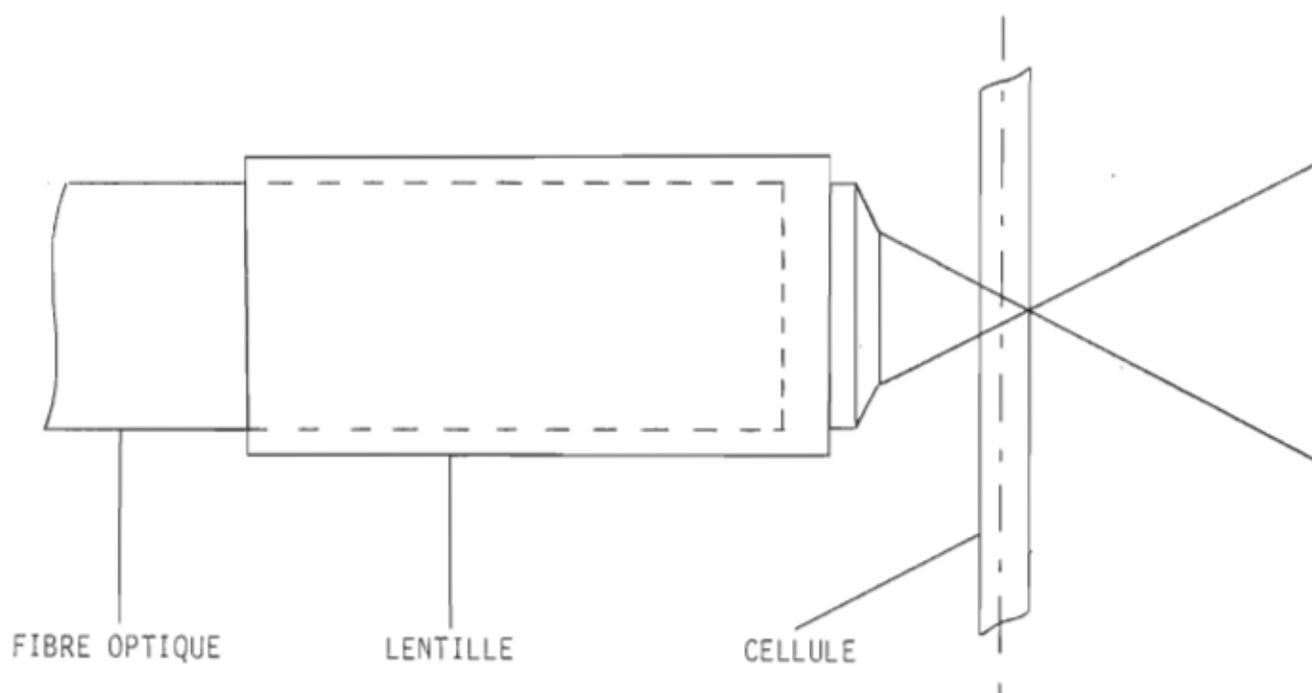


FIGURE 3.C.6 Système optique servant à l'excitation.

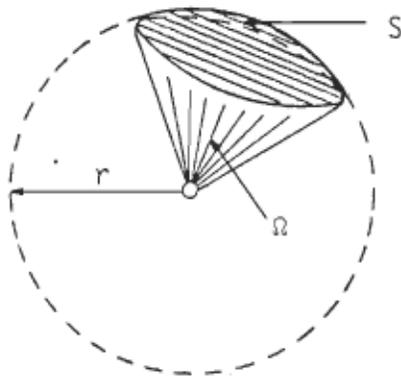
2.2×10^{18} photons par seconde. Dans 0.038 cm^3 d'une solution de 10^{-8} M , nous avons 2.2×10^{11} molécules. Ce nombre est relativement faible comparé au nombre de photons par seconde. La chlorophylle est un pigment sensible à la lumière, si elle est trop intensément irradiée, il y a photodégradation. C'est pourquoi, il faut prendre soin de ne pas laisser la chlorophylle sous irradiation en dehors du temps de lecture.

L'utilisation d'un objectif de microscope par l'excitation est nécessitée par la géométrie du système. Le faisceau du laser pénètre par l'entrée de la fibre et il en sort selon son ouverture numérique (0.83), c'est-à-dire que la lumière à la sortie de la fibre est émise selon un cône de soixante-treize (73) degrés d'ouverture. Comme il faut concentrer les rayons sur le côté étroit de la cellule, nous devons employer un objectif de microscope possédant un diamètre de lentille équivalent à celui de la fibre et une distance focale très courte.

Une autre possibilité serait d'utiliser une cellule de plus grande largeur; si la cellule au lieu d'avoir 0.075 pouce (0.191 cm) de largeur en possédait 0.25 pouce (0.635 cm), alors dans ce cas, toute la lumière serait captée par l'échantillon. Ainsi, en augmentant le volume irradié, on augmente la quantité de lumière émise. Mais d'autre part, l'augmentation du volume a pour effet d'accroître la réabsorption. De plus, cette augmentation ne favoriserait pas la formation d'un verre translucide aux basses températures. Par conséquent, les dimensions réduites utilisées sont appropriées aux études spectroscopiques à basse température.

3.C.8 Emission

Pourquoi utiliser des fibres optiques plutôt qu'un cryostat de type conventionnel ? La raison est que nous voulions éliminer tous les problèmes que posent fenêtres, joints métalliques et lentilles à longue distance focale. De plus, nous voulions une optique qui soit près de notre échantillon. Si on examine de quelle façon se produit l'émission on observe qu'elle est isotrope. Cette propriété permet de définir l'irradiance :



$$E_r = \frac{F_r}{S}$$

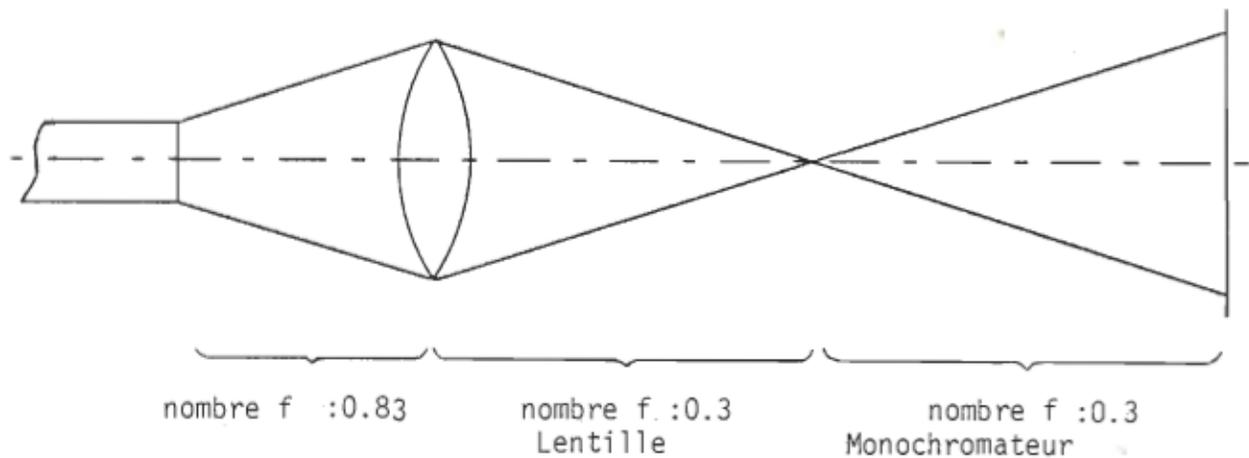
E_r : irradiance
(W/m^2)

F_r : flux radiant
(W)

S : surface (m^2)

Imaginons que le centre (o) de la sphère soit notre source de luminescence et que la section de surface (S) soit une lentille ou l'ouverture de la fibre optique. Pour avoir la plus grande irradiance possible, il faut maximiser (S) et minimiser (r). Pour ce faire, nous devons employer une lentille de courte distance focale et de grand diamètre. Nous avons opté pour un assemblage de lentilles, type objectif de microscope. Si l'objectif de microscope s'est avéré un bon choix à l'excitation, il en fut autrement à l'émission; ce que l'on gagnait en focalisation on le perdait en réflexion. L'utilisation de la fibre optique ayant un nombre f de 0.8 et un diamètre de 3/8 pouce ((0.953 cm) servait mieux nos fins qu'une combinaison lentille-fibre optique.

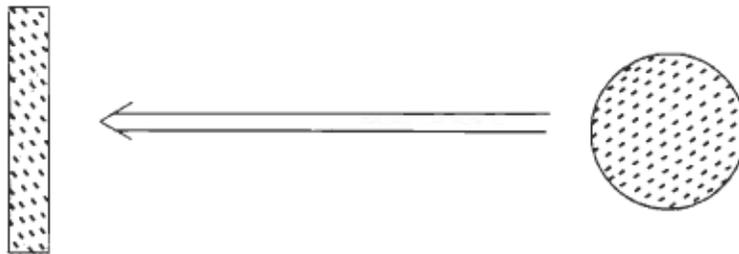
Les fibres optiques ne se comportent pas comme des sources ponctuelles. Pour coupler deux systèmes optiques avec le minimum de perte, il faut que leurs optiques correspondent. Ainsi, les nombres f des composantes doivent avoir la plus grande similitude. Dans les plans originaux, le couplage entre la sortie de la fibre optique à l'émission, et le monochromateur, devait être assuré par une lentille tel que montré ci-dessous.



Comme nous l'avons vu, une fibre optique est composée de centaines de petits conducteurs de verre. L'extrémité de la fibre ne forme pas un point lumineux, mais une multitude de points constituant autant de sources ponctuelles. Il est très difficile de focaliser un tel système. Après maints essais, on est venu à la conclusion que l'utilisation d'une lentille atténuait notre signal. Nous avons donc effectué un couplage direct entre la fibre et le monochromateur.

Un couplage direct entre monochromateur et fibre optique entraîne une perte de résolution. De plus, la non focalisation de la lumière à la fente (1 mm) du monochromateur diminue l'intensité lumineuse de 60 %.

Il serait éventuellement possible d'améliorer le système optique en reformant le paquet de conducteurs contenu dans la fibre. La fibre optique, tel que vendue par le manufacturier, possède ses conducteurs réunis en cercle aux extrémités. Il serait facile de remplacer la bague terminale de façon à voir les conducteurs alignés tel que montré ci-dessous. De cette façon, les pertes dues à la géométrie de la fente seraient éliminées.



Lorsque nous avons fait l'acquisition des fibres optiques, nous ne pouvions connaître les difficultés que nous allions rencontrer. Maintenant l'expérience montre que l'utilisation de fibre optique de plus large diamètre et de plus grande ouverture numérique serait un atout à l'émission. L'achat de fibres optiques déjà couplées à des lentilles serait une solution à envisager.

3.C.9 Laser

Nous utilisons à l'excitation soit un laser Hélium-Néon de 5 mW de puissance, soit un laser Hélium-Cadmium de 75 mW. En remplacement de ce dernier, nous avons acquis récemment un laser He-Cd de 20 mW. Un laser à l'excitation nous procure maints avantages : une grande puissance d'excitation, un faisceau monochromatique et en raison de la cohérence du faisceau, il est possible d'employer une fibre optique à l'excitation.

LASER HELIUM-CADMIUM

manufacturier : Spectra-Physics
 longueur d'onde : 441.6 nm et 325 nm
 puissance : 75 mW à 441.6 nm
 diamètre du faisceau : 0.5 mm

LASER HELIUM-NEON

manufacturier : Spectra-Physics
 longueur d'onde : 632.8 nm
 puissance : 5 mW
 diamètre du faisceau : 0.65 mm

3.C.10 Monochromateur

Un monochromateur "Jobin-Yvon" de modèle H-20 est utilisé dans notre étude. Un moteur synchrone muni d'un dispositif de commande permet un large choix de vitesses de balayage. Il est possible de l'utiliser en mode cyclique

ou répétitif. Nous avons tenté d'asservir un enregistreur XY au monochromateur; un potentiomètre relié à l'avance manuelle du monochromateur permettrait de faire varier le voltage à la borne X de l'enregistreur. Pour des raisons d'imprécisions dans le système de décommande, l'idée dut être abandonnée. Il est prévu de faire la correction des spectres par un micro-ordinateur, il sera alors relativement facile de contrôler l'avance du moteur par le micro-processeur.

L'incorporation d'un filtre est nécessaire pour enlever la seconde harmonique du laser He-Cd présente à 883.2 nm. Nous l'avons installé à l'intérieur du monochromateur. Nous devons prendre garde de ne pas l'utiliser avec le laser He/Ne et de nous méfier des réflexions qu'il peut produire. Le spectre de transmission de ce filtre est présenté à la figure 3.C.7.

manufacturier	:	Jobin-Yvon
modèle	:	H-20
dispersion linéaire	:	4 nm, 2 nm et 1 nm (dépendant de la largeur de fente utilisée)
domaine spectral	:	400 nm à 1600 nm
ouverture numérique	:	F/3.5
longueur de focale	:	200 mm
lumière dispersante	:	0.01 % à 400 nm, non détectable à > 420 nm
réseau	:	réseau holographique concave, 1200 sillons/mm.

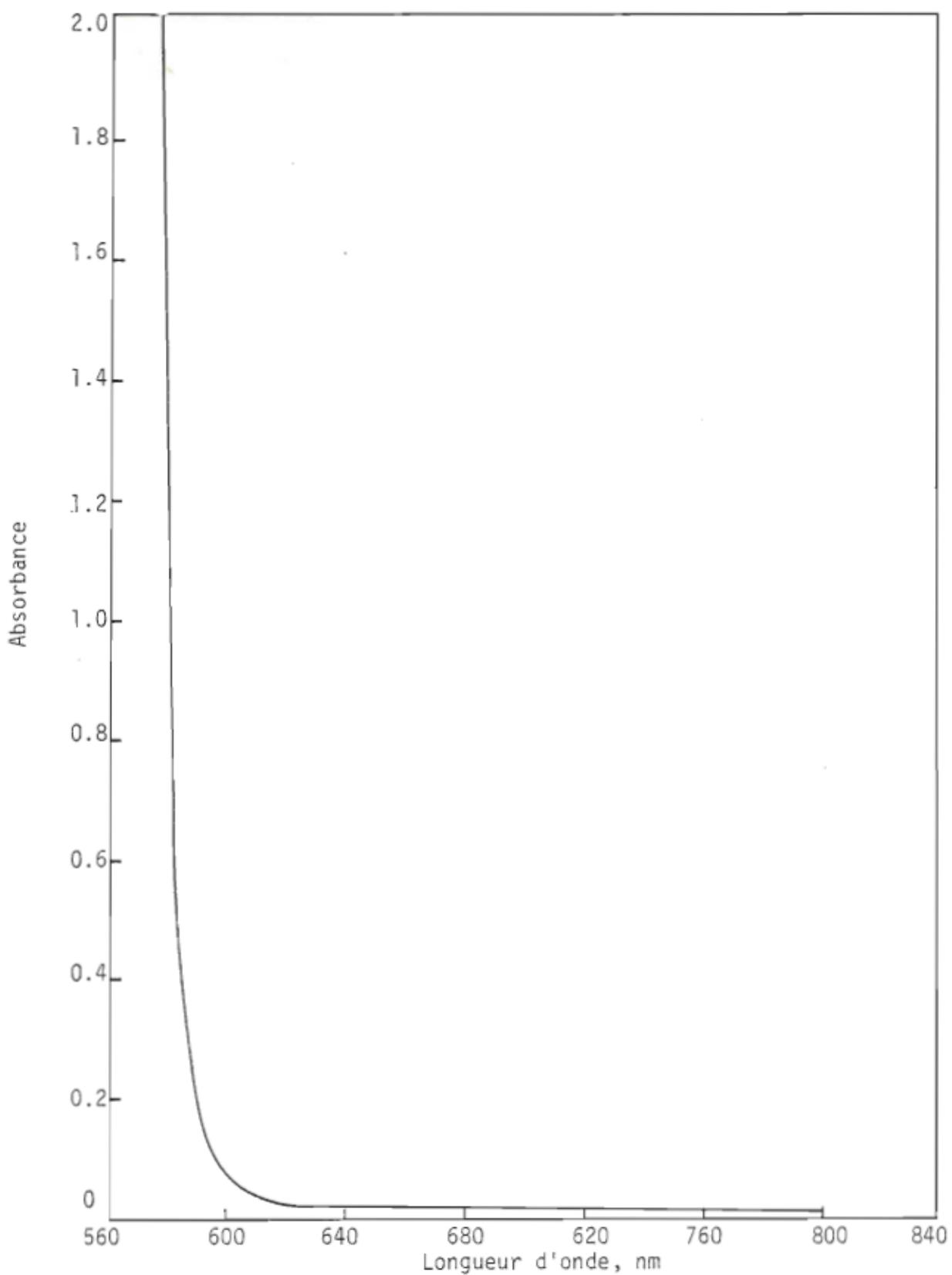


FIGURE 3.C.7 Spectre de transmission du filtre RG 475.

3.C.11 Photodiode

Comme moyen de détection, il nous fallait un système très sensible dans la région du proche infrarouge (700 nm à 1200 nm). Pour répondre à cette exigence, nous avons choisi une photodiode au silicone de type HUV-4000 de la compagnie Optikon combinée à un amplificateur opérationnel.

La figure 3.C.8⁵¹ montre le circuit de l'amplificateur et de la photocathode. Précisons que les pattes (2) et (6) servent à l'ajustement du zéro, les connexions (4) et (11) sont reliées à la masse tandis que les pattes (1) et (3) fournissent l'alimentation au circuit. En rétroaction, une résistance de 200 M Ω nous permet l'amplification. Le condensateur de 5 pF forme un filtre RC pour éliminer une fréquence d'oscillation de 4000 hertz qui nous amène de l'instabilité.

Manufacturier	:	Optikon
modèle	:	HUV-4000
surface active	:	100 mm ²
réponse à 900 nm	:	10 ⁷ V/W
domaine spectral	:	200 nm à 1150 nm (voir courbe de réponse, page 63)
courant de fuite	:	0.5 pA
stabilité du zéro	:	10 V/ ^o C, le manufacturier indique une stabilité de 1 volt/ ^o C en DC, tandis que nos tests indiquent une valeur de 10 V/ ^o C. Le refroidissement de la photodiode n'améliore pas le bruit de fond

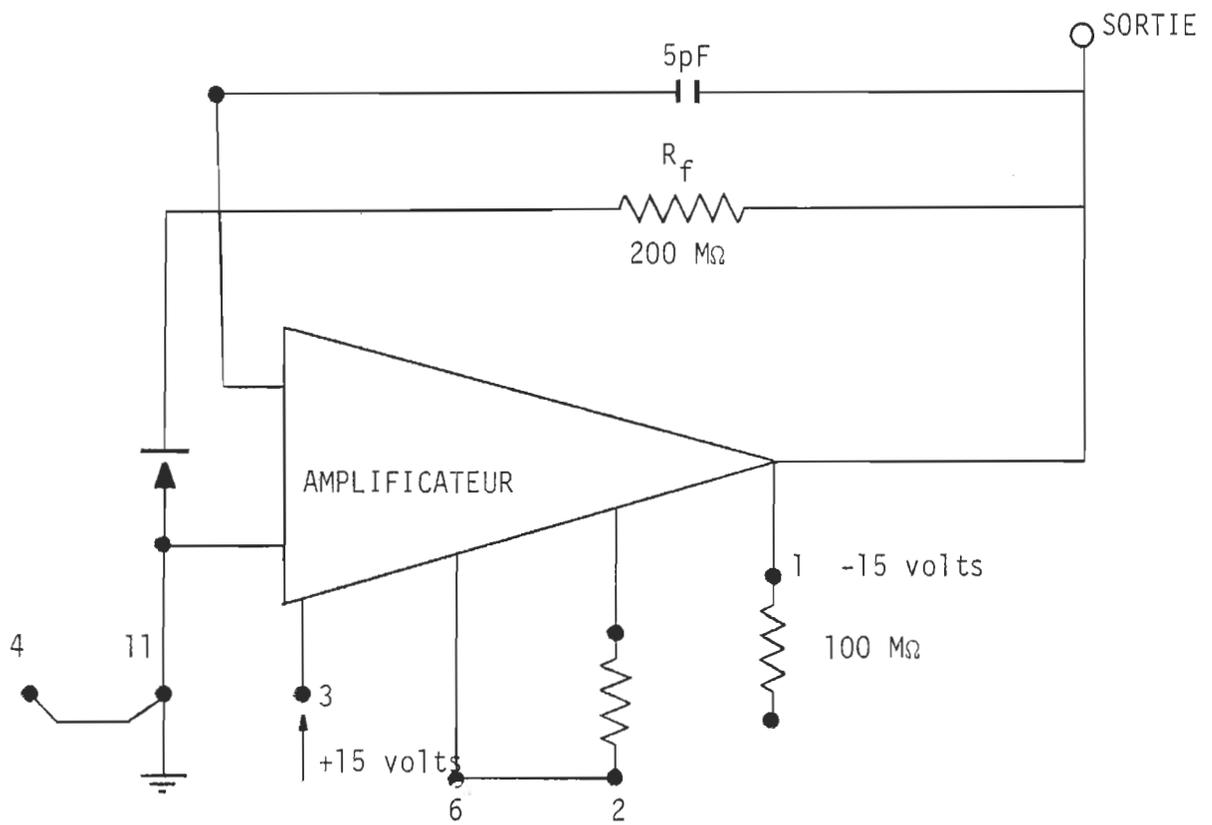


FIGURE 3.C.8 Circuit de l'amplificateur et de la photocathode.

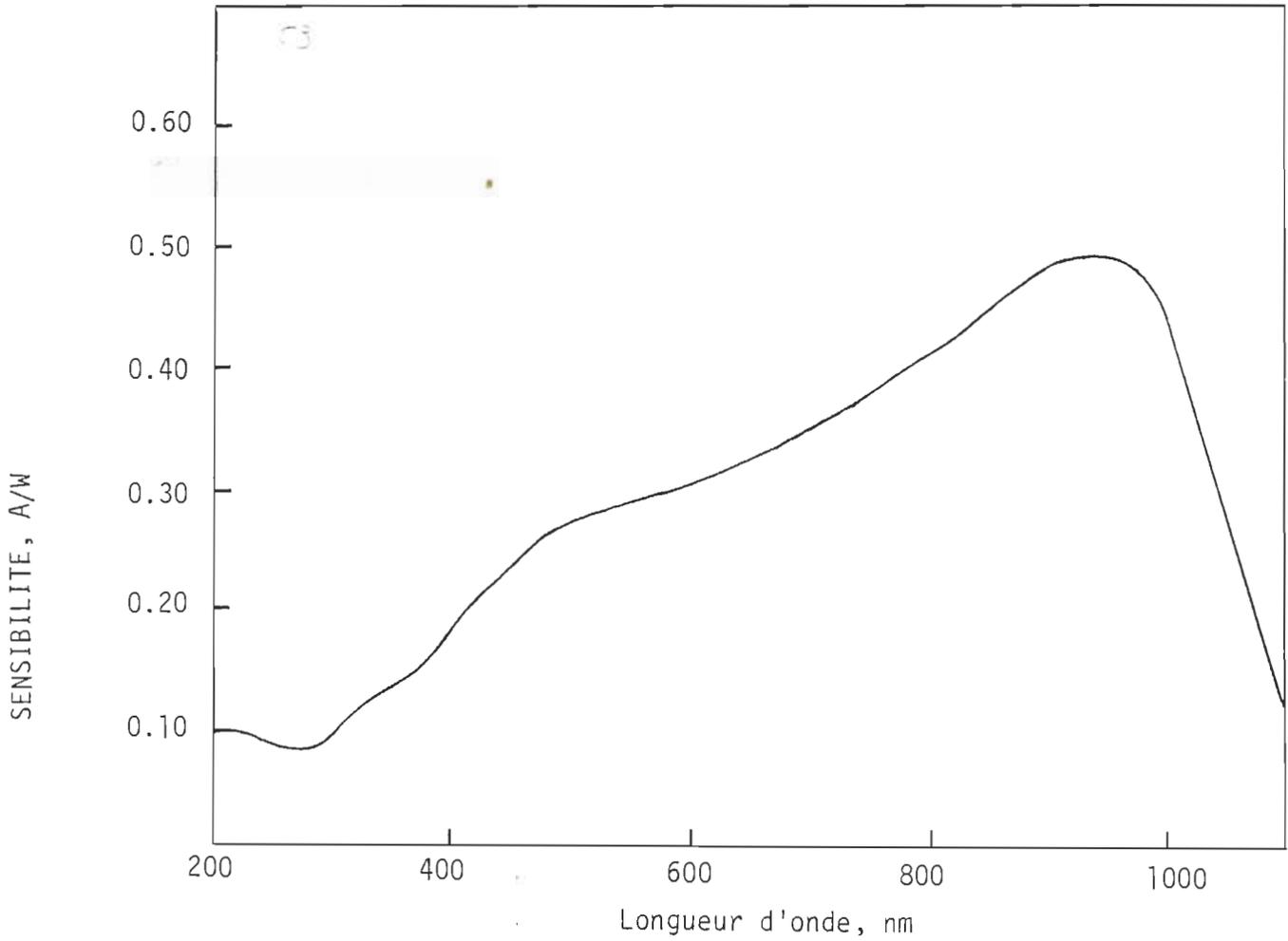


FIGURE 3.C.9 Spectre de réponse de la cellule photo-voltaïque au silicium.

résistance de sortie : 90 ohms
 voltage d'alimentation : ± 15 volts
 courant d'alimentation : 2.2 milliampères

3.C.12 Amplificateur différentiel (Lock-in)

Un amplificateur différentiel (Lock-in) est un détecteur de voltage synchronisé sur un signal de référence qui lui même est synchronisé sur le signal que l'on veut mesurer. La phase est telle que le détecteur synchrone reste positif sur la moitié d'un cycle et ensuite inversé sur le demi cycle négatif suivant. Ceci a pour effet de donner un voltage unipolaire DC proportionnel à la composante synchronisée du signal d'entrée. Comme le bruit et l'interférence sont non synchronisés, donc ils ne sont pas transformés en DC, il en résulte qu'à la sortie ils peuvent être éliminés par un filtre passe-bas.

Le pouvoir de réjection d'un amplificateur différentiel (Lock-in) dépend entre autre de la valeur d'intégration du filtre passe-bas. Un bon détecteur synchrone est celui dont la réponse en DC est purement fonction de l'amplitude du signal synchrone à l'entrée, c'est-à-dire que la sortie n'est nullement influencée par le bruit ou l'interférence provenant du détecteur.

manufacturier : Princeton Applied Research
 modèle : synchro-het, lock in amplifieur 186
 domaine de fréquence : 0.5 Hz à 100 kHz
 sensibilité : 100 nV à 500 mV
 bruit interne : $10 \text{ nV/Hz}^{\frac{1}{2}}$ à 1kHz

stabilité d'amplification	:	0.1 %/°C
impédance d'entrée	:	100 M Ω
mode normal de rejet	:	80 dB à 1 kHz

3.C.13 Enregistreur

Les caractéristiques de notre enregistreur sont les suivantes:

manufacturier	:	Yewtec Corporation
modèle	:	3043
voltage d'utilisation	:	1 mV à 100 V
temps de réponse	:	0.8 seconde, déflexion pleine échelle
précision	:	0.25 %
vitesse	:	2,6,20 cm/min et 2,6,20 cm/h

3.C.14 Thermocouple

Lorsqu'on effectue des mesures à basse température, il faut s'assurer que la température reste stable. A cette fin, nous avons installé une sonde thermocouple à l'intérieur de la cellule. La précision sur la mesure de la température n'étant pas critique, un montage simple utilisant une jonction froide et un amplificateur différentiel tel que présenté à la figure 3.C.10 a été employé.

L'utilisation du couple cuivre/constantan est justifiée par le fait que nous ne voulions pas créer de jonction au niveau de l'amplificateur. De plus, ce type de jonction donne une bonne différentiation des températures même à 77 K (voir courbe de réponse du thermocouple en fonction de la température à la figure 3.C.11)⁵³. Une amplification de 100 est utilisée

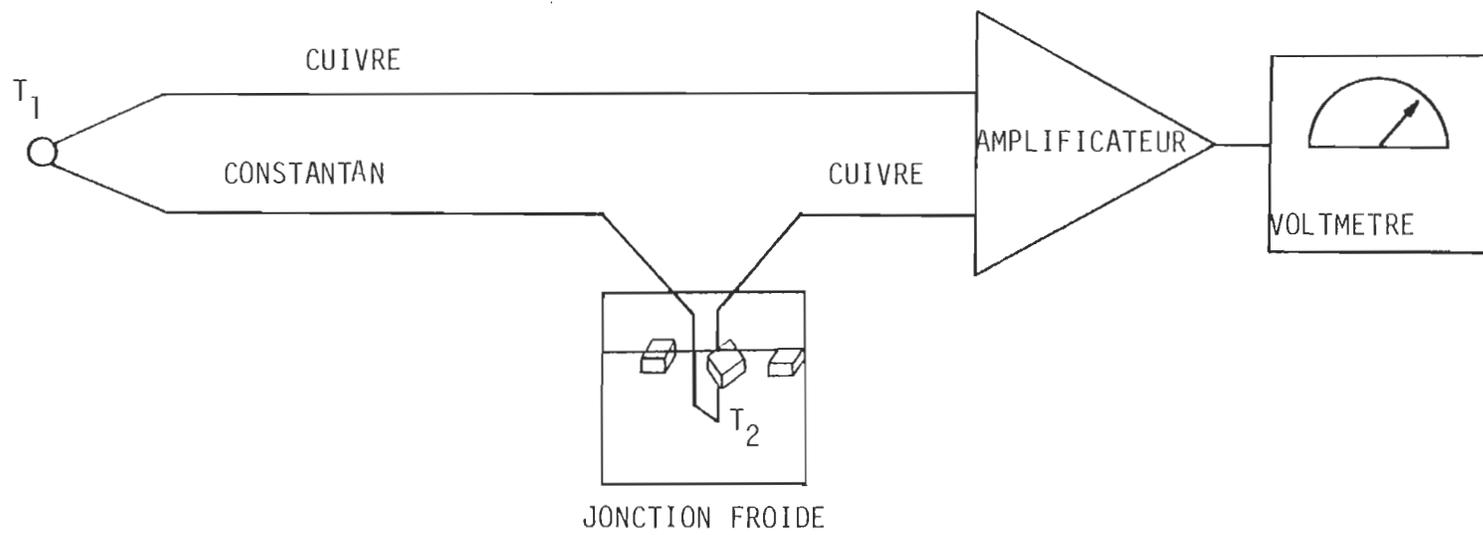


FIGURE 3.C.10 Système de mesure de la basse température.

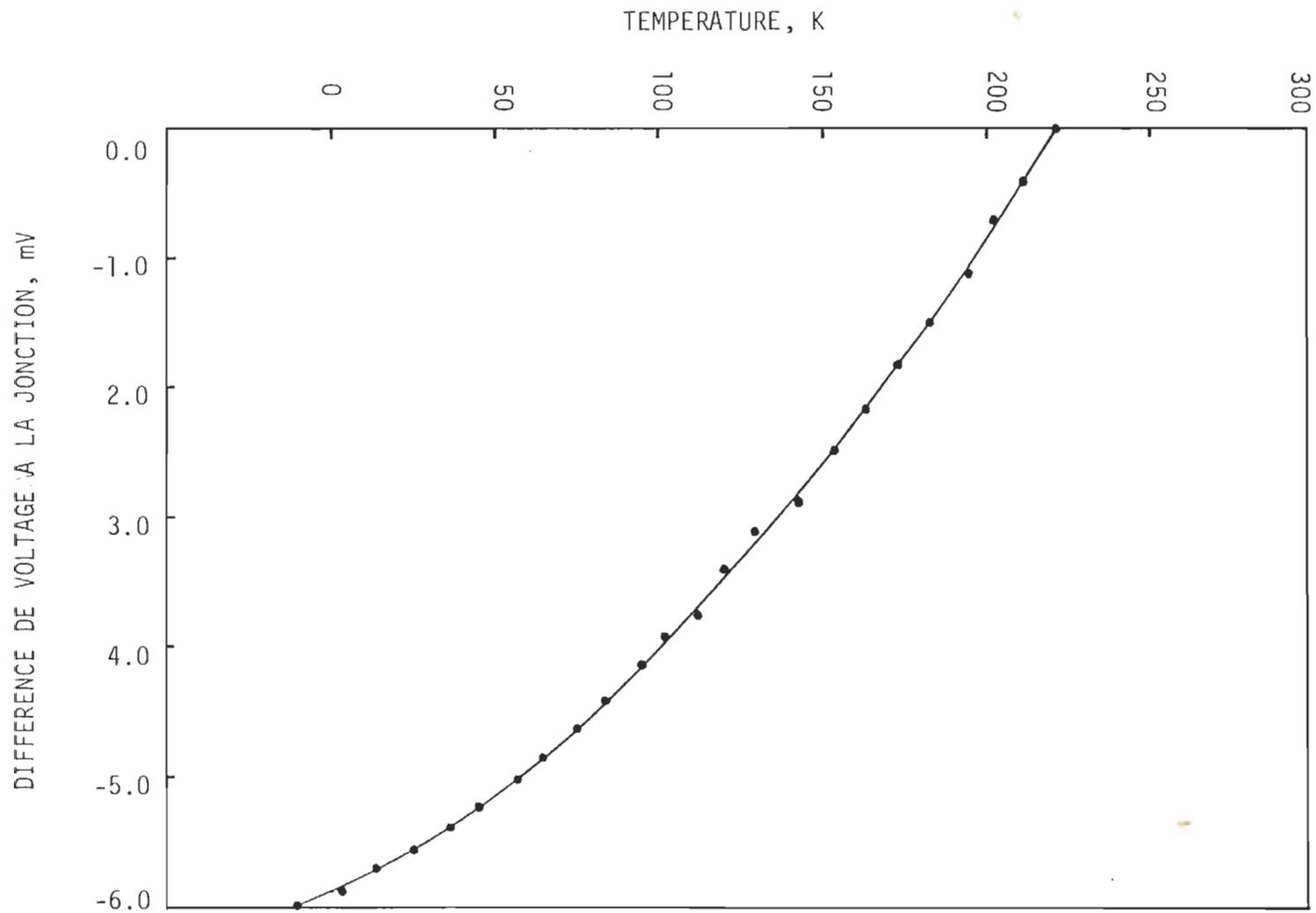


FIGURE 3.C.11 Courbe de réponse du termocouple cuivre/constantan.

pour avoir une meilleure précision sur la lecture du voltmètre. Nous évaluons notre précision sur la température à 4 ou 5⁰C.

3.C.15 Résultats à basse température

Bien souvent dans un projet d'une certaine envergure, les moyens que l'on prend pour arriver à nos fins deviennent tellement importants qu'ils nous font oublier l'objectif de notre étude. Quelque fois aussi, l'expérimentateur obtient des résultats insoupçonnés qu'il ne peut ignorer. Il sait qu'il n'aura probablement pas le temps ni le loisir d'en faire une étude complète, mais il doit faire part de ses observations, laissant le soin à un autre chercheur de les approfondir.

Nous jugeons les résultats présentés dans cette section d'une importance scientifique réelle et non seulement comme la preuve du bon fonctionnement d'un appareillage. Il est toutefois important de mentionner qu'il n'y a pas de correction de spectre suivant la réponse du détecteur et la transmission du monochromateur.

Les figures 3.C.12 et 3.C.13 présentent les spectres de fluorescence à basse température de la chlorophylle a dans l'éthanol et de la chlorophylle b dans l'EPA. On observe deux bandes de fluorescence similaires à celles de référence, soit $\lambda_{\max} \sim 675, 730$ nm. Au début de notre projet, notre intérêt pour ces bandes était mitigé par la recherche de la phosphorescence. Nous étions bien sûr informé de la polémique existante au sujet de l'assignation de ces deux bandes (voir introduction, page 1), mais

nous n'y voyions à l'époque, aucun élément de solution pouvant lever les contradictions.

Rappelons aux lecteurs qu'un certain nombre de chercheurs, appuyés par les travaux de Broyde et Brody¹⁷ sur la fluorescence à basse température, assignaient la bande à 730 nm (long wave band) à un agrégat de chlorophylle, tandis que la bande à 675 nm était assignée à un monomère. Leur raisonnement est basé sur la modification des bandes lorsqu'on fait varier certains paramètres tels que la température, la concentration ou la polarité du solvant. Une augmentation de la concentration, un abaissement de la température ou de la polarité amènent une augmentation du rapport $I_{730\text{nm}}/I_{675\text{nm}}$, un phénomène apparenté à une agrégation.

Mau en 1976³⁰ propose l'hypothèse de la réabsorption pour expliquer le déplacement vers le bleu de la bande à 675 nm lorsqu'on abaisse la concentration. La fluorescence aux basses longueurs d'onde est réabsorbée, ce qui a pour effet de déplacer le maximum et de diminuer l'intensité de la bande principale, d'où un accroissement de I_{730}/I_{675} avec l'augmentation de la concentration. La bande à 730 nm est en quelque sorte protégée de la réabsorption due à son éloignement des bandes d'absorption.

Nous croyons que le même phénomène se produit en fonction de la température pour les solvants polaires à des concentrations égales ou supérieures à 10^{-4} mol l^{-1} . Cela ne veut pas dire que nous nions l'existence de complexes fluorescents à 730 nm en solution non polaire. Nous avons examiné l'état d'agrégation de la chlorophylle a en fonction de la température dans l'hexane.

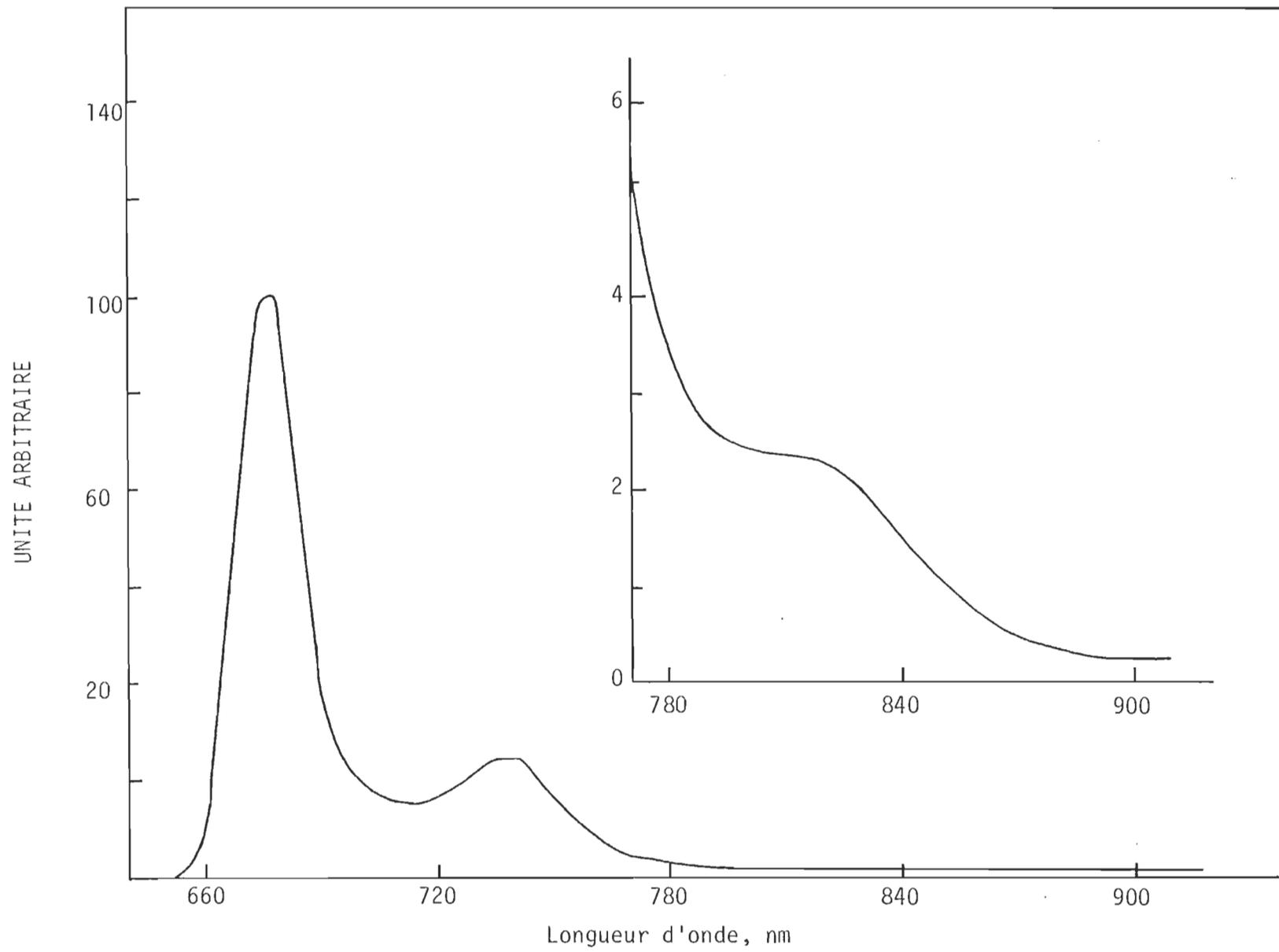


FIGURE 3.C.12 Spectres de fluorescence de la chlorophylle a dans l'éthanol ($9.3 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) à 77 K.

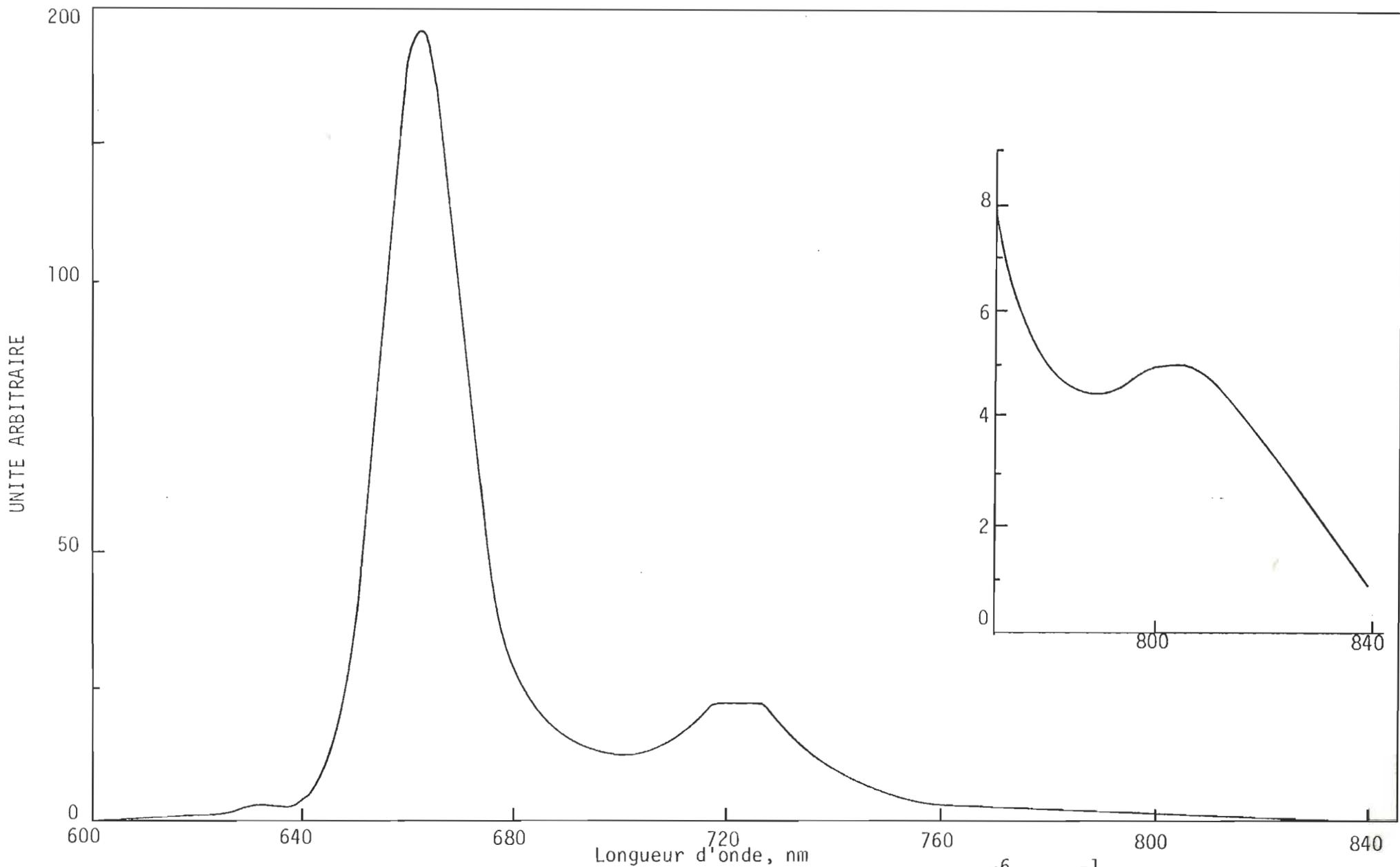


FIGURE 3.C.13 Spectres de fluorescence de la chlorophylle *b* dans l'EPA (1×10^{-6} mol l^{-1}) à 77 K.

Pour une solution de chlorophylle a, $3.5 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, (figure 3.C.14a) on observe un déplacement vers le rouge avec diminution de fluorescence dans l'intervalle de température 300-225 K, suivi d'une augmentation de fluorescence pour les températures inférieures à 225 K.

Nous croyons que le déplacement vers le rouge et la diminution de l'intensité de fluorescence provient de la réabsorption⁵⁶. L'augmentation par la suite, est due à ce que l'abaissement de la température augmente le rendement quantique de fluorescence en diminuant la conversion interne⁵⁷.

Lorsqu'on refait la même expérience pour une solution 10 fois plus concentrée (figure 3.C.14b), on observe l'inverse. Entre 300 et 225 K, il se produit un déplacement vers le rouge avec une légère diminution de fluorescence. Par la suite, la bande à 675 nm diminue tandis que la bande à 730 nm reste stable ou augmente. Dans ce cas, trois facteurs interviennent, soit la réabsorption, l'augmentation du rendement quantique de fluorescence et la formation d'agrégats. L'effet de l'augmentation du rendement quantique de fluorescence n'est pas apparent, sauf dans le cas du spectre à 225 K qui devrait être de plus faible intensité. L'effet de l'augmentation du rendement quantique de fluorescence est annulé par l'effet d'agrégation. Les agrégats de chlorophylle ne sont pas fluorescents.

Nous avons laissé notre solution de chlorophylle a ($3.5 \times 10^{-5} \text{ mole l}^{-1}$) au congélateur pendant 24 heures à -20°C . Nous avons repris par la suite un spectre de fluorescence à 77 K. L'agrégation est cette fois-ci beaucoup plus importante, presque toute la chlorophylle est sous forme agrégé, i.e. le maximum de fluorescence se retrouve à 730 nm (voir spectre 3 de la figure 3.C.15). Même le retour à la température ambiante (spectre 1) laisse voir

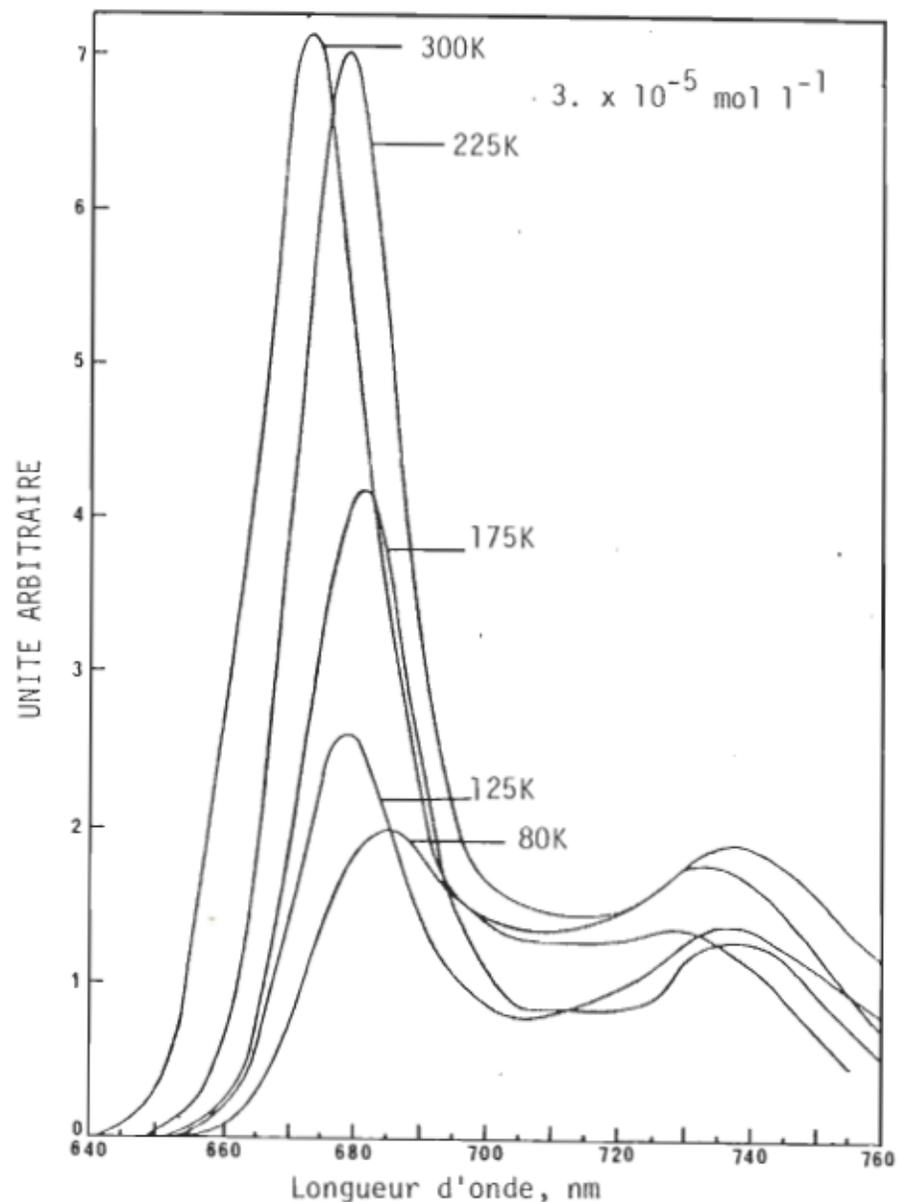
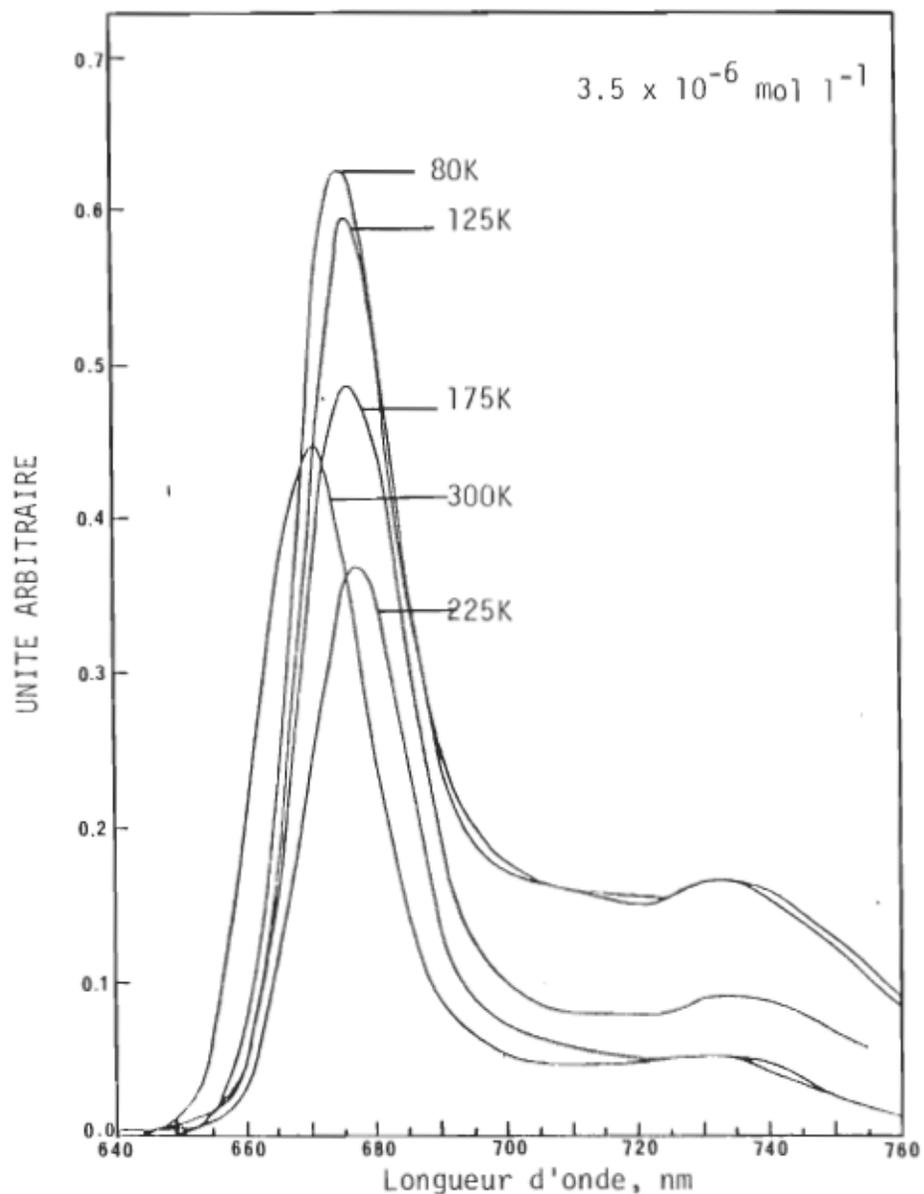


FIGURE 3.C.14 Effets de la température sur les spectres de fluorescence de la chlorophylle a dans l'hexane; (a) $3.5 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $3.5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

beaucoup d'agrégats. En ajoutant 5 % d'éthanol, on retrouve le spectre d'origine (spectre 2). La table 3.1 (page 77) présente le rapport des bandes de fluorescence ($I_{675\text{ nm}}/I_{740\text{ nm}}$) de la chlorophylle a dans l'hexane.

Nous concluons que l'agrégation de la chlorophylle est favorisée par les solvants non polaires, les basses températures et les fortes concentrations. L'état agrégé de la chlorophylle possède un maximum à 740 nm et son rendement quantique est faible. Par contre, les solutions diluées de chlorophylle en solvant polaire possèdent un maximum de fluorescence à 750 nm (λ_{max}^2) dont le rapport $I_{675\text{ nm}}/I_{730\text{ nm}}$ ne varie que très peu en fonction de la température et de la concentration, et ceci même à des concentrations 10^{-11} M.

En solution concentrée de chlorophylle, la dépendance du rapport des bandes en fonction de la température et de la concentration est grandement attribuable à la réabsorption. Ce phénomène n'est pas considéré dans plusieurs études de fluorescence de la chlorophylle. Les travaux de Vacek et coll.²⁹ soutiennent la thèse de la symétrie miroir, i.e. la bande à 675 nm et 730 nm en fluorescence proviendrait du même état électronique que les bandes à 660 nm et 630 nm en absorption. Les résultats publiés à la température ambiante et en solutions diluées sont en accord avec cette thèse. Il existe cependant certaines divergences au niveau de la position et de l'intensité de la deuxième bande de fluorescence pour avoir symétrie parfaite.

Nous émettons l'hypothèse que la divergence ne se situe pas au niveau de la deuxième bande mais au niveau de la première. En ne tenant pas compte

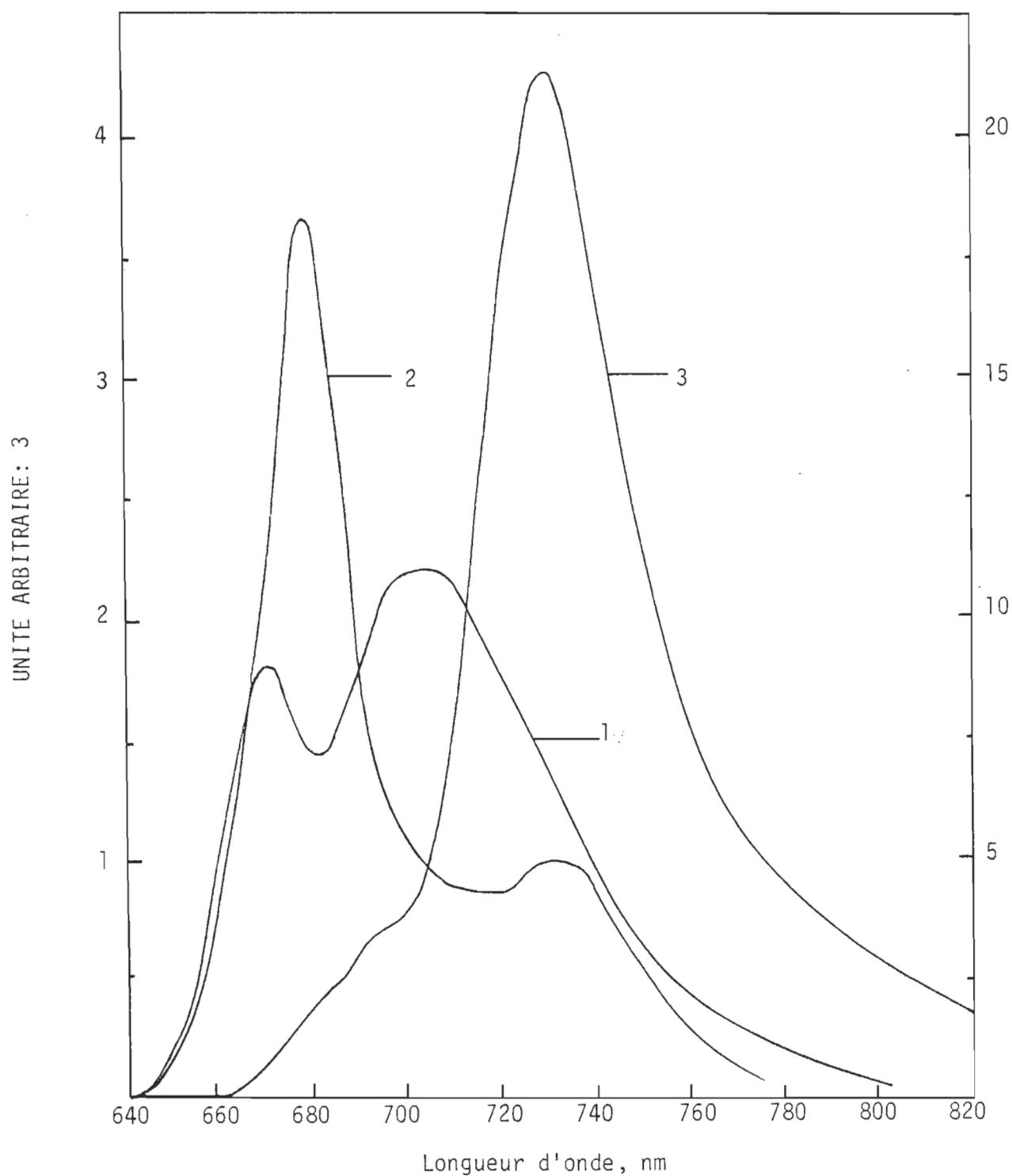


FIGURE 3.C.15 Effets de l'agrégation de la chlorophylle a sur les spectres de fluorescence dans l'hexane.

de la réabsorption, on néglige le déplacement vers le rouge et l'atténuation de la première bande de fluorescence d'où l'impossibilité d'avoir symétrie parfaite. Ceci nous amène à parler d'un autre résultat obtenu à basse température: la détection d'une troisième bande de fluorescence chez la chlorophylle a comme chez la chlorophylle b (voir figures 3.C.12, 3.C.13, pages 70, 71).

La probabilité que ces émissions prennent origine d'une impureté est faible car elles se retrouvent quelque soit la provenance de notre chlorophylle: Sigma Chemical Co., extraction dans nos laboratoires ou sur plaques TLC. De plus, on retrouve cette troisième bande de fluorescence, soit en excitant à 441.6 nm ou 632.8 nm ce qui serait fort peu probable dans le cas d'une impureté. Ces bandes sont passées inaperçues jusqu'à présent, cela est dû à leur faible intensité, environ 200 fois moins intense que la bande principale à 675 nm.

L'hypothèse de la symétrie miroir apporte un élément nouveau. En effet, on sait que les maxima pour la chlorophylle a dans l'éthanol à basse température se retrouvent à 672 nm, 655 nm et 618 nm, il est possible qu'à ces trois bandes d'absorption correspondent en image les trois bandes de fluorescence 675 nm, 730 nm et 810 nm. Il nous est cependant impossible d'en faire la démonstration car nous n'avons pas le cryostat nécessaire pour prendre des spectres d'absorption à 77 K.

Table 3.1 : RAPPORT DES BANDES I_{675nm}/I_{740nm} DE LA CHLOROPHYLLE a DANS L'HEXANE EN FONCTION DE LA TEMPERATURE.

$$C = 5.3 \times 10^{-5} \text{ M}$$

T	300K	225K	175K	125K	80K
$\frac{I_{675}}{I_{730}}$	5.2	4.1	3.2	3.0	1.0

$$C = 5.3 \times 10^{-6} \text{ M}$$

T	300K	225K	175K	125K	80K
$\frac{I_{675}}{I_{730}}$	8.3	7.5	5.1	3.5	3.6

3.D Spectrophosphorimètre

Notre but premier était la recherche de la phosphorescence de la chlorophylle. Les essais dans ce sens effectués à basse température avec le spectrophosphorimètre ne nous ont pas permis d'observer de résultats reproductibles. Il nous est arrivé d'observer deux (2) bandes dans la région où devait se trouver la phosphorescence de la chlorophylle b, soit 950 nm et 1010 nm comparativement à 930 et 1010 nm déjà publiées⁴⁴, mais ces résultats n'ont pu être reproduits par la suite. Nous présentons le spectre d'émission en page 79.

Nous avons conclu à un manque de sensibilité de notre montage. Nous avons donc modifié l'appareillage pour résoudre cette difficulté. Ce présent chapitre décrit ces modifications.

3.D.1 Description générale

Le diagramme de l'appareil est présenté à la figure 3.D.2. La source d'excitation est un laser au colorant émettant des impulsions lumineuses de l'ordre de la μ s. Un diviseur de faisceau réfléchit la majorité de la lumière ($\sim 99\%$) sur l'entrée de la fibre optique, elle est ensuite transmise à l'échantillon. La lumière émise est présente soit instantanément sous forme de fluorescence, soit sous forme de phosphorescence. Cette luminescence est captée par la deuxième fibre optique, elle traverse le monochromateur pour être détectée par un photomultiplicateur. Le courant produit est pré-amplifié (de l'ordre de 10^{-4} - 10^{-5} A/V) avant d'être mis en mémoire sur l'oscilloscope.

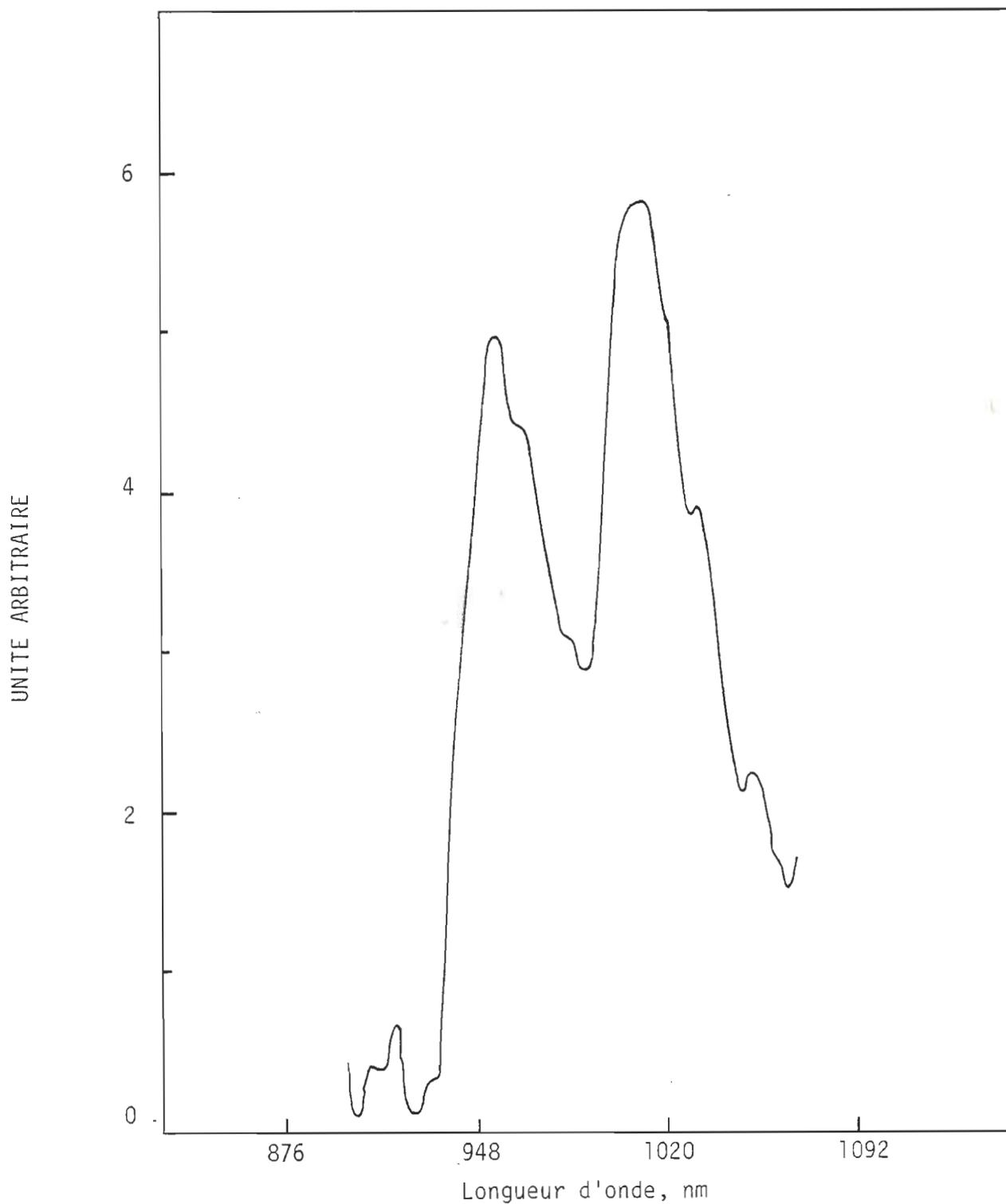


FIGURE 3.D.1 Spectre d'émission de la chlorophylle *b* dans l'éthanol (3×10^{-8} mol l^{-1}) à 77K.

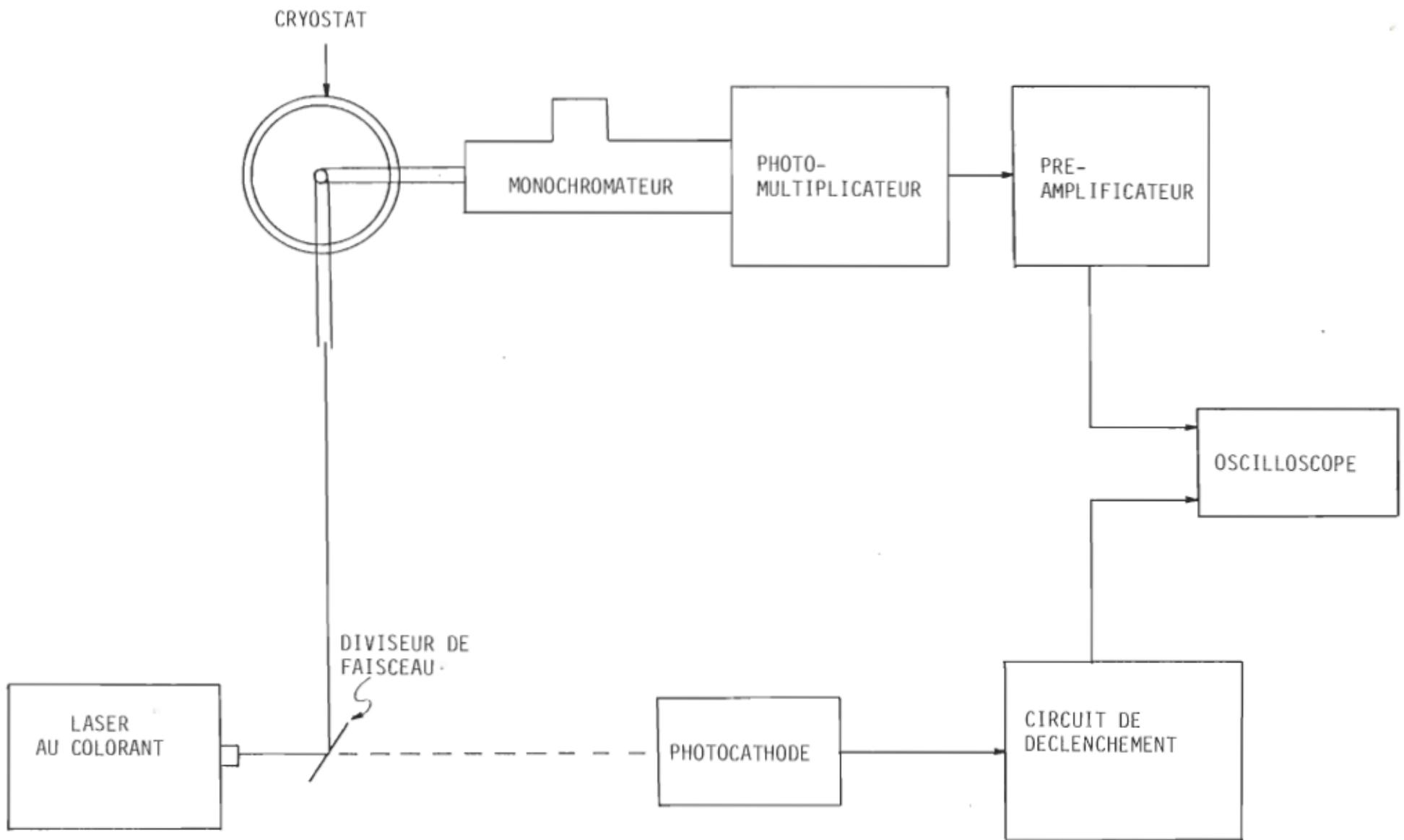


FIGURE 3.D.2 Diagramme schématique du spectrofluorimètre.

Nous utilisons un mode de déclenchement (trigger) à balayage unique (single sweep). Le 1% de lumière transmise est absorbé par la photocathode. Ce signal de déclenchement provient du 1% de la lumière transmise ayant atteint la photocathode. Le problème est de déclencher l'oscilloscope à l'instant où arrive le signal d'émission. Ce problème est d'autant plus sérieux que l'impulsion du laser est précédée d'un bruit électronique considérable provenant du déchargement d'un condensateur de 14 kV aux bornes de la lampe au xénon. Ce seul bruit suffit à déclencher l'oscilloscope. Nous avons intercalé un circuit logique entre la photocathode et l'oscilloscope ce qui permet à ce dernier de déclencher seulement sur un signal d'origine lumineuse. Nous décrivons dans la section suivante le fonctionnement de ce circuit.

3.D.2 Circuit de déclenchement

Pour remédier aux problèmes que nous causait le bruit du condensateur, nous avons utilisé une porte "ET" à quatre (4) entrées. La sortie est inversée par la combinaison des portes 1 et 2. Précédant la porte 2, deux monostables servent à imposer un délai à l'ouverture de cette dernière.

Pour le lecteur non familiarisé avec l'électronique numérique, précisons que ce type de circuit possède la logique (1) ou la logique (0) suivant qu'il y a présence ou absence de signal. Pour une porte "ET" la sortie sera de la logique (1) si et seulement si toutes les entrées ont la logique (1), sinon elle sera de logique (0), (voir table logique 4.1). Vu la présence d'un inverseur*, la sortie (6) sera de logique (0) si et seulement si toutes

* La présence d'un inverseur en symbole numérique est indiquée par le cercle après la porte dans le diagramme (figure 3.D.3)

les entrées ont la logique (1), sinon elle sera de logique (0).

Pour notre application, nous désirons avoir un signal positif à la sortie (8), logique (1), lorsqu'il y a un signal à chacune des entrées (1,2,4,5) de la porte (1). Il faut donc court-circuiter cet inverseur. Nous nous sommes servi de la deuxième porte pour réinverser notre signal de sortie. La sortie (6) fut reliée aux entrées (9,10,11,13) de la deuxième porte, de cette façon, grâce au deuxième inverseur nous annulons l'effet du premier. Le tout se comporte comme une simple porte "ET".

Les entrées non utilisées (2,3) furent maintenues à la logique (1) en les reliant à la source d'alimentation (V_{CC}). L'ouverture de l'entrée (5) est assujettie à un monostable (4) dont le changement d'état est amené par la présence de bruit électronique. Un deuxième monostable (2), contrôlé par la photocathode, coordonne l'ouverture de l'entrée (1). La combinaison de ces deux monostables et de la porte "ET" assurent le bon fonctionnement du système de déclenchement.

Un multivibrateur monostable possède un état stable déterminé selon que l'entrée A ou B soit en état stationnaire. Pour le premier monostable, 1A fut maintenue en position basse en la reliant à la masse, ce qui implique que le monostable réagi sur un signal ascendant à l'entrée B (voir troisième ligne de la table de vérité, page 84). Nous avons donc relié à la patte (2) du premier monostable une antenne pour capter le bruit, de cette façon, lorsque l'entrée B capte du bruit, une impulsion de la forme (1,0,1) est émise à la sortie \bar{Q} . Cette impulsion garde la position basse (0) aussi longtemps qu'on le désire (t_{w_1} choisit plus long que la durée des bruits), ce qui a

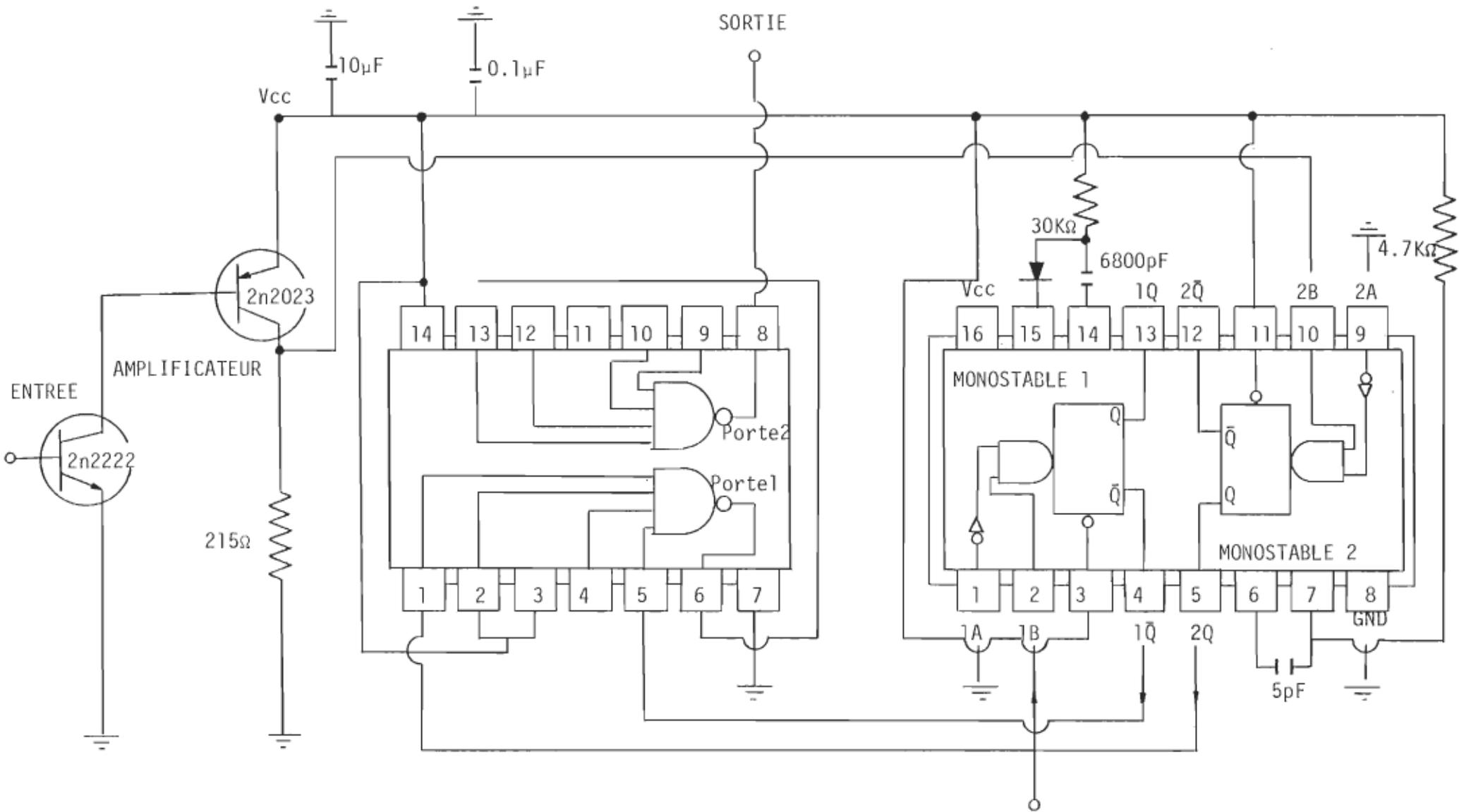


FIGURE 3.D.3 Circuit de déclenchement de l'oscilloscope

TABLE LOGIQUE 4.1 (PORTE "ET")

ENTREE				SORTIE 1ère PORTE	SORTIE 2ième PORTE
1	2	3	5	6	8
1	1	1	1	0	1
1	1	1	0	1	0
1	1	0	1	1	0
1	0	1	1	1	0
0	1	1	1	1	0
1	1	0	0	1	0
1	0	1	0	1	0
0	1	1	0	1	0
1	0	0	1	1	0
0	1	0	1	1	0
0	0	1	1	1	0
1	0	0	0	1	0
0	0	0	1	1	0
0	1	0	0	1	0
0	0	1	0	1	0
0	0	0	0	1	0

TABLE DE VERITE 4.2 (MONOSTABLE)

ENTREES		SORTIES	
A	B	Q	\bar{Q}
H	X	L	H
X	L	L	H
L	↑	⌈	⌋
↓	H	⌋	⌈

NOTES : H = état stationnaire haut (logique (1)); L = état stationnaire bas (logique (0)); ↑ = transition de l'état bas à haut; ↓ = transition de l'état haut à bas; ⌈ = pulse montant (0,1,0); ⌋ = pulse descendant (1,0,1); X = indépendant (toutes entrées y compris les transitions).

pour effet d'imposer la logique (0) à l'entrée (5) de la porte (1).
Donc aucun signal, logique (0), ne serait émis à la sortie (8) de la deuxième porte pendant toute la période de temps où se produit le bruit.

Après que le premier monostable soit revenu en position stable, sortie \bar{Q} en position haute (logique, 1), la deuxième monostable entre en fonction. L'impulsion lumineuse atteint la photocathode, le signal est transmis à l'entrée B, patte (10), tandis que l'entrée A est maintenue à la masse. Ceci permet à une impulsion de la forme (0,1,0) d'être émis de Q à l'entrée (1) de la porte (voir page 84). La montée de l'impulsion du monostable permet l'ouverture de la porte, entrées (1, 2, 4, 5) de logique (1), une impulsion est alors émise à la sortie (8) de la porte et synchronise l'oscilloscope. Pour bien comprendre les mécanismes décrits précédemment, nous les avons schématisé en fonction du temps à la figure 3.D.4.

La période de chacun des monostables (tw_1) et (tw_2) est ajustée à l'aide de condensateurs et de résistances extérieures placés en position (14 et 15) et (6 et 7). La période du premier monostable est choisie assez longue pour qu'il englobe toute la durée où se produit le bruit électronique:

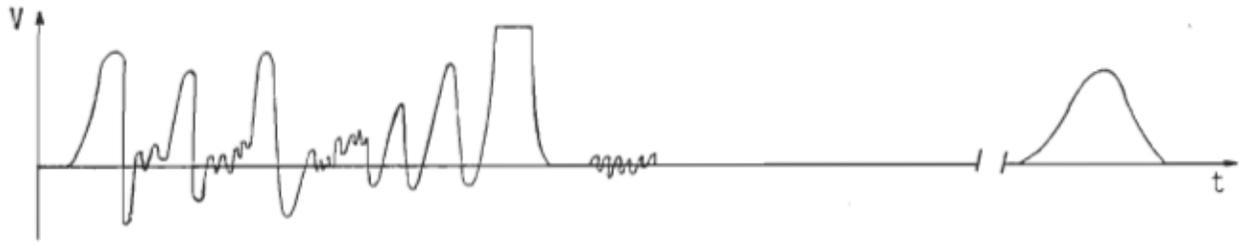
$$tw_1 = 0.28 R_t C_t \left(1 + \frac{0.7}{R_t} \right) \quad (\text{équation 4.1})$$

R_t en $k\Omega$

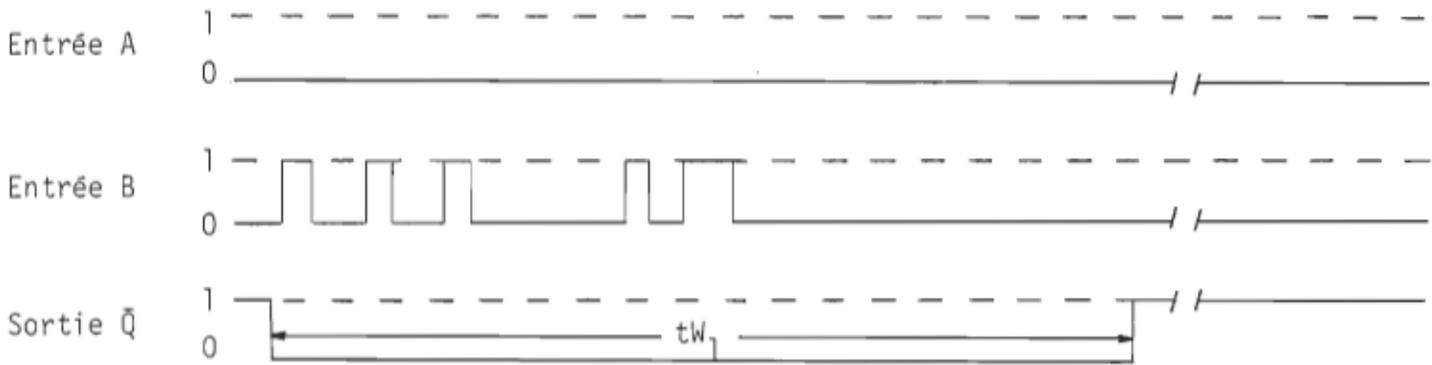
C_t en pF

tw en ns

SPECTRE HYPOTHETIQUE DE LA PHOTO-CATHODE :



MONOSTABLE 1 :



MONOSTABLE 2 :

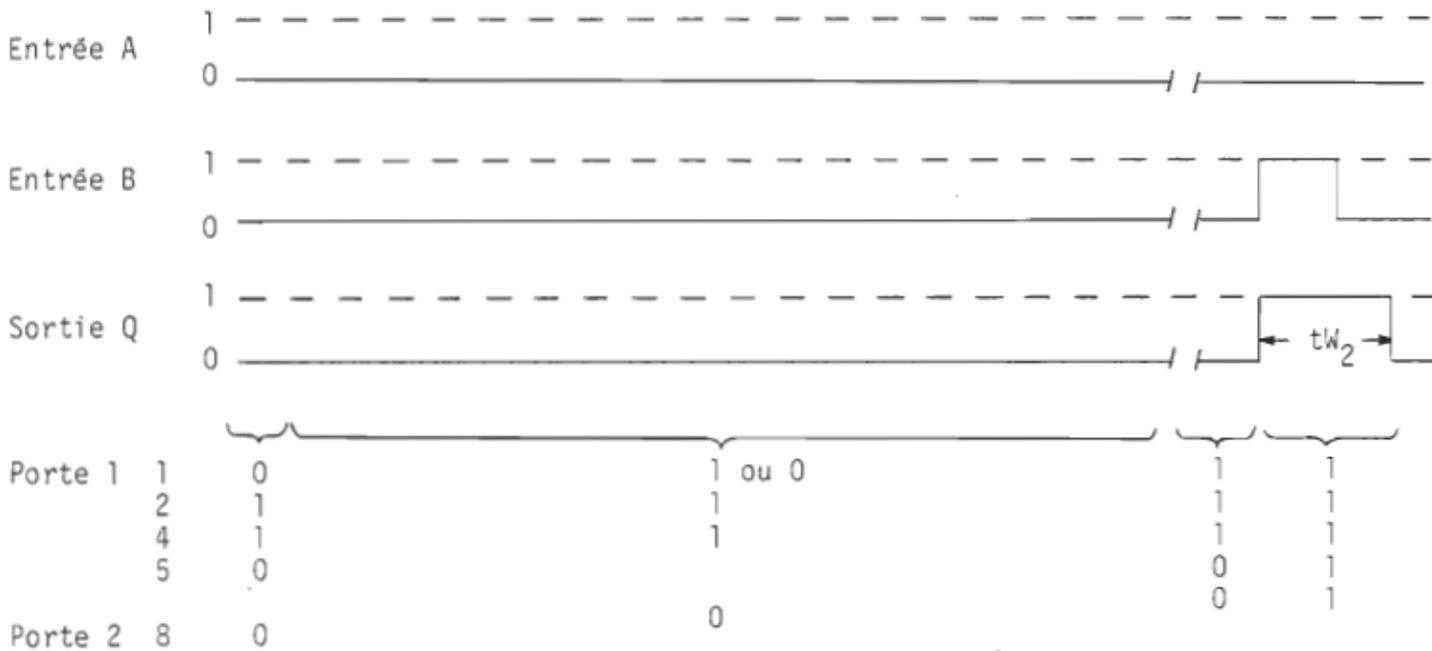


FIGURE 3.D.4 Schéma du circuit de déclenchement de l'oscilloscope

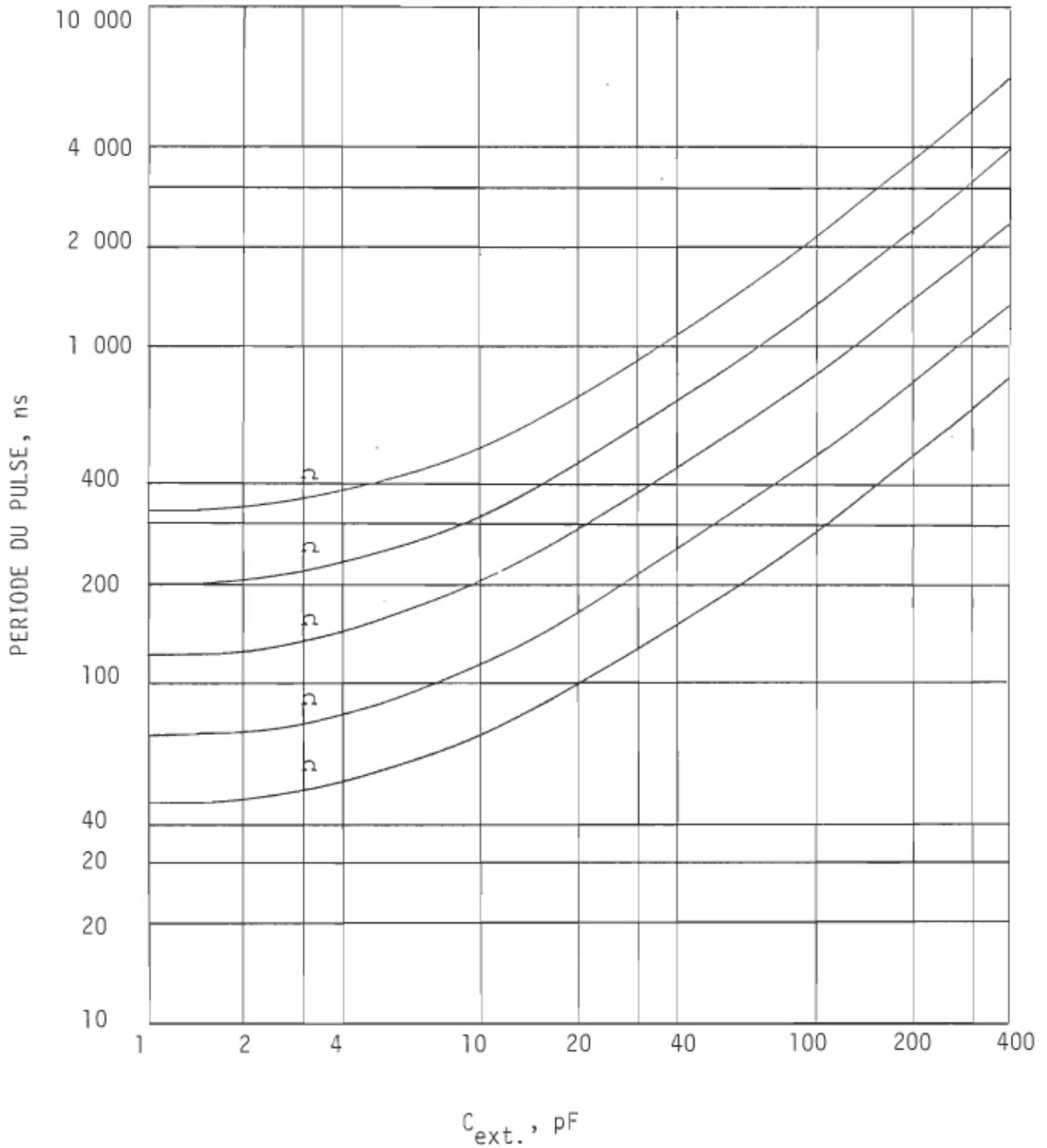


FIGURE 3.D.5 Période du pulse en fonction de la capacité du condensateur.

Le premier délai (tw_1) est de 52 us, tandis que le deuxième délai (tw_2) fut choisi de façon à ne pas retarder le déclenchement de l'oscilloscope, tout en gardant une valeur assez grande pour être détectée par ce dernier. Sa valeur peut être déterminée à l'aide de la figure 3.D.4, page 86⁵⁸. Pour une résistance (R_t) de 4.7 k Ω et une capacité (C_t) de 5pF la période est de 50 ns.

Le courant produit par la photocathode est 10 micro-ampères. Nous avons inséré un amplificateur de type Darlington entre la photocathode et le monostable. Chacun des transistors possède un facteur de gain (H_{fe}) de 50, cela nous permet une amplification du courant de :

$$I_e = (H_{fe}) (H_{fe}) I_b = 25 \text{ mA}$$

Un minimum de deux volts est nécessaire pour faire passer le monostable en position haute et de 0.8 volt pour le retour en position basse. Vingt-cinq milliampères passant à travers une résistance de deux cent quinze ohms, nous donnent un voltage de cinq volts pour le changement d'état du monostable.

L'alimentation du circuit de déclenchement et de la photocathode est assurée par une batterie d'automobile de six (6) volts. De plus, l'ensemble (photocathode, monostable, porte et batterie) est logé dans une cage de Faraday.

3.D.3 Phototube

La photocathode servant au déclenchement de l'oscilloscope est de type S-5. Le manufacturier est la compagnie RCA et le numéro du phototube est 935.

Ce type de phototube est beaucoup trop sensible pour l'application à laquelle on l'emploie. Même si très peu de la lumière du laser lui parvient, cela suffit amplement à envoyer un courant au circuit de déclenchement. Pour ne pas le saturer, nous travaillons en dessous du voltage anodique; nous utilisons la batterie de 6 volts servant à l'alimentation du circuit de déclenchement. Il serait préférable de remplacer le phototube par un phototransistor.

3.D.4 Laser au colorant

modèle	: Chromabeam 1050
manufacturier	: Synergetics Research inc.
voltage d'utilisation	: 24 kilovolts
pression du "Spark Gap"	: 16 psi
longueur d'onde d'émission	: voir spectre d'émission de la rhodamine <u>B</u> (figure 3.D.6) ⁵⁸ .

Le réseau servant à choisir la longueur d'onde d'émission a été positionné de façon à réfléchir l'émission totale de la rhodamine B. Cette émission a servi à exciter la chlorophylle dans le rouge. L'excitation de la chlorophylle dans la région des bandes Soret a été effectuée grâce au colorant 4-méthyl-umbelliferone.

3.D.5 Pré-amplificateur

modèle	: 181 "Current Sensitive Preamplifier"
manufacturier	: Princeton Applied Research
sensibilité	: 10^{-9} A/V à 10^{-4} A/V. Une atténuation de (X 0.1) permet l'utilisation à 10^{-3} A/V.

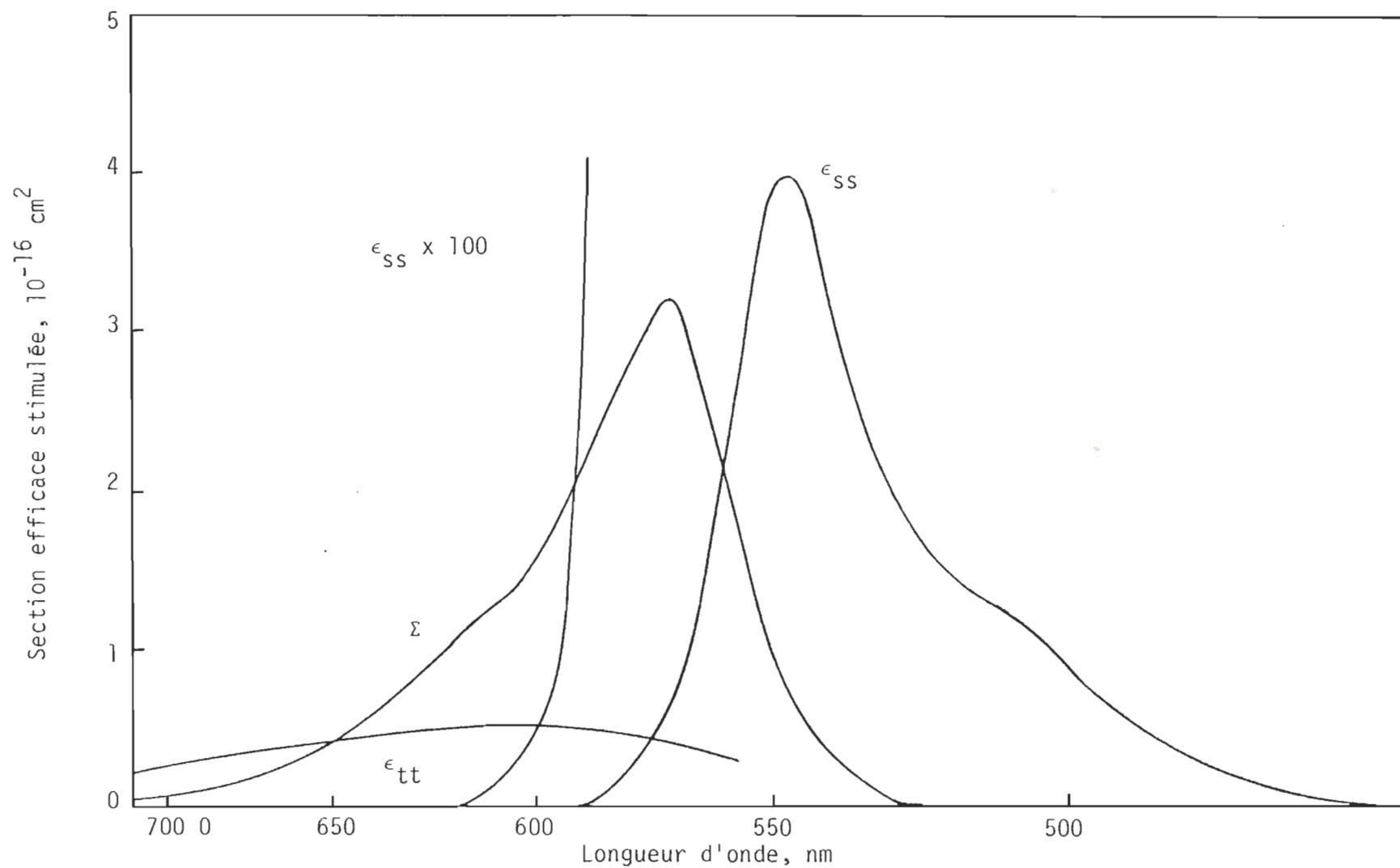


FIGURE 3.D.6 Spectre d'absorption (Σ) et spectres d'émission singulet-singulet (ϵ_{ss}) et triplet-triplet (ϵ_{tt}) pour la rhodamine B dans l'éthanol.

fréquence de réponse : circuit ouvert : 10 MHz
 en fonction de la sensibilité : voir figure 3.D.7
 voltage maximum de sortie : 6.5 volts rms
 voltage d'alimentation : entre 15 V et 25 V

En fluorescence, la plus grande sensibilité pouvant être utilisée est 10^{-6} A/V. A de plus haute amplification, il y a déformation du signal de sortie. En effet, une impulsion de 1.5×10^{-6} seconde correspond à une fréquence de signal sinusoidal de 200 kHz, ce qui est la limite pour cette amplification. En phosphorescence par contre, on n'est nullement influencé par la vitesse de l'amplificateur.

Une cage de Faraday et une alimentation par piles sont des précautions prises pour isoler l'amplificateur du bruit. L'amplificateur est protégé de la surcharge par une résistance de 1/8 de watt. Les court-circuits sont signalés par deux lampes diodes de type "LED".

3.D.6 Photomultiplicateur

Dans le but d'augmenter la sensibilité, nous avons remplacé la photodiode (voir page 61) par un photomultiplicateur de la série S-1. C'est ce type de photomultiplicateur, qu'utilisait Mau³⁰ dans l'étude de la phosphorescence de la chlorophylle. Les cathodes de cette série sont à base de AgOCs, ce qui leurs confèrent un domaine spectral allant de 300 nm à 1200 nm. Le rendement quantique (quantum efficiency) est plutôt faible (0.4 % à 800 nm) pour un photomultiplicateur.

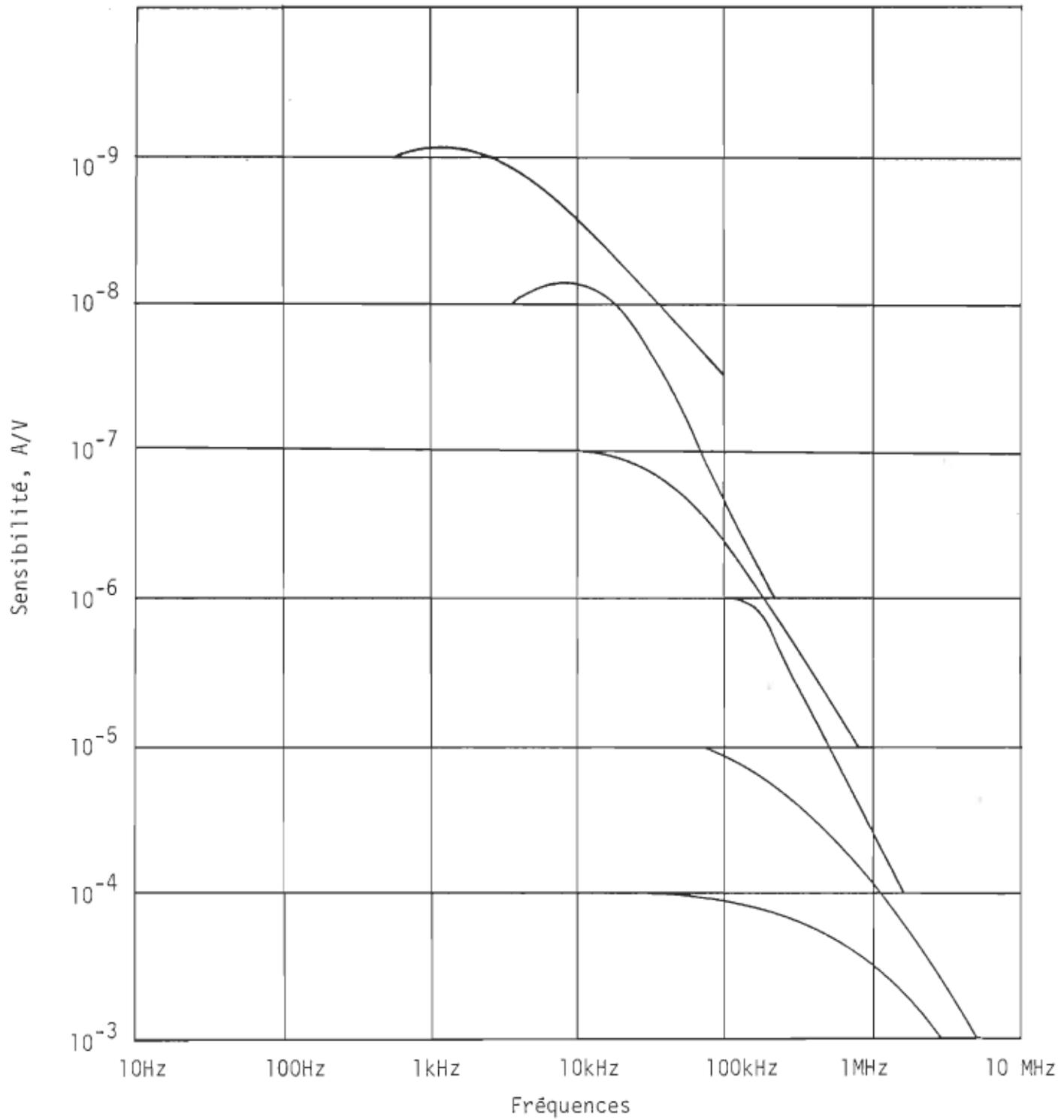


FIGURE 3.D.7 Réponse spectrale du préamplificateur modèle 181 en fonction de la sensibilité.

Le phototube utilisé est de type 9684B de la compagnie EMI avec une cathode semi-transparente de 44 mm, sa sensibilité et sa réponse spectrale sont présentées aux figures 3.D.8 et 3.D.9. La chambre de refroidissement et le connecteur restent les mêmes que ceux employés précédemment pour le tube EMI-9558QB. Les surfaces de AgOCs ont un courant de fuite (dark current) assez élevé, il fut donc nécessaire de refroidir le phototube avec un mélange de glace sèche et d'isopropanol. Les températures atteintes avec ce mélange (-70°C) réduisent beaucoup le courant de fuite. Il fut donc relativement facile d'utiliser une bonne amplification du signal produit.

3.D.7 Oscilloscope

Nous avons utilisé un oscilloscope à mémoire de la compagnie Tektronik, modèle 7514. Ce type d'oscilloscope comporte plusieurs caractéristiques très appréciables pour les applications qu'on lui réservait. Premièrement, le système de mémorisation des données évite l'utilisation de caméras dispendieuses. Deuxièmement sa vitesse d'écriture (2 MHz) est appropriée pour l'étude de la phosphorescence et de la fluorescence et sa sensibilité nous permet une déflexion de 0.5 millivolt par division.

L'utilisation de câbles coaxiaux de type BNC est appropriée. Toutefois, il est préférable d'éloigner, autant que possible, le préamplificateur et l'oscilloscope du "spark gap" du laser au colorant.

3.D.8 Résultats

La fluorescence de la chlorophylle a possède un rendement quantique de 0.32, celui de la phosphorescence, selon les travaux de Mau et Puza⁴⁵, de 5×10^{-5} .

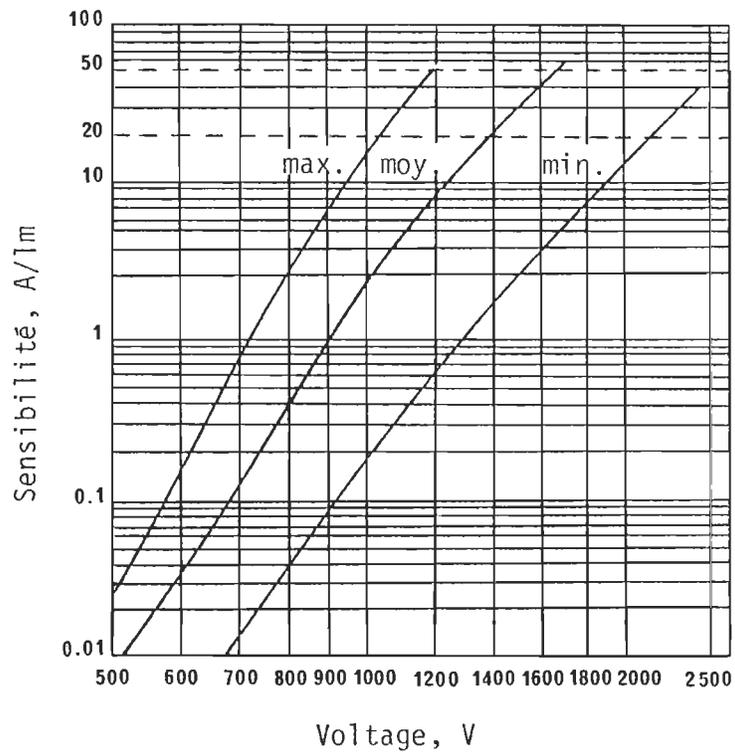


FIGURE 3.D.8 Sensibilité du phototube EMI-9684B en fonction du voltage d'alimentation.

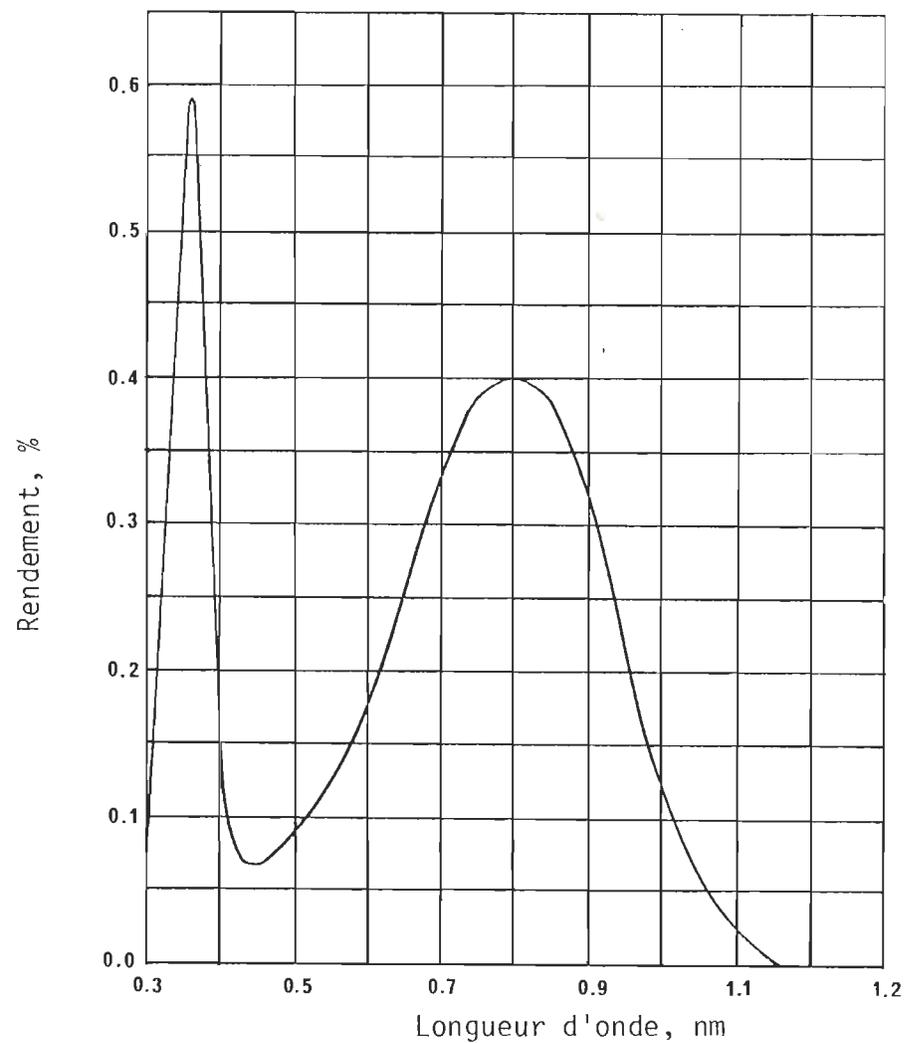


FIGURE 3.D.9 Réponse spectrale du phototube EMI-9684B

Le rapport des rendements quantiques est donc de 6400.

L'émission maximale de fluorescence pour une solution de chlorophylle à 10^{-5} M, mesurée en utilisant une tension au photomultiplicateur de 700 volts et un facteur d'amplification de 10^{-4} A/V, donne un signal de 2.5 volts à l'oscilloscope. L'éloignement graduel du λ_{\max} de fluorescence, tout en gardant un signal comparable à l'oscilloscope, permet de calculer l'amplification disponible de notre appareillage.

L'augmentation d'un facteur de tension du photomultiplicateur de 700 volts à 1600 volts accroît l'amplification de 720. L'amplificateur permet un passage de 10^{-4} à 10^{-6} A/V tandis que l'oscilloscope permet la détection d'un signal de 5 millivolts à la sensibilité maximale tout en gardant un rapport signal sur bruit acceptable (environ 10-15 %).

La comptabilité de ces amplifications nous donne donc: 10^2 pour le pré-amplificateur, 10^3 pour l'oscilloscope et 7.2×10^2 pour l'accroissement de la tension au photomultiplicateur ce qui nous donne un écart dynamique de 7.2×10^7 . Et même avec un facteur de 72 000 000 entre l'intensité de fluorescence et l'intensité minimale détectable, nous n'avons pas observé de phosphorescence. Nous avons varié nos techniques expérimentales telles que: l'excitation à différentes longueurs d'onde, l'utilisation de différents solvants (ethanol, hexane, EPA), différentes sources de chlorophylle (Sigma Cie, extraction dans nos laboratoires, purification par chromatographie sur couches minces).

Nous avons obtenu dans un cas, un résultat similaire à celui publié lors des premiers travaux de Krasnovskii et coll.⁴⁴. Ce résultat n'a pu être répété par la suite.

Il est possible que notre technique de purification de la chlorophylle, même sur chromatographie sur couche mince, ne permette pas l'élimination complète d'un "quencher" de la phosphorescence. Il est prouvé que les carotènes sont de très bon "quencher" de l'état triplet^{61,62}. Nous avons remarqué lors de nos chromatographies sur couche mince que l'échantillon commercial de chlorophylle considéré comme pur, contenait une quantité appréciable de ce pigment et que sa séparation de la chlorophylle n'était pas toujours facile à réaliser.

Krasnovskii et coll.⁴⁴ signalent que le spectre d'excitation de la phosphorescence diffère du spectre d'absorption à basse température. Pour expliquer ce phénomène, ils supposent l'existence d'une espèce émettrice très peu absorbante à la température ambiante. Il est possible que dans leur traitement de la chlorophylle, ils obtiennent une espèce qui n'est pas présente dans notre cas et que ce soit cette nouvelle forme de chlorophylle qui soit responsable de la phosphorescence.

4. CONCLUSION

Dans cette étude sur la luminescence de la chlorophylle, nous avons porté une grande attention à l'appareillage. Maintenant nous pouvons étudier toute forme de luminescence entre 350 et 1150 nm et ceci avec une sensibilité rarement atteinte.

La non-linéarité de l'intensité de la fluorescence en fonction de la concentration, le déplacement du maximum de fluorescence pour de faibles concentrations ou la présence d'une troisième bande de fluorescence, forment un tout. Ces résultats pour les solutions diluées ou très diluées (10^{-12} M) de chlorophylle indiquent la présence de phénomène de concentration encore inexpliqué.

Ces hypothèses pourraient être éventuellement étudiées grâce à un cryostat permettant des études d'absorption aux basses températures.

La phosphorescence de la chlorophylle pour sa part nécessite une plus grande purification des pigments utilisés. Une recristallisation répétée serait à envisager.

5. BIBLIOGRAPHIE

1. DUYSSENS, L.M.N., Nature, 168, 748 (1951).
2. FRENCH, S., YOUNG, V.K., Biological Effects of Radiation, 2, McGraw Hill, New-York (1952).
3. BRODY, S.S., Science, 128, 838 (1958).
4. BRODY, S.S., BRODY, M., Nature, 169, 547 (1961).
5. WEBER, G., Symp. Comp. Biol. Kaiser Found. Res. Inst., 1, 395 (1965).
6. ANDERSON, A.F.H., CALVIN, M., Arch. Bioch. Bioph., 107, 251 (1964).
7. STENSBY, S., ROSENBERG, J., J. Phys. Chem., 65, 906 (1961).
8. AMSTER, R.L., PORTER, G., Proc. Roy. Soc. B, 296, 38 (1967).
9. TOMITA, G., Biophysik, 4, 296 (1968).
10. FREED, S., SANCIER, K., J. Am. Chem. Soc., 76, 198 (1954).
11. LINSTED, R.P., LOWE, A.R., J. Chem. Soc., 85, 3801 (1934).
12. SINGHAL, G.S., WILLIAM, W.P., RABINOWITCH, E., J. Phys. Chem., 72, 3941 (1968).
13. RABINOWITCH, E., Photosynthesis, Interscience Publisher, Inc., New-York, (1945).
14. EVSTIGNEEV, V.B., GAVRILOVA, V.A., KRASNOVSKII, A.A., Dokl. Akad. Nauk SSSR, 70, 261 (1950).
15. CLOSS, G. KATZ, J., PENNINGTON, F., THOMAS, M., STRAIN, H., J. Am. Chem. Soc., 85, 3809 (1963).

16. SAUER, K., SMITH, J.R.L., SCHULTZ, A.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 2681 (1966).
17. BROYDE, S.B., BRODY, S.S., *J. Chem. Phys.*, 46, 3334 (1967).
18. BALNY, C., BRODY, S.S., HUI BON HOA, G., *Photochem. Photobiol.*, 9, 445 (1969).
19. KAWABE, K., NAEMURA, M., MATSUKAWA, Y., *Technol. Rept. Osaka Univ.*, 20, 665 (1970).
20. SINGHAL, G.S., HEVESI, J., *Photochem. Photobiol.*, 14, 509 (1971).
21. HEVESI, J., SINGHAL, G.S., *Spectrochim. Acta*, 25A, 1751 (1969).
22. VAVRINEC, E. VACEK, K., KAPLANOVA, M., *J. Lum.*, 5, 449 (1972).
23. KAWSKI, A., *Acta Phys. Polon.*, A37, 651 (1970).
24. SZALAY, L., TOMBACZ, E., SINGHAL, G.S., *Acta Phys. Acad. Scient. Hung.*, 35, 29 (1974).
25. SZALAY, L., TOMBACZ, E., SINGHAL, G.S., KOZMA, L., *Acta Phys. Acad. Scient. Hung.*, 34, 341 (1973).
26. VAVRINEC, E., VACEK, K., KAPLANOVA, M., KALOUSEK, I., CERNA, V., *Acta Univers. Carol.*, 14 (1973).
27. VACEK, K., VAVRINEC, E., CERNA, V., VINDUSKOVA, O., NAUS, J., LOKAJ, P., *Studia Biophys.* 44, 155 (1973).
28. KAPLANOVA, M., VACEK, K., *Photochem. Photobiol.*, 28, 371 (1974).
29. VACEK, K., VAVRINEC, E., KAPLANOVA, M., *Acta Univers. Carol.*, 17, 45 (1976).

30. MAU, A.W.-H., Chem. Phys. Lett., 38, 279 (1976).
31. CALVIN, M., DOROUGH, G.D., Science, 105, 433 (1947).
32. CALVIN, M., DOROUGH, G.D., J. Am. Chem. Soc., 70, 699 (1948).
33. BECKER, R.S., KASHA, M., J. Am. Chem. Soc., 77, 3669 (1955).
34. BECKER, R.S., FERNANDEZ, J., J. Chem. Phys., 31, 467 (1959).
35. SINGH, I.S., BEKER, R.S., J. Am. Chem. Soc., 82, 2083 (1960).
36. AMSTER, R.L., Photochem. Photobiol., 9, 331 (1969).
37. WITT, H.T., Quart. Rev. Biophys., 4, 365 (1971).
38. STACY, W.T., MAR, T., SWENBERG, C.E., GOVINDJEE, Photochem. Photobiol., 14, 192 (1971).
39. SANE, P.V., TATAKE, V.G., DESAI, T.S., FEBS Lett., 45, 290 (1974).
40. KRASNOVSKII, A.A., SHUVALOV, V.A. et col., Dokl. Akad. Nauk SSSR, 216, 1181 (1971).
41. KRASNOVSKII, A.A., ROMANIUK, V.A., LITVIN, F.F., Dokl. Akad. Nauk SSSR, 209, 965 (1973).
42. KRASNOVSKII, A.A., LEBEDEV, N.N., LITVIN, F.F., Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 216, 1406 (1974).
43. KRASNOVSKII, A.A., LEBEDEV, N.N., LITVIN, F.F., Dokl. Akad. Nauk SSSR, 225, 207 (1975).
44. KRASNOVSKII, A.A., LITVIN, F.F., Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Fiz., 39, 1948 (1975).
45. MAU, A.W.-H., PUZA, M., Photochem. Photobiol., 25, 601 (1977).
46. LEBLANC, R.M., GALINIER, G., TESSIER, A., LEMIEUX, L., Can. J. Chem., 52, 3723 (1974).

47. GOVINDJEE, GOVINDJEE, R., *Scient. Am.*, 231, 68 (1974).
48. BEDDARD, G., *Nature*, 263, 459 (1976).
49. EISENGER, J., *Photochem. Photobiol.*, 9, 247 (1969).
50. BIERZINSKI, A., JASNY, J., *J. Photochem.*, 3, 341 (1975).
51. APPLICATIONS NOTES, D 3000B-1, EG & G, Electro Optic Division.
52. INSTRUCTION MANUAL, SYNCHRO-HET LOCK-IN AMPLIFIER, Model 186, Princeton Applied Research Corp., II-2 (1973).
53. TEMPERATURE MEASUREMENT HANDBOOK, Omega Engineering Inc., A-12 (1977).
54. PERKINS, H.J., ROBERTS, D.W., *Biochem. Biophys. Acta*, 79, 20 (1964).
55. THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY, Ed. Egon Stahl, Springer-Verlag-Berlin, (1969).
56. PARKER, C.A., REES, W.T., *Analyst.*, 85, 587 (1960).
57. THE TTL DATA BOOK, Texas Instruments Inc. (1976).
58. BIRKS, J.B., *Organic Molecular Photophysics*, 1, John Wiley & Sons (1973).
59. INSTRUCTION MANUAL, CURRENT SENSITIVE PREAMPLIFIER, Model 181, Princeton Applied Research Corp., I-3 (1973).
60. INSTRUCTION MANUAL, EMI Photomultiplier tubes, P001/fP70.
61. BORISOV, A.Y., *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 215, 1240 (1974).
62. BENSASSON, R., LAND, E.J., TRUSCOTT, T.G., *Photochem. Photobiol.*, 17, 53 (1973).
63. GEOMETRICAL AND PHYSICAL OPTICS, R.S. Langhurst, Langman Group Limited, 1973, pp. 516-517.

64. HANDBOOK OF OPTICS, section 13 by W.R. Siegmund, Ed. G. Driscoll and W. Vaughan, McGraw-Hill Cie, 1978, pp. 13.1-13.26.

6. ANNEXES

Annexe 1

	CHLOROPHYLLE <u>a</u>			CHLOROPHYLLE <u>b</u>			PHEOPHYTINE <u>a</u>			PHEOPHYTINE <u>b</u>		
	REF 42	REF 44	REF 45	REF 42	REF 44	REF 45	REF 42	REF 44	REF 45	REF 42	REF 44	REF 45
DIETHYL ETHER	930 nm	--	--	890 nm	--	--	930 nm	--	--	890 nm	--	--
ETHANOL	985 nm	985 nm 1050 nm	960 nm	912 nm	930 nm 1010 nm	901 nm	935 nm	940 nm 1000 nm	932 nm	910 nm	910 nm 980 nm	900 nm
EPA	970 nm	--	950 nm	890 nm	--	890 nm	930 nm	--	922 nm	890 nm	--	888 nm
E-M (6.1)	975 nm	--	--	--	--	--	940 nm	--	--	--	--	--
HEXANE	--	--	--	950 nm	--	--	--	--	--	960 nm	--	--

Maxima de phosphorescence selon Krasnovskii^{42,44} et Mau⁴⁵.

6.1 Méthodes expérimentales

6.1.1 Préparation des solutions de chlorophylle a

Nous préparons une solution de chlorophylle a (10^{-6} M) dont la concentration est déterminée par spectrophotométrie. Cette solution est considérée comme notre solution mère. A partir de cette solution nous en préparons deux autres de sorte que le rapport de leurs concentrations soient différents d'un nombre décimal, i.e. différent de 1,10,100 etc. Ensuite, chacune de ces deux solutions est diluée par facteur de 10 jusqu'aux concentrations désirées.

En utilisant cette méthode, si une erreur se glisse, ladite erreur n'entraînera dans l'inexactitude seulement qu'une partie des résultats et elle sera donc facilement décelable.

6.1.2 Calibration de l'appareillage

Quelque soit le type d'instrumentation utilisé: visible, proche-infrarouge ou basse température, nous devons être en mesure de déterminer la sensibilité et la linéarité de la détection.

Pour ce faire, nous devons déterminer la relation entre l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration.

Pour éviter les erreurs d'instabilité du système, nous utilisons une solution standard (chl a ou b) et établissons nos courbes selon le logarithme du rapport (I_1/I_0). I_1 étant l'intensité de fluorescence de l'échantillon et I_0 celui du standard.

Pour éviter que l'instabilité du système fausse nos résultats, nous utilisons un standard, qui est habituellement une solution de chlorophylle a ou b dont on connaît la concentration. En prenant après chaque spectre une lecture de notre standard à son maximum de fluorescence et en prenant le rapport des intensités de fluorescence de l'échantillon à celui du standard, nous éliminons l'effet que peut avoir une fluctuation dans la sensibilité du système. Pour de faibles signaux, il faut tracer la ligne de base avec le solvant seulement.

6.1.3 Purification de la chlorophylle a

Le premier critère d'évaluation de la pureté de la chlorophylle est le spectre d'absorption. Le rapport des bandes dans le bleu et dans le rouge, I_{430}/I_{660} , se situe entre 1.28 et 1.31⁵⁴.

Une seconde vérification de la pureté fut l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (TLC). Les plaques sont de gel de silice et l'éluant un mélange d'éther de pétrole (36° - 60°C), d'acétone et de 2-propanol ayant les proportions 90/9.5/0.5⁵⁵. Nous avons utilisé cette méthode d'extraction dans la recherche de phosphorescence. Les chlorophylles migrent en deux bandes d'égale importance. Il est difficile de dire ce qui les différencie; est-ce une allomérisation, une dégradation ou tout simplement les deux formes de chlorophylle, a et b? Nous croyons qu'il y a solvation par le 2-propanol amenant la formation de ce qui est appelée chlorophylle a "P-solvate"¹⁵. Des spectres d'émission de ces deux fractions montrent une grande similitude.

L'isotherme de pression de surface permet de vérifier rigoureusement la pureté de nos échantillons. Cette technique consiste à déterminer l'aire moléculaire limite d'une monocouche de chlorophylle déposée à l'interface air-eau. Cette aire moléculaire limite est grandement influencée par la présence d'impuretés⁶³.