

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

THÈSE PRÉSENTÉE À
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR
GILLES PICARD

"EFFET DE L'ENVIRONNEMENT LIPIDIQUE ET PROTÉINIQUE SUR LA DURÉE
DE VIE DE FLUORESCENCE DE LA CHLOROPHYLLE a EN FILM
MONOMOLÉCULAIRE ET EN FILM LANGMUIR-BLODGETT"

JUILLET 1990

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: *

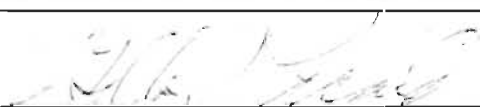
Les plantes vertes utilisent les pigments accessoires pour capter l'énergie solaire et la transférer aux pièges d'énergie où la conversion de l'énergie électromagnétique en énergie chimique a lieu. Ces pigments se situent dans la couche lipidique de la membrane photosynthétique. Un des principaux pigments qui est directement responsable de l'évolution de l'oxygène est celui de la chlorophylle *a*. Afin d'approfondir nos connaissances sur l'état d'agrégation de ce pigment dans la membrane interne du chloroplaste, nous nous sommes proposés d'examiner les propriétés photophysiques de la chlorophylle *a*, pure et en mélange, en employant le modèle biomimétique d'un film de Langmuir-Blodgett.

Deux méthodologies expérimentales ont été élaborées, soit celle de la préparation d'un film de Langmuir à l'interface azote-eau ainsi que celle du transfert de la couche monomoléculaire de l'interface azote-eau à un support de quartz (film Langmuir-Blodgett). Les propriétés thermodynamiques des films de Langmuir et les propriétés optiques telles que l'absorption, la fluorescence et la durée de vie de fluorescence des films Langmuir-Blodgett ont été étudiées. Le choix des lipides pour l'étude des mélanges s'est fait en se basant sur l'importance en quantité des lipides dans la bicouche chloroplastique et sur la classe de lipides dont on peut varier la longueur et le degré d'insaturation de la chaîne hydrocarburée ainsi que le groupement de la tête polaire. C'est pourquoi les lipides du chloroplaste tels que le mono- et digalactosyldiacylglycérol, les phosphatidylcholines ayant une composition variée de la chaîne et les phospholipides se différenciant par un groupement polaire, ont été employés. Quant à l'étude de l'interaction chlorophylle *a*-protéine en mélange binaire, le cytochrome *c* a été utilisé comme protéine modèle.

On a observé que les couches monomoléculaires de chlorophylle *a* pure présente un état élevé d'agrégation. Il existe de fortes interactions des plans porphyriques entre les molécules de chlorophylle *a*. Les bandes d'excitation et d'émission déplacées vers le rouge par rapport aux bandes observées en solution polaire ainsi que la durée de vie inférieure à 10 picosecondes attestent la présence d'un ensemble d'agrégats fort important. Par contre, l'étude des mélanges binaires

montre que la dilution de la chlorophylle *a* par les lipides chloroplastiques permet une désagrégation car on observe les propriétés optiques de la chlorophylle *a* monomère. La présence d'insaturation dans les chaînes hydrocarbonées des phosphatidylcholines est nécessaire pour diluer la chlorophylle, sinon on détecte dans le mélange binaire la présence d'agrégats. Ainsi, les mesures de durée de vie de fluorescence du mélange chlorophylle *a*-disteroylphosphatidylcholine attestent la formation d'îlots de chlorophylle *a* dans la couche monomoléculaire. Quant à l'interprétation de nos observations sur les mélanges chlorophylle *a*-lipides ayant différentes têtes polaires, nous avons noté une réaction chimique entre le proton labile du groupement polaire et le magnésium de la chlorophylle dans le cas de la phosphatidylsérine et de la sulfoquinovosyldiacylglycérole. On a démontré pour le système chlorophylle *a*-protéine que le cytochrome *c* diluait en partie la chlorophylle *a* ce qui a permis d'observer un spectre d'émission identique aux systèmes chlorophylle *a*-lipides chloroplastiques. Cependant, les données expérimentales de durée de vie de fluorescence nous indiquent qu'il existe une chlorophylle partiellement agrégée dans le mélange ce qui réduirait la durée de vie à une valeur inférieure à 0.2 ns.

Notre étude a démontré la possibilité d'obtenir un état monomérique de la chlorophylle *a* en la diluant avec un lipide chloroplastique tel que le mono- et le digalactosyldiacylglycerol. L'insaturation dans une chaîne hydrocarbonée est nécessaire pour obtenir un système binaire chlorophylle *a*-lipide homogène. Le nombre d'insaturation et la longueur de la chaîne n'ont aucune influence sur les propriétés optiques de la chlorophylle *a*. Notre recherche sur le système chlorophylle-cytochrome *c* est fort prometteur puisqu'il a permis de simuler les propriétés de fluorescence du piège d'énergie PSII, siège de l'oxydation de l'eau.

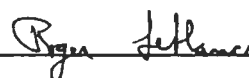


Signature du candidat

Date: Le 26 juin 1990

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

Date:



Signature du directeur de recherche

Date: Le 26 juin 1990

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

Date:

à ma femme Régine et à mes enfants

Louis-Gabriel et Ariane.

REMERCIEMENTS

Comme il se doit, mes premiers remerciements vont au Professeur Leblanc. Sans lui, l'évolution de ce projet était différente.

Je tiens à souligner la participation efficace de M. Alain Tessier. Sa conscience professionnelle remarquable ainsi que son sens de l'humour raffiné font de lui un compagnon de travail exceptionnel et grandement apprécié.

Une autre personne dont le sens de l'humour constitue sa marque de commerce (de même que le sujet de sa thèse de doctorat en littérature) mérite d'être remarquée. En effet, mon ami et écrivain Yvan Lacoursière a apporté à ce manuscrit son style.

Les spectres furent digitalisés et tracés par M. Michel Trudel grâce aux progiciels du Professeur Chapados. Je tiens à les remercier sincèrement pour leur généreuse contribution.

Enfin, j'aimerais que l'on garde dans la mémoire de ceux qui parcourent ces lignes le souvenir du Professeur Châtillon. Lorsque je lui posai le problème de la section 2 en 1985, ce sympathique mathématicien trouva la solution avec amusement et spontanéité. Mes plus belles pensées lui sont dédiées.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
REMERCIEMENTS	iii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xvii

CHAPITRES

I	INTRODUCTION.....	1
	A) Le rôle de la chlorophylle <i>a</i>	2
	B) Deux approches	4
	1) <i>In vivo</i>	4
	2) <i>In vitro</i>	5
	C) L'apport de ces deux approches.....	6
	1) Durée de vie de fluorescence <i>in vivo</i>	6
	2) Durée de vie de fluorescence <i>in vitro</i>	9
	D) But du projet.....	10
II	MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	13
	A) Matériel.....	13
	1) Chlorophylle <i>a</i>	13
	2) Les lipides.....	13
	a) Les phosphatidylcholines.....	14
	b) Les phospholipides.....	14

	Page
c) Les galactolipides.....	14
3) Les lames de quartz.....	17
B) Description de l'appareillage de durée de vie de fluorescence dans la nanoseconde.....	17
1) Diagramme schématique.....	19
2) Analyse fonctionnelle des composantes.....	19
a) Lampe à éclair.....	21
b) Monochromateur à l'excitation.....	21
c) Compartiment à échantillon.....	22
d) Monochromateur à l'émission.....	22
e) Rampe de voltage.....	22
f) Analyseur multi-canal.....	23
g) Ensemble informatique.....	23
3) Configuration pour les films de Langmuir-Blodgett.....	25
4) Configuration pour les monocouches à l'interface gaz-eau.....	27
C) Description de l'appareillage de spectroscopie dans le domaine de la picoseconde.....	31
1) Fonctionnement du montage.....	31
2) Acquisition des données.....	32
D) Spectrofluorométrie.....	32
1) Description du montage.....	33
2) Correction des spectres.....	34
a) Excitation.....	34
b) Émission.....	36
i) Méthode de la lampe standard.....	39

	Page
ii) Méthode du radiomètre.....	42
E) Spectrophotométrie d'absorption.....	44
F) Préparation des films de Langmuir-Blodgett.....	47
1) Purification de l'eau.....	47
a) La déminéralisation.....	47
b) La distillation.....	48
2) Nettoyage des lames de quartz.....	48
3) Bain de Langmuir.....	49
4) Transfert sur lame.....	50
5) Mélanges chlorophylle <i>a</i> -cytochrome <i>c</i>	52
III RÉSULTATS.....	53
A) Mesures en solution de la chlorophylle <i>a</i>	54
1) Absorption.....	54
2) Fluorescence.....	58
3) Durée de vie de fluorescence.....	58
B) Mesures en film de Langmuir-Blodgett.....	65
1) Absorption.....	65
2) Fluorescence.....	68
3) Durée de vie de fluorescence.....	73
C) Mesures en films mixtes de Langmuir-Blodgett.....	76
1) Mélanges chlorophylle <i>a</i> -phosphatidylcholine.....	78
a) Spectre d'excitation de monocouche mixte de chlorophylle <i>a</i> et de phosphatidylcholine.....	78

b)	Spectre d'émission de monocouche mixte de la chlorophylle <i>a</i> et de phosphatidylcholine.....	80
c)	Durée de vie de fluorescence de la chlorophylle <i>a</i> en monocouche mixte avec des phosphatidylcholines	80
2)	Mélanges chlorophylle <i>a</i> -phospholipides.....	87
a)	Spectre d'excitation en monocouche mixte de chlorophylle <i>a</i> avec des phospholipides.....	87
b)	Spectre d'émission en monocouche mixte de la chlorophylle <i>a</i> avec des phospholipides.....	89
c)	Durée de vie de fluorescence de film mixte de chlorophylle <i>a</i> avec des phospholipides.....	89
3)	Mélanges chlorophylle <i>a</i> -lipides du thylacoïde.....	92
a)	Spectre d'excitation de monocouche mixte de chlorophylle <i>a</i> et de lipides du thylacoïde.....	92
b)	Spectre d'émission d'une monocouche mixte de chlorophylle <i>a</i> et de lipides du thylacoïde.....	99
c)	Durée de vie de fluorescence des monocouches mixtes de chlorophylle <i>a</i> et de lipides du thylacoïde	102
4)	Mélanges chlorophylle <i>a</i> -DOPC à diverses concentrations.....	102
5)	Mélanges chlorophylle <i>a</i> -cytochrome <i>c</i>	105
a)	Absorption.....	105
b)	Spectre d'émission d'une monocouche mixte.....	111
c)	Durée de vie de fluorescence des monocouches mixtes de chlorophylle <i>a</i> et de cytochrome <i>c</i>	113
D)	Mesures à l'interface azote-eau.....	113

	Page
IV DISCUSSION.....	116
V CONCLUSION.....	123
VI RÉFÉRENCES.....	125
VII ANNEXE I.....	132
VIII ANNEXE II.....	136

LISTE DES FIGURES

	Page
1 Diagramme schématique du système de mesure de durée de vie de fluorescence en solution.....	20
2 Configuration de l'optique collectrice pour les films de Langmuir-Blodgett.....	26
3 Configuration de l'optique collectrice pour les monocouches à l'interface azote-eau.....	29
4 Facteurs de correction en fonction de la longueur d'onde à l'excitation.....	37
5 Diagramme schématique du montage avec la lampe standard.....	40
6 Facteurs de correction en fonction de la longueur d'onde à l'émission.....	45
7 Illustration d'un transfert sur lame.....	51
8 Spectre d'absorption de la chlorophylle <i>a</i> dans le benzène.....	55
9 Spectre d'absorption de la chlorophylle <i>a</i> dans l'éther.....	56

	Page
10 Spectre d'excitation de la chlorophylle <i>a</i> dans le benzène	59
11 Spectre d'émission de la chlorophylle <i>a</i> dans l'éther.....	60
12 Spectre d'émission de la chlorophylle <i>a</i> dans le benzène.....	61
13 Durée de vie de fluorescence de la chlorophylle <i>a</i> dans l'éthanol.....	63
14 Spectre d'absorption de la chlorophylle <i>a</i> en film de Langmuir-Blodgett.....	67
15 Spectre d'absorption de 6 monocouches de chlorophylle <i>a</i>	69
16 Spectre d'excitation de la bande de Soret de la chlorophylle <i>a</i> en film de Langmuir-Blodgett	70
17 Spectre d'excitation dans le rouge de la chlorophylle <i>a</i> en film de Langmuir-Blodgett.....	71
18 Spectre d'émission de la chlorophylle <i>a</i> en film de Langmuir-Blodgett.....	72
19 Spectre d'émission de la chlorophylle <i>a</i> en multicouche	74

20	Durée de vie de fluorescence de la chlorophylle <i>a</i> en film de Langmuir-Blodgett.....	75
21	Spectroscopie dans la picoseconde de la chlorophylle <i>a</i> en film de Langmuir-Blodgett.....	77
22	Spectre d'excitation du mélange de chlorophylle <i>a</i> et de phosphatidylcholine en film de Langmuir-Blodgett.....	79
23	Spectre d'émission du mélange de chlorophylle <i>a</i> et de phosphatidylcholine en film de Langmuir-Blodgett.....	81
24	Durée de vie de fluorescence du mélange de chlorophylle <i>a</i> et de phosphatidylcholine en film de Langmuir-Blodgett.....	84
25	Spectroscopie dans la picoseconde du mélange de chlorophylle <i>a</i> et de phosphatidylcholine en film de Langmuir-Blodgett.....	85
26	Spectres d'excitation du mélange de chlorophylle <i>a</i> et de phospholipides en film de Langmuir-Blodgett.....	88
27	Spectres d'émission du mélange de chlorophylle <i>a</i> et de phospholipides en film de Langmuir-Blodgett.....	90

28	Spectre d'excitation du mélange de chlorophylle <i>a</i> -galactolipides en film de Langmuir-Blodgett	93
29	Spectre d'excitation du mélange de chlorophylle <i>a</i> et de MGDG en film de Langmuir-Blodgett	95
30	Spectre d'excitation du mélange de chlorophylle <i>a</i> et de SQDG non purifié par HPLC en film de Langmuir-Blodgett	96
31	Spectre d'excitation d'une solution de 10^{-6} M de chlorophylle <i>a</i> dans le benzène avec du MGDG non purifié par HPLC dans un rapport molaire de 1:100	97
32	Spectre d'excitation d'une solution de 10^{-6} M de chlorophylle <i>a</i> dans le benzène avec du MGDG non purifié par HPLC dans un rapport molaire de 1:100 après 90 minutes.....	98
33	Spectre d'excitation des mélanges chlorophylle <i>a</i> /MGDG non purifié et phéophytine/DOPC en film Langmuir-Blodgett dans un rapport molaire 1:100.....	100
34	Spectre d'émission du mélange de chlorophylle <i>a</i> et de lipides thylacoïdiens en film de Langmuir-Blodgett.....	101

35	Durée de vie de fluorescence du mélange de chlorophylle <i>a</i> et de MGDG en film de Langmuir-Blodgett.....	103
36	Effet de la concentration en chlorophylle <i>a</i> sur les deux durées de vie de fluorescence en film de Langmuir-Blodgett	106
37	Effet de la concentration en chlorophylle <i>a</i> et de l'intensité de l'éclair sur le déclin de fluorescence en film de Langmuir-Blodgett.....	107
38	Spectre d'absorption de la chlorophylle <i>a</i> en présence de cytochrome <i>c</i> en film de Langmuir-Blodgett.....	109
39	Spectre d'émission de la chlorophylle <i>a</i> en présence de cytochrome <i>c</i> en film de Langmuir-Blodgett.....	112
40	Modèle mathématique de distribution de molécules en film de Langmuir ou de Langmuir-Blodgett.....	137
41	Distribution des distances minimales intermoléculaires (en nombre de molécules) entre les chlorophylles dans un rapport molaire de 1:10.....	140
42	Distribution des distances minimales intermoléculaires (en nombre de molécules) entre les chlorophylles dans un rapport molaire de 1:100.....	141

43	Distribution des distances minimales intermoléculaires (en nombre de molécules) entre les chlorophylles dans un rapport molaire de 1:1 000	142
----	--	-----

LISTE DES TABLEAUX

		Page
1	Source d'approvisionnement des phosphatidylcholines	15
2	Source d'approvisionnement des phospholipides.....	15
3	Source d'approvisionnement des galactolipides	16
4	Source d'approvisionnement du phytol et SQDG.....	18
5	Position et rapport des maxima d'absorption et de leur rapport d'absorbance de la chlorophylle <i>a</i> en solution.....	57
6	Position des maxima d'émission de la chlorophylle <i>a</i> en solution.....	62
7	Durée de vie de fluorescence de la chlorophylle <i>a</i> en solution	64
8	Position des maxima d'absorption de la chlorophylle <i>a</i> en film de Langmuir-Blodgett.....	66
9	Durée de vie de fluorescence du mélange chlorophylle <i>a</i> - phosphatidylcholine en film de Langmuir-Blodgett.....	82
10	Durée de vie de fluorescence du mélange chlorophylle <i>a</i> -DOPC (1:100) en film de Langmuir-Blodgett.....	86

11	Durée de vie de fluorescence des mélanges chlorophylle <i>a</i> - phospholipide en film de Langmuir-Blodgett.....	91
12	Durée de vie de fluorescence des mélanges chlorophylle <i>a</i> -lipide thylacoïdien en film de Langmuir-Blodgett.....	104
13	Durée de vie de fluorescence des mélanges chlorophylle <i>a</i> -lipide thylacoïdien non purifié par HPLC en film de Langmuir-Blodgett.....	104
14	Spectroscopie des monocouches chlorophylle <i>a</i> -cytochrome <i>c</i>	108
15	Durée de vie de fluorescence des mélanges chlorophylle <i>a</i> -lipide à l'interface azote-eau.....	115

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Produits chimiques

DLPC	:	dilinolénoylphosphatidylcholine
DMPC	:	dimyristoylphosphatidylcholine
DOPC	:	dioléoylphosphatidylcholine
DPPC	:	dipalmitoylphosphatidylcholine
DSPC	:	distéroylphosphatidylcholine
OSPC	:	oléoylstéroylphosphatidylcholine
POPC	:	palmitoyloléoylphosphatidylcholine
SOPC	:	stéroyloléoylphosphatidylcholine
PC d'oeuf	:	phosphatidylcholine d'oeuf
MGDG	:	monogalactosyldiacylglycérol
DGDG	:	digalactosyldiacylglycérol
SQDG	:	sulfoquinovosyldiacylglycérol
PG	:	phosphatidylglycérol
PI	:	phosphatidylinositol
PS	:	phosphatidylsérine

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Le soleil déverse sur la terre beaucoup d'énergie. En fait, on l'évalue à 3×10^{24} J par année. De cette énergie, 8×10^{21} J servent à introduire 2×10^{11} tonnes de carbone dans les grands cycles biochimiques du globe, soit 0,3% de l'énergie incidente. Ce chiffre est petit parce que la végétation ne recouvre pas toute la surface terrestre. En fait, dans le cas d'une région à forte végétation, ce rendement atteint 6%. L'activité des processus photosynthétiques varie selon les longueurs d'onde. Elle atteint un maximum d'efficacité à la longueur d'onde de 680 nanomètres. On obtient alors le chiffre remarquable: 30% (Hoover, 1984).

Cette performance suscite l'intérêt des chercheurs. On aimerait imiter ce processus pour la construction de systèmes photochimiques performants. Afin d'y parvenir, la connaissance détaillée de la structure et du fonctionnement de l'appareil photosynthétique devient nécessaire.

Déjà, une partie importante de cette connaissance est acquise. Toutefois, les mécanismes de transfert d'énergie entre l'antenne et le centre réactionnel restent à préciser. Förster a établi une théorie du transfert excitonique. Il devient intéressant de faire des systèmes modèles pour connaître le comportement caractéristique des molécules biologiques. Ces modèles utilisent la chlorophylle *a*, molécule la plus directement impliquée dans la capture du photon et la transduction de l'énergie lumineuse vers le centre réactionnel. D'une façon générale, l'absorption et l'émission serviront à examiner les membranes artificielles. Plus spécifiquement, la détermination de la

durée de vie de fluorescence permettra de connaître le temps de rétention de l'énergie sur la molécule. Cependant, les membranes artificielles ne contiennent pas beaucoup de matière et une forte intensité lumineuse détruirait la chlorophylle *a*. L'appareillage standard a une sensibilité insuffisante pour l'étude de ces membranes. De ce fait, le projet consiste à mettre au point un appareillage de durée de vie de fluorescence capable d'examiner ces échantillons peu lumineux. Une autre partie consiste à adapter et à calibrer spécialement pour les membranes minces un spectrofluorimètre. Des standards ont été utilisés ou mis au point afin de comparer judicieusement les résultats avec l'ensemble de la littérature.

A) LE RÔLE DE LA CHLOROPHYLLE *a*

La chlorophylle *a* joue un rôle de premier plan dans les étapes primaires de la photosynthèse. En effet, la vie doit composer avec le type d'énergie offerte: des ondes électromagnétiques réparties du rouge au bleu. L'assemblage de quatre anneaux pyrroles avec un cinquième cycle dans la structure de la chlorophylle *a* permet aux électrons π de l'anneau porphyrine d'absorber la lumière du soleil sur une large gamme de longueurs d'onde. Les transferts de type Förster, à cause du recouvrement des bandes d'absorption et d'émission dans le rouge, entrent en jeu et permettent la migration de l'exciton sur l'antenne. Enfin, cette énergie est acheminée à un centre photochimique composé d'une paire spéciale de chlorophylle *a* où la séparation de charges a lieu (Hoover, 1984).

Dans cette migration d'énergie, il y a des pertes. Elles se manifestent principalement par dissipation thermique, fluorescence et transfert vers les états triplets. L'ensemble de tous les processus photosynthétiques se divise en deux phases séquentielles, dans

l'ordre: la phase lumineuse et la phase obscure. La première comprend toutes les étapes directement entraînées par l'absorption d'un photon. On constate que cet ensemble de processus s'articule autour de deux photosystèmes, le PSI et le PSII, qui fonctionnent en série. Ces photosystèmes sont partie intégrante de la membrane du thylacoïde (petit sac interne au chloroplaste). Les nombreuses réactions biochimiques subséquentes ne requièrent pas la participation de la lumière. Pour cette raison, on nomme cet ensemble de réactions la phase obscure. Elle consiste à utiliser le potentiel électrochimique pour produire des molécules à haut potentiel énergétique comme le glucose.

Notre intérêt porte spécifiquement sur la séquence d'événements photophysiques entre la capture d'un photon et la séparation de charges. C'est ce que l'on appelle les étapes primaires de la photosynthèse. La nature électromagnétique de ces processus permet l'utilisation de la spectroscopie. Parmi ses nombreuses possibilités, l'absorption et la fluorescence constituent deux moyens d'exploration des pigments (Evans et Anderson, 1987).

La spectrophotométrie mesure les niveaux d'énergie de la molécule. On sait qu'ils sont influencés par l'environnement immédiat. On a déjà mesuré le solvatochromisme de la chlorophylle *a* (Seely et Jensen, 1965). L'état d'agrégation influe aussi sur les bandes d'absorption (Shipman *et al.*, 1976). La spectrofluorométrie étudie la désactivation. En effet, la chlorophylle *a* est une sonde intrinsèque. En plus de son rôle de transducteur, elle nous informe sur le niveau énergétique de la dernière molécule visitée par l'exciton (Goedheer, 1966).

L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la population d'états excités. Ainsi, par la mesure du déclin de cette fluorescence, on obtient leur durée de

vie. La précision d'analyse des logiciels actuels permet de calculer jusqu'à quatre durées de vie. Alors, des trois techniques, c'est sans doute la plus sensible à l'état d'agrégation de la chlorophylle *a*. C'est pourquoi elle sera la procédure centrale de ce présent ouvrage. Les deux autres techniques serviront à étayer l'ensemble des résultats.

B) DEUX APPROCHES

L'ensemble de la recherche expérimentale sur les étapes primaires de la photosynthèse procède par deux approches: *in vivo* et *in vitro*. Nous décrivons l'approche *in vivo* pour fin de comparaison seulement.

1) In vivo

Les biochimistes ont fragmenté le thylacoïde en sous-systèmes. Pour ce faire, ils ont utilisé des détergents, la centrifugation et la chromatographie. Toutefois, si on a démontré que la somme des spectres de chacun de ces sous-systèmes reconstitue celui du thylacoïde complet, on ne peut déterminer de quelle façon la chlorophylle est associée à la protéine (Evans et Anderson, 1987).

Malgré cette simplification, les tentatives pour déconvoluer les durées de vie de fluorescence ont amené les chercheurs à utiliser de multiples composantes. Leurs résultats étaient à la base semblables mais présentaient quand même des divergences significatives (Hodges et Moya, 1987 et Schatz et Holzwarth, 1987). Ceci les a conduit à des conclusions contradictoires.

Dans son ensemble, cette approche reste laborieuse. En effet, elle procède de façon analytique sans connaître les éléments de base.

2) In vitro

À l'inverse de la première approche, la seconde est synthétique. Elle consiste à incorporer la chlorophylle *a* et d'autres molécules dans un environnement connu. On vérifie les propriétés spectroscopiques de ces modèles afin de comprendre l'interaction de ces molécules. Par opposition à la méthode précédente, celle-ci procède par addition.

La littérature nous propose plusieurs systèmes modèles pour l'étude des propriétés photophysiques de la chlorophylle *a*. Les plus connus sont les solutions, les cristaux liquides, les films PVA, l'adsorption sur des particules de plastique, les vésicules, les liposomes, les micelles, les monocouches et les films de Langmuir-Blodgett (Picard *et al.*, 1986). Ces deux dernières techniques rencontrent trois exigences de base pour modéliser les membranes naturelles:

1. atteindre une concentration de chlorophylle *a* de 1 M: c'est la concentration de pigments dans la membrane naturelle;
2. ne mettre en présence que des composés concentrés dans les plantes, et;
3. pouvoir orienter les pigments.

Donc, la technique de Langmuir-Blodgett a été préférée en raison de ces trois contraintes expérimentales.

C) L'APPORT DE CES DEUX APPROCHES

L'approche analytique consiste à chercher les éléments simples des systèmes complexes. Toutefois, son progrès est laborieux à cause de la grande complexité des systèmes biologiques. L'approche synthétique consiste à combiner des éléments simples afin de simuler des systèmes complexes. Ainsi, ces deux approches se rejoignent dans l'étude des sous-systèmes. Afin de mieux situer les résultats issues de l'approche synthétique, un bref survol diachronique de l'évolution de la méthodologie des mesures de durée de vie de fluorescence *in vivo* et *in vitro* est présenté ci-bas.

1) Durée de vie de fluorescence *in vivo*

Les mesures de durée de vie de fluorescence *in vivo* débutent en 1957 avec la technique impulsionnelle. Elle consiste à éclairer la membrane naturelle du thylacoïde avec un éclair bref et à observer la fluorescence. Brody et Rabinovitch (1957) obtiennent alors une durée de vie de fluorescence de 1,5 ns.

À la même époque, la technique de décalage de phase intervient. Elle consiste à éclairer l'échantillon d'un faisceau à amplitude modulée. La fluorescence possède alors la même modulation mais avec un retard de phase dépendant de la durée du phénomène. L'idée est astucieuse mais le calcul permet difficilement la détermination de multiples composantes. Ainsi, les premiers travaux n'ont rapporté qu'une seule durée de vie de fluorescence de 0,6 ns en 1966 par Terenin *et al.*

Ensuite, la méthode impulsionnelle s'équipait de laser précis à la nanoseconde. La méthode consistait simplement à éclairer l'échantillon et à détecter la

fluorescence de façon analogue. Toutefois, la lenteur relative de l'éclair ne permettait pas de mesurer des durées beaucoup plus courtes que la nanoseconde. De fait, Tumerman, en 1967, ne trouvait qu'une seule composante d'environ 0,6 ns, de même que Butler et Norris en 1963.

Plus tard, les lasers devenaient de plus en plus puissants et rapides. On arrivait à la picoseconde et utilisait comme détecteur une caméra à balayage de fente. Les premiers résultats étaient encourageants mais la trop grande puissance de l'éclair provoquait des processus de désactivation de deuxième ordre par collision exciton-exciton (Seibert et Alfano, 1974). Par contre, la réduction de puissance réduisait l'efficacité de la caméra à balayage de fente. Ainsi, les signaux bruyants obtenus ne permirent que de déterminer une durée de vie de fluorescence moyenne de 0,6 ns (Porter *et al.*, 1977).

Pendant cette période, une nouvelle technique était mise à contribution: la mesure de durée de vie de fluorescence par comptage de photons. Lors des premières mesures sur des systèmes entiers, on utilisait une lampe à hydrogène. Cette lampe produisait des éclairs de 1-2 ns et par déconvolution, on pouvait déterminer des durées jusqu'à 0,1 ns. Encore une fois, cette source de lumière n'avait pas la rapidité nécessaire pour les mécanismes rapides des systèmes photosynthétiques et on ne trouva qu'une seule composante d'environ 0,4 ns (Brewington, 1979).

Parallèlement, on remplaça la lampe par un laser à argon à mode bloqué. Il fonctionne à 10 MHz et génère des impulsions de 10 ps chacune. Dès le début, on obtient à nouveau la composante de 0,4 ns mais avec des logiciels de déconvolution de plus en plus performants, les chercheurs purent obtenir deux (Beddard *et*

al., 1979), trois (Holzwarth *et al.*, 1984) et quatre (Hodges et Moya, 1987) durées de vie de fluorescence des membranes naturelles.

Parmi l'ensemble des résultats des années '80, ceux de Holzwarth et de Moya ressortent nettement des autres surtout à cause de l'appareillage performant utilisé. Le premier groupe a un modèle basé sur l'hétérogénéité des systèmes constituant les thylacoïdes. Il interprète donc ses résultats ainsi: le 80 ps provient du PSI et la composante de 180 ps est attribuée au déclin de l'antenne PSII avec les centres réactionnels ouverts. Après leur fermeture, cette composante devient 2,3 ns. La composante moyenne de 500 ps est attribuée au PSII dans l'état ouvert et 1,3 ns dans l'état fermé. Ce modèle cadre bien dans l'ensemble des résultats obtenus par Berens *et al.* (1985), Gulotty *et al.* (1985) et Karukstis et Sauer (1985) où ils font intervenir eux aussi l'hétérogénéité du thylacoïde.

Le groupe de Moya se distingue des autres chercheurs sur plusieurs points significatifs. On trouve un minimum de quatre composantes: 50, 200, 250 et 450 ps. La plus rapide est attribuée au PSI: c'est le seul point où les chercheurs s'accordent. Toutefois, selon Moya *et al.*, les trois autres τ_F sont reliées au PSII. Ils observent que l'inhibition progressive des centres réactionnels du PSII entraîne une diminution progressive des durées de vie et du rendement quantique de fluorescence. L'interprétation de ces mesures ne nécessite pas l'intervention des systèmes hétérogènes. Au contraire, le groupe de Moya les conteste au même titre que la recombinaison de charges de Klimov (Klimov *et al.*, 1978). Enfin, ils éclairent les PSII à la longueur d'onde d'absorption de la chlorophylle *b* et ne voient aucun changement dans les durées de vie de fluorescence, contrairement aux mesures du groupe de Holzwarth.

Cette analyse diachronique démontre que l'avancement de la connaissance suit étroitement les progrès technologiques. Ainsi, il y a encore place à une amélioration au niveau de l'appareillage et de l'analyse. Cette amélioration doit aussi se faire au niveau de la modélisation. Les calculs théoriques effectués sur d'hypothétiques antennes composées de chlorophylles disposées en rangées devraient être validés sur des systèmes modèles bien connus.

2) Durée de vie de fluorescence *in vitro*

Parallèlement aux investigations réalisées dans le milieu *in vivo*, les chercheurs se sont intéressés aux propriétés optiques de la chlorophylle *a* monomérique depuis trente ans. Les mesures de durée de vie de fluorescence réalisées en solution ont permis de déterminer une seule composante de 6 ns dans l'éther (Connolly *et al.*, 1982). Cette valeur correspond aux autres résultats de provenances diverses, par exemple Cermak et Kaplanova (1980) et Avarmaa *et al.* (1977). À concentration plus élevée, cette durée de vie diminue (Campillo *et al.*, 1976). On attribue cette diminution à l'annihilation de l'exciton par un groupement moléculaire spécifique, appelé trappe. D'autres chercheurs ont abordé ce problème sous un autre angle. Ils ont déduit que la durée de vie de fluorescence d'un oligomère était égale à celle du monomère divisée par le nombre de constituants de l'agrégat (Alfano *et al.*, 1985).

Les mesures de durée de vie de fluorescence en milieu biomimétique sont peu nombreuses. Jusqu'à maintenant, seulement deux publications rapportent des mesures expérimentales sur la chlorophylle *a* diluée dans une monocouche lipidique. La première concerne la chlorophylle *a* à l'interface azote-eau (Agrawal *et al.*, 1985). On y a étudié l'effet de la concentration sur le déclin et l'intensité de la

fluorescence. À leur plus grande dilution, ils obtenaient 5,5 ns. Ces résultats diffèrent avec ceux publiés par un autre groupe de chercheurs où une deuxième composante de 1,5 ns s'ajoutait à la composante lente pour la chlorophylle *a* en film de Langmuir-Blodgett (Picard *et al.*, 1986). Ainsi, malgré la simplicité des échantillons, il y a une discordance entre les groupes de chercheurs.

Les membranes naturelles contiennent aussi des protéines. La littérature rapporte des mélanges en films minces de chlorophylle *a* et de cytochrome *c* (Chin et Brody, 1976 et Aghion *et al.*, 1969). On a noté que la chlorophylle modifie le comportement de la protéine en surface. D'autre part, la photodégradation du pigment semble inhibée par la présence de la protéine. Le rapprochement de ces résultats avec ceux de pression de surface de chlorophylle *a* en fonction du temps (Aghion *et al.*, 1970) supporte l'idée d'une interaction entre le pigment et la protéine. Toutefois, le caractère du lien Chl-protéine, spécifique ou non, demeure mal compris. Ainsi, la mise en présence de la Chl *a* avec des molécules ou protéines du thylacoïde dans une membrane artificielle s'impose.

D) BUT DU PROJET

L'utilisation exclusive de composés rencontrés dans la membrane du thylacoïde est essentielle pour les expériences de reconstitution. De plus, les principaux constituants sont orientés dans la bicouche lipidique. Ces caractéristiques doivent être contrôlées et respectées dans le système modèle. Enfin, la concentration de chlorophylle *a* atteint environ un molaire dans la membrane naturelle. Seule la technique des monocouches rencontre toutes ces exigences.

Les films à l'interface azote-eau relèvent d'un procédé bien connu et les paramètres importants sont rigoureusement contrôlés. La technique de transfert en film mince est elle aussi maîtrisée. Ensemble, ils ont la versatilité nécessaire pour simuler l'environnement naturel de la chlorophylle *a*. Ainsi, on peut réaliser des mesures expérimentales dont l'objectif serait l'étude des propriétés optiques de la chlorophylle *a* dans des membranes biomimétiques. Cet objectif se subdiviserait en mini-projets.

La première série de mesures concerne la chlorophylle *a* en film de Langmuir-Blodgett. Les maxima d'absorption se situent près de ceux rencontrés dans les membranes du thylacoïde. Il sera intéressant de comparer les durées de vie de fluorescence de ces monocouches avec les résultats rencontrés *in vivo*. Afin de se situer dans un système lipidique similaire, la chlorophylle *a* sera mélangée, dans un premier temps, avec divers phospholipides. Ces mélanges sont abondamment cités dans la littérature et constituent donc un repère. Ensuite, la membrane du thylacoïde étant constituée de plus de 80% de galactolipides, de faibles proportions de chlorophylle *a* sont mélangées avec le MGDG et le DGDG afin de laisser le pigment sous forme de monomère. Tous ces mélanges seront étudiés en film de Langmuir-Blodgett par durée de vie de fluorescence.

L'étape suivante consiste à mettre en présence des protéines avec la monocouche de pigments. On opère selon une technique qui ne force pas l'incorporation. Par cette méthode, on veut étudier les propriétés d'auto-organisation de la chlorophylle *a* avec les protéines par la spectroscopie. Cette séquence de mesures prend fin avec une courte série de déterminations de durées de vie de fluorescence de la chlorophylle *a* à l'interface azote-eau. D'une part, ces résultats vérifieront l'intégrité de l'arrangement moléculaire de la chlorophylle *a* sur lame de quartz. D'autre part, ils permettent la

comparaison directe de l'ensemble de ces résultats avec ceux de l'interaction avec les protéines du thylacoïde.

Par l'étude comparative de ces résultats d'absorption, de fluorescence et de durée de vie de fluorescence avec ceux provenant de la littérature sur les systèmes photosynthétiques entiers ou fragmentés, on pourra déterminer l'état d'association de la chlorophylle *a* avec les protéines du thylacoïde.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODE

A) MATÉRIEL

Cette section décrit les sources d'approvisionnement des produits utilisés tout au long du présent projet de doctorat. Nous employons successivement deux procédés des plus sensibles à la présence de contaminants: la technique de Langmuir-Blodgett et la durée de vie de fluorescence. Par conséquent, les critères de pureté doivent être stricts. Ceci explique l'effort déployé dans la purification des produits.

1) Chlorophylle *a*

La chlorophylle *a* est extraite de feuilles d'épinard ou d'orge et purifiée selon une méthode déjà éprouvée (Iriyama et Yoshiura, 1979 et Omata et Murata, 1980). On cristallise le pigment au moyen d'un tampon iso-octane/phosphate 10^{-3} M (100:0.5, v/v) (Bellamy et Lynch, 1963). On maintient les cristaux de chlorophylle *a in vacuo* ou dans une atmosphère d'argon à une température de -20°C afin d'éviter leur oxydation ou leur phéophitinisation. La vérification de leur pureté par HPLC (Waters, modèle 510) ou par TLC précède leur utilisation.

2) Les lipides

Ils constituent l'environnement de la chlorophylle *a* dans les films minces. Cette dénomination cache une grande diversité de composés au niveau des têtes

polaires et des chaînes grasses. Trois tableaux les regroupent selon leurs traits principaux: les phosphatidylcholines, les phospholipides et les galactolipides.

a) Les phosphatidylcholines

Le tableau 1 résume la provenance des phosphatidylcholines. On détermine ensuite la composition des chaînes grasses et la masse moléculaire utilisée dans les calculs. Les fournisseurs de lipides situent leur degré de pureté au-delà de 99%. Des contrôles de qualité par TLC n'ont décelé aucune impureté.

b) Les phospholipides

Le tableau 2 regroupe cette catégorie comme nous l'avons fait auparavant. Toujours pour alléger, on utilise les abréviations.

c) Les galactolipides

Deux galactolipides constituent ce groupe. Le tableau 3 les décrit comme dans les tableaux précédents.

Dans les deux cas, la vérification par TLC n'a permis de déceler aucune impureté. Toutefois, à cause des résultats spectrofluorométriques incohérents, un effort de purification supplémentaire a été déployé avec le MGDG. On sait que les compagnies le livrent avec des anti-oxydants à cause de sa grande fragilité en dehors de son milieu naturel. Ainsi, la purification du mélange initial par chromatographie liquide à haute pression lui confère

TABLEAU 1

Source d'approvisionnement des phosphatidylcholines

Lipide	Fournisseur	Chaîne grasse		P.M. (μ .m.a.)
DLPC	P.L. Biochem.	18:3	18:3	804,1
DMPC	Serdary	14:0	14:0	691,9
DOPC	P.L. Biochem.	18:1	18:1	806,1
DPPC	P.L. Biochem.	16:0	16:0	752,0
DSPC	P.L. Biochem.	18:0	18:0	808,1
OSPC	Sigma	18:1	18:0	788,1
POPC	Sigma	16:0	18:1	760,1
SOPC	Sigma	18:0	18:1	788,1
PC d'oeuf	Sigma	18:1 30%	16:0 20%	806,1

TABLEAU 2

Source d'approvisionnement des phospholipides

Lipide	Fournisseur	Chaîne grasse		P.M. (μ .m.a.)
PC	Applied Sci.	18:1 30%	16:0 20%	806
PG	Serdary	18:1 20%	16:0 40%	775
PI	Supelco	18:2 43%	16:0 48%	856
PS	Supelco	18:1 34%	18:0 32%	788

TABLEAU 3

Source d'approvisionnement des galactolipides

Lipide	Fournisseur	Chaîne grasse				P.M. (μ .m.a.)
MGDG	Serdary	18:3	72%	16:3	26%	778
DGDG	Serdary	18:3	87%	16:0	5%	940

une pureté quasi absolue. La chromatographie en phase gazeuse certifie le maintien prolongé de cet état. Enfin, il est emmagasiné sous argon à -135°C . Le MGDG ainsi obtenu a produit une série de résultats différents. Deux autres lipides complètent cet ensemble: le phytol et le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG). Le tableau 4 résume leur provenance.

3) Les lames de quartz

Il a été démontré que les lames de microscope produisent de la fluorescence. Pour éviter tout ennui avec la transparence dans l'UV ou le proche IR, on utilise des lames de quartz de haute qualité. Leur surface régulière et leur non-fluorescence les rendent utilisables. Ces lames proviennent de Esco Product Inc.

B) DESCRIPTION DE L'APPAREILLAGE DE DURÉE DE VIE DE FLUORESCENCE DANS LA NANOSECONDE

La détermination de durées de vie de fluorescence aussi courtes que 0,1 nanoseconde requiert l'utilisation d'un appareillage rapide et précis. Ces exigences sont rencontrées avec le PRA 3000 ns livré clef en main par la Photochemical Research Associates Inc. Ce montage mesure des délais entre l'éclair d'excitation et la détection du seul photon émis. La distribution statistique de ces délais obéit à une loi exponentielle. Il sera donc possible de calculer les durées de vie de fluorescence.

Le montage original a été conçu pour les mesures en solution. Les exigences expérimentales rencontrées avec les films de Langmuir-Blodgett (échantillon mince, faible fluorescence et mesure de temps dans la nanoseconde) ont nécessité l'invention d'une

TABLEAU 4

Source d'approvisionnement du phytol et SQDG

Lipide	Fournisseur	Chaîne grasse		P.M. (μ .m.a.)
Phytol	Sigma	---	---	297
SQDG	Nutfield	18:3 40%	16:0 38%	920

nouvelle optique. En fin de projet, l'étude des monocouches à l'interface gaz-eau a requis une modification complète de son optique et de sa configuration. Nous vous proposons d'examiner d'abord le système original et ensuite les deux arrangements utilisés dans le projet pour le film Langmuir-Blodgett et le film à l'interface gaz-eau.

1) Diagramme schématique

L'appareillage de durée de vie de fluorescence est composé de trois sous-ensembles: la source de lumière, le montage optique et la détection. À la figure 1, le premier sous-ensemble comprend la lampe à arc (*), le bloc d'alimentation (BA), une bonbonne d'azote (N) et une pompe mécanique (P). La partie optique est constituée du monochromateur à l'excitation (X) et à l'émission (M) et d'une cuvette (C) de solution. Des lentilles de quartz convergentes maintiennent le faisceau lumineux dans le parcours optique. La détection est assurée par deux tubes photomultiplicateurs (TP) alimentés indépendamment par deux sources de tension (S). Ces tubes transmettent un signal électrique à la rampe de voltage (R) qui va alors acheminer à l'analyseur multi-canal (A) un voltage proportionnel au temps écoulé entre les deux impulsions. On vérifie cette proportionnalité avec un calibrateur (CAL) prévu à cet effet. Enfin, après un échantillonnage suffisant, on transfère le contenu des mémoires de l'analyseur multi-canal sur disques souples (D). Un progiciel (μ) traite les données et produit les résultats en vidéo (V) ou par impression (IMP).

2) Analyse fonctionnelle des composantes

Afin de bien saisir le rôle de chacune des composantes du montage, il importe de les décrire davantage.

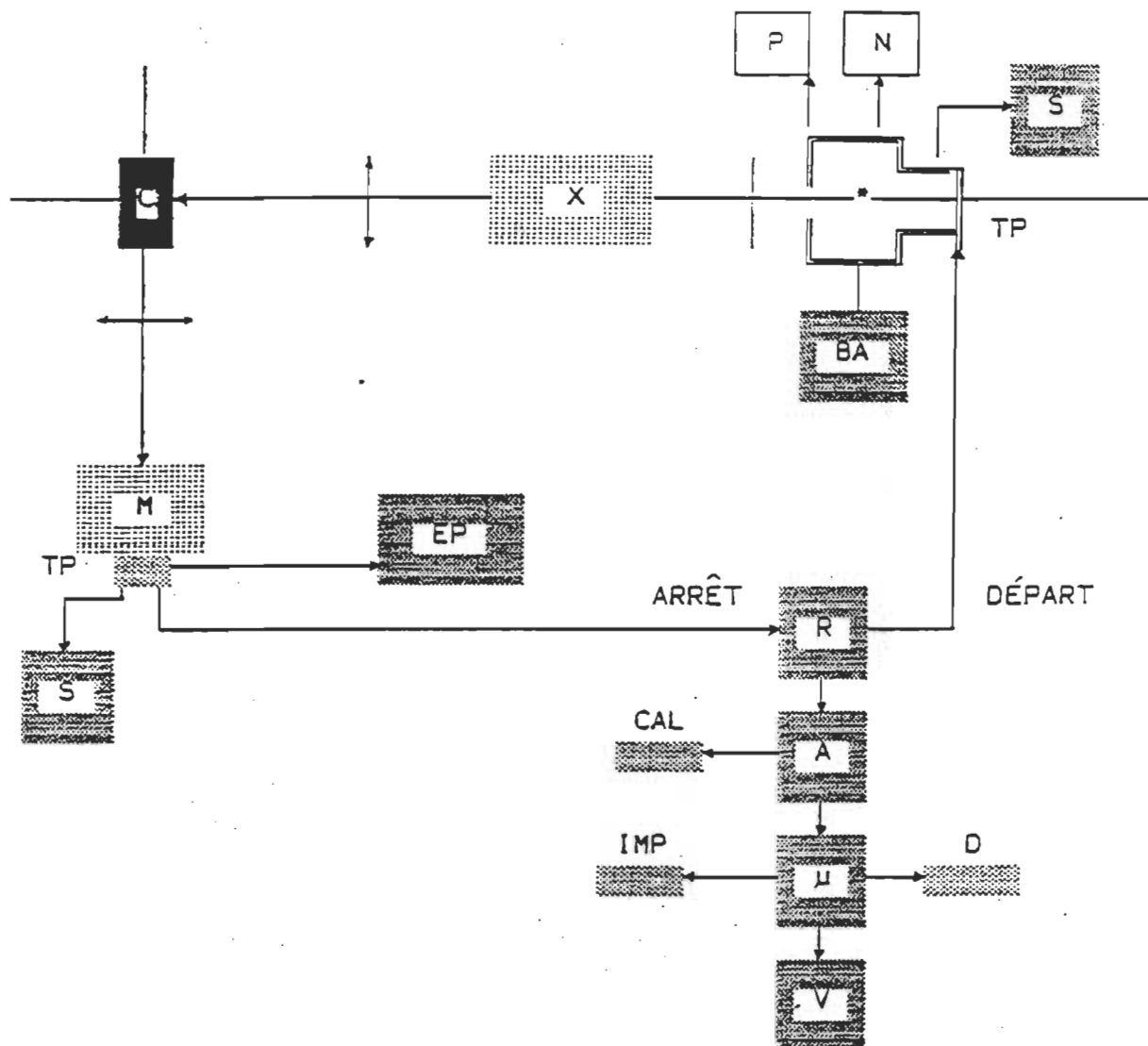


Figure 1: Diagramme schématique du système de mesure de durée de vie de fluorescence en solution.

a) Lampe à éclair

La source lumineuse du montage est une lampe à arc. La puissance et la durée de l'éclair dépendent du gaz excité. La faible quantité de pigments contenus dans le film de Langmuir-Blodgett nous oblige à employer un gaz à forte émission, en l'occurrence l'azote. Le fabriquant de la lampe laisse à l'utilisateur le soin de trouver les conditions idéales pour son emploi par essais et erreurs. On constate que l'obtention d'un arc stable nécessite, en général, une pression de 0,5 atmosphère et un espacement de 1-2 mm entre les électrodes. De plus, le bloc d'alimentation doit générer un voltage de 5 kV à une fréquence de 30 kHz. À ces conditions, il en résulte le plus souvent, mais pas toujours, un arc droit et stable durant plusieurs dizaines d'heures. Chaque éclair dure 4 ns à mi-hauteur et possède une énergie totale de 5 nJ. Son émission se situe surtout dans l'UV. Le pouvoir collecteur de l'optique doit être adapté pour chaque type d'échantillon. Un tube photomultiplicateur IP28 détecte l'éclair et envoie un signal électrique vers la rampe de voltage.

b) Monochromateur à l'excitation

La transmissibilité à la lumière bleue du monochromateur à l'excitation doit être excellente. Ce critère nous amène à utiliser le H 10 1200 UV-V de Instruments SA Inc. Il comprend un réseau holographique concave sans aberration. Sa dispersion linéaire de 8 nm par mm sur une fente de 1 mm assure une monochromaticité de 8 nm au faisceau d'excitation.

c) Compartiment à échantillon

L'utilisation de solutions n'impose pas un grand pouvoir collecteur de photons. Ainsi dans sa version initiale, ce compartiment ne contenait que deux lentilles convergentes et le support à cellule. Ceci suffit largement pour ce type de mesures. À la sortie de ce compartiment se situe le monochromateur à l'émission.

d) Monochromateur à l'émission

La fluorescence des échantillons de chlorophylle *a* appartient au domaine spectral du rouge. Le monochromateur doit bien transmettre ces longueurs d'onde. Cette exigence impose l'usage du Jarrel-Ash modèle 82-440. Il disperse la fluorescence à raison de 5 nm par mm. Combinée avec des fentes de 2 mm, on obtient une bande passante de 10 nm.

e) Rampe de voltage

Après génération d'une impulsion lumineuse, le tube photomultiplicateur IP28 à 1 000 V situé près de l'arc reçoit une partie de l'éclair. Il émet alors un signal électrique vers le discriminateur variable PRA1718 qui l'accepte si l'intensité est suffisante. Dans ce cas, il émet une impulsion vers l'entrée "départ" de la rampe de voltage PRA1701 réglée sur une échelle de 200 ns. Celle-ci génère une tension à croissance linéaire en fonction du temps. D'autre part, le faisceau d'excitation va éclairer l'échantillon et provoquer la fluorescence. Le tube photomultiplicateur R-928 sous 900 V de tension, à la réception d'un photon, produit une impulsion. Après vérification par un

discriminateur à fraction constante PRA1716, ce dernier génère, si l'intensité est suffisante, une impulsion vers l'entrée "arrêt" de la rampe de voltage. Typiquement, 30 000 "départs" par seconde ne sont arrêtés que 400 fois par le signal de la fluorescence. Celle-ci s'arrête instantanément et achemine la dernière tension vers l'analyseur multi-canal. Ceci donne l'assurance d'un échantillonnage statistique basé sur la détection d'un photon unique. Alors, 29 600 fois par seconde, la rampe de voltage atteint la fin de sa montée et retourne à zéro.

f) Analyseur multi-canal

Cette composante du système fonctionne en mode de classification par voltage. Il additionne une unité vis-à-vis le canal qui correspond à la tension reçue.

L'acquisition de données s'achève après l'obtention de 2 000 unités dans le canal de pic. Ensuite, on transfère le contenu des mémoires de l'analyseur vers un ensemble informatique. L'analyseur multi-canal est un Tracor Northern modèle TN-1750.

g) Ensemble informatique

Cet ensemble comprend un mini-ordinateur LSI-11 muni d'un terminal VT-105 de Digital Equipment Corporation, un lecteur de disque de 8 pouces et une traceuse de courbes.

L'enregistrement des données se fait sur disques souples par le programme DOWNLD. Un progiciel créé par la compagnie, le programme DECAY, version 4.0, assure le calcul des durées de vie de fluorescence. Il fait la déconvolution de la courbe de décroissance expérimentale qui contient le profil de la lampe et le déclin de fluorescence. Le profil de la lampe est obtenu expérimentalement en faisant diffuser la lumière d'excitation sur une lame de quartz dépolie avec de l'acide fluorhydrique. Le profil de la lampe utilisé par l'ordinateur résulte de la somme arithmétique des profils de la lampe avant et après la mesure de fluorescence. On suppose que le déclin de fluorescence est mono- ou multi-exponentiel. Pour démarrer ce logiciel, il faut supposer des valeurs initiales approximatives mais réalistes (dans le même ordre de grandeur) pour les durées de vie de fluorescence et les amplitudes. L'ordinateur calcule la convolution du profil de la lampe par la courbe de déclin de fluorescence. Puis, il soustrait la courbe calculée de la courbe expérimentale. Les écarts sont évalués selon 6 paramètres statistiques: le khi carré, le "run test" où on surveille l'apparition de séries non aléatoires, la corrélation entre paramètres, la fonction d'autocorrélation des résidus pondérés, la déviation non statistique et le paramètre Dubin-Watson.

Le programme évalue l'écart et cherche la solution par itérations successives en utilisant l'algorithme de Marquart. Il s'arrête quand la variation des écarts est faible. L'opérateur doit lui-même juger si la réponse est satisfaisante. Typiquement, on débute avec une exponentielle. Si la réponse ne convient pas, on re-initialise avec deux exponentielles. On peut ainsi aller jusqu'à quatre exponentielles. Pour les solutions de chlorophylle *a* dans

l'éther par exemple, une seule suffit tandis que pour les monocouches diluées, deux seulement sont nécessaires.

Bien que des tests numériques aient été faits par la compagnie PRA pour vérifier la fiabilité de leur logiciel, il était quand même nécessaire que ces tests soient réalisés par nous pour s'assurer de sa validité. Pour ce faire, le profil de la lampe a été remplacé par une pente linéaire. Du bruit a été ajouté en utilisant le générateur de nombres aléatoires. Enfin, la courbe pseudo-expérimentale est la convolution du profil artificiel de la lampe avec des exponentielles auxquelles ont été ajouté aussi du bruit.

Les résultats de ces tests corroborent ceux de la compagnie PRA: le programme, dans les conditions normales d'opération avec les monocouches, est fiable dans les limites d'incertitudes calculées statistiquement par le logiciel. Les résultats obtenus peuvent être imprimés ou tracés.

3) Configuration pour les films de Langmuir-Blodgett

Dans la première phase, on a employé l'appareillage initial pour les mesures de durée de vie de fluorescence en film de Langmuir-Blodgett. Ce dernier s'est avéré tout à fait inefficace. Il fallait donc accroître de beaucoup le pouvoir collecteur de l'optique. Après de nombreux essais, la configuration suivante a été retenue et employée.

La lampe, ses accessoires et le monochromateur à l'excitation restent en place. L'intérieur du compartiment à échantillon subit une profonde transformation. Le schéma présenté à la figure 2 le démontre. Le film mince et le foyer du

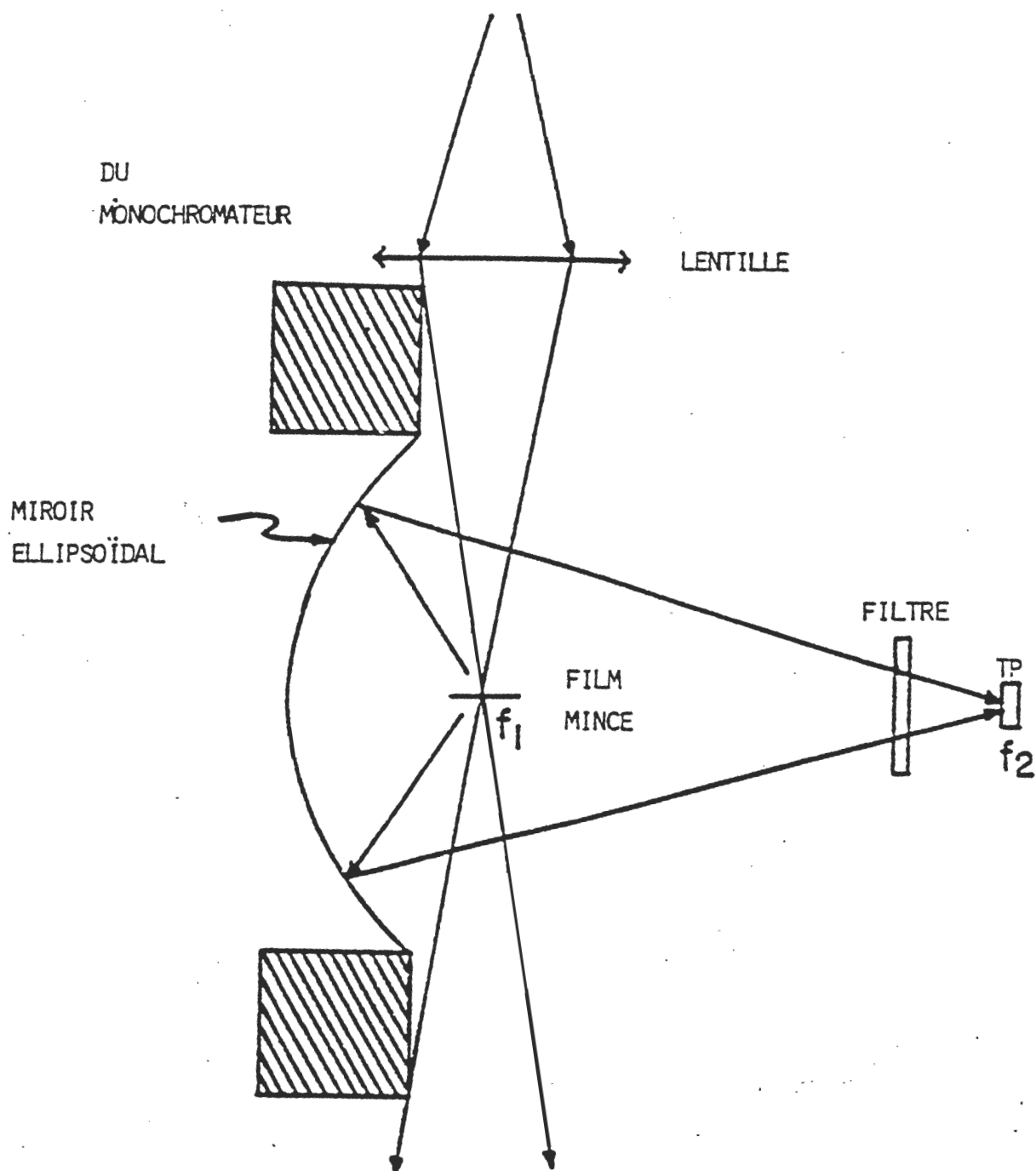


Figure 2. Configuration de l'optique collectrice pour les films de Langmuir-Blodgett.

faisceau d'excitation coïncident avec le foyer primaire d'un miroir ellipsoïdal (f1). Il concentre environ un tiers de la fluorescence vers son foyer secondaire (f2) occupé par la photocathode du tube photomultiplicateur Hamamatsu R-928. Entre ces deux foyers, un filtre à réjection élimine la lumière de la lampe. Le miroir ellipsoïdal provient de Optics Co. Il a 10,2 cm de diamètre et ses foyers sont à 3,8 et 15,2 cm de distance du centre. Le filtre à réjection est un Oriel 630. Cette configuration maintient un niveau de détection très satisfaisant sur une large gamme de concentrations. De fait, les films de chlorophylle *a* pure et de chlorophylle *a*:lipide dans un rapport molaire de 1:1 000 constituent les deux extrêmes mesurés.

La majeure partie des mesures de durée de vie de fluorescence présentées dans cet ouvrage provient de ce montage.

4) Configuration pour les monocouches à l'interface gaz-eau

Les films de Langmuir-Blodgett offrent la possibilité de superposer plusieurs monocouches et ainsi, de construire une variété quasi-infinie de systèmes modèles. Cependant, les mesures de durée de vie de fluorescence à l'interface gaz-eau permettent d'étudier les propriétés d'émission en fonction de la pression de surface avec beaucoup de facilité. On peut même songer à des expériences d'adsorption de protéine dissoute dans la sous-phase sur la monocouche de chlorophylle *a* (Lamarche *et al.*, 1990). Ainsi, il devenait de plus en plus souhaitable de réorganiser le montage afin d'atteindre cet objectif.

La réalisation d'un tel système a demandé encore une fois plusieurs tentatives et beaucoup de travail. La recherche d'une version améliorée justifiait les efforts déployés si on considère le rendement atteint.

La figure 3 illustre les changements apportés au montage dans sa configuration et son optique. Le support à échantillon devient le bain de Langmuir lui-même. Son équipement nous assure un contrôle précis de l'étalement et la compression de la monocouche à l'interface. Suite à sa préparation, elle est éclairée par le faisceau d'excitation. Par le choix de l'orientation du faisceau d'excitation, la réflexion de surface et du fond du bain, de même que la diffusion par la monocouche n'interfèrent pas avec la détection de la fluorescence.

Plus précisément, on a remplacé le monochromateur à l'excitation par un filtre coloré Oriel à bande passante de 100 nm centrée autour de 440 nm. Ceci augmente la puissance du faisceau incident. Toutefois, des lumières parasites viennent s'ajouter à cette fluorescence augmentée. En effet, à la surface de l'eau, une partie du faisceau changera de direction par réflexion ou diffusion. Heureusement, la planéité naturelle de l'eau permet l'élimination de la lumière réfléchie par l'inclinaison à 45° du faisceau. De plus, la lumière diffusée à l'interface sera tout à fait filtrée. Cependant, le cône lumineux transmis poursuit son trajet et illumine le fond du bain. Parce qu'il est constitué de Teflon blanc, il devient une source de problèmes pour la détection. Afin d'éviter la superposition des aires d'éblouissement et de fluorescence, un bain plus profond a été construit par nos ateliers de mécanique. Ceci amoindrit le retour de la lumière d'excitation dans les fibres optiques de quartz.

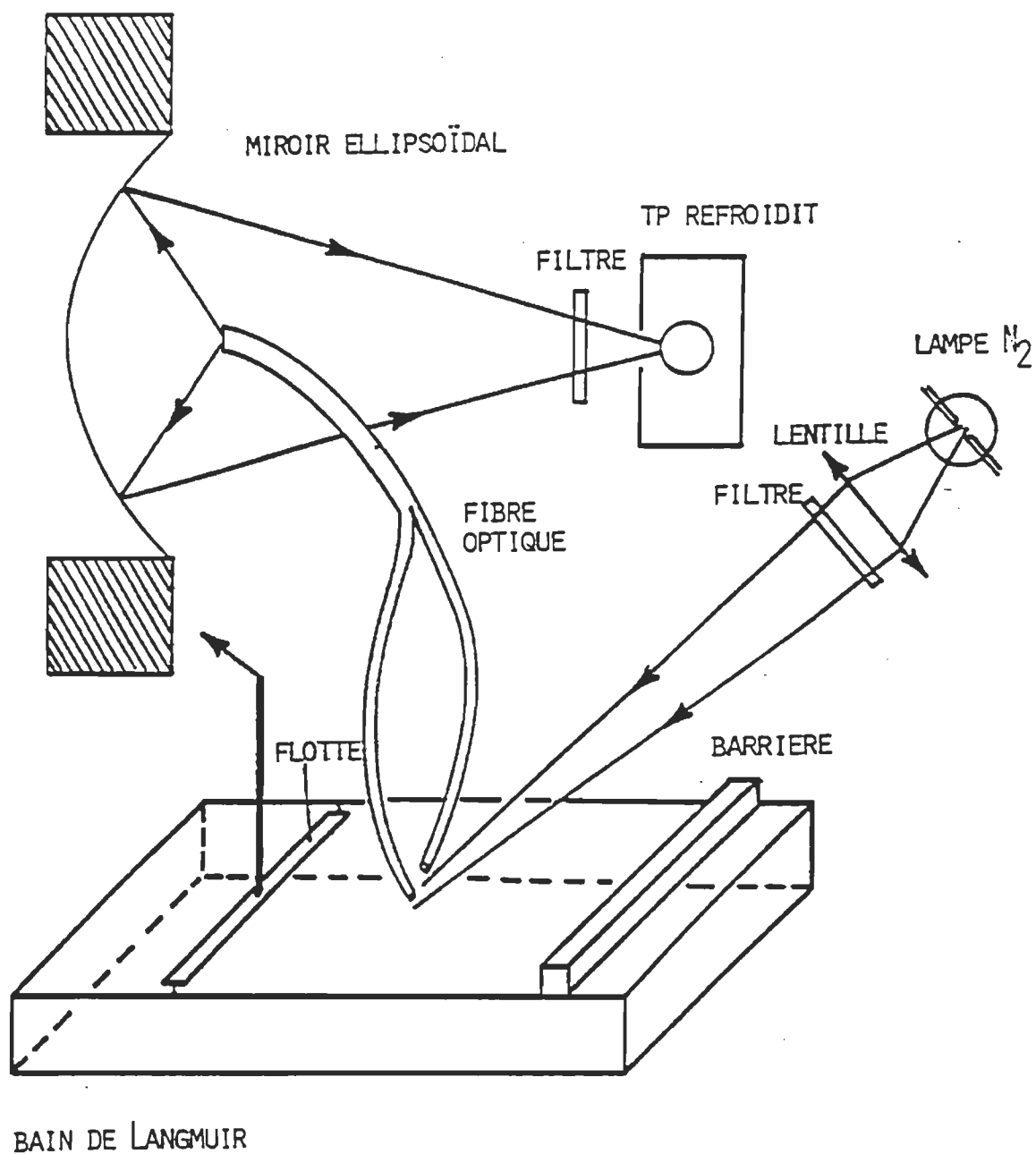


Figure 3. Configuration de l'optique collectrice pour les monocouches à l'interface azote-eau.

Les fibres optiques, Oriel no. 77365, 36 po. de longueur, en verre, $NA \approx 0,35$ à 680 nm, sont regroupées en deux faisceaux placés de part et d'autre du trajet lumineux. Elles regardent le point d'intersection avec un angle de 45° par rapport au plan d'eau. Ces fibres captent la fluorescence et la lumière parasite pour les acheminer ensuite vers le miroir ellipsoïdal situé dans l'ancien compartiment à échantillon. L'extrémité de ce faisceau de fibres est positionnée au foyer primaire du miroir. Celui-ci concentre la lumière émergente au foyer secondaire. À cet endroit se situe la photocathode du tube photomultiplicateur R-928. Entre ces deux foyers, un filtre interférentiel de 680 nm avec une bande passante de 10 nm sépare la fluorescence de la lumière diffusante.

Avec ce nouveau montage, le refroidissement du tube photomultiplicateur par effet Pelletier élimine le bruit thermique. Avec le boîtier, le montage n'enregistre pas la lumière de la pièce. Ces deux caractéristiques sont essentielles dans les conditions de faible fluorescence. D'autre part, afin de réaliser les mesures à l'interface azote-eau, un tuyau perforé, relié à une bonbonne d'azote, encercle le bain de Langmuir.

Pour vérifier le bon fonctionnement de l'appareillage, des tests ont été menés en solution et les résultats se comparent avec ceux de la littérature (Connolly *et al.*, 1982). De même, des films standard de Langmuir-Blodgett ont été analysés. Là aussi, on observe une bonne concordance avec les résultats publiés (Dick *et al.*, 1988).

C) DESCRIPTION DE L'APPAREILLAGE DE SPECTROSCOPIE DANS LE DOMAINE DE LA PICOSECONDE

La durée de vie de fluorescence de la chlorophylle *a* en milieu dilué se situe autour de 6 ns. Sa détermination par le montage précédant ne pose aucun problème. Toutefois, à concentration élevée, on atteint la limite temporelle du montage précédent. L'utilisation d'un appareil plus rapide s'impose.

L'Université Concordia, à Montréal, possède un système capable d'étudier le domaine de la picoseconde. Sa proximité géographique de même que la disponibilité des équipements rendaient son utilisation intéressante. En fait, les films minces préparés le matin étaient expédiés vers Montréal pour y être mesurés en début d'après-midi par un personnel expert.

1) Fonctionnement du montage

Un laser Nd³⁺/YAG à mode bloqué constitue la source lumineuse (Picard *et al.*, 1986). Il génère un train d'impulsions de 1 006 nm d'où une seule est extraite et reçue par deux amplificateurs Nd/YAG. L'impulsion de 40 ps à mi-hauteur et d'énergie de 100 mJ est dirigée vers un cristal KDP de type II pour générer une troisième harmonique, c'est-à-dire une impulsion de 355 nm. Celle-ci possède une énergie de 2 mJ. Un diviseur de faisceau en prélève 10%, dirigé vers un photomètre. La lumière résultante est focalisée sur une surface de 4 mm² dans le plan de la monocouche de chlorophylle *a*.

Une lentille de 50 mm de diamètre (*f*/1.5) collecte la fluorescence. Une deuxième lentille (*f* = 60 mm, *f*/1.2) focalise la lumière collectée dans une fente de

100 microns située à l'entrée de la caméra à balayage rapide Hamamatsu C979. Un filtre UG11, placé en face de la caméra, sépare la lumière d'excitation de la fluorescence. Un courant d'argon balaie les films minces tout au long des mesures.

2) Acquisition des données

Pendant une mesure de déclin de la fluorescence, la caméra à balayage de fente emmagasine les intensités en mémoire. Ensuite, elle transfère ces données sur imprimante. La tâche consiste donc à transférer ces données sur nos disques souples et ce, dans un format compatible avec les progiciels codés déjà en place. Des problèmes de compatibilité ont obligé la transcription manuelle des données.

Ceci a demandé la création d'un logiciel pour saisir les données par le clavier. L'exécution de ce logiciel a lui-même requis le montage d'un compilateur Fortan qui n'était pas disponible autrement.

D) SPECTROFLUOROMÉTRIE

Les spectres de fluorescence permettent d'étudier les niveaux énergétiques des molécules. Ceux-ci nous renseignent sur les interactions de l'environnement. Ainsi, le contrôle de ce milieu combiné avec la spectroscopie par fluorescence constituent un moyen sensible pour mesurer les propriétés d'émission de la chlorophylle *a*.

1) Description du montage

C'est un spectrofluorimètre Spex Fluorolog II, conçu pour réaliser des spectres d'excitation ou d'émission de solutions dans des cuvettes, en détection frontale ou latérale. Le positionnement des films dans le compartiment à échantillons a nécessité peu de modifications. Un support à lame de quartz a été construit spécialement pour y être installé. De chaque côté de ce compartiment se situent deux monochromateurs. Ils sont munis de réseaux à échelottes. Leur 1 200 lignes au mm leur procure un pouvoir dispersif de 3,7 nm au mm.

Une lampe au xénon à haute pression de 450 W fournit la lumière d'excitation. La détection est assurée par un tube photomultiplicateur R-928 de Hamamatsu. Celui-ci est refroidi par effet Pelletier afin de réduire le bruit électronique d'origine thermique. Le contrôle de l'ensemble de l'appareillage par un micro-ordinateur accroît la répétitivité des spectres car ainsi la machine peut répéter souvent, automatiquement et fiablement les mêmes mesures dans les mêmes conditions sur le même échantillon.

La minceur des films de Langmuir-Blodgett requiert une coïncidence quasi-absolue des axes optiques de l'excitation et de l'émission sur la monocouche. Pour réaliser un alignement suffisant, il est nécessaire de visualiser les axes optiques par des faisceaux visibles. Afin de réaliser ceci, on installe la lame sur son support et place l'ensemble dans le compartiment à échantillon.

Ensuite, on substitue l'ensemble de détection par un laser He-Ne. Son rayon est dirigé dans l'axe optique jusqu'au compartiment à échantillon. Le

monochromateur doit être réglé à 632,8 nm. Le rayon croise alors la surface de quartz où son point d'intersection est perçu comme une tache rouge.

Il s'agit maintenant d'y orienter le faisceau excitateur. Afin de faciliter le repérage, le choix d'une couleur très différente du rouge (le bleu par exemple) est préférable. Pour y parvenir, on allume la lampe au xénon, on sélectionne la longueur d'onde appropriée à l'excitation et ajuste le miroir à l'entrée du compartiment.

Le point d'intersection des deux faisceaux doit coïncider avec la surface qui portera la monocouche. Cette configuration permet d'éliminer la lumière réfléchie sans perte de fluorescence.

2) Correction des spectres

La publication de spectres de fluorescence non corrigés devient de moins en moins acceptée par la communauté scientifique. En effet, l'analyse de tels spectres conduit facilement à de mauvaises interprétations. Afin d'éviter ces ennuis, les facteurs de correction ont été déterminés tant à l'excitation qu'à l'émission.

a) **Excitation**

Les spectres d'excitation de chlorophylle *a* diluée en film de Langmuir-Blodgett sont préférés aux spectres d'absorption. Leur absorbance est inférieure aux limites des spectrophotomètres disponibles au centre de recherche. Toutefois, les spectrofluorimètres détectent facilement ces

émissions. L'émission dépend du nombre de molécules excitées, donc au nombre de photons absorbés. Pour de faibles absorbances, le spectre correspond à celui d'excitation dans les longueurs d'onde inférieure à l'émission.

Ces affirmations sont prouvées expérimentalement avec de la chlorophylle *a* en solution dans le benzène et l'éther. La correction de ces spectres apparaît inévitable pour tenir compte du spectre d'émission de la lampe et aussi de ses fluctuations d'intensité.

La région spectrale d'intérêt va de 350 nm à 700 nm. Toutefois, pour des raisons techniques, la bande de Soret a été explorée dans la majeure partie du projet. Ainsi, pour corriger chaque point entre 350 et 500 nm, on prépare une solution concentrée de rhodamine B dans du propylène glycol (8 g par litre) car elle a un rendement de fluorescence constant et élevé. Cette solution est ensuite versée dans une cuvette de 1 cm de parcours optique. Une partie du faisceau d'excitation, à la sortie du monochromateur, est déviée puis focalisée vers la cuvette. La solution absorbe tous les photons incidents et réémet dans le rouge toujours aux mêmes longueur d'onde. Une partie de cette émission est ensuite captée par un tube photomultiplicateur placé à l'arrière de la cuvette. Cet ensemble produit un signal de référence indépendant de la longueur d'onde mais proportionnel au nombre de photons d'excitation.

La correction proprement dite se fera par le micro-ordinateur. Il divise les voltages en provenance des tubes situés à l'émission et à la référence. Le quotient devient l'ordonnée du spectre d'excitation à cette longueur d'onde. Cette réalisation, malgré son importance, ne constitue qu'une étape.

Il demeure intéressant de pouvoir exciter l'échantillon jusqu'à 700 nm. Dans cette partie, on place un filtre du côté de l'émission afin de couper la seconde harmonique. Toutefois, le rendement quantique faible ou nul de la rhodamine B exclut son utilisation entre 500 et 700 nm. On utilise alors une photodiode. Sa fonction consistera à mesurer l'intensité du faisceau exciteur à chaque longueur d'onde. Ces mesures sont emmagasinées dans le micro-ordinateur. Ces données servent directement à corriger le spectre final. La figure 4 illustre ces facteurs de correction à l'excitation. Pour prendre un spectre de calibration complet, on balaie de 350 à 500 nm avec la rhodamine B comme référence et de 500 à 700 nm avec la correction radiométrique emmagasinée dans la mémoire permanente du micro-ordinateur. La comparaison des spectres d'absorption et d'excitation de la chlorophylle *a* diluée dans l'éther à 10^{-6} M vérifie ce procédé. L'écart entre ces deux résultats demeure en-dessous de 5%. Un logiciel EXE a été développé pour automatiser les opérations de mesure, de calibration et de lissage des deux régions spectrales (350 à 500 nm et 500 à 700 nm). Ce logiciel est utilisé par l'équipe du Centre de recherche en photobiophysique.

b) Émission

Les films monomoléculaires de chlorophylle *a* émettent dans le rouge, autour de 700 nm. À ces longueurs d'onde, la sensibilité du tube photomultiplicateur diminue rapidement. Ceci déforme de façon significative le spectre d'émission et nécessite l'utilisation de facteurs de correction. Le fabricant du spectrofluorimètre nous propose une méthode éprouvée: la lampe standard. On la nomme ainsi parce que son spectre d'émission a été mesuré précisément par un bureau de standardisation. Cependant,

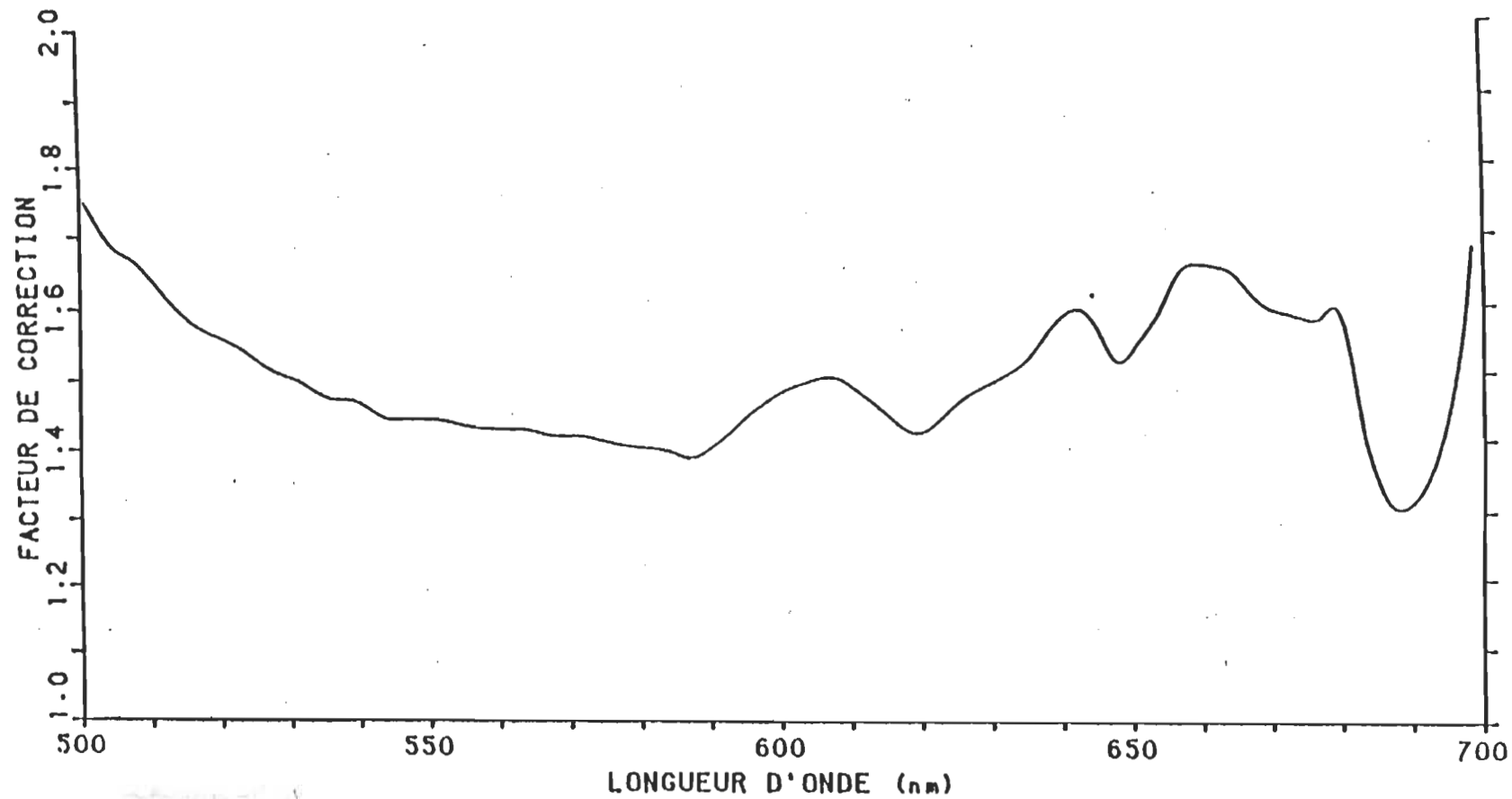


Figure 4: Facteurs de correction en fonction de la longueur d'onde à l'excitation.

l'installation proposée de la lampe sur l'appareillage semblait douteuse et à cause de la région spectrale difficile, il eût été hasardeux de s'y fier. Conséquemment, il fallait trouver une méthodologie plus sûre.

La littérature nous décrit trois méthodes de correction: la solution fluorescente standard, la lampe standard et le radiomètre standard (Roberts, 1981).

La première méthode est préférée des chercheurs en raison de sa facilité et rapidité d'utilisation (Velapoldi et Mielenz, 1980). Toutefois, il n'existe aucun standard de fluorescence pour le proche infrarouge (Melhuish, 1973).

La méthode de la lampe standard, malgré sa simplicité théorique, demeure très délicate d'application. De légers changements dans les conditions d'utilisation de la lampe influencent les résultats.

Enfin, la méthode du radiomètre standard est la plus délicate à utiliser. Le faisceau doit ressembler le plus possible au faisceau réel pour obtenir une lecture correcte.

Comme l'incertitude des deux dernières méthodes est de nature systématique, seule leur application successive nous mènera à une réponse fiable. En effet, si l'utilisation de la lampe et du radiomètre standard convergent vers une même courbe de correction, sa crédibilité atteint un niveau acceptable.

La première étape consiste donc à s'assurer de l'exactitude des deux standards. Il suffit de mesurer l'intensité de la lampe standard avec le

radiomètre standard dans les conditions prescrites par les deux fournisseurs. Pour plus de sûreté, ces lectures sont prises à trois longueurs d'onde différentes avec trois filtres interférentiels. Les profils de leurs transmissivités sont déterminés avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer modèle 553. On intègre la surface du spectre de transmittance d'un filtre par la méthode du découpage et de la pesée. On multiplie cette transmittance intégrée par le spectre standard donné par le fournisseur de la lampe. On obtient alors l'irradiance qui arrive au radiomètre. Le produit de l'irradiance par la surface active du radiomètre nous donne le flux radiant que devrait mesurer le radiomètre standard.

La réponse du radiomètre aux trois longueurs d'onde correspond à 5% près à la valeur calculée. Ceci valide les deux standards utilisés comme outil de travail.

i) Méthode de la lampe standard

La configuration du montage avec la lampe standard a subi une modification. La figure 5 illustre l'installation de la lampe au sommet d'un tube de plastique noir de 2 mètres de longueur. À l'intérieur, 7 rondelles de caoutchouc percées au centre interceptent la lumière dispersée. À la sortie du tube, le faisceau est pratiquement parallèle. Il atteint un miroir incliné à 45°, troué perpendiculairement par rapport au trajet lumineux. Suite à la réflexion, le faisceau continue son chemin et éclaire uniformément la surface blanche diffusante. Elle est constituée d'une plaque de métal enduite d'oxyde de magnésium. Afin de s'assurer de ses propriétés de dépolarisation, un ellipsomètre a

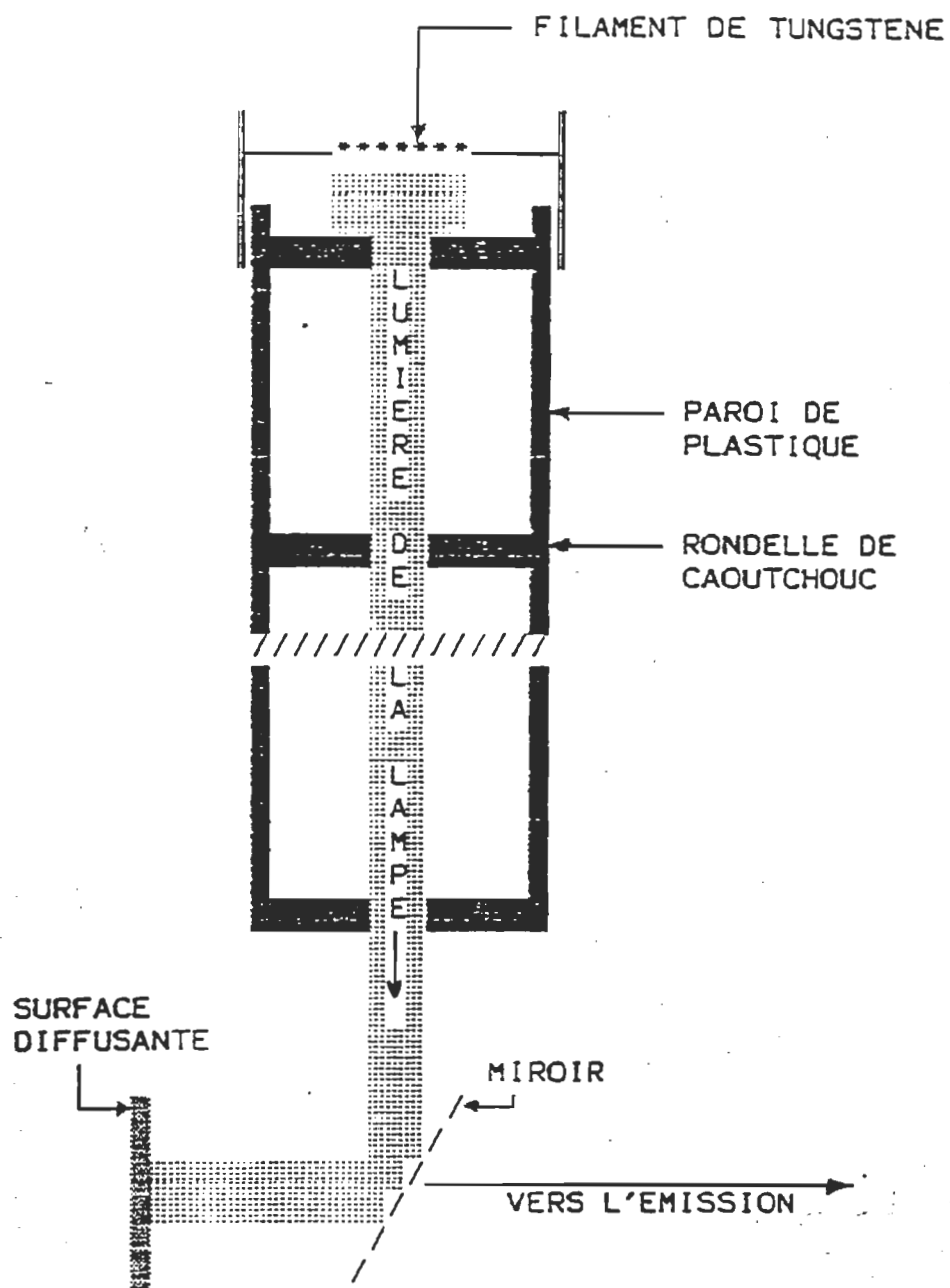


Figure 5: Diagramme schématique du montage avec la lampe standard

été utilisé (Ducharme, 1987). De plus, l'indépendance de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde a été vérifiée par un spectre de réflectance avec le spectrophotomètre Cary 17D.

Une faible proportion de la lumière diffusée par la surface blanche passe par le petit trou. Afin d'éviter la réflexion du rebord inférieure du trou vers le monochromateur à l'émission, un tube-écran noir y a été inséré. Sa sortie se comporte comme une source de fluorescence. Sa position doit donc coïncider avec l'axe optique à l'émission. Afin de le positionner avec précision, on utilise un laser d'enlignement He-Ne Melles Griot. Il s'agit d'enlever le compartiment du tube photomultiplicateur pour y placer le laser. Le monochromateur à l'émission est accordé avec le laser pour laisser entrer le rayon dans le compartiment à échantillon. Après avoir enligné le trou et le rayon, le parcours optique est parfait. Ainsi, cette lumière à la sortie du tube parcourt le monochromateur à l'émission de la même façon que celui de la fluorescence.

Ensuite, un autre problème reste à surmonter: l'anomalie de Wood (Velapoldi et Mielenz, 1980). Cette anomalie provient des sillons gravés sur la surface des réseaux. En effet, la transmissivité du réseau dépend de l'angle des sillons avec le vecteur électrique de l'onde électromagnétique. Une orientation parallèle cause une distorsion dans le spectre de transmission situé dans notre région d'intérêt. Toutefois, dans le cas d'une orientation perpendiculaire, cette anomalie disparaît. En conséquence, il s'agit de placer un polariseur à la sortie du compartiment à échantillon pour éliminer cette source d'erreur.

La suite de la manipulation consiste à balayer le monochromateur à l'émission et à enregistrer le spectre d'émission de la lampe standard. Au préalable, on choisit une largeur de fente qui devra être la même pour la correction radiométrique. Enfin, on entre les données du spectre standard fourni par le fabricant de la lampe dans l'ordinateur après les avoir converties en nombre de photons. De la division du spectre standard par celui de la lampe, il en résulte la courbe des facteurs de correction à l'émission. On l'emmagasine dans la mémoire permanente de l'ordinateur pour utilisation ultérieure.

ii) Méthode du radiomètre

La correction à l'émission par la méthode radiométrique utilise une source au tungstène au lieu d'une lampe au xénon. On doit la fixer devant l'entrée du monochromateur à l'excitation afin d'éviter toute fluctuation d'intensité pendant la calibration. Ensuite, on installe le radiomètre dans le compartiment à échantillon. Un miroir perforé avec un écran diffusant (ceux de la section précédente) occupe la position de l'échantillon. Il dirige le faisceau incident vers le radiomètre. L'étalement du faisceau doit emplir toute la surface active du détecteur. On achemine le signal vers le micro-ordinateur. Il enregistre un spectre d'émission non corrigé de la lampe. Afin d'obtenir son spectre exact, on applique les facteurs de corrections fournis par la compagnie du radiomètre.

Toutefois, il faut noter un point délicat dans cette opération. La focalisation du faisceau incident doit se faire 1 mm à côté de la perforation.

Alors, deux choix s'offrent à nous: déplacer le faisceau d'excitation par le pivot du miroir situé au sein du compartiment d'optique ou glisser le miroir perforé. Dans les deux cas, on se démarque un peu des conditions idéales. Afin de minimiser ces problèmes, une solution a été élaborée. Le miroir est glissé pour que le faisceau n'éclaire pas le trou. Suite à la prise de mesures radiométriques, le repositionnement du miroir se fait avec le laser d'enlignement (voir section précédente). Le faisceau d'excitation est ensuite légèrement déplacé à côté du trou mais la lumière réfléchie s'étale maintenant sur la surface blanche. Celle-ci diffuse la lumière dont une partie passe par le petit tube inséré dans le miroir. À sa sortie, la lumière résultante se comporte de la même manière que la fluorescence.

On prend alors le spectre d'émission avec un polariseur afin d'éviter l'anomalie de Wood. Toutefois, cette prise de mesure pose aussi sa part de problèmes. Les deux monochromateurs doivent balayer rigoureusement à la même longueur d'onde. Dans ce but, leur calibration avec une lampe au mercure a été effectuée avec précision. Cependant, les limites mécaniques dans les engrenages d'entraînement des réseaux rendent le balayage à la même longueur d'onde presque impossible. Par conséquent, un logiciel a été créé et installé dans la mémoire de programmation du micro-ordinateur. Il fixe le monochromateur à l'excitation et déplace l'autre jusqu'à l'obtention d'une intensité maximum: ainsi les deux monochromateurs sont rigoureusement accordés.

Le spectre d'émission mesuré par le tube photomultiplicateur est alors emmagasiné en mémoire. La dernière étape consiste à diviser le spectre d'émission corrigé de la chambre à échantillon par celui mesuré par le tube photomultiplicateur. On trouve enfin les facteurs de correction du spectrofluorimètre à l'émission.

La comparaison des deux courbes de correction obtenues par la méthode de la lampe standard et celle du radiomètre démontre leur validité. En effet, l'écart entre elles ne dépasse pas 5%. Ainsi, pour les corrections, l'une ou l'autre méthode serait satisfaisante. Toutefois, la simplicité d'utilisation de la lampe standard la favorise grandement.

D'autre part, l'utilisation du polariseur à l'émission limite la détection de faible fluorescence. Ainsi, on conseille l'utilisation de la lampe standard sans polarisation à condition que l'échantillon soit lui-même isotrope. La figure 6 montre la courbe utilisée pour les corrections.

E) SPECTROPHOTOMÉTRIE D'ABSORPTION

Tous les spectres d'absorption de films de Langmuir-Blodgett de chlorophylle *a* pure ou mélangée avec du cytochrome *c* contenus dans le présent ouvrage proviennent d'un appareil Perkin-Elmer modèle 553.

La reproductibilité des échantillons dépend de la précision dans le positionnement du film dans le faisceau d'analyse. Ainsi, des perforations dans le support de Teflon fixent sa position dans le compartiment à échantillon.

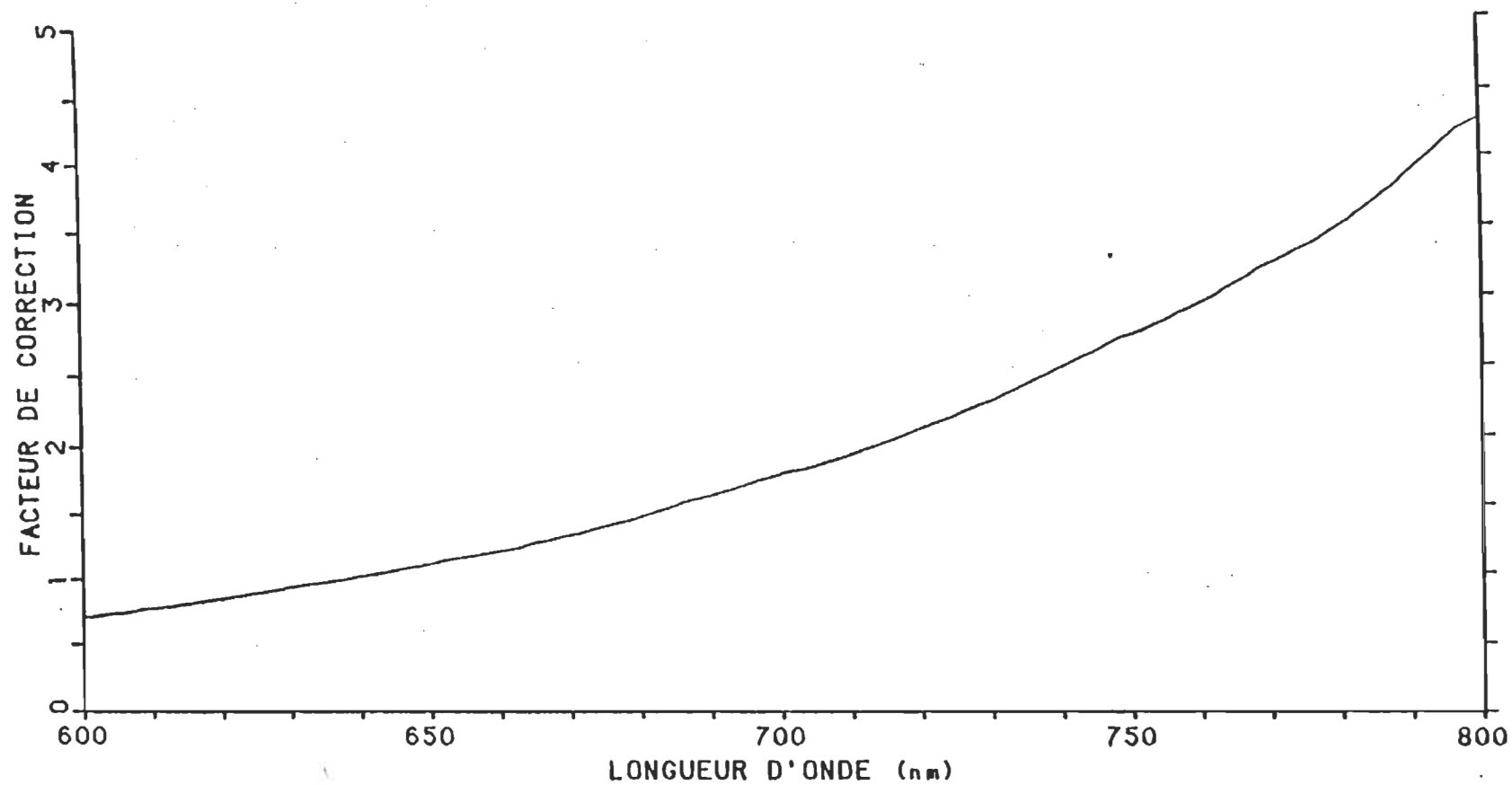


Figure 6: Facteurs de correction en fonction de la longueur d'onde à l'émission.

La précision de l'échelle des longueurs d'onde a été vérifiée avec un standard solide, le didymium. L'écart entre les valeurs publiées et les résultats se situaient en-dessous du nanomètre.

La précision de la mesure d'absorbance a aussi fait l'objet de quelques démarches. En effet, basé sur un ouvrage de standardisation (Vinter, 1981), des solutions standard ont été préparées pour couvrir toute l'échelle des longueurs d'onde de 350 à 800 nm. Ces solutions comprenaient du dichromate de potassium, du sulfate de cuivre pentahydraté, du nitrate de nickel hexahydraté et du sulfate d'ammonium et de cobalt. Encore une fois, les résultats démontrèrent l'exactitude de l'appareillage.

En conclusion, aucun ajustement ne fut apporté au spectrophotomètre car il répondait à nos exigences les plus strictes.

Voici la méthode utilisée pour la mesure des spectres d'absorption des films monomoléculaires: on place une lame de quart nettoyée par photolyse, pyrolyse et ozonolyse dans le faisceau d'analyse (voir section II, f.2) et on enregistre son spectre par rapport à l'air dans la mémoire du spectrophotomètre. C'est un spectre de fond. Ensuite, on remplace la lame de quartz par un échantillon. Automatiquement, on soustrait du spectre de l'échantillon le spectre de fond, et le résultat est transféré vers un ensemble informatique. La largeur de fente était de 1 nm et la vitesse de balayage de 120 nm par minute.

Il faut noter que cette procédure est préférée à celle où on compare le faisceau d'analyse avec un faisceau de référence traversant une lame de quartz. La principale raison réside dans le positionnement rigoureusement identique de l'échantillon par rapport à la référence.

F) PRÉPARATION DES FILMS DE LANGMUIR-BLODGETT

La majorité de la littérature issue du groupe de recherche du Dr Leblanc concerne la technique de Langmuir-Blodgett et son utilisation dans des domaines variés. Le présent ouvrage s'inscrit dans son évolution par l'introduction de techniques photo-physiques de pointe afin de mieux étudier les films minces.

1) Purification de l'eau

Le substrat liquide à la base de l'étalement du mélange chlorophyllien doit correspondre à des critères de pureté absolue, et ce pour trois raisons importantes:

- les impuretés peuvent devenir des noyaux de cristallisation;
- elles peuvent éteindre la fluorescence;
- elles réagissent aux composants du film mince.

L'obtention d'une telle qualité nécessite deux étapes: la déminéralisation et la distillation.

a) La déminéralisation

Il s'agit ici de filtrer l'eau jusqu'à élimination des minéraux. L'eau de l'aqueduc municipal de Trois-Rivières subit dans un premier temps une filtration primaire avec deux filtres poreux en série. Ils retiennent les impuretés les plus grossières. Ensuite, un ensemble de filtres de marque "Sybron-Barnstead nanopure", constitué de quatre cartouches disposées en série, élimine tour à tour les impuretés organiques, minérales et ioniques.

L'eau atteint alors une résistivité de $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$. Finalement, une bonbonne de 18 litres en verre la reçoit.

b) La distillation

L'eau déminéralisée contient toujours d'autres types d'impuretés. Il faut alors les enlever sans laisser s'y introduire des corps étrangers. Une colonne à distillation en quartz à deux étages Heraeus-Quartzschmelze GMBH type BI-18 apporte une réponse satisfaisante à ce problème. Seul le quartz entre en contact avec l'eau. Des bouteilles de 2 litres en verre recueillent ce précieux liquide.

2) Nettoyage des lames de quartz

La lame de quartz prélève la monocouche de la surface de l'eau selon la technique de Langmuir-Blodgett. La pureté de sa surface joue un rôle clef dans les résultats finals. En effet, on connaît bien la grande sensibilité de la spectrofluorométrie et plus encore, celle de la durée de vie de fluorescence. La moindre trace d'acide pourrait avoir des conséquences désastreuses sur nos résultats.

Le nettoyage de sa surface débute avec un bain d'acide sulfurique additionné de "NO-Chromix" durant trois jours. Ensuite, on rince à l'eau déminéralisée puis à l'eau bidistillée. Dans cette dernière eau, une sonication de 15 minutes favorise le détachement des impuretés de la surface de quartz. Une immersion de 15 minutes dans une solution de 0,01N de NaOH neutralise les dernières traces d'acide. Un autre rinçage à l'eau déminéralisée et à l'eau bidistillée, suivi d'une sonication de 15 minutes, enlève la base elle-même. Les lames sont laissées dans

la dernière eau de rinçage. Enfin, on sèche la lame de quartz avec de l'azote juste avant son usage. Ces lames sont alors hydrophiles.

Bien qu'empirique, cette recette donne de bons résultats pour un nombre limité de cycles d'utilisation. De fait, la surface de quartz ressemble d'avantage à un enchevêtrement poreux de molécules d'oxyde de silice. Dans ces pores, les molécules de faible atomocité, comme les chromates, deviennent indélogeables. Il leur faut alors un traitement choc. On place les lames près d'une lampe de 1 000 W. Ainsi, elles subissent une atmosphère d'ozone à haute température et sont traversées par un rayonnement UV et IR intense. Ce traitement reconstitue leur propriété hydrophile. Toutefois, le prix prohibitif de cette méthode explique son usage modéré.

On doit souligner l'importance de la neutralisation au NaOH dans le processus de nettoyage. L'anecdote suivante en illustre la nécessité. Dans une longue série de mesures de durées de vie de fluorescence avec des monocouches de chlorophylle *a*, la première moitié seulement comprenait des lames neutralisées. La fluorescence de ce groupe déclinait avec une seule composante rapide ($\leq 0,2$ ns). Le deuxième groupe avait en plus une deuxième composante de 4 ns. Il ne fait aucun doute que cette composante provient de la décomposition de la chlorophylle *a* à la surface de la lame.

3) Bain de Langmuir

Il est l'élément central de toute la méthode de Langmuir-Blodgett. Le mémoire de maîtrise de G. Munger (1979) résume la technique ainsi que ses menus détails. Afin d'éviter la répétition, on opte pour un aperçu général.

Une cuve recouverte d'une feuille de Teflon est la pièce centrale de cet ensemble. On y verse de l'eau jusqu'au comble. Cette sous-phase aqueuse est un tampon phosphate (10^{-3} M, pH 8,0) déoxygené par barbotage d'azote et maintenu à $17 \pm 1^\circ\text{C}$. Une balance à film moléculaire de Langmuir contrôle la pression de surface de la monocouche à la surface de l'eau.

Cette balance à fil de torsion nous permet de préparer des monocouches à 20 mN m^{-1} . D'autre part, une barrière mobile ferme le plan d'eau. Un moteur couplé avec un système de rouages déplace avec régularité cette barrière. Sur ce plan, on étale une solution de chlorophylle. Après l'évaporation du solvant d'étalement, il ne reste que les pigments à la surface. Leur distribution ressemble probablement à des filaments plutôt qu'à un gaz homogène. Quand la barrière approche du flotteur, l'espace libre diminue peu à peu d'où accroissement de pression. On atteint ainsi le collapse. En pratique, les monocouches préparées dans cet ouvrage ont une pression superficielle de 20 mN m^{-1} .

4) Transfert sur lame

Ces étapes précédentes préparent le processus du transfert de la monocouche de la surface de l'eau à la surface de quartz (voir figure 7). Ceci est l'essence même de la technique de Langmuir-Blodgett. On suspend les lames à un support lui-même relié à un système hydraulique. Celui-ci assure une descente et une remonté régulière de la lame à une vitesse de 1 cm/min . Le transfert a lieu lors de la remonté. Le déplacement de la barrière maintient la pression constante. Ceci produit généralement des monocouches régulières et bien caractérisées. Toutes ces manipulations se sont déroulées dans une atmosphère d'azote et avec un éclairage vert tamisé. On maintient l'humidité relative à 40%.

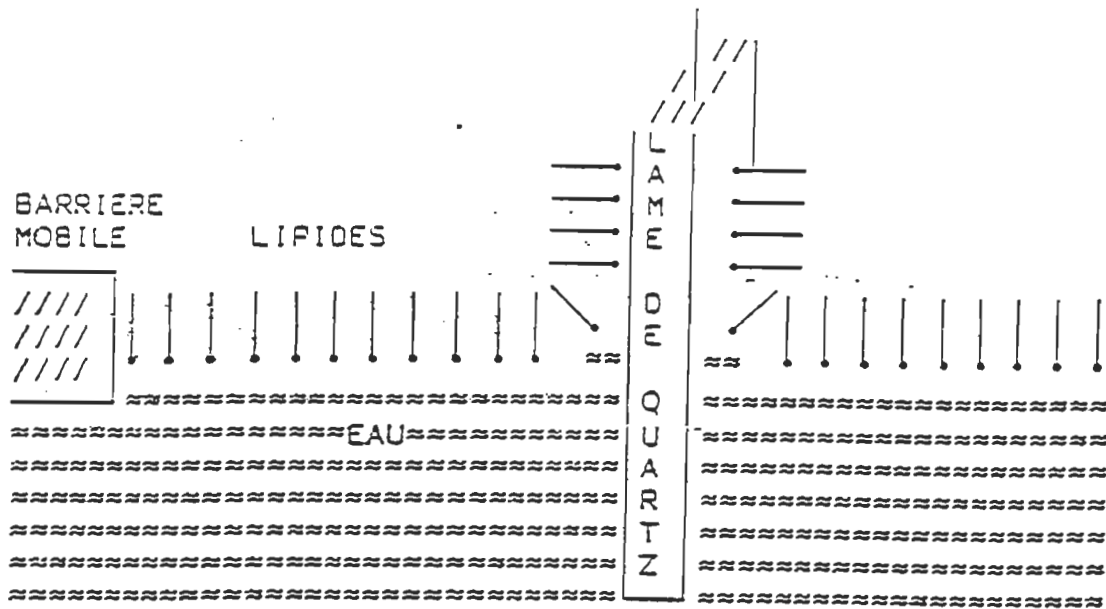


Figure 7: Illustration d'un transfert sur lame.

La fabrication de multicouches de chlorophylle *a* requiert une préparation supplémentaire. En effet, on doit rendre la surface de quartz hydrophobe par le transfert de cinq monocouches d'arachidate de cadmium. Par la suite, on plonge la lame dans une monocouche de chlorophylle *a*. Cette fois-ci, la déposition a lieu à la descente et à la remontée. On obtient donc deux monocouches par cycle de plongée.

5) Mélanges chlorophylle *a*-cytochrome *c*

Afin d'étudier l'auto-organisation entre la chlorophylle *a* et le cytochrome *c*, un montage spécial a été conçu et fabriqué au Centre de recherche. Il diffère du bain de Langmuir classique à barrière mobile par le double-prisme. Celui-ci repose au fond du bain et son arête supérieure affleure la surface de l'eau. Ainsi, après l'injection de cytochrome *c* dans la sous-phase, le déplacement horizontal du prisme oblige la protéine à passer à proximité de la monocouche de chlorophylle *a*. Ce rapprochement rend l'auto-organisation possible. La thèse de doctorat de F. Lamarche (1988) explique en détail la réalisation de ces mélanges pigment-protéine.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Cette section résume les résultats de nos mesures expérimentales. La première partie (III, A) présente les mesures réalisées en solution. On vérifie de ce fait l'exactitude des appareils impliqués dans les mesures optiques et l'état de nos produits par comparaison avec d'autres sources.

Ensuite, on présente les résultats sur les monocouches de la chlorophylle *a* en film de Langmuir-Blodgett (III, B). La littérature rapporte des spectres d'absorption et de fluorescence à l'interface gaz-eau. Ces techniques servent de point de repère pour des mesures de déclin de fluorescence des monocouches.

La partie suivante (III, C) contient toutes les mesures spectroscopiques de la chlorophylle *a* en monocouches mixtes. Les mesures de durées de vie de fluorescence concernent aussi bien les films Langmuir-Blodgett que les films à la surface de l'eau.

Ensuite, plusieurs expériences réalisées sur les interactions de la chlorophylle *a* avec les protéines sont compilées. On a utilisé une protéine bien caractérisée: le cytochrome *c*.

Enfin, on présente des résultats de déclin de fluorescence de la chlorophylle *a* mélangée avec un phospholipide à l'interface azote-eau. Pour la première fois, on étudie le mélange chlorophylle *a*-galactolipide directement à l'interface azote-eau.

A) MESURES EN SOLUTION DE LA CHLOROPHYLLE *a*

Les propriétés spectroscopiques du monomère de la chlorophylle *a* dépendent de la polarité du milieu. Afin de vérifier cet effet, des mesures ont été prises par absorption, fluorescence et déclin de fluorescence dans le benzène et l'éther.

1) Absorption

Le spectre d'absorption de la chlorophylle d'algue bleue diluée dans le benzène à une concentration de 10^{-6} M est présenté à la figure 8. On observe des maxima à 431 et 666 nm. Le rapport d'absorption de la bande bleue et rouge est de 1,24. La bande satellite du bleu pointe à 414 nm. Notons qu'il y a une petite bande à 734 nm. On a vérifié qu'elle est reproductible et qu'elle ne provient pas d'artefacts instrumentaux.

La dilution de la chlorophylle *a* d'algue bleue dans l'éther diéthylique à la même concentration provoque un déplacement hypsochrome à 428 et 661 nm pour les bandes principales (voir figure 9). Dans ce cas, leur rapport d'absorbance est de 1,27. La petite bande à 734 nm n'apparaît plus.

Ces résultats cadrent bien avec l'ensemble des valeurs parues dans la littérature à l'exception de cette petite bande à 734 nm. Le tableau 5 en fait la liste. La position des bandes d'absorption concordent bien mais le rapport des absorptivités maximales diffèrent d'environ 5%.

Il faut noter que la chlorophylle *a* diluée dans l'éther provient de l'algue bleue, dépourvue de chlorophylle *b*.

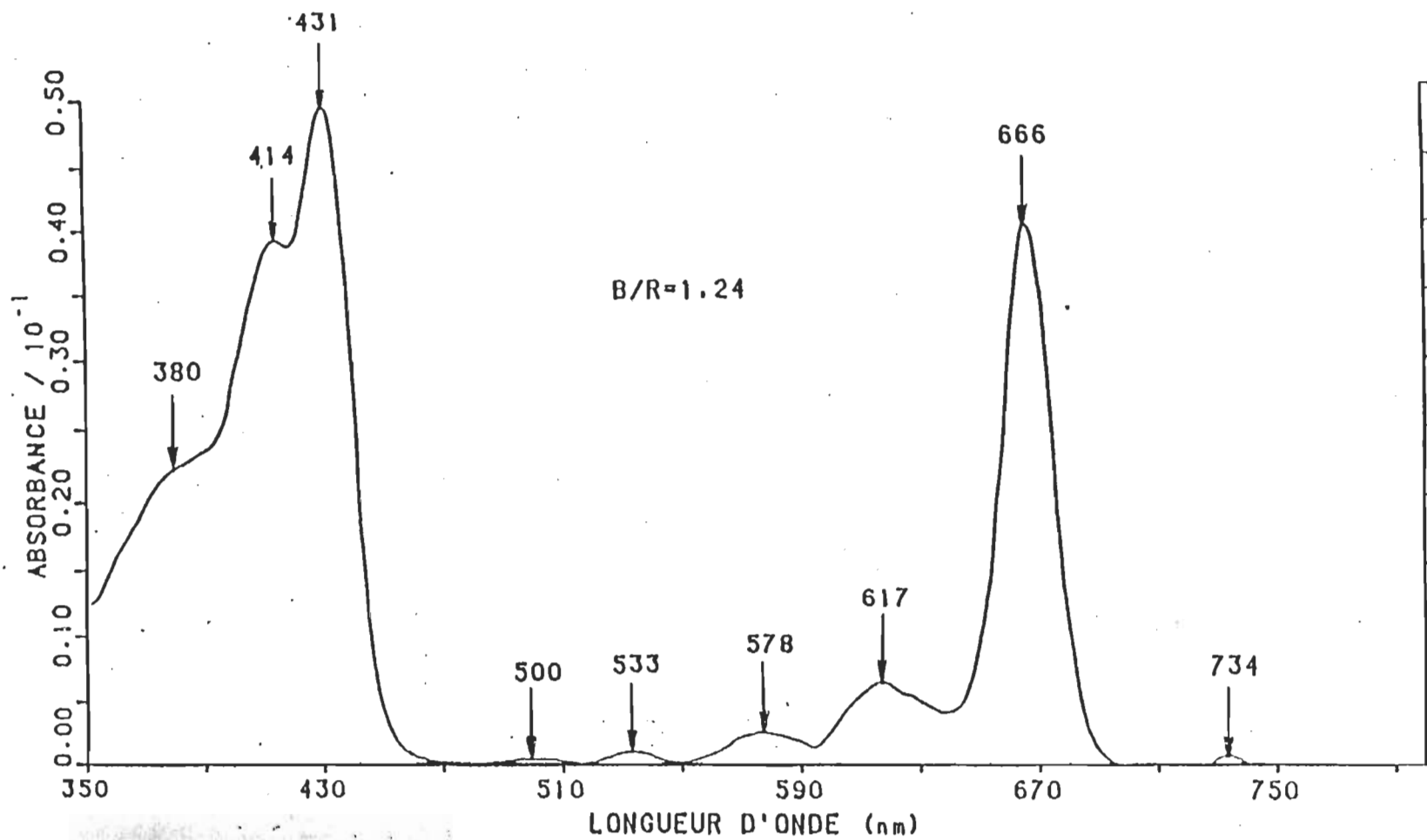


Figure 8: Spectre d'absorption de la chlorophylle a dans le benzène (parcours optique, 1 cm).

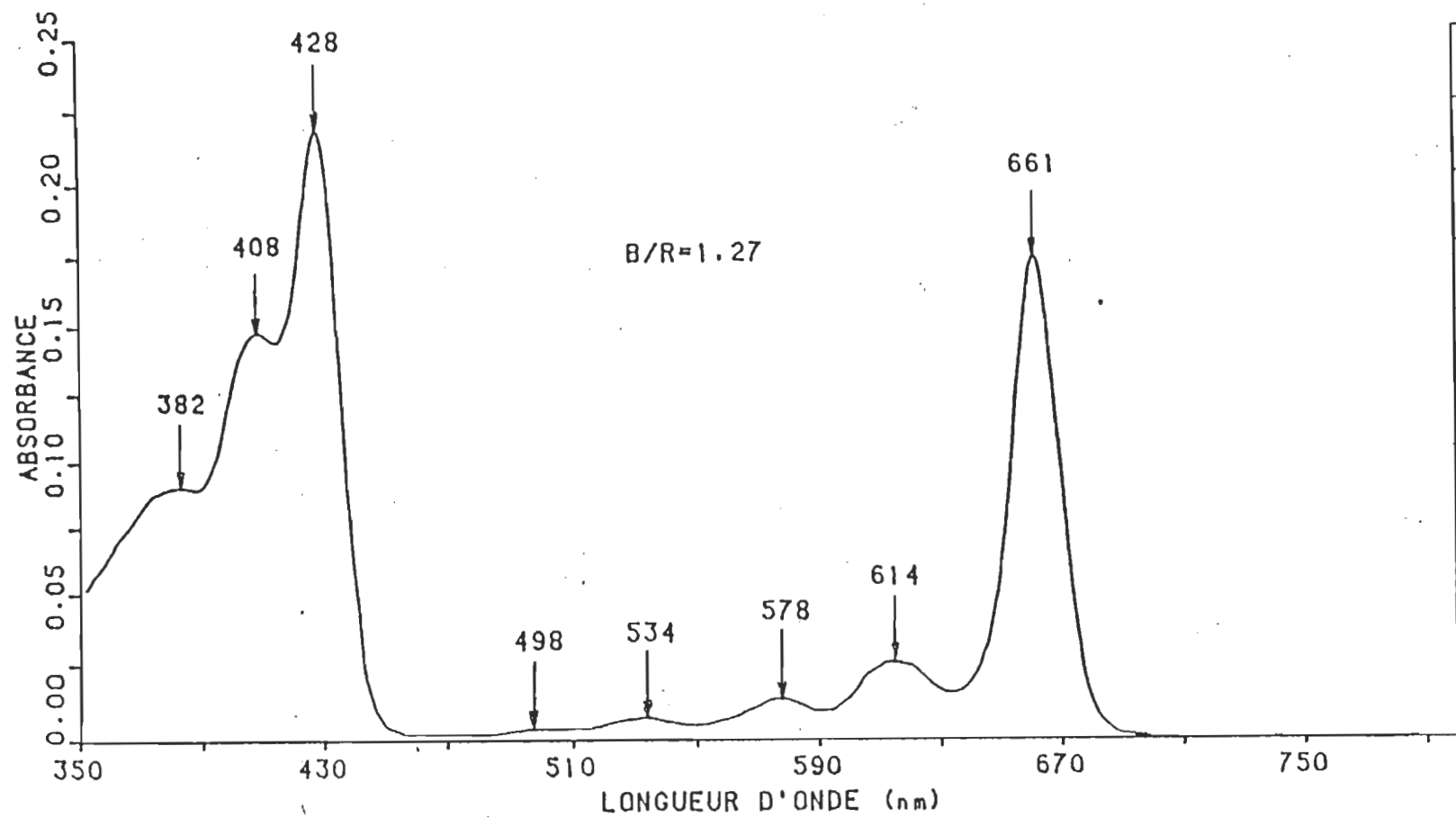


Figure 9: Spectre d'absorption de la chlorophylle a dans l'éther.

TABLEAU 5

Position et rapport des maxima d'absorption et de leur rapport d'absorbance
de la chlorophylle *a* en solution

Solvant	Bande de Soret (nm)	Bande rouge (nm)	Rapport des absorbances	Référence
Benzène	431	666	1,24	Ce projet
Éther	428	661	1,27	Ce projet
Benzène	433	666	1,29	Seely et Jensen, 1965
Benzène	—	666	---	Szalay <i>et al.</i> , 1974
Éther	429	661	1,31	Seely et Jensen, 1965
Éther	430	666	1,34	Szalay <i>et al.</i> , 1973
Éther	430	662	1,31	Goedheer, 1966

2) Fluorescence

Les spectres d'excitation (figure 10) démontrent le fonctionnement correcte de l'appareil entre 350 et 700 nm. L'émission a été prise à 730 nm. L'allure générale de même que la position des pics principaux, 432 et 667 nm correspondent bien avec les données obtenues à partir du spectre d'absorption (figure 8).

Les spectres d'émission de la chlorophylle *a* diluée dans l'éther et le benzène sont présentés aux figures 11 et 12. On observe une bande principale à 667 et 673 nm respectivement. Ces résultats concordent avec ceux déjà publiés (voir tableau 6). Il faut noter aussi l'existence d'une petite bande à 633 nm dans le benzène. Dans l'éther, cette bande n'existe plus. Il ne subsiste qu'un très faible épaulement à 625 nm.

3) Durée de vie de fluorescence

À la figure 13, on peut voir le profil d'émission en fonction du temps de la lampe à éclair et le déclin de la fluorescence pour la chlorophylle *a* dans l'éthanol. L'ordinateur calcule la convolution du profil de la lampe par une exponentielle et la compare avec la courbe expérimentale. Il considère l'écart et refait d'autres simulations jusqu'à l'obtention d'un ajustement adéquat. Les paramètres choisis dans la dernière itération constituent les valeurs acceptées de durée de vie de fluorescence.

Le tableau 7 compare nos résultats avec ceux de la littérature. La valeur de 5,85 ns dans l'éther correspond aux 5,87 ns de Connolly *et al.* (1982) obtenues avec un

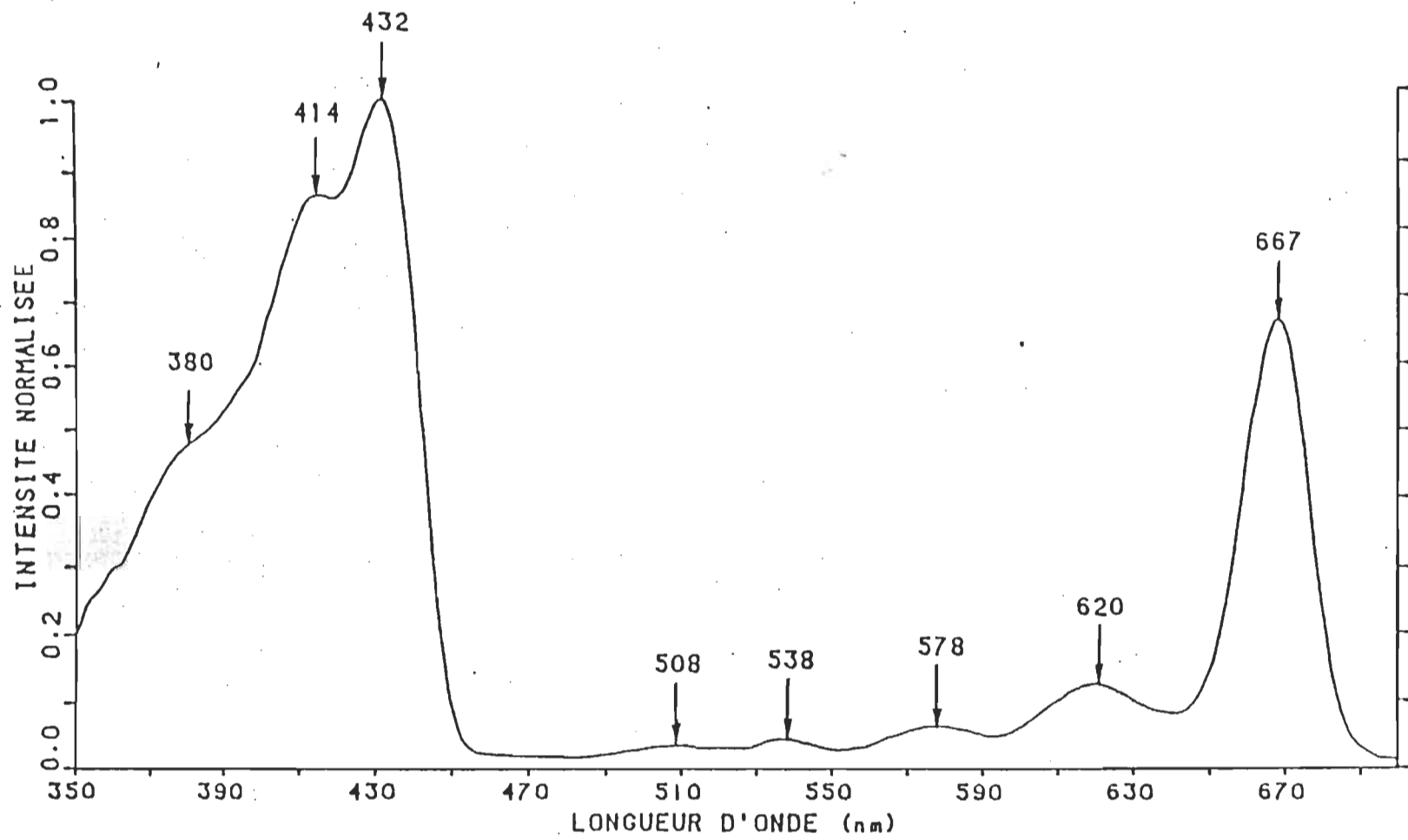


Figure 10: Spectre d'excitation de la chlorophylle a dans le benzène.

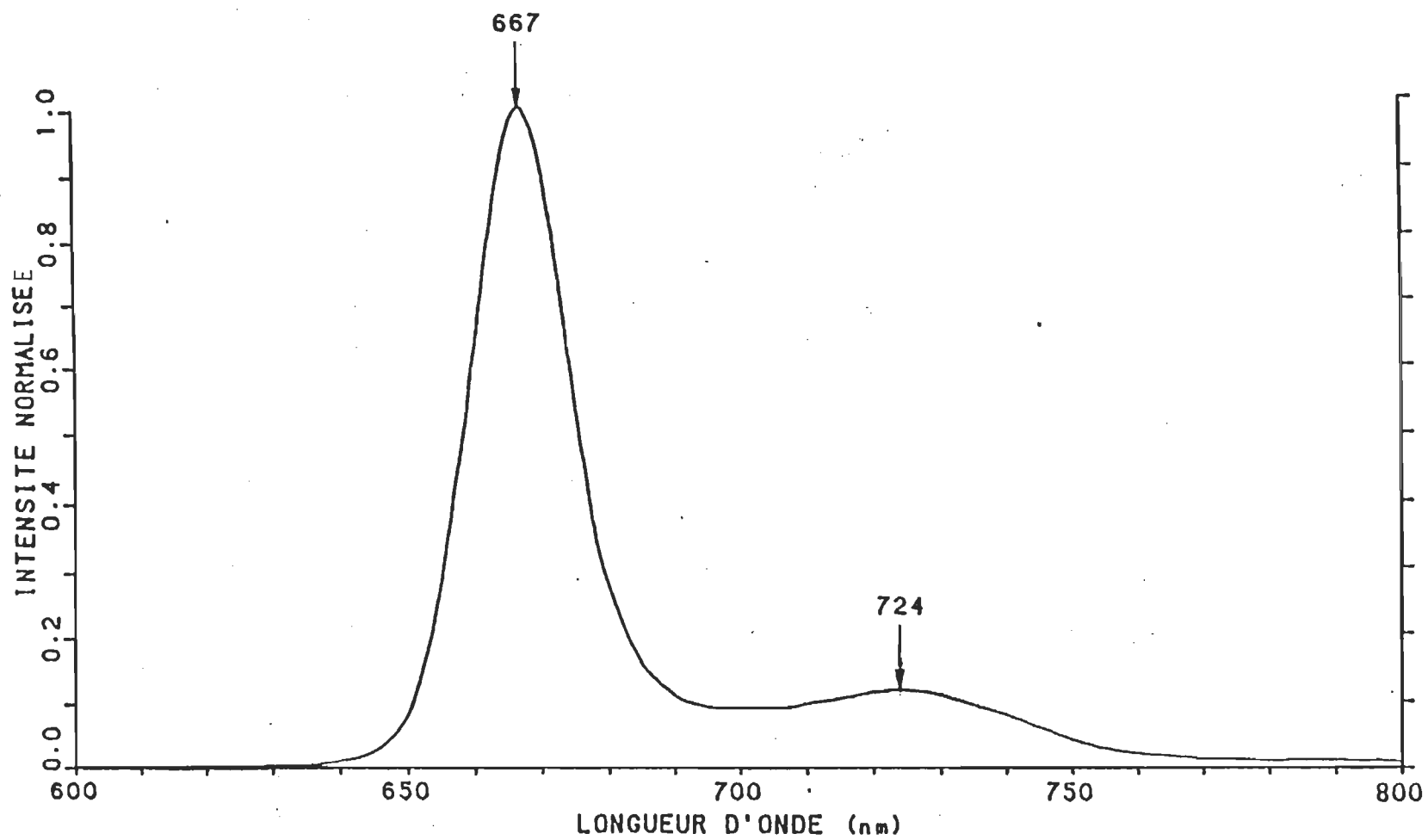


Figure 11: Spectre d'émission de la chlorophylle a dans l'éther.

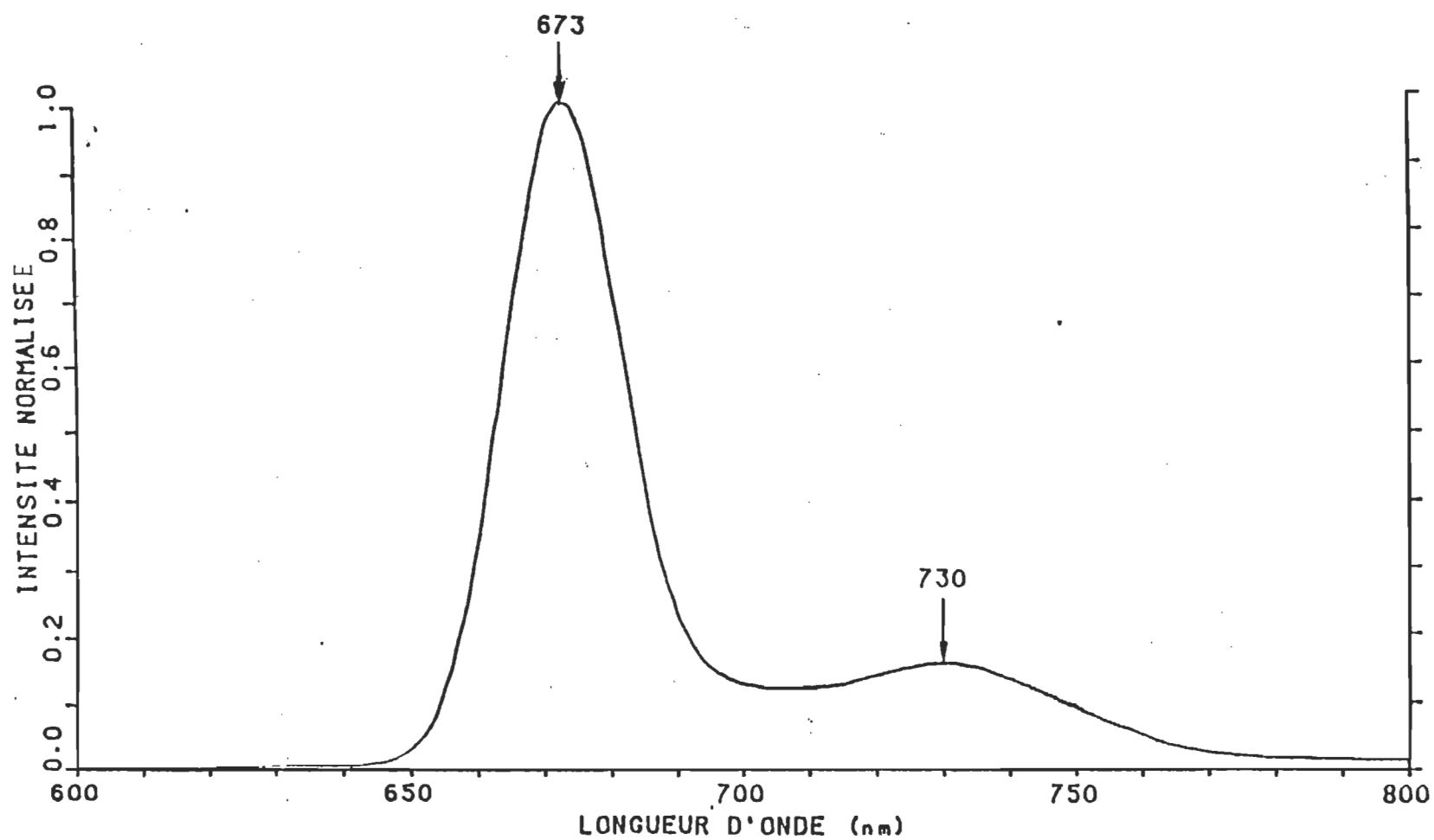


Figure 12: Spectre d'émission de la chlorophylle a dans le benzène.

TABLEAU 6

Position des maxima d'émission de la chlorophylle *a* en solution

Solvant	Maximum (nm)	Référence
Éther	667	Ce projet
Benzène	673	Ce projet
Benzène	671	Szalay <i>et al.</i> , 1974
Éther	666	Szalay <i>et al.</i> , 1974
Éther	669	Goedheer, 1966

22-100-00 10.40 DELAY V. 2.3
CHLA/ETOH 10-0M 8440 F1000 .1714 ETOH1
A1-0.128 #0.021 T1-0.181 #0.010

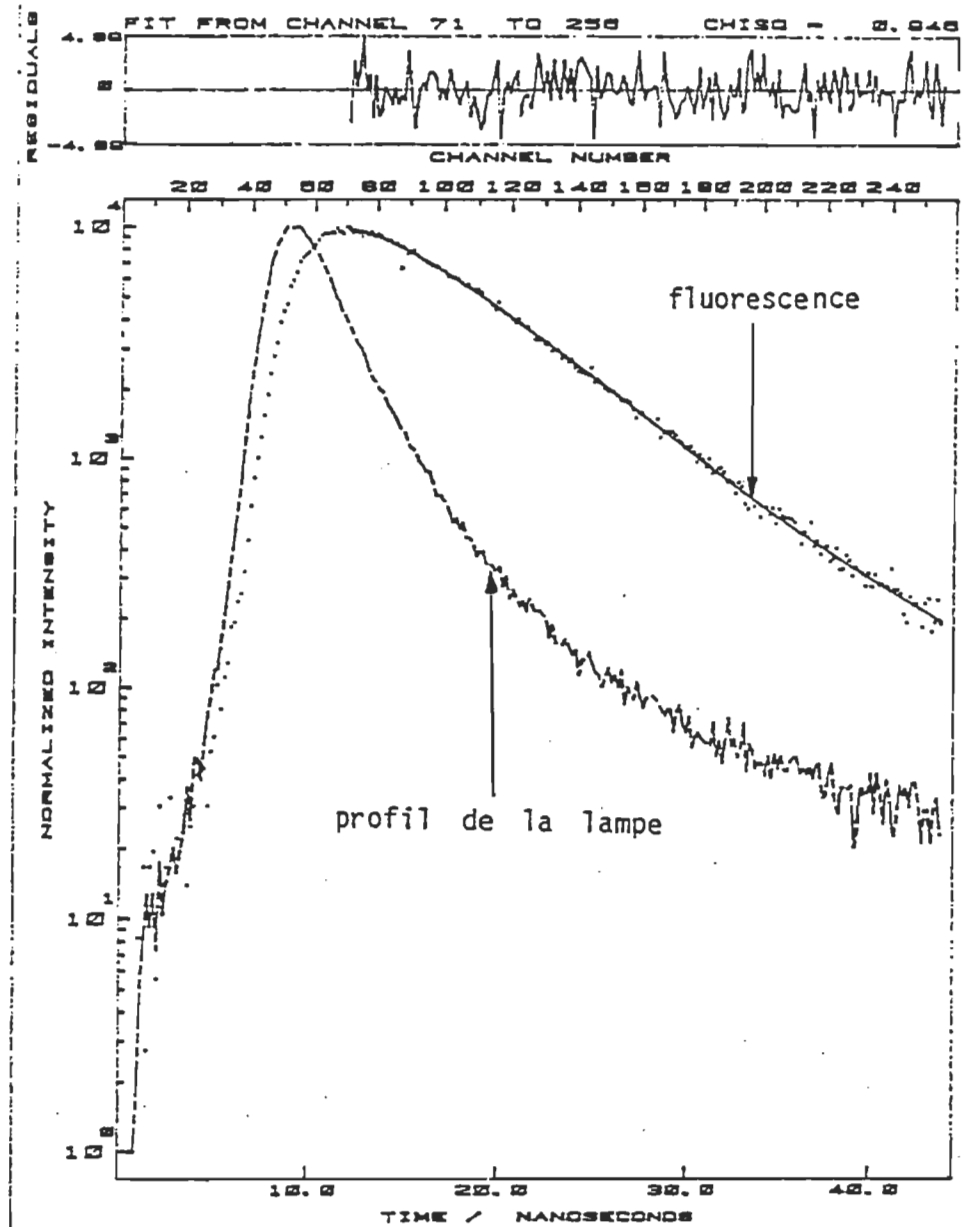


TABLEAU 7

Durée de vie de fluorescence de la chlorophylle *a* en solution

Solvant	τ_f ns	Méthode	Référence
Éther	$5,85 \pm 0,05$	CP	Ce projet
Benzène	$4,89 \pm 0,03$	CP	Ce projet
Éthanol	$6,16 \pm 0,05$	CP	Ce projet
Éthanol	4,9	CP	Gurinovitch <i>et al.</i> , 1968
Éthanol	6,3	FP	Butler et Norris, 1963
Éthanol	5,16	FP	Müller <i>et al.</i> , 1969
Éther	3,9	Flash	Brody et Rabinovitch, 1957
Éther	2,5	Phase	Butler et Norris, 1963
Éther	5,0	Phase	Terenin <i>et al.</i> , 1966
Éther	5,87	CP	Connolly <i>et al.</i> , 1982
Éther	6,7	CP	Avarmaa <i>et al.</i> , 1977
Éther	4,9	CP	Singhal et Rabinovitch, 1969
Éther	6,1	CP	Dzagarov <i>et al.</i> , 1972
Éthanol	4,9	CP	Gurinovitch <i>et al.</i> , 1968
Éthanol	6,3	FP	Butler et Norris, 1963
Éthanol	5,16	FP	Müller <i>et al.</i> , 1969
Méthanol	5,44	CP	Connolly <i>et al.</i> , 1982
Méthanol	6,12	IS	Kaplanova et Cermak, 1981
Toluène	6,05	CP	Connolly <i>et al.</i> , 1982
EPA	6,38	CP	Bélanger, 1982
Chloroforme	0,8	ND	Shapira <i>et al.</i> , 1975

CP: comptage de photons

IS: impulsion simple

ND: impulsion laser et caméra à balayage de fente

FP: fluorimètre à phase

montage identique. Dans l'ensemble, les durées de vie se situent autour de 6 ns en dépit de la grande diversité des montages utilisés.

Ceci prouve le bon fonctionnement du montage pour les études en solution. Il faut noter que les mesures dans le benzène ont donné un déclin plus rapide d'une nanoseconde. Ainsi, la polarité du solvant influence les résultats.

Globalement, les mesures d'absorption, de fluorescence et de durée de vie de fluorescence en solution se comparent bien avec la littérature (voir tableaux 5 à 7). Conséquemment, la qualité des pigments de même que le degré de pureté des solvants rejoignent ceux des autres équipes de recherche.

B) MESURE EN FILM DE LANGMUIR-BLODGETT

La chlorophylle *a* en film mince constitue un système modèle qui a fait l'objet de quelques publications (voir tableau 8). Il a été étudié par les diverses techniques de la spectroscopie. Ceci nous permet de comparer nos résultats avec ceux de la littérature.

1) Absorption

Le spectre d'absorption de la chlorophylle *a* en monocouche (une couche de chaque côté de la lame) est présenté à la figure 14. On observe deux maxima situés à 439 et 680 nm. Le rapport des absorbances est de 1,29.

Au tableau 8, on compare ces valeurs avec celles obtenues dans la littérature. Si on considère les plus récents résultats, l'accord est presque unanime. Malgré

TABLEAU 8

Position des maxima d'absorption de la chlorophylle *a* en film de Langmuir-Blodgett

Système	Bande de Soret (nm)	Bande rouge (nm)	Référence
---	435	675	Jacobs et Holt, 1954
---	420	675	Trurnit et Colmano, 1959
Air-eau	440	680	Bellamy <i>et al.</i> , 1963
N ₂ -quartz	440	680	Lamarche <i>et al.</i> , 1989
Air-eau	439	680	Heithier <i>et al.</i> , 1983
Air-eau	440	680	De Costa <i>et al.</i> , 1972
Air-quartz	440	680	Désormeaux et Leblanc, 1985

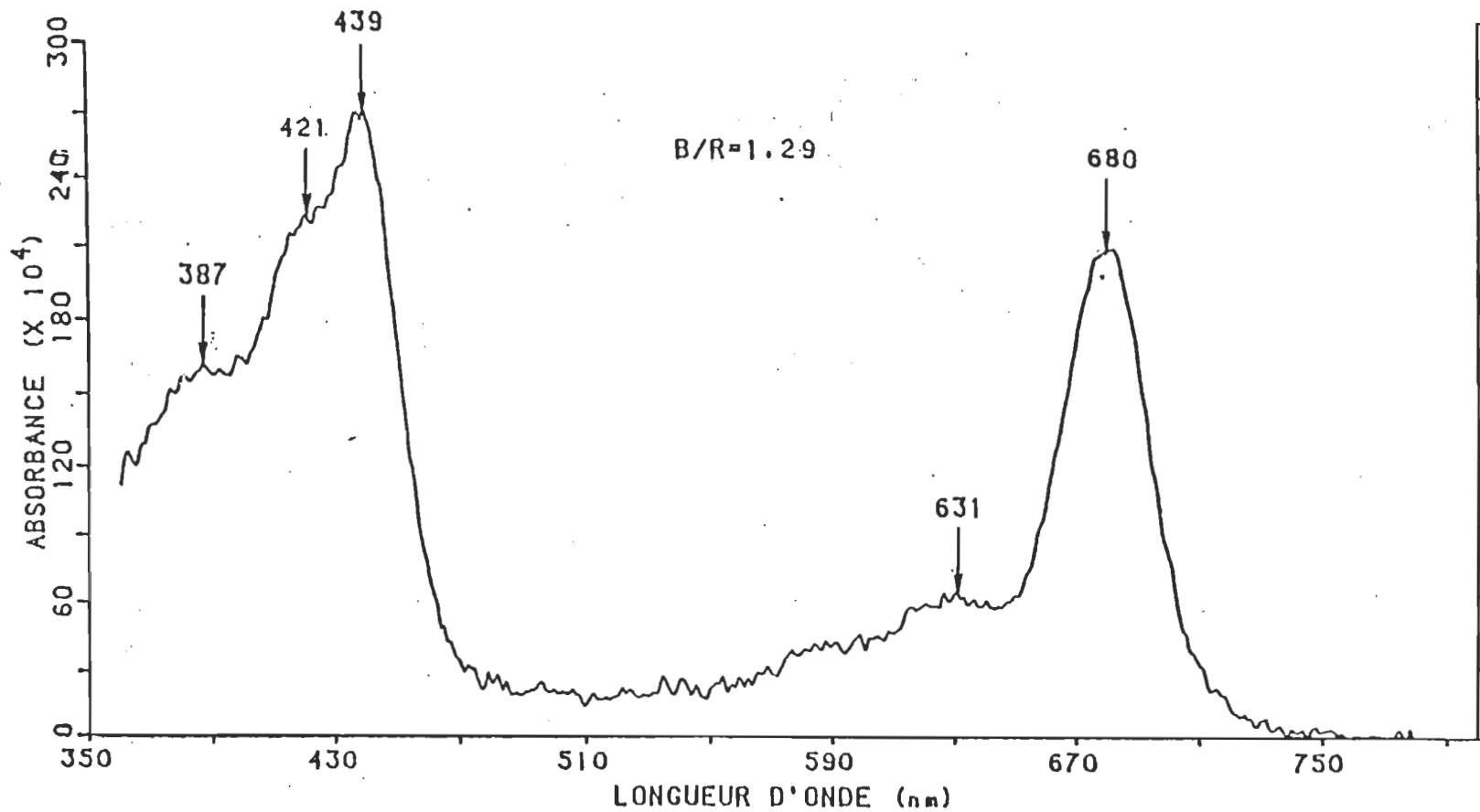


Figure 14: Spectre d'absorption de la chlorophylle a en film de Langmuir-Blodgett.

l'amélioration des techniques de purification, on note l'insensibilité des spectres d'absorption aux impuretés résiduelles.

La superposition des couches de chlorophylle *a* ne modifie pas sensiblement le spectre d'absorption. On constate à la figure 15 un léger élargissement de la bande dans le rouge mais les positions restent les mêmes. Ces observations concordent avec d'autres résultats déjà publiés (voir tableau 8).

2) Fluorescence

Le spectre d'excitation est montré à la figure 16. On observe la bande de Soret. Le maximum se situe à 438 nm et les autres bandes satellites à 421 et 387 nm. La superposition de monocouches n'a que peu d'effets sur la bande de Soret et aussi du massif dans le rouge. À la figure 17, on montre un spectre d'excitation de 500 à 700 nm pour 6 monocouches. L'émission est à 730 nm. Le maximum se situe à 677 nm et les bandes satellites à 635 et 592 nm. L'ensemble de ces valeurs concordent bien avec le spectre d'absorption des figures 14 et 15.

L'allure du spectre à l'émission d'une monocouche de chlorophylle *a* est illustré à la figure 18. Sa forme de large bande montre que l'énergie d'excitation ne réside pas dans un monomère isolé. Son sommet se situe à 702 nm et le rendement quantique est diminué de plusieurs ordres de grandeur (par rapport à la chlorophylle diluée en film de Langmuir-Blodgett). De plus, la gamme de longueur d'onde s'étend dans le proche infrarouge. Ceci rend la correction spectrale difficile car il n'y a pas de standard de fluorescence dans le proche infra-rouge.

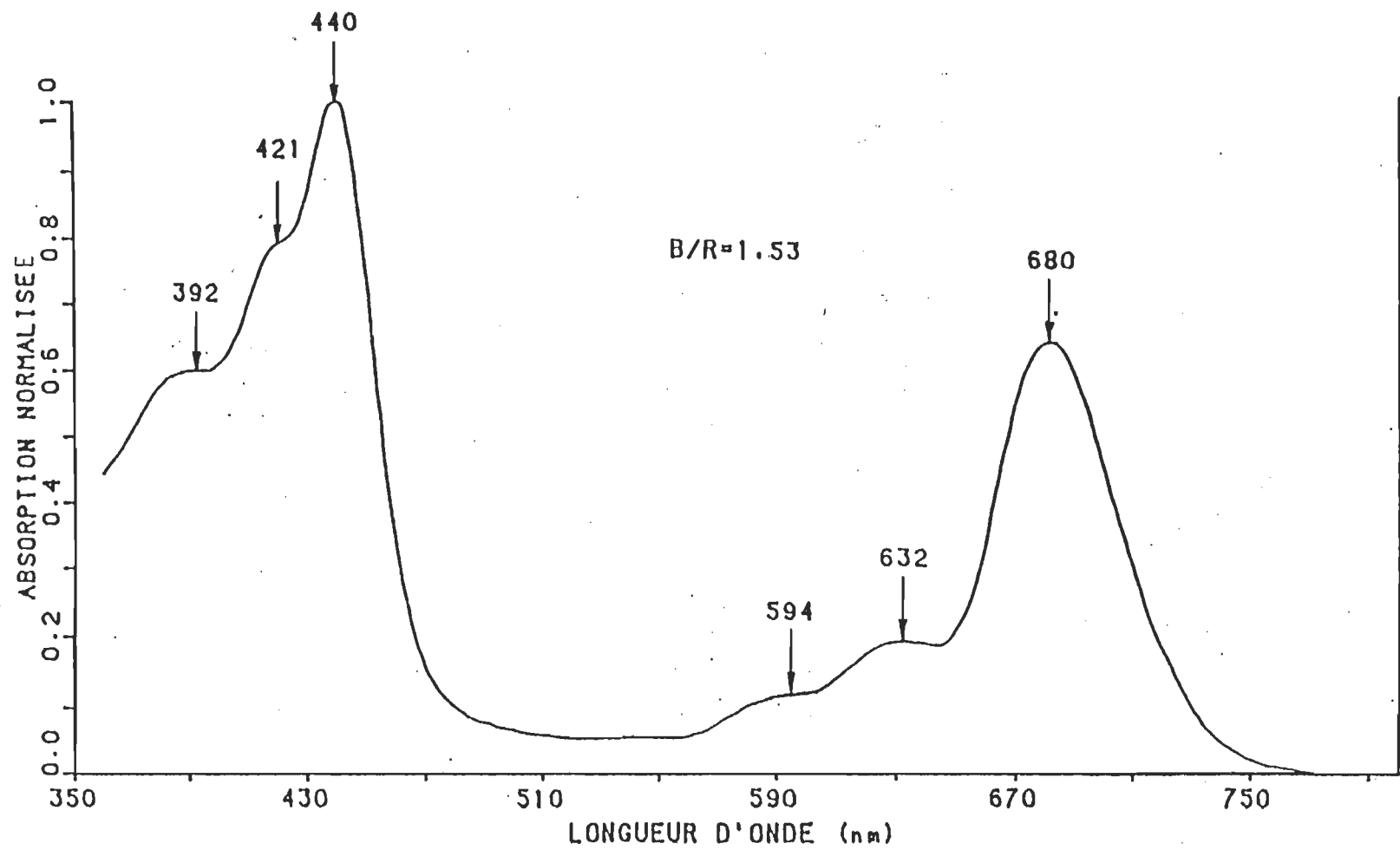


Figure 15: Spectre d'absorption de 6 monocouches de chlorophylle *a*.

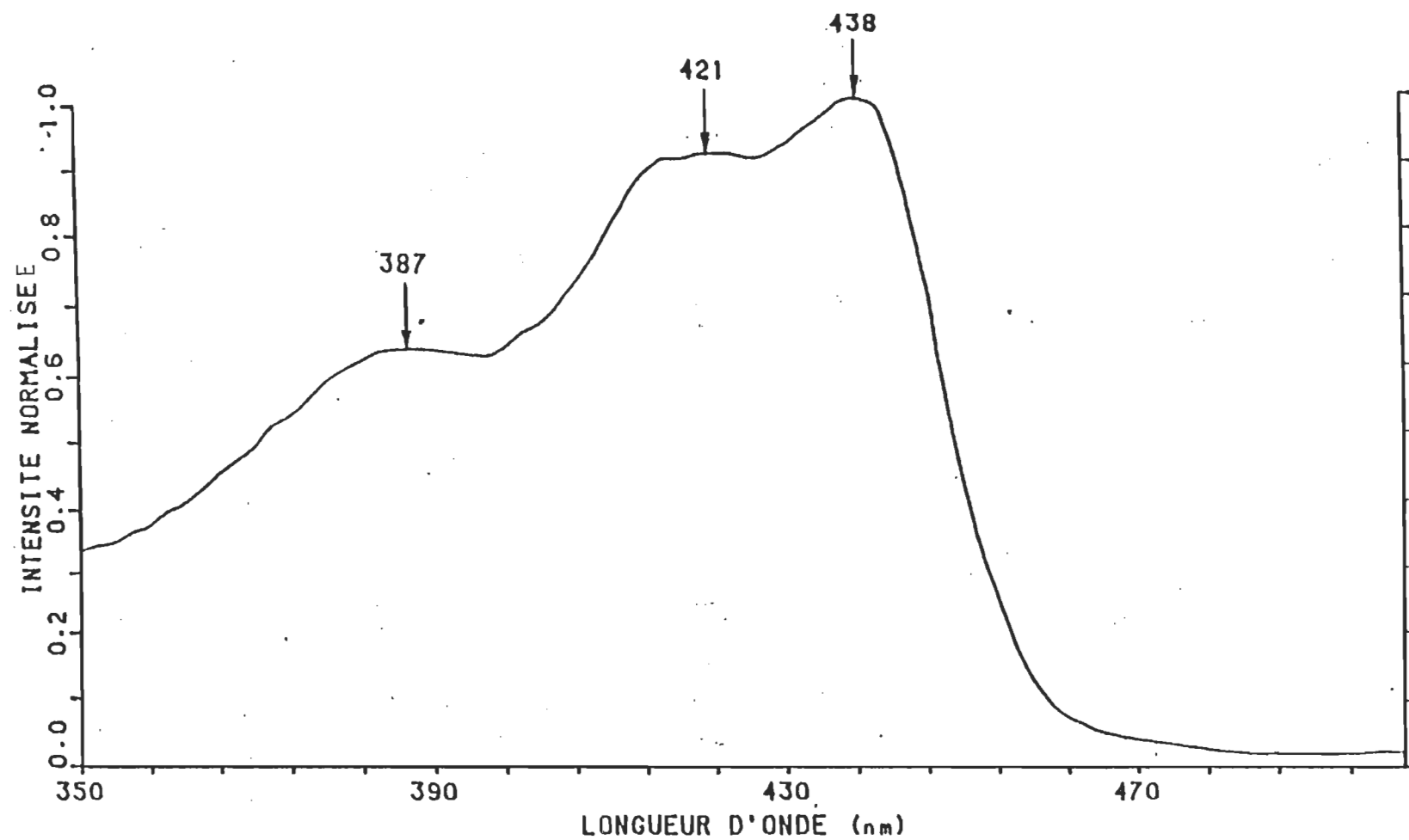


Figure 16: Spectre d'excitation de la bande de Soret de la chlorophylle a en film de Langmuir-Blodgett.

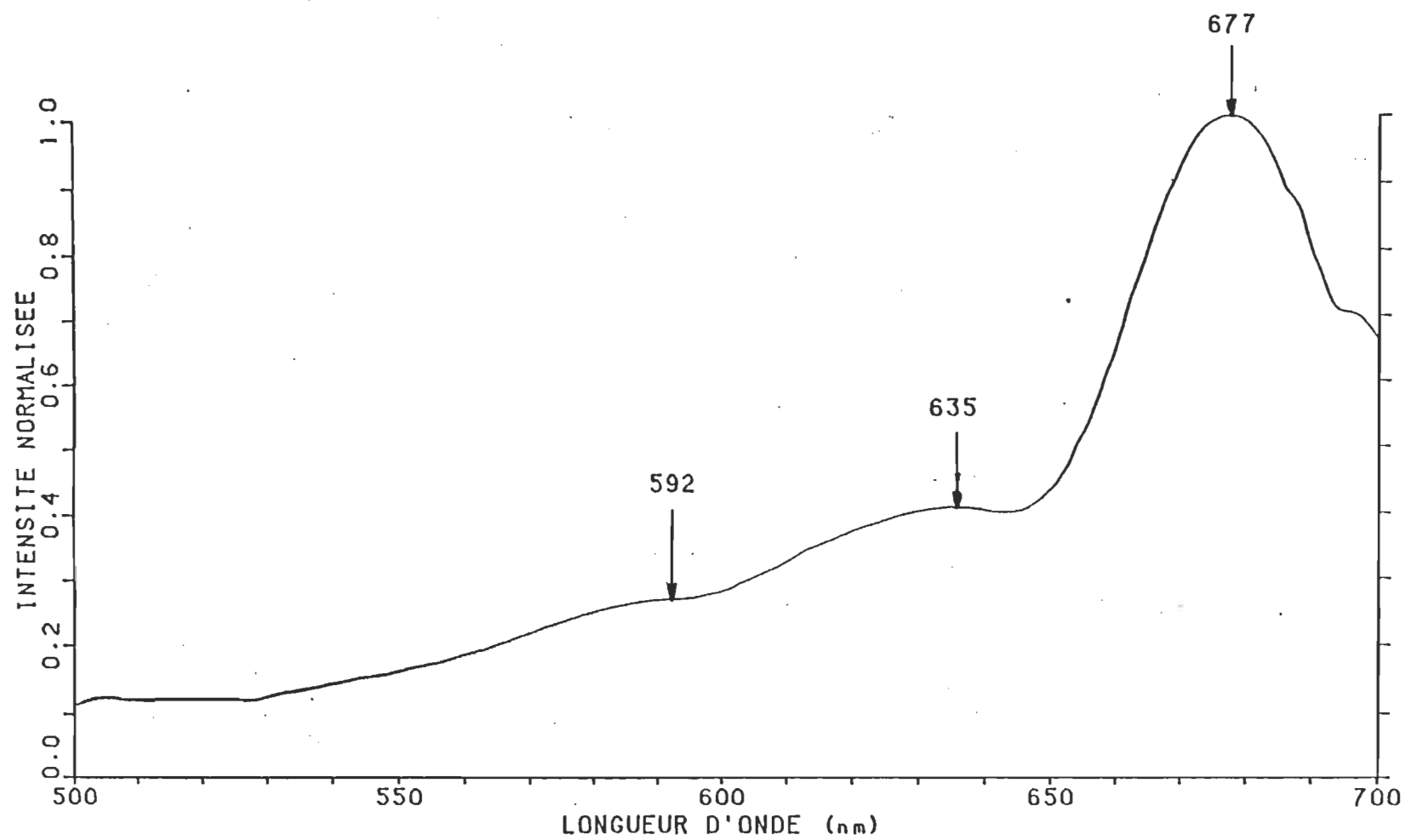


Figure 17: Spectre d'excitation dans le rouge de la chlorophylle a en film de Langmuir-Blodgett.

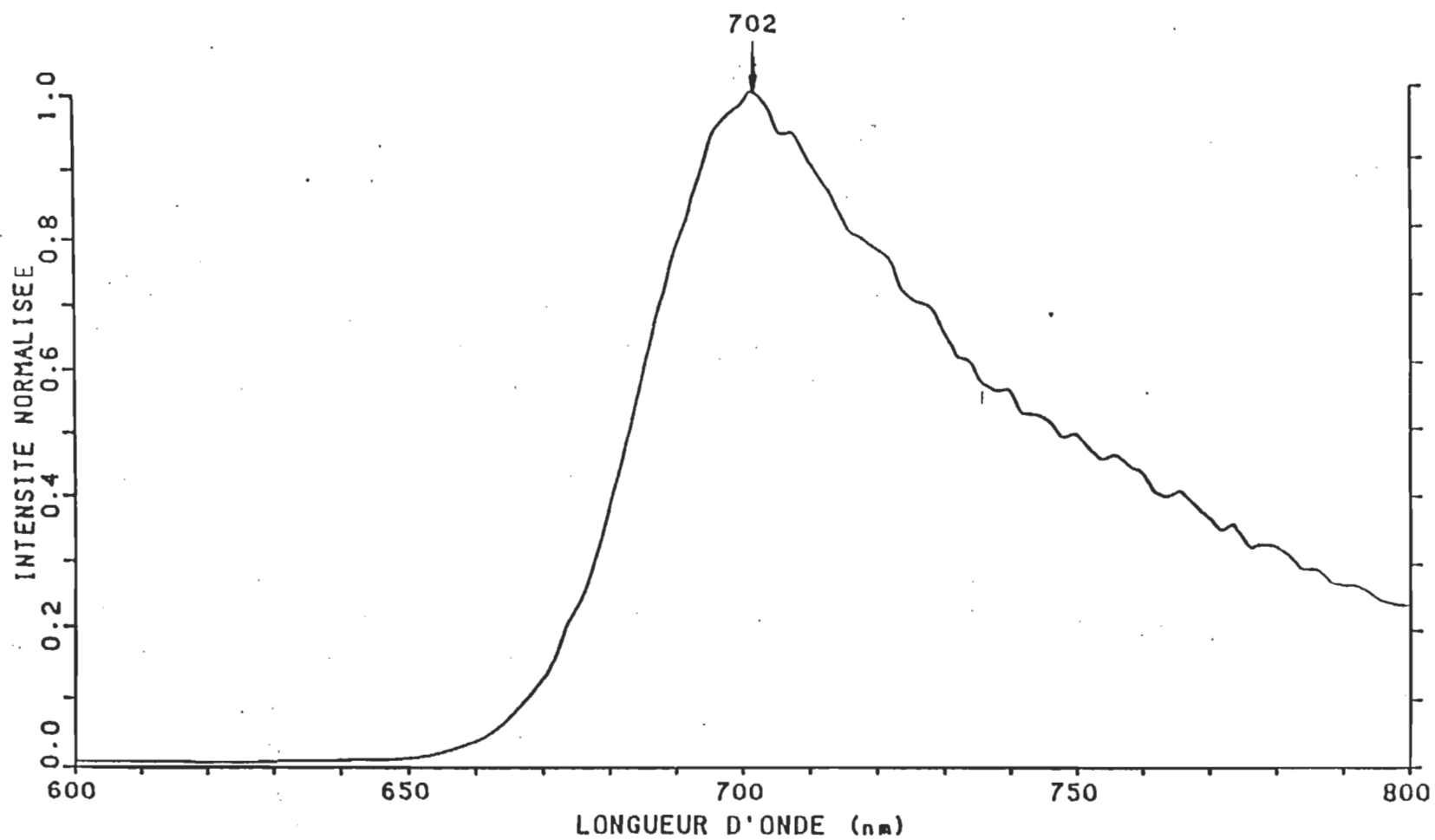


Figure 18: Spectre d'émission de la chlorophylle a en film de Langmuir-Blodgett.

Tweet *et al.*, 1964 ont rapporté un spectre d'émission de la chlorophylle *a* à l'interface air-eau. Ils obtenaient une bande avec un sommet à 730 nm. Ces valeurs concordent avec nos résultats en monocouche. De plus, le profil d'émission de la multicouche montre très clairement un déplacement bathochrome du sommet. Ainsi, avec une superposition de 10 couches, il se situe à 736 nm. L'allure générale reste la même (voir figure 19). Il faut souligner que cet important déplacement ne provient pas d'un effet filtre dû à la réabsorption (voir Annexe I).

3) Durée de vie de fluorescence

Le fait que le rendement quantique de fluorescence ait diminué par trois ordres de grandeurs laisse déjà entrevoir une fluorescence dans la picoseconde. De fait, on atteint la limite de l'appareillage par le comptage de photons, c'est-à-dire moins que 0,2 ns.

Expérimentalement, on voit à la figure 20 que le profil de la lampe et de la fluorescence se confondent. On observe aucune composante lente. Ceci indique un autre processus plus rapide, dû au voisinage immédiat d'autres molécules de chlorophylle *a*. De plus, à cette concentration, le transfert d'énergie est à son maximum.

Ces mesures ont demandé la création d'une nouvelle optique pour recueillir la faible fluorescence. On comprend alors que ces difficultés expérimentales accumulées ont suscité un désintéressement des chercheurs sur ces systèmes modèles.

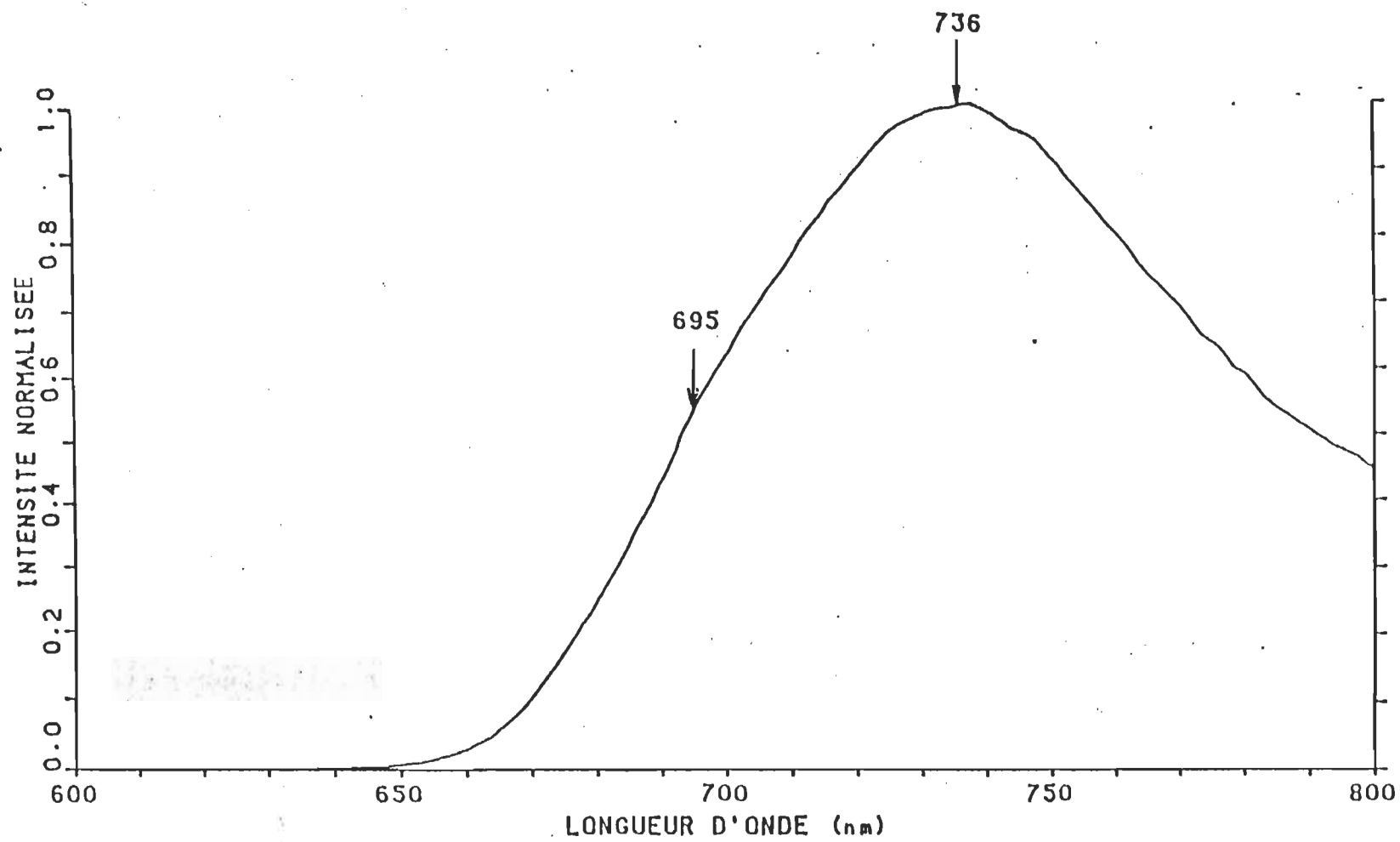


Figure 19: Spectre d'émission de la chlorophylle a en multicouche.

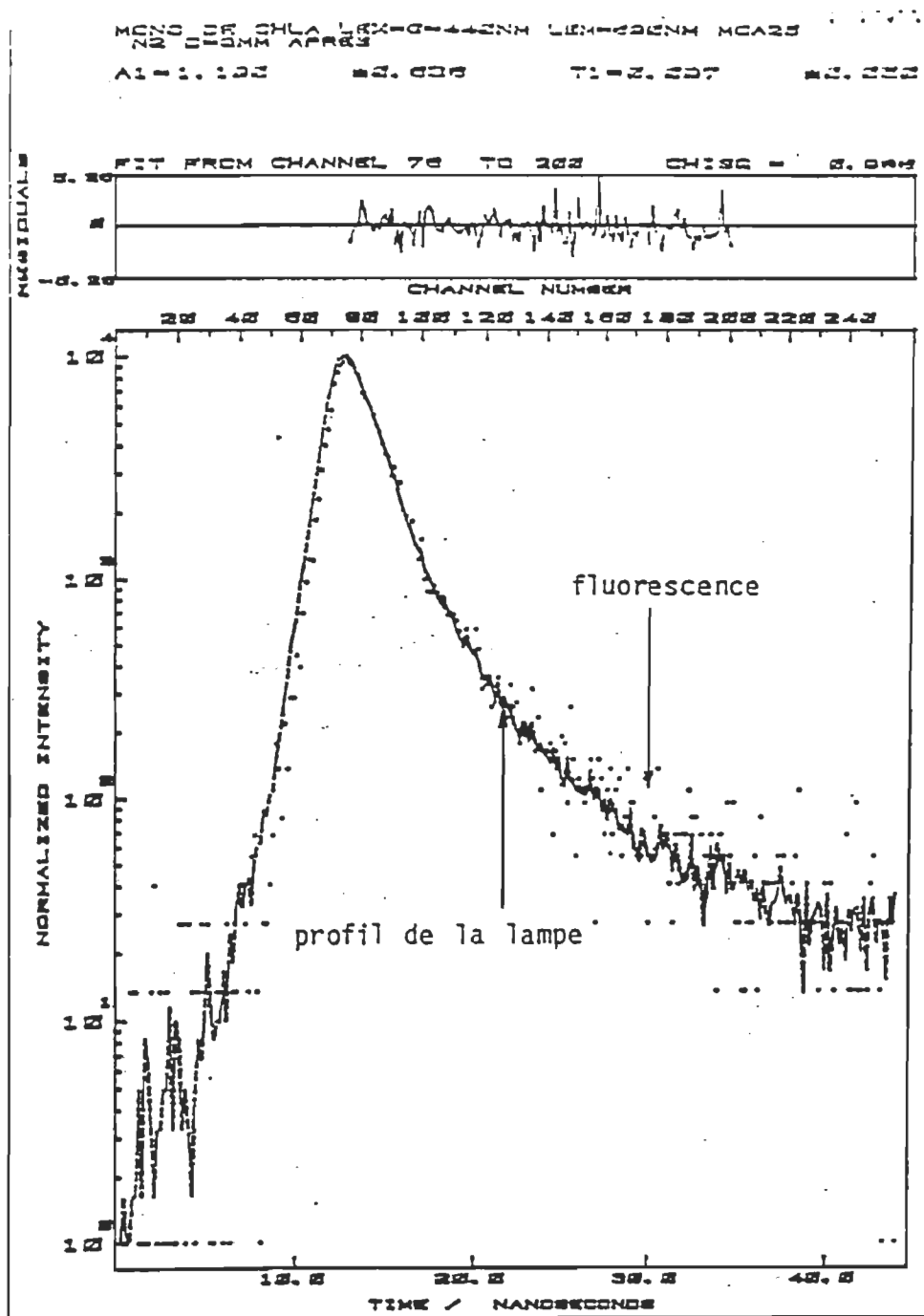


Figure 20: Durée de vie de fluorescence de la chlorophylle a en film de Langmuir-Blodgett.

Dans le but de pousser plus loin notre investigation, on a utilisé l'instrumentation de l'Université Concordia. Cet équipement génère des éclairs dans la picoseconde. Encore une fois, les profils de l'éclair et de la fluorescence coïncident presque (figure 21). Ceci nous permet d'évaluer la durée du phénomène dans la picoseconde. Il faut ajouter toutefois que la haute intensité lumineuse du laser YAG a probablement provoqué des processus de deuxième ordre par collision exciton-exciton. Ils raccourcissent la durée de phénomène.

Les spectres d'absorption et de fluorescence montrent un décalage vers le rouge. Ceci dépend d'un effet de concentration, corroboré par les mesures de durée de vie de fluorescence.

C) MESURES EN FILMS MIXTES DE LANGMUIR-BLODGETT

Les mélanges binaires de chlorophylle *a* avec des lipides en film monomoléculaire visent à simuler sa situation *in vivo*. On s'approche alors de la réalité des membranes du thylacoïde. En plus d'utiliser une grande variété de lipides dans les tests d'influence des chaînes grasses sur les propriétés optiques de la chlorophylle *a*, on varie aussi la tête polaire du lipide afin de mieux comprendre leur influence sur l'anneau porphyrine. Toutes les procédures de purification ont été exécutées par le Centre de recherche. Le mélange binaire composé de chlorophylle *a* et de ces lipides permet l'étude du comportement du pigment dans cet environnement lipidique.

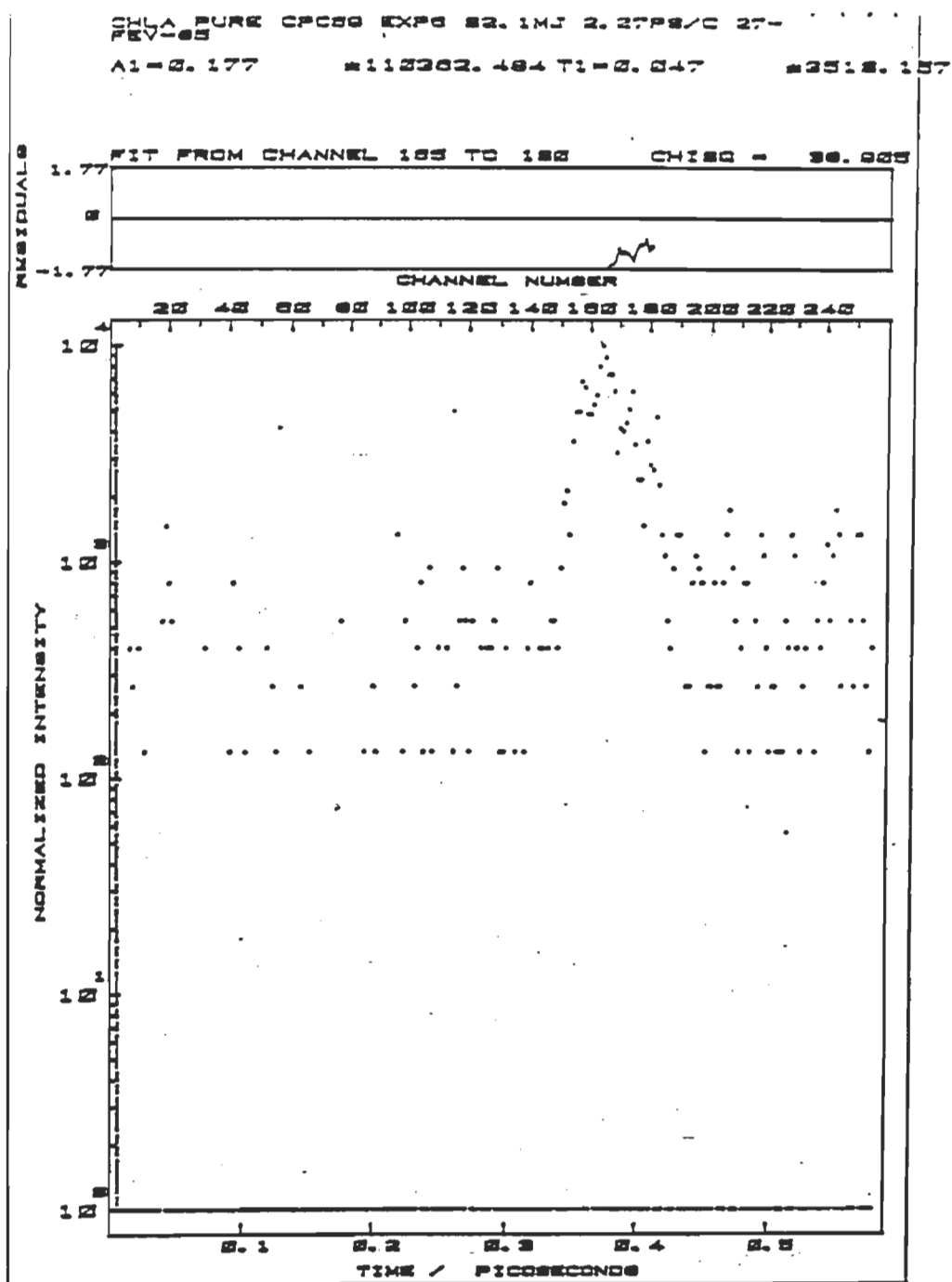


Figure 21: Spectroscopie dans la picoseconde de la chlorophylle a en film de Langmuir-Blodgett.

1) Mélanges chlorophylle *a*-phosphatidylcholine

Le premier groupe de mesures concerne le mélange de la chlorophylle *a* avec plus de 10 phosphatidylcholines. Par cette série de mesures, on veut détecter le degré d'insaturation des acides gras du lipide intervenant dans la photophysique de l'anneau porphyrine en film de Langmuir-Blodgett.

Le maintien d'une dilution constante d'un pigment par cent lipides situe l'absorbance des monocouches mixtes bien en-dessous du niveau de détection du spectrophotomètre. Ceci nous contraint à utiliser les spectres d'excitation comme substitut.

a) Spectre d'excitation de monocouche mixte de chlorophylle *a* et de phosphatidylcholine

Le choix des phosphatidylcholines se base sur le degré d'insaturation des chaînes d'acide gras. Au chapitre II, A, 2, on a dressé la liste des produits utilisés.

Les spectres d'excitation de la chlorophylle *a* diluée dans ces lipides sont tous semblables. De plus, ils présentent les mêmes caractéristiques que les spectres d'absorption du pigment pure en monocouche. Celui du mélange chlorophylle *a*:DOPC est montré à la figure 22. La bande de Soret a son sommet à 438 nm avec des épaulements situés à 422 et 386 nm. Ces valeurs concordent avec d'autres mesures effectuées à l'interface azote-eau (Agrawal *et al.*, 1985). La poursuite du balayage jusqu'à 700 nm nous montre des détails intéressants. La bande principale dans le rouge et son premier

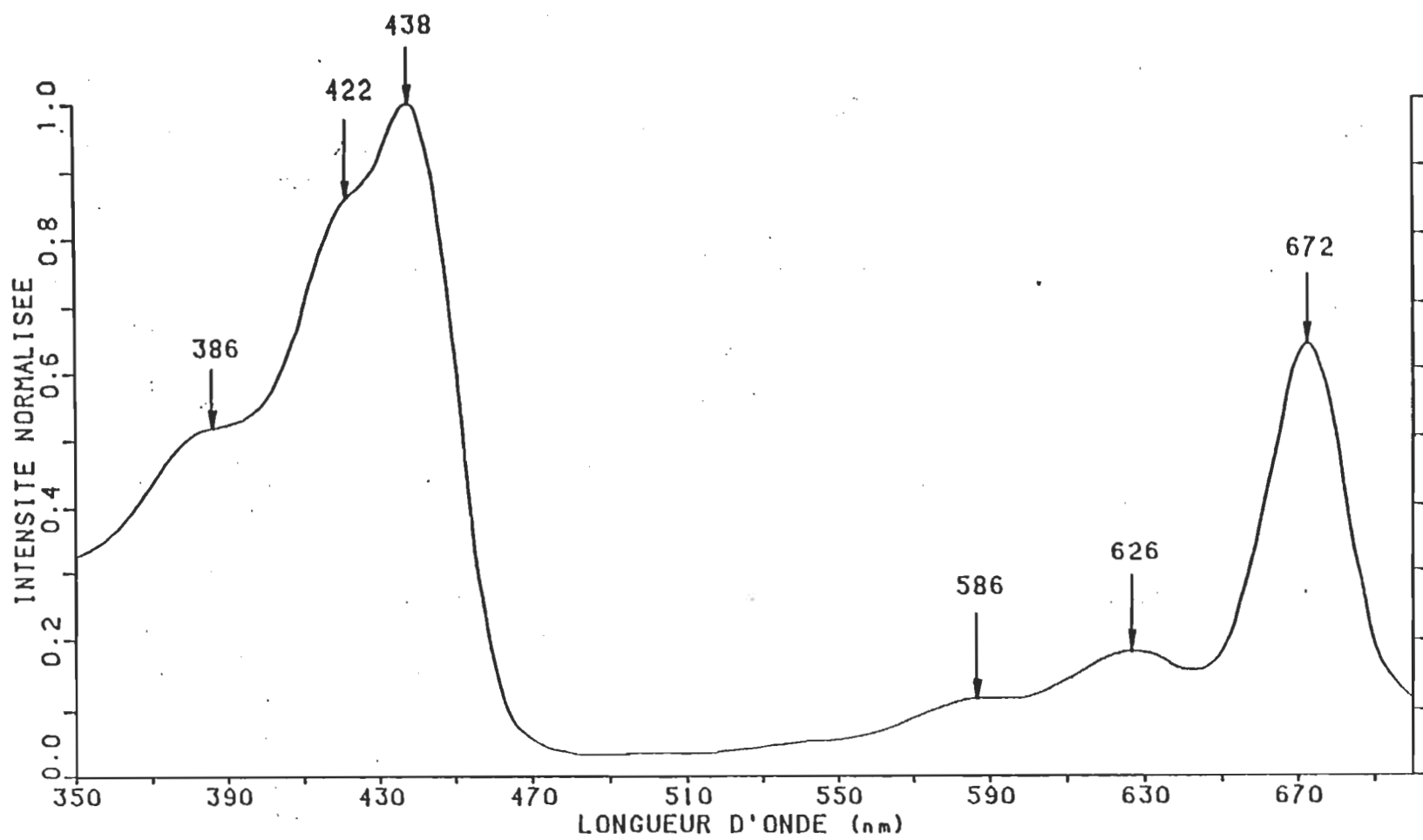


Figure 22: Spectre d'excitation du mélange de chlorophylle a et de phosphatidylcholine en film de Langmuir-Blodgett.

satellite sont situés à 672 et 626 nm respectivement. Ceci représente un déplacement hypsochrome de 8 et 6 nm par rapport au spectre d'absorption du pigment pure. La position du 2^e satellite est à peu près constante. Ceci indique que la transition $S_0 \rightarrow S_1$ est plus affectée par cet effet de dilution que ne l'est la bande de Soret.

b) Spectre d'émission de monocouche mixte de la chlorophylle *a* et de phosphatidylcholine

On présente un spectre d'émission à la figure 23. Toutes les phosphatidylcholines présentent le même spectre. On a choisi le DOPC comme exemple dans cette figure. Ce spectre est comparé aux monocouches et multicouche de chlorophylle *a* pure. Le maximum se situe à 679 nm. Une petite bande se profile à 633 nm et une autre plus importante à 736 nm. Seulement deux lipides présentent des spectres légèrement différents, soit le DMPC et le DPPC. Toutefois, cet effet est probablement indirect. En effet, ces deux lipides se situent dans la phase gel à la température de la pièce. Ainsi, on a déjà observé directement la formation de micro-cristaux à l'interface gaz-eau (Weis et McConnell, 1984). Cette ségrégation a comme conséquence la concentration des pigments dans des surfaces réduites.

c) Durée de vie de fluorescence de la chlorophylle *a* en monocouche mixte avec des phosphatidylcholines

Le tableau 9 présente l'ensemble des résultats sur le déclin de fluorescence pour les mélanges de chlorophylle *a* avec des phosphatidylcholines à concentration constante de un pigment pour cent lipides.

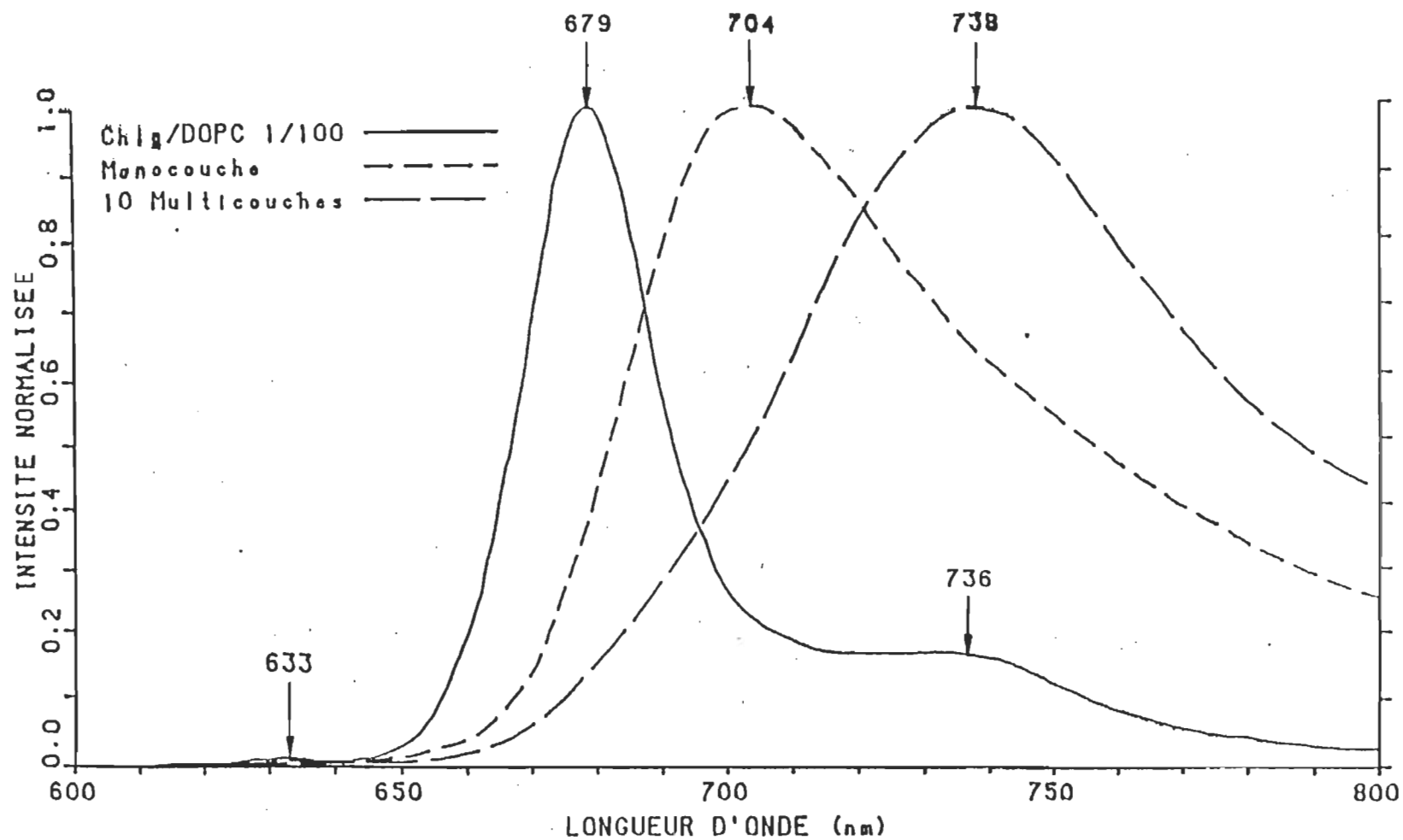


Figure 23: Spectre d'émission du mélange de chlorophylle *a* et de phosphatidylcholine en film de Langmuir-Blodgett.

TABLEAU 9

Durée de vie de fluorescence du mélange chlorophylle *a*-phosphatidylcholine
en film de Langmuir-Blodgett

Lipide	Excitation (nm) $\pm 0,5$	τ_1 ns $\pm 0,2$	% 1	τ_2 ns	% 2
Aucun	440	---	—	$\leq 0,2 \pm 0,2$	100
POPC	438	4,5	65	$2,2 \pm 0,4$	35
DMPC	438	4,7	70	$2,6 \pm 0,4$	30
DPPC	438	4,8	35	$0,8 \pm 0,1$	65
DOPC	438	5,3	70	$2,8 \pm 0,3$	30
DSPC	437	4,2	30	$0,7 \pm 0,1$	70
DLPC	438	4,0	75	$1,6 \pm 0,6$	25
SOPC	438	4,5	80	$1,9 \pm 0,6$	20
OSPC	438	4,5	80	$1,9 \pm 0,6$	20
PC d'oeuf	438	4,5	75	$2,3 \pm 0,1$	25

La première évidence se situe au niveau du nombre de composantes. En effet, la fluorescence décline selon deux composantes autour de 4,5 et 2,0 ns (voir figure 24). Leur contribution respective à la fluorescence totale est de 75% et 25% des surfaces sous la courbe de leur exponentielle. Dans l'ensemble, cette valeur se maintient pour les autres dilutions à quelques variantes près. Toutefois, pour les mêmes lipides mentionnés dans la section précédente, c'est-à-dire le DSPC et le DPPC, on observe un déclin beaucoup plus rapide. Là composante courte prédomine avec une valeur de 0,2 ns pour 80% de toute la fluorescence. On attribue la composante lente aux pigments libres. Conséquemment, il existe des micro-domaines à haute concentration de pigments.

Afin de confirmer cette hypothèse de la phase solide, on a chauffé la sous-phase à une température supérieure au point de fusion de la monocouche. Comme prévu, la composante rapide a perdu de sa participation au profit de la composante lente. De plus, la valeur de cette composante rapide a passé de 0,2 à 1,2 ns. Ceci indique une dilution plus homogène à l'interface avant le transfert.

Les mélanges chlorophylle *a*-phosphatidylcholine furent aussi étudiés avec le laser YAG de l'Université Concordia (voir figure 25). Les résultats de ces mesures sont présentés au tableau 10. On présente seulement la partie exponentielle. On observe des variations importantes d'une mesure à l'autre. Bien des facteurs peuvent être intervenus. Le plus probable est la forte intensité de l'impulsion. On peut approximer que tous les pigments sont excités après le passage de l'éclair. L'annihilation excitonique participe à la désactivation. Ensuite, la désactivation selon un mode monomérique

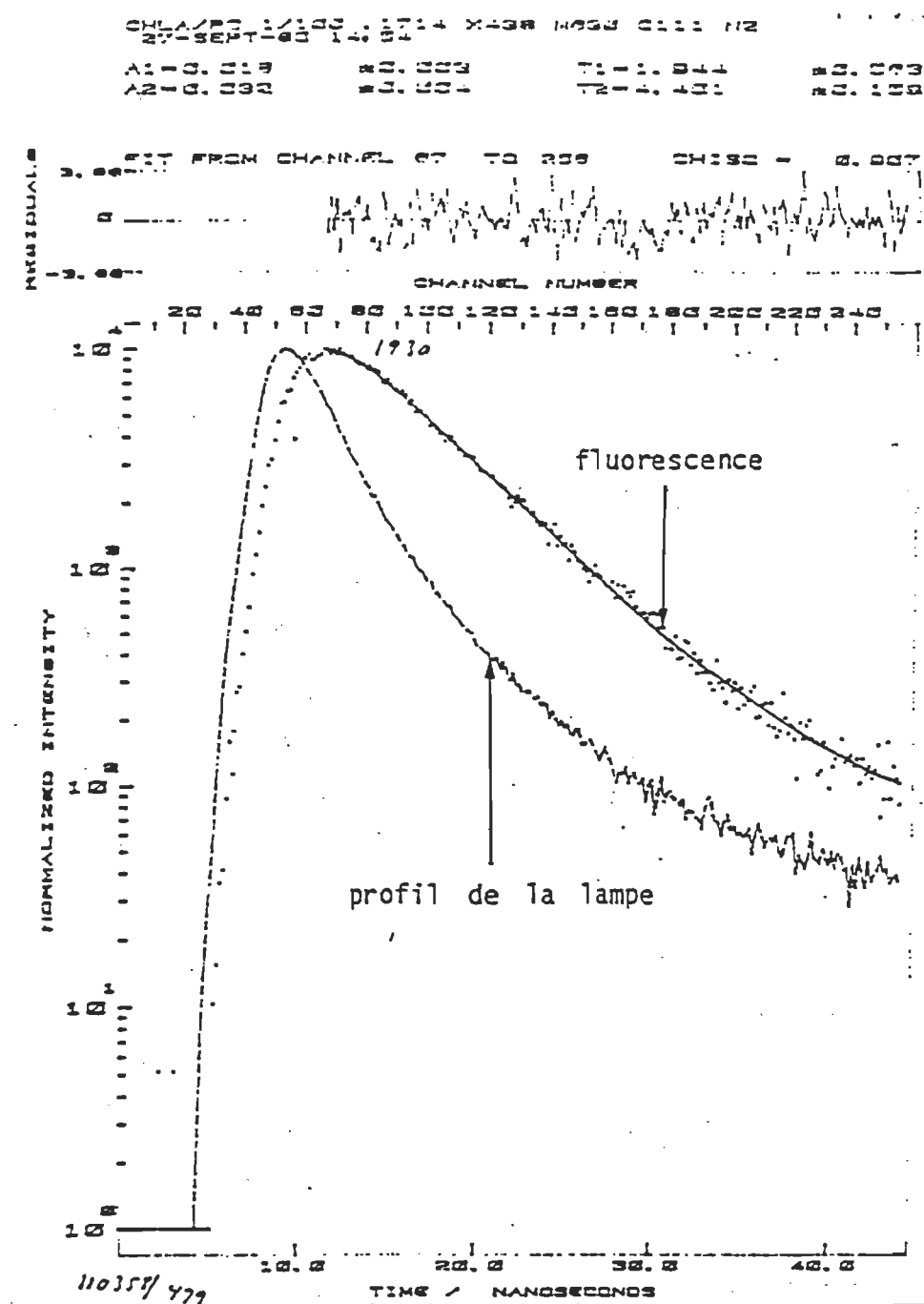


Figure 24: Durée de vie de fluorescence du mélange de chlorophylle a et de phosphatidylcholine en film de Langmuir-Blodgett.

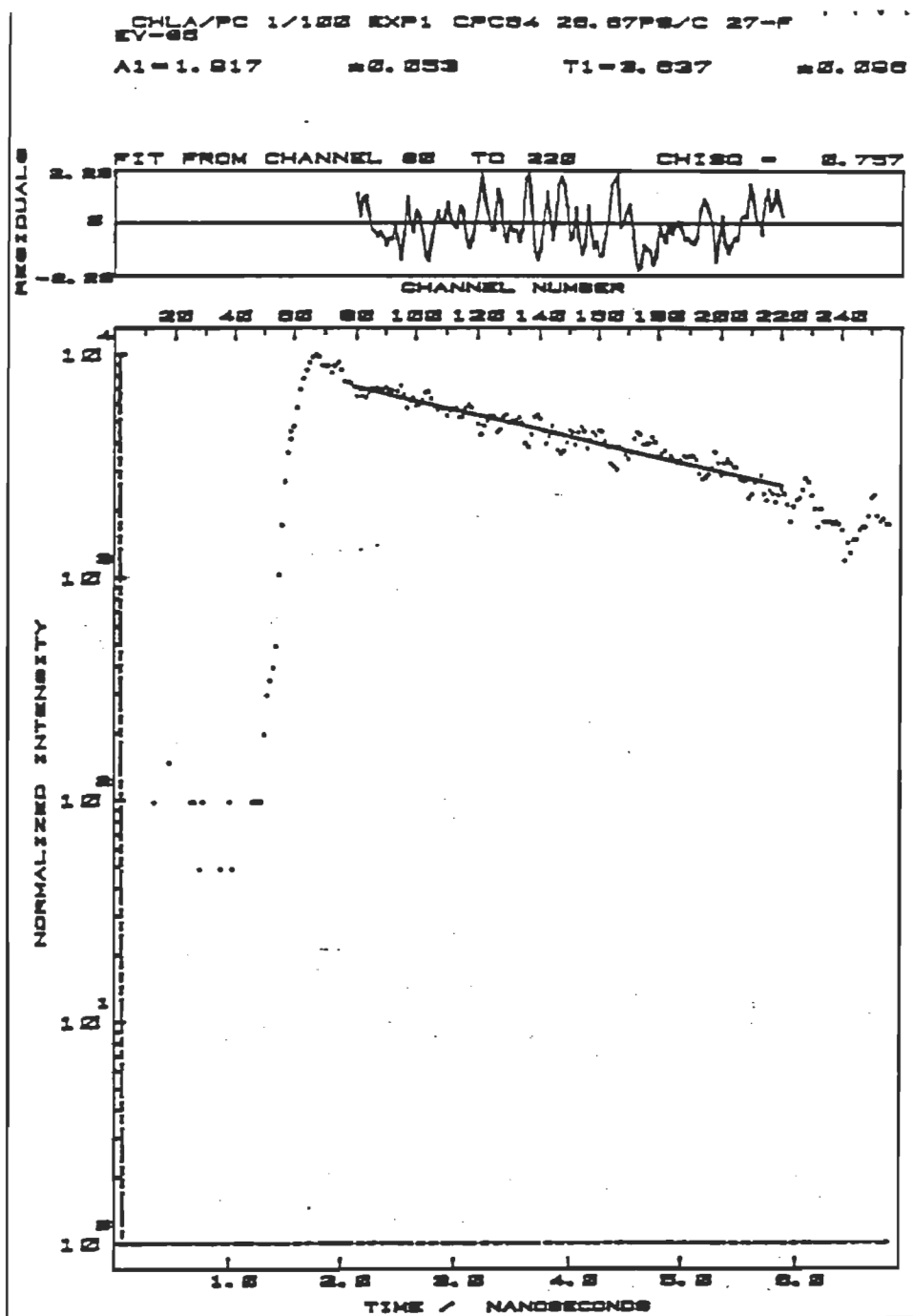


Figure 25: Spectroscopie dans la picoseconde du mélange de chlorophylle a et de phosphatidylcholine en film de Langmuir-Blodgett.

Tableau 10

Durée de vie de fluorescence du mélange chlorophylle a-DOPC (1:100)
en film de Langmuir-Blodgett

Date	Nom	Exp	τ_f ns	$\Delta\tau$ ns	Éclair	Énergie mJ/éclair	χ^2	Commentaires
11-02-85	CPC1	1	1.15	.09	1 seul	2.84	4.14	Lame inverse
12-02-85	CPC4	1	2.75	.11	Moy 4	2.98	1.25	Lame #1
12-02-85	CPC5	2	3.31	.17	Moy 4	2.43	1.29	Lame #2
13-02-85	CPC8	1	3.83	.17	Moy 4	2.75	0.87	Lame #1
13-02-85	CPC9	2	3.49	.17	Moy 4	2.77	1.14	Lame #2
14-02-85	CPC14	1	2.65	.16	Moy 4	2.45	1.94	Lame #1
14-02-85	CPC15	2	2.83	.15	Moy 4	2.83	1.38	Lame #2
18-02-85	CPC20	1	3.11	.21	Moy 2	2.51	1.66	Lame #1
18-02-85	CPC21	2	3.43	.18	1 seul	3.01	3.06	Lame #1
18-02-85	CPC22	3	3.36	.10	Moy 4	2.33	.80	Lame #2
19-02-85	CPC25	1	2.52	.06	Moy 4	2.12	1.50	Lame #1
19-02-85	CPC26	2	2.82	.06	Moy 4	2.16	1.29	Lame #2
20-02-85	CPC33	1	1.90	.07	1 seul	2.35	3.21	Lame #1
20-02-85	CPC34	2	1.98	.07	1 seul	2.67	2.71	Lame #1
20-02-85	CPC35	3	1.95	.08	1 seul	2.34	3.19	Lame #1
20-02-85	CPC36	4	2.12	.08	1 seul	3.17	3.05	Lame #1
20-02-85	CPC37	5	2.39	.07	Moy 4	2.49	1.05	Lame #2
20-02-85	CPC38	6	2.08	.06	Moy 4	2.34	1.35	Lame #2
21-02-85	CPC45	1	3.28	.11	Moy 4	2.63	1.15	Lame #1 no Ar
25-02-85	CPC52	1	3.29	.11	Moy 4	1.94	1.07	Lame #1 no Ar
26-02-85	CPC63	1	3.11	.08	Moy 4	2.39	1.02	no Ar
27-02-85	CPC64	1	3.64	.10	Moy 4	2.07	.77	Réalignement

domine le déclin. On a pris en considération cette évolution dans nos calculs mais là encore, le déclin dans la dernière partie de la courbe est beaucoup plus rapide que les mesures en comptage de photons. Ceci signifie que les processus de désactivation supplémentaire générés par la haute intensité de l'éclair ne sont pas encore terminés. Ces écarts seront analysés plus en détails dans la discussion.

2) Mélanges chlorophylle *a*-phospholipides

Ce deuxième groupe de mesures explore l'effet de la tête polaire sur l'anneau porphyrine. On procède par substitution de groupements associés avec le phosphate. Ainsi, la sérine, choline, glycérol et inositol ont été employés dans cette investigation. On garde toujours la même concentration afin de faciliter les comparaisons.

a) **Spectre d'excitation en monocouche mixte de chlorophylle *a* avec des phospholipides**

L'utilisation de ces divers composés a généré de grandes disparités entre les divers modèles. À la figure 26, on constate que les spectres d'excitation ont subi un déplacement hypsochrome important. Le sommet du spectre d'excitation se situe à 420 nm. Avec le phosphatidylsérine, on le retrouve à 414 nm.

En partant de l'hypothèse que ces effets proviennent de l'interaction entre la tête polaire et l'anneau porphyrine, il y a manifestement une forte

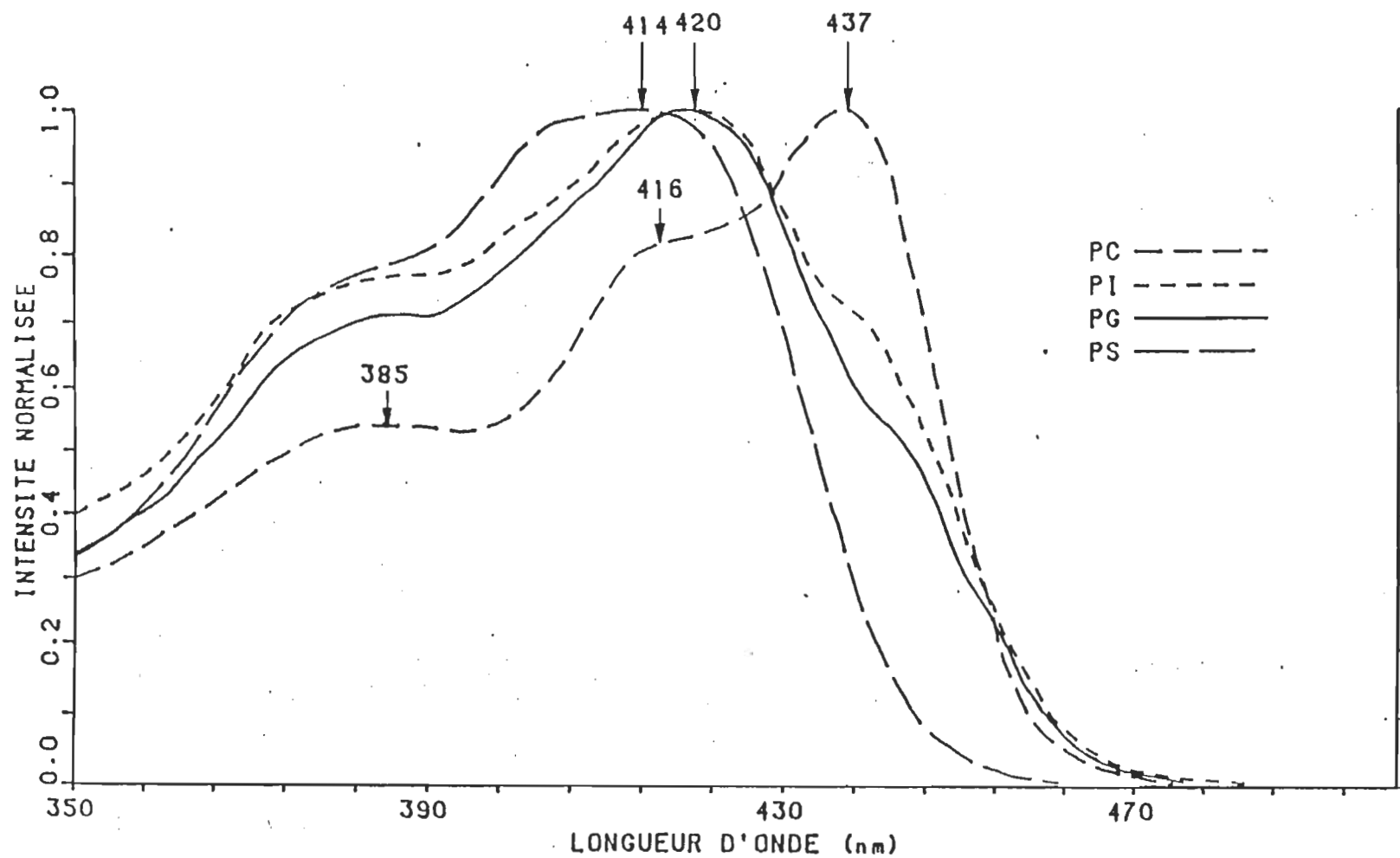


Figure 26: Spectres d'excitation du mélange de chlorophylle a et de phospholipides en film de Langmuir-Blodgett.

influence. Les mélanges en solution ne rapportent pas une situation équivalente (Seely et Jensen, 1965).

Enfin, il apparaît un début de bande près de 500 nm. Cette bande était inexistante avec le phosphatidylcholine. De plus, avec le phosphatidylinositol et le phosphatidylglycérol, on observe un épaulement autour de 440 nm.

b) Spectre d'émission en monocouche mixte de la chlorophylle *a* avec des phospholipides

La comparaison des divers spectres d'émission, à la figure 27, met en évidence des faits très nets. Premièrement, la bande de 633 nm disparaît avec les PI, PG et PS. Deuxièmement, le profil garde son apparence générale. Le sommet se déplace de 3 nm vers le bleu. On observe une bande à 736 nm avec le phosphatidylsérine. Cette bande se détache plus nettement du massif central et indique une association plus marquée du pigment de son environnement.

c) Durée de vie de fluorescence de film mixte de chlorophylle *a* avec des phospholipides

Le tableau 11 montre l'ensemble des résultats obtenus du mélange de la chlorophylle *a* avec les divers phospholipides. Les résultats des mesures en solution servent de point de comparaison. Là aussi, on détecte deux composantes. Les pourcentages varient. Avec le phosphatidylsérine, la composante lente de 6,3 ns participe pour 75% de la fluorescence totale.

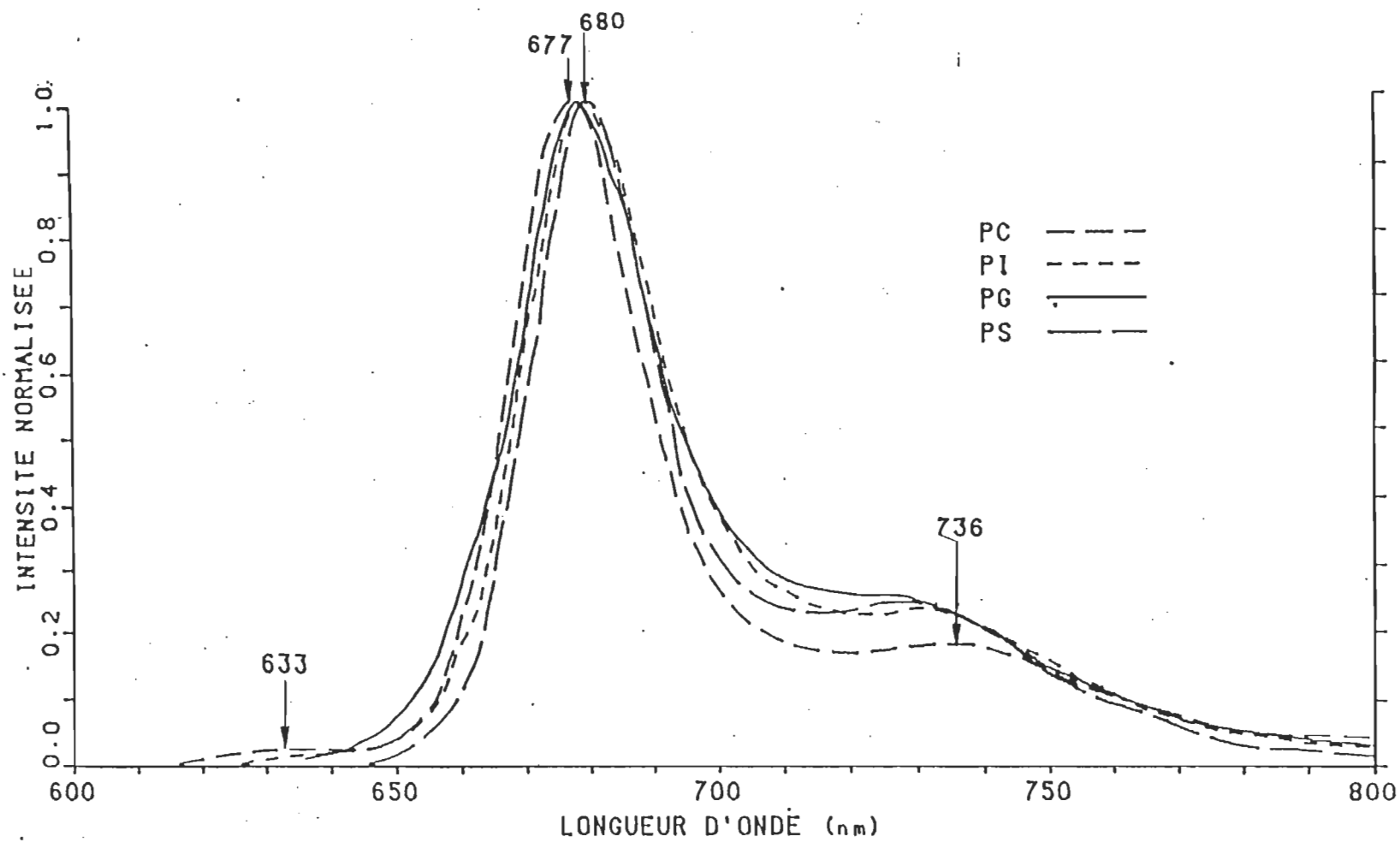


Figure 27: Spectres d'émission du mélange de chlorophylle a et de phospholipides en film de Langmuir-Blodgett.

TABLEAU 11

Durée de vie de fluorescence des mélanges chlorophylle *a*-phospholipide
en film de Langmuir-Blodgett

Benzène	Excitation	τ_1 ns	% 1	τ_2 ns	% 2
Éther	429	$5,85 \pm 0,05$	100	---	--
Benzène	432	$4,89 \pm 0,03$	100	---	--
PC d'oeuf	438	$4,5 \pm 0,2$	75	$2,0 \pm 0,3$	25
PS	414	$6,3 \pm 0,4$	75	$3,3 \pm 0,4$	25
PI	421	$5,5 \pm 0,4$	40	$2,3 \pm 0,4$	60
PG	414	$5,2 \pm 0,3$	40	$2,3 \pm 0,2$	60

Le phosphatidylinositol et le phosphatidylglycérol affectent aussi la chlorophylle *a*. Plus de 60% de la fluorescence provient de la composante rapide. Il y a hétérogénéité dans la monocouche. La composante lente se situe à 5 ns. On l'attribue au monomère de la chlorophylle *a*.

3) Mélanges chlorophylle *a*-lipides du thylacoïde

Cette dernière section concerné les mélanges de chlorophylle *a* avec des lipides en monocouche. Ceux-ci ont été choisis en fonction de leur rôle dans la membrane du thylacoïde. Ce mélange binaire met en présence les principaux lipides de l'appareillage photosynthétique.

a) **Spectre d'excitation de monocouche mixte de chlorophylle *a* et de lipides du thylacoïde**

Ces lipides sont le MGDG, DGDG et le SQDG. La figure 28 illustre l'effet des galactolipides sur les propriétés spectroscopiques de la chlorophylle *a*. On constate que leurs actions peuvent être radicalement différentes. La dilution de la chlorophylle *a* dans un film de MGDG, purifié par HPLC et manipulé dans des conditions extrêmes de conservation, garde le même spectre d'excitation que dans la monocouche sans dilution. On observe le maximum à 438 nm avec des épaulements à 414 et 386 nm. Ainsi, le MGDG est spectroscopiquement pur.

La seconde partie du spectre d'excitation, de 500 à 700 nm, de la chlorophylle *a* mélangée avec du MGDG purifié par HPLC et étalée en monocouche nous montre un massif très caractéristique avec un pic

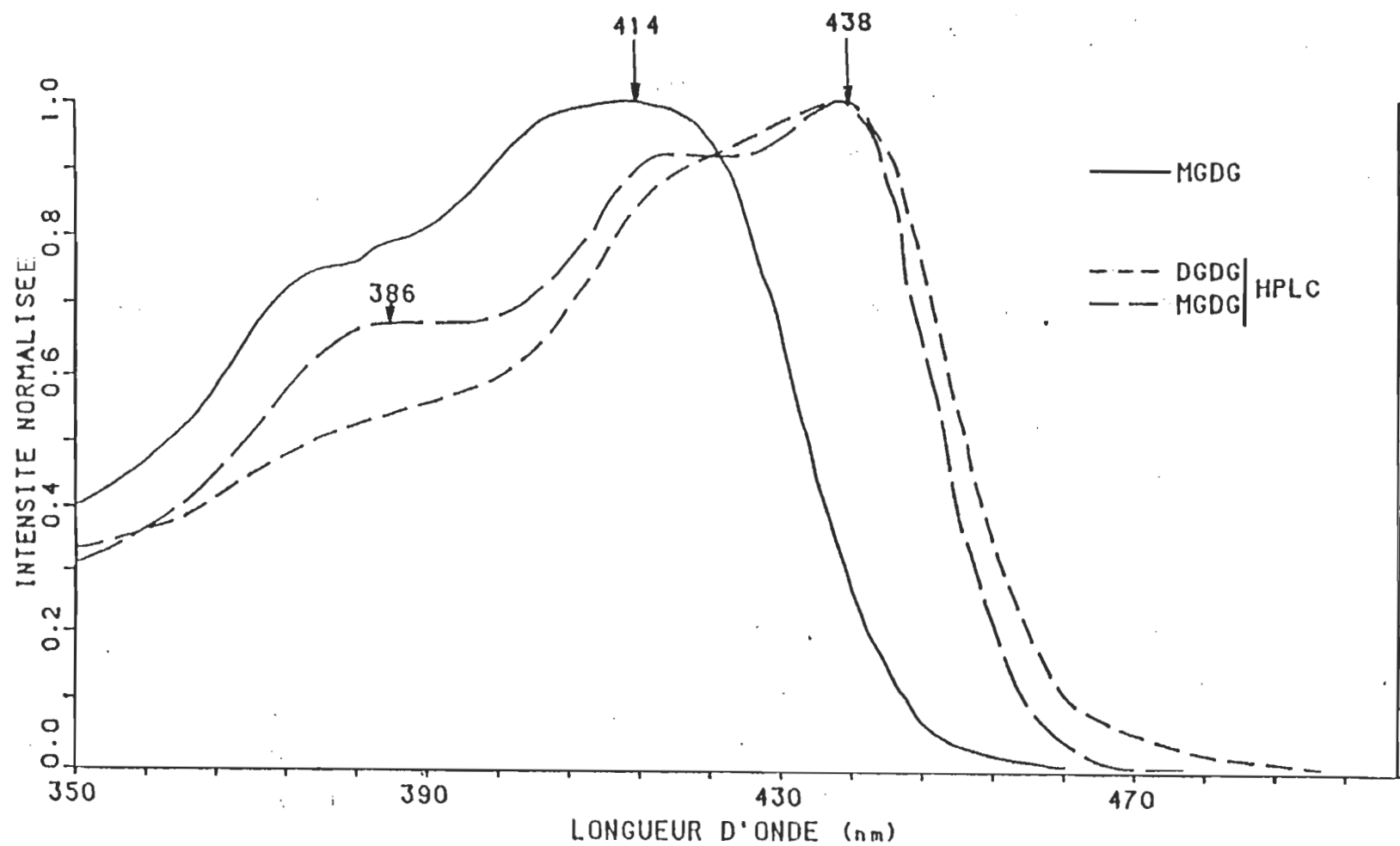


Figure 28: Spectre d'excitation du mélange de chlorophylle α :galactolipides en film de Langmuir-Blodgett.

principal à 672 nm et trois satellites à 542, 588 et 628 nm (voir figure 29). Ces valeurs se comparent très bien avec le spectre correspondant de la chlorophylle *a* dans le phosphatidylcholine (voir figure 22).

La dilution du pigment dans une couche de DGDG obtenue de la même façon conduit presque à la même observation: sommet à 438 nm et bandes satellites à 423 et 386 nm. Toutefois, l'allure du spectre est quelque peu différente. La bande satellite atteint une amplitude égale et quelque fois supérieure à la bande principale. Ceci pourrait être associé à une interaction différente, mais les résultats suivants conduisent à une autre hypothèse.

La dilution dans le SQDG non purifié par HPLC mais simplement vérifié par TLC a produit le spectre montré à la figure 30. La bande principale a disparu. Il reste un épaulement à 442 nm; la bande à 417 nm prédomine. Deux nouvelles bandes situées à 511 et 543 nm suggèrent l'apparition d'un nouveau composé, la phéophytine.

Ces résultats reproduisent ceux de la chlorophylle *a* dans un film de MGDG ou de DGDG non purifié. Afin de déterminer si le processus de détérioration du pigment avait lieu dans la solution de benzène, un mélange chlorophylle *a*/MGDG 1:100 dans le benzène avec une concentration de 10^{-6} M en pigment a été étudié. Ce MGDG n'avait pas été traité au HPLC. Immédiatement après le mélange, un spectre d'excitation a été pris (voir figure 31). On observe un spectre caractéristique de la chlorophylle *a* avec ses maximums à 430 et 666 nm (voir figure 8). Toutefois, une heure et demie plus tard, on observe une détérioration quasi-complète (voir figure 32). La bande principale à 430 est disparue et deux bandes à 506 et 537 nm suggèrent encore

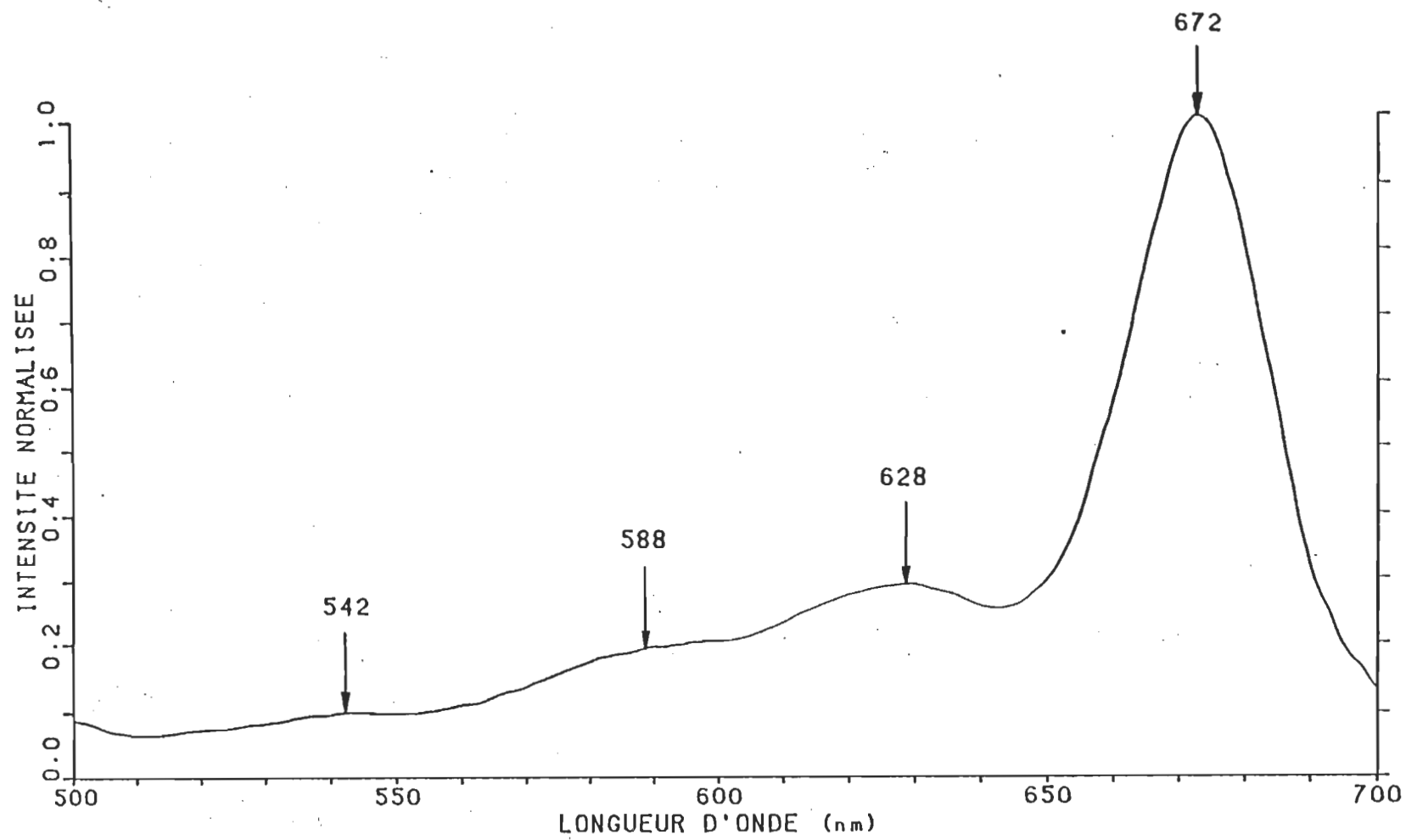


Figure 29: Spectre d'excitation du mélange de chlorophylle a et de MGDG en film de Langmuir-Blodgett.

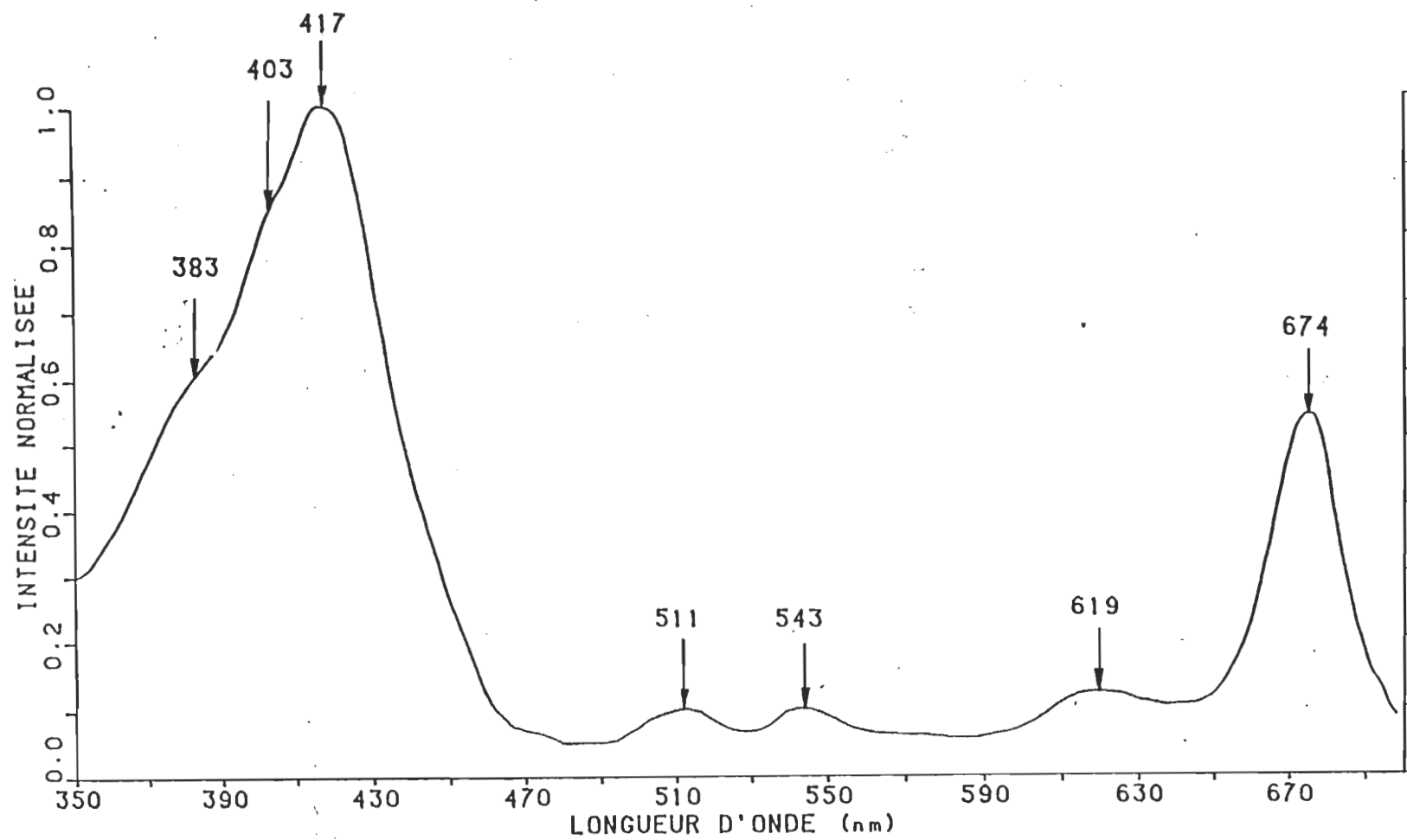


Figure 30: Spectre d'excitation du mélange de chlorophylle a et de SQDG non purifié par HPLC en film de Langmuir-Blodgett.

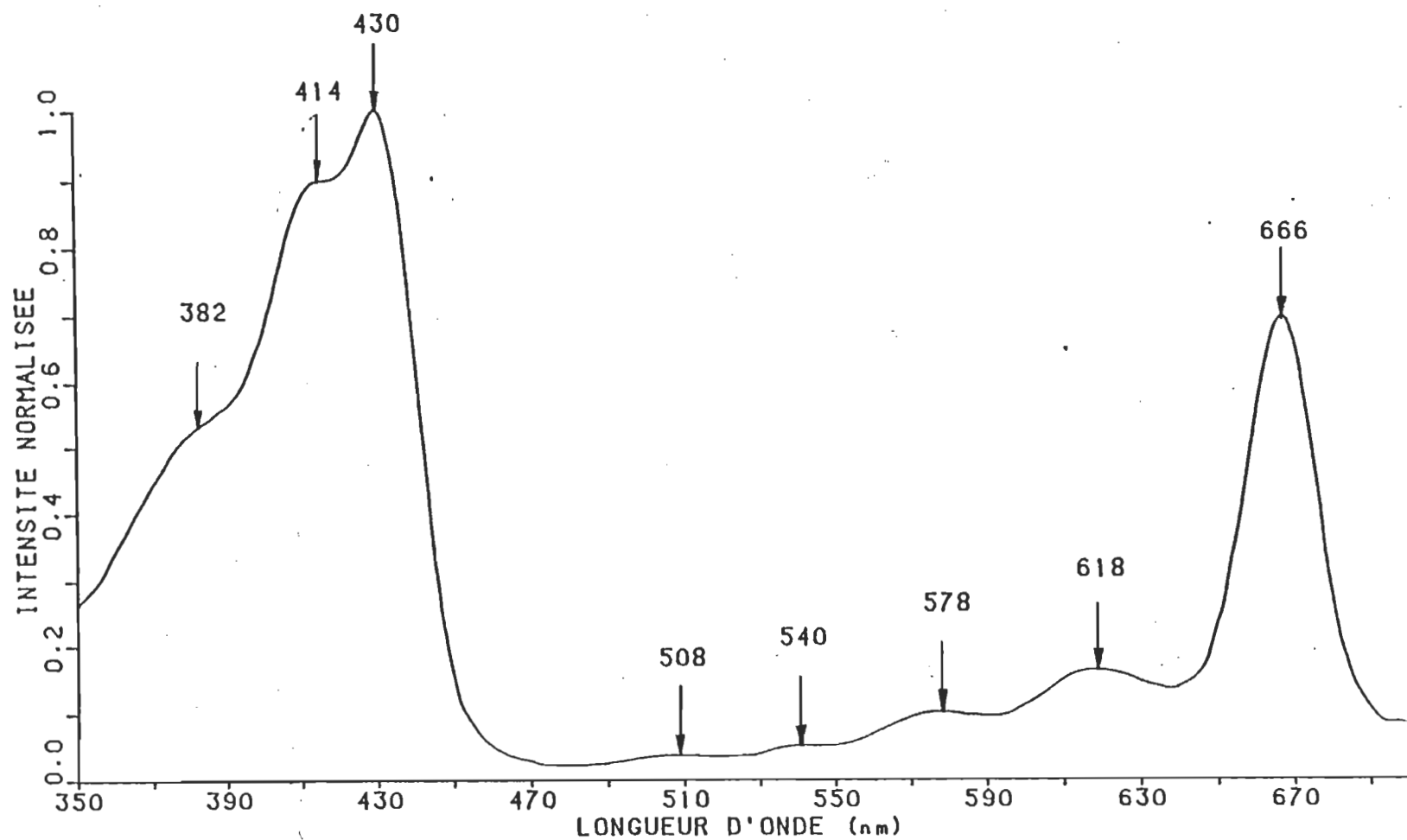


Figure 31: Spectre d'excitation d'une solution de 10^{-6} M de chlorophylle a dans le benzène avec du MGDG non purifié par HPLC dans un rapport molaire de 1:100.

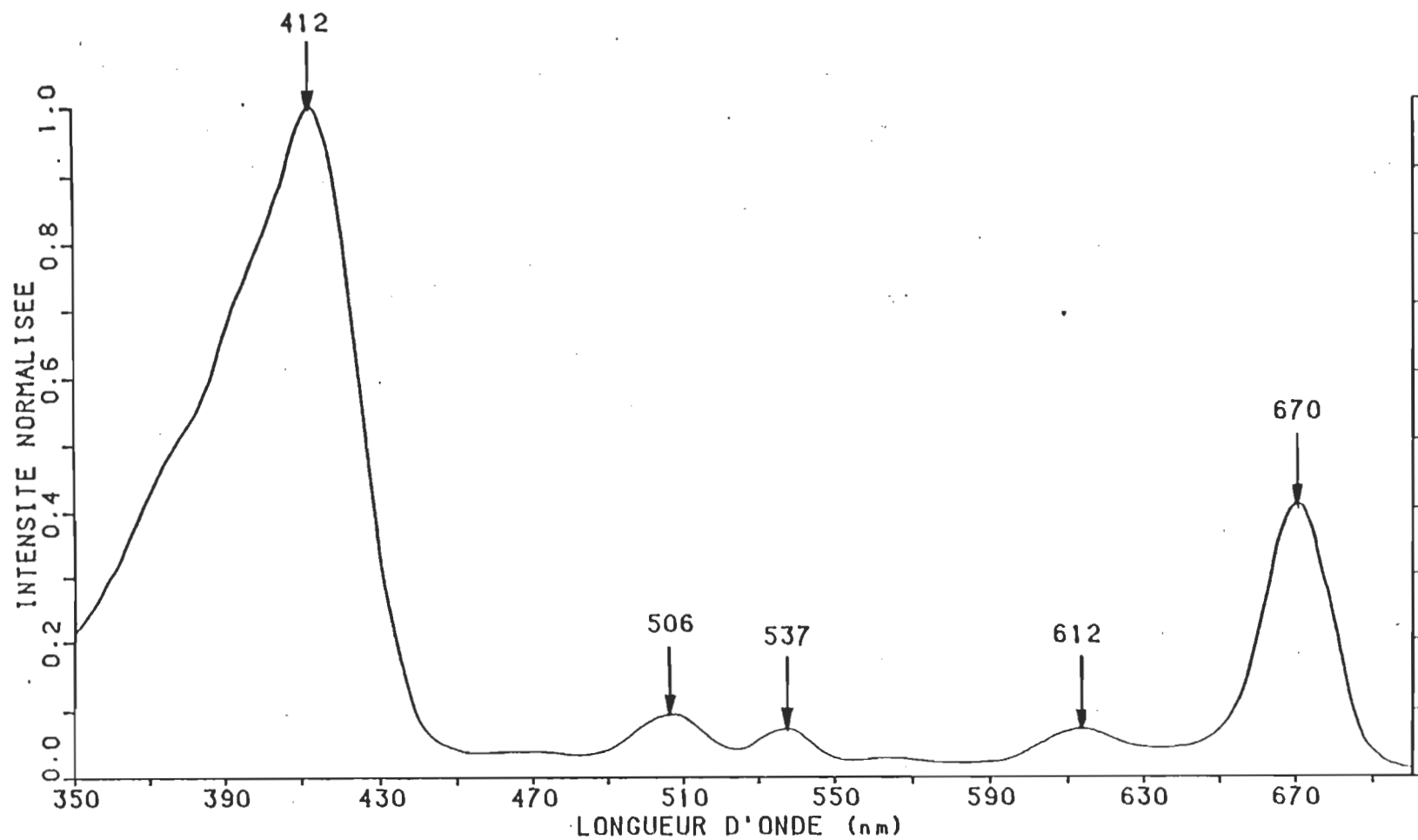


Figure 32: Spectre d'excitation d'une solution de 10^{-6} M de chlorophylle a dans le benzène avec du MGDG non purifié par HPLC dans un rapport molaire de 1:100 après 90 minutes.

un processus de phéophytinisation. De fait, la grande ressemblance entre les spectres d'excitation de la bande de Soret de la chlorophylle *a* mélangée avec du MGDG non purifié et celui de la phéophytine *a* dans du DOPC (voir figure 33), en film Langmuir-Blodgett dans un rapport molaire de 1:100, suggèrent fortement qu'un groupement acide se soit formé dans les galactolipides. Comme la sous-phase est tamponnée à pH 8, cette acidité est neutralisée après l'étalement. Mais avant l'étalement, ces acides peuvent détruire la chlorophylle *a* en solution.

Par conséquent, on peut se poser les mêmes hypothèses pour les phospholipides PI, PG, PS. L'examen plus approfondi de leurs groupements suggère la possibilité que les têtes polaires soient dans certains cas des acides intrinsèques ou que des acides apparaissent par dégradation.

b) Spectre d'émission d'une monocouche mixte de chlorophylle *a* et de lipides du thylacoïde

Les spectres d'émission de la chlorophylle *a* diluée dans ces lipides après purification par HPLC présentent tous les mêmes caractéristiques (voir la figure 34). Le sommet se situe à 678 nm et sa bande satellite à 736 nm. Il y a aussi la petite bande à 634 nm. Celle-ci disparaît avec la dégradation du pigment.

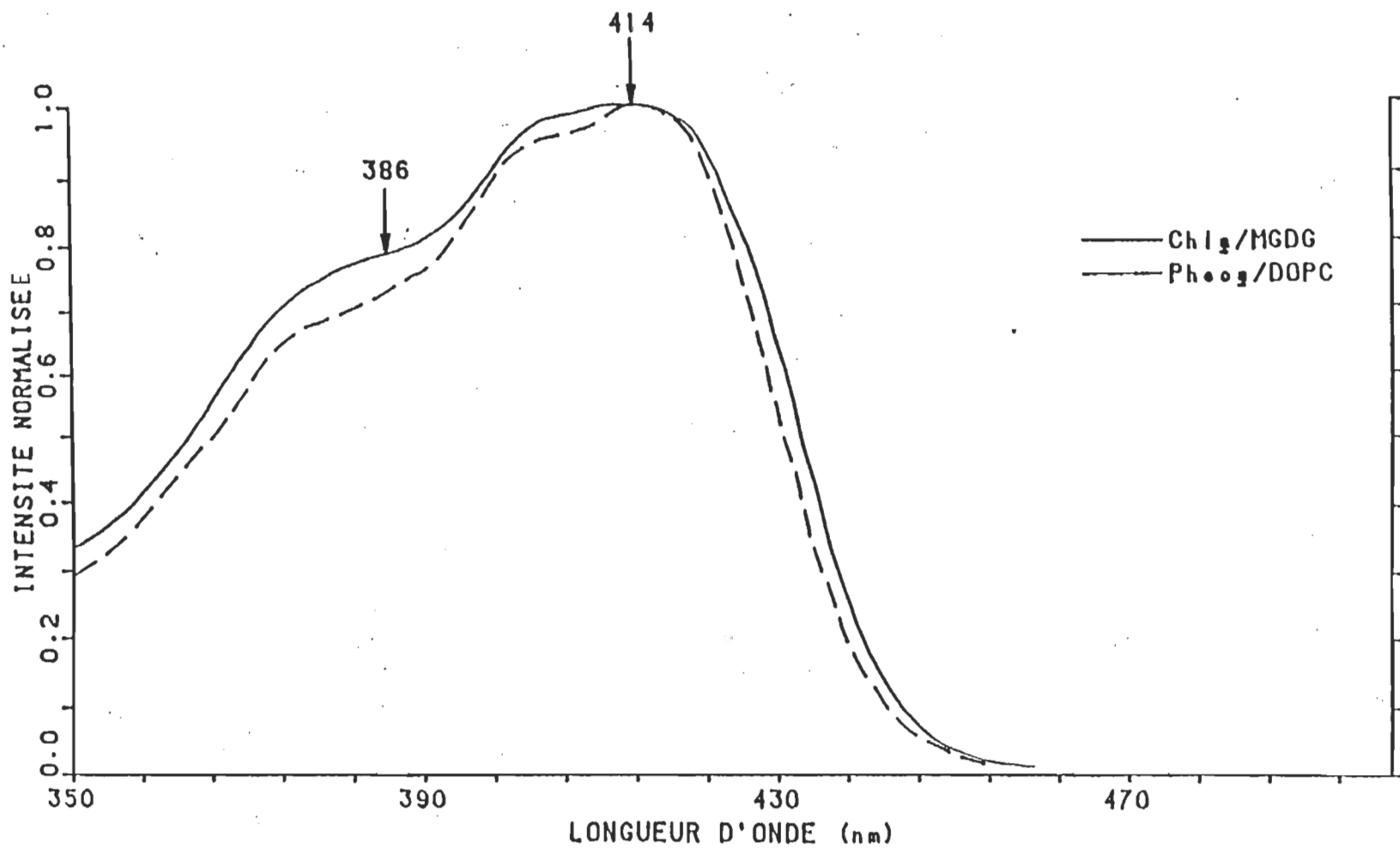


Figure 33: Spectre d'excitation des mélanges chlorophylle a/MGDG non purifié et phéophytine/DOPC en film Langmuir-Blodgett dans un rapport molaire 1:100.

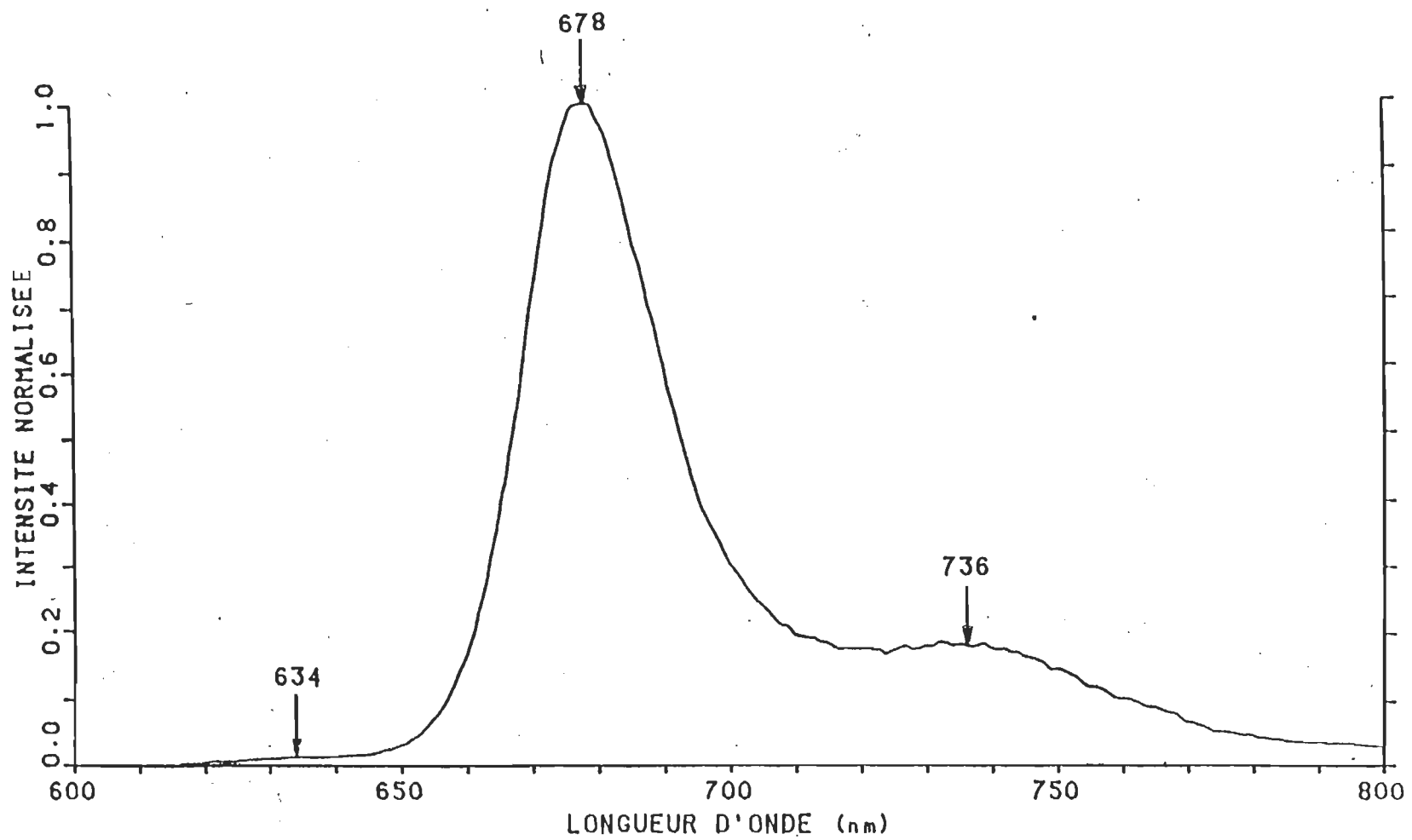


Figure 34: Spectre d'émission du mélange de chlorophylle a et de lipides thylacoïdiens en film de Langmuir-Blodgett.

c) **Durée de vie de fluorescence des monocouches mixtes de chlorophylle *a* et de lipides du thylacoïde**

Les films de Langmuir-Blodgett de chlorophylle *a* et de MGDG purifié par HPLC montrent des durées de vie de fluorescence comparables à celles observées dans les films de phosphatidylcholine (voir figure 35). On obtient deux composantes, une de 4,7 ns et l'autre de 1,6 ns. Leur participation relative est de 80 et 20% respectivement. Le tableau 12 contient les résultats des galactolipides purifiés par HPLC. Les valeurs restent semblables.

Les mesures avec des lipides non purifiés ont démontré un changement radical dans les déclins de fluorescence. La composante rapide a disparue et la composante lente se situe près de 6,0 ns. Un essai avec la phéophytine *a* dans une monocouche de phosphatidylcholine a donné les mêmes valeurs. Donc, la phéophytinisation de la chlorophylle *a* a lieu dans cet environnement impur (voir tableau 13).

4) **Mélanges chlorophylle *a*-DOPC à diverses concentrations**

Ces mélanges concernent l'effet de la concentration de chlorophylle *a* sur ses propriétés spectroscopiques. Pour ce faire, on a utilisé la spectrofluorimétrie et la durée de vie de fluorescence. La spectrophotométrie d'absorption reste inutilisable à cette échelle de concentration. Les spectres d'excitation de même que les spectres d'émission nous montrent des profils inchangés dans une grande gamme de concentration. Il faut dépasser l'équimolarité pour observer un effet.

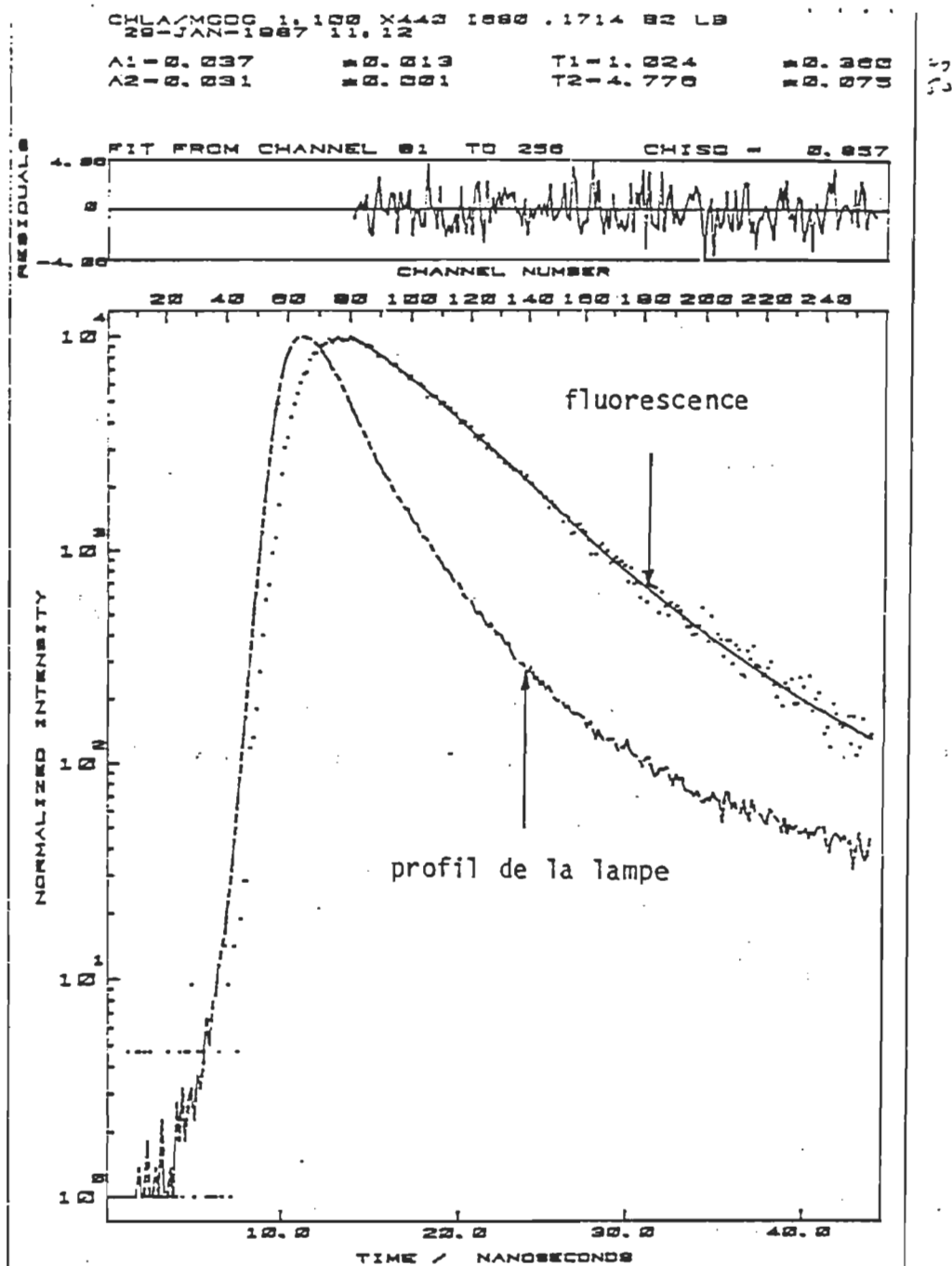


Figure 35: Durée de vie de fluorescence du mélange de chlorophylle a et de MGDG en film de Langmuir-Blodgett.

TABLEAU 12

Durée de vie de fluorescence des mélanges chlorophylle *a*-lipide thylacoïdien
en film de Langmuir-Blodgett

Lipide	Excitation	τ_1 ns	%1	τ_2 ns	%2
MGDG	440	$4,7 \pm 0,2$	80	$1,6 \pm 0,5$	20
DGDG	440	$5,1 \pm 0,1$	75	$1,7 \pm 0,2$	25

TABLEAU 13

Durée de vie de fluorescence des mélanges chlorophylle *a*-lipide thylacoïdien
non purifié par HPLC en film de Langmuir-Blodgett

Lipide	Excitation	τ_1 ns	%1	τ_2 ns	%2
MGDG	414	$5,9 \pm 0,2$	90	$0,1 \pm 0,1$	10
DGDG	414	$6,2 \pm 0,3$	100	---	--
Phéo <i>a</i>	414	5,9	100	---	--

Ces valeurs de durées de vie de fluorescence changent radicalement en fonction de la concentration comme le montre la figure 36. La durée de vie de fluorescence moyenne est calculée selon Moya *et al.*, 1986. Il est surprenant de constater la relative constance de la composante rapide même à des dilutions poussées. Elle n'est pas détectée par une autre équipe de chercheurs à l'interface azote-eau (Agrawal *et al.*, 1985).

La figure 37 montre le tracé des résultats obtenus avec le système dans la picoseconde avec un laser Nd:YAG. Pour fin de comparaison, on a ajouté la moyenne arithmétique des durées de vie de fluorescence moyenne mesurées par notre système à lampe PRA. Ces deux tracés diffèrent. Afin de bien comprendre, il faut tenir compte que l'intensité des éclairs du laser est de plusieurs ordres de grandeurs supérieure à celle de notre lampe.

5) Mélanges chlorophylle *a*-cytochrome *c*

Cette série de manipulations met en présence la chlorophylle *a* avec une protéine, le cytochrome *c*. On étudie son auto-organisation par les propriétés photophysiques du pigment (Lamarche *et al.*, 1990). Les méthodes spectroscopiques utilisées sont la spectrophotométrie, la spectrofluorométrie et les durées de vie de fluorescence.

a) Absorption

L'interaction de la chlorophylle *a* avec le cytochrome *c* entraîne un déplacement vers le bleu des maxima d'absorption (voir le tableau 14 et la figure 38). Dans le cas de la monocouche hydrophile, ils sont de 3 et 6,4 nm

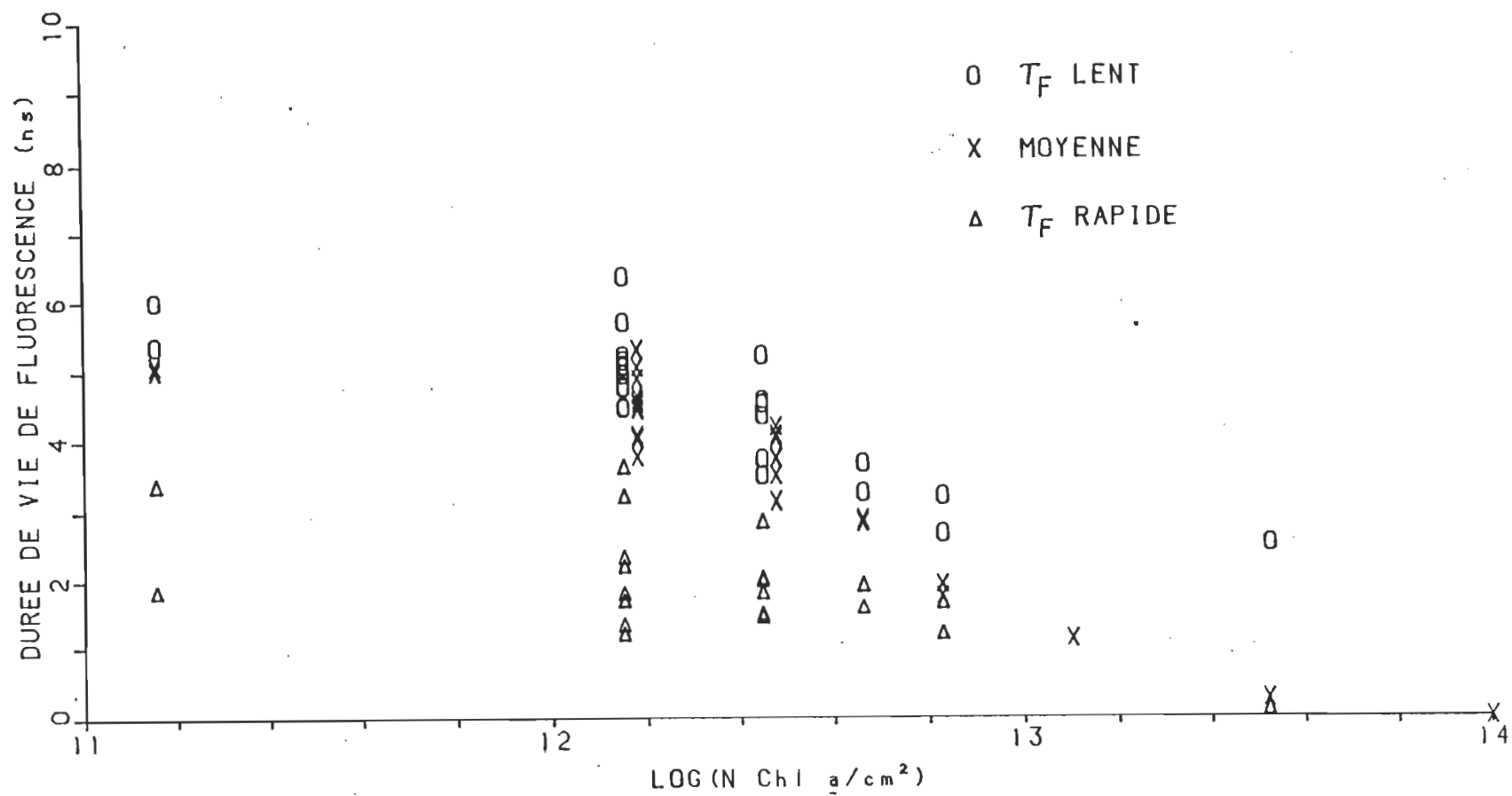


Figure 36: Effet de la concentration en chlorophylle \underline{a} sur les deux durées de vie de fluorescence en film de Langmuir-Blodgett.

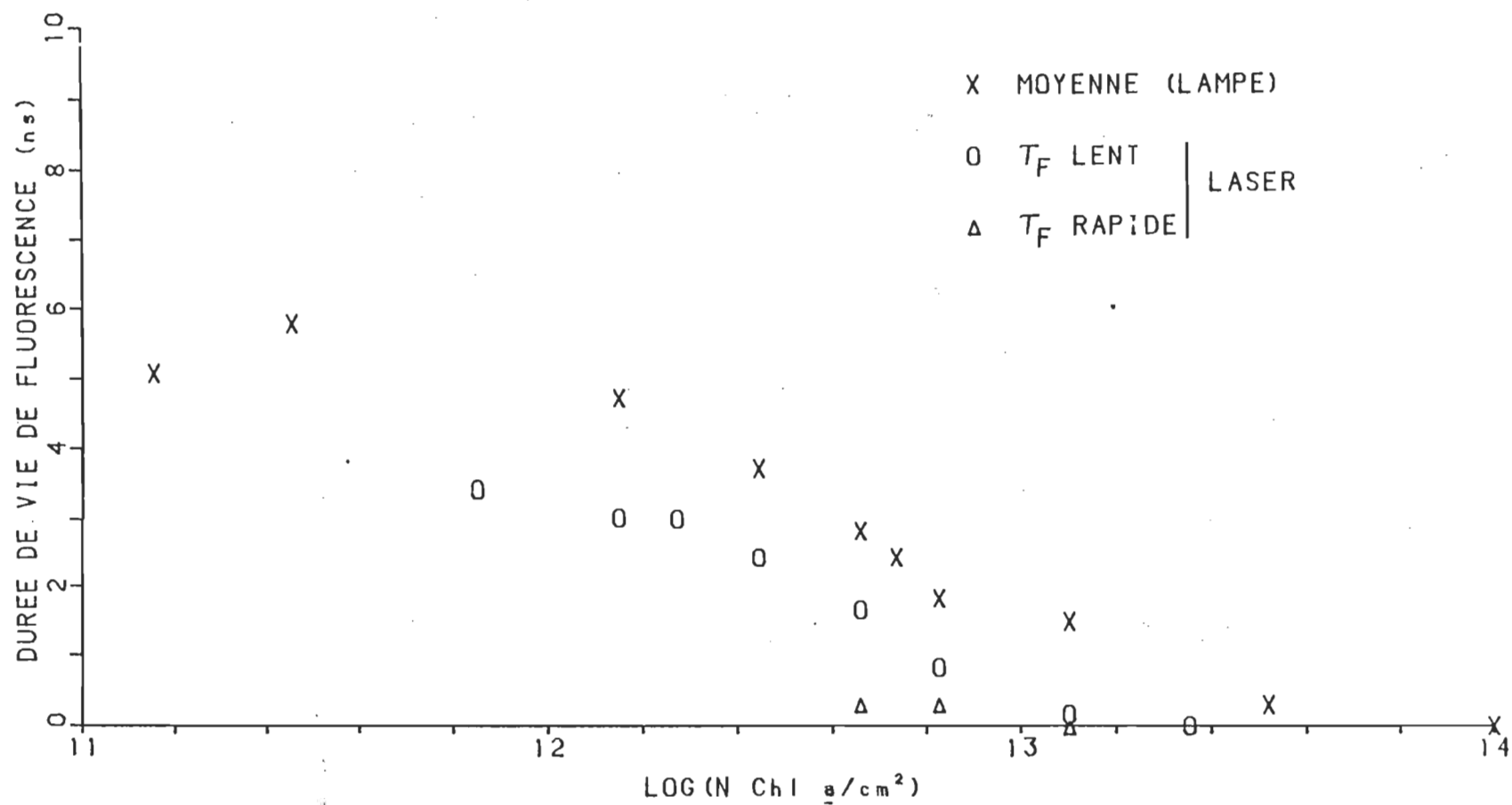


Figure 37: Effet de la concentration en chlorophylle a et de l'intensité de l'éclair sur le déclin de fluorescence en film de Langmuir-Blodgett.

TABLEAU 14

Spectroscopie des monocouches chlorophylle *a*-cytochrome *c*

Système	Nombre de couches	Support	Nombre de lames	Absorption		Fluorescence	
				Bleu nm	Rouge nm	Princ. nm	Sat. nm
Chl <i>a</i>	1	il	6	439	679	706	---
Chl <i>a</i>	1	ob	2	436	677	680	734
Chl <i>a</i>	2	ob	6	438	679	706	742
Chl <i>a</i>	10	ob	3	438	679	736	695
Chl <i>a</i> /Cyt <i>c</i>	1	il	11	436	673	683	740
Chl <i>a</i> /Cyt <i>c</i>	1	ob	1	432	671	682	740
Chl <i>a</i> /Cyt <i>c</i>	2	ob	6	437	674	684	748
Chl <i>a</i> /Cyt <i>c</i>	8	ob	1	436	673	682	744

il: hydrophile

ob: hydrophobe

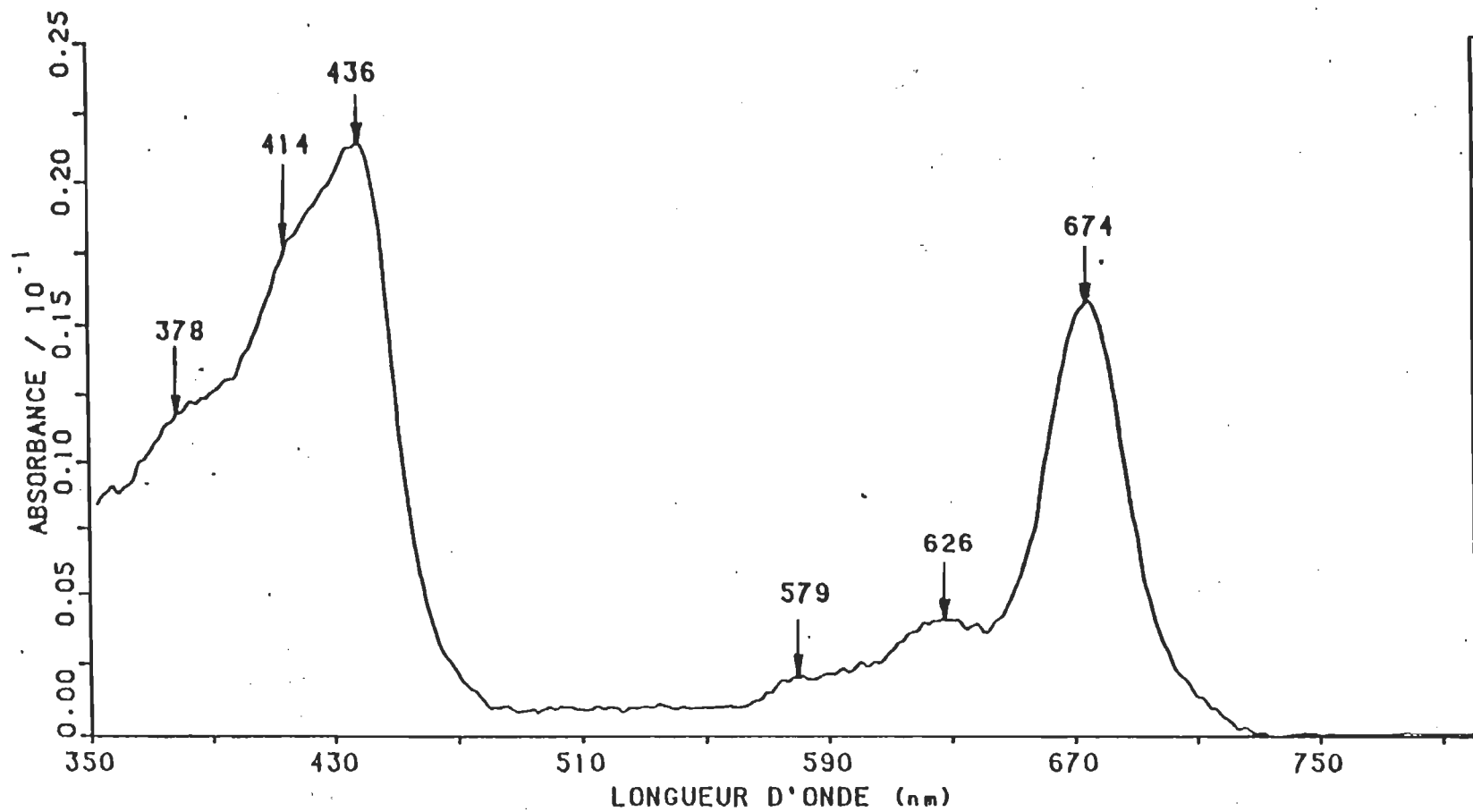


Figure 38: Spectre d'absorption de la chlorophylle a en présence de cytochrome c en film de Langmuir-Blodgett.

pour la bande de Soret et la bande rouge respectivement. La monocouche hydrophobe montre les mêmes déplacements. Ils semblent s'atténuer en fonction de la multiplicité. En effet, huit monocouches de chlorophylle *a* et dix monocouches de complexes chlorophylle *a*-cytochrome *c* diffèrent par 1,7 et 6 nm pour les bandes de Soret et rouge respectivement.

La largeur à mi-hauteur de la bande dans le rouge varie elle-aussi selon l'hydro-affinité des lames et aussi selon la multiplicité des films de chlorophylle *a*. On observe un léger rétrécissement en passant d'un support hydrophobe à un support hydrophile. Toutefois, la superposition de dix couches a élargi de façon marquée la bande. Sa largeur va de 33,3 à 47,0 nm. Les manipulations similaires effectuées avec les complexes chlorophylle *a*-cytochrome *c* affectent relativement peu la largeur de la bande dans le rouge. De plus, elles sont relativement étroite en comparaison avec les films de chlorophylle *a* pure.

La mise en présence de la chlorophylle *a* avec la protéine en monocouche modifie l'absorbance des deux bandes principales. Si on compare les valeurs d'absorbance pour deux films monomoléculaires sans et avec protéines sur lame hydrophile, on observe une diminution de 25% des amplitudes. Ceci ne peut être directement relié à la concentration de pigments dans le film à cause des coefficients d'extinction méconnus dans le cas des mélanges chlorophylle *a*-cytochrome *c*. La comparaison avec les autres films est rendue difficile à cause des transferts non-uniformes. Une inspection visuelle confirme ces doutes. Notons enfin que les spectres d'absorption obtenus avec des multicouches de chlorophylle *a* correspondent aux valeurs publiées dans la littérature (Désormeaux et Leblanc, 1985).

b) Spectre d'émission d'une monocouche mixte

Le profil d'émission de la chlorophylle *a* pure en milieu hydrophile présente une large bande avec un sommet à 706 nm. Ceci correspond aux valeurs déjà parues dans la littérature (Tweet *et al.*, 1964). L'ajout de la protéine à cette monocouche résulte en un déplacement considérable du maximum jusqu'à 682 nm, accompagné d'une bande secondaire à 746 nm (voir figure 39). Le spectre est donc complètement modifié et se rapproche des spectres déjà publiés de chlorophylle *a* diluée dans des lipides en monocouche (Picard *et al.*, 1989).

Le spectre d'émission de la chlorophylle *a* pure en milieu hydrophobe présente une particularité par rapport au même film en milieu hydrophile. Le sommet d'émission de monocouches de chlorophylle *a* reste à 706 nm. De plus, une bande à 742 nm est apparue. Cependant, l'allure générale reste intacte. Ceci est encore plus vrai avec les films de chlorophylle *a*-cytochrome *c* dans les mêmes conditions d'échantillonnage. Les sommets principaux à 682 et 683 nm et secondaires à 746 et 748 nm le démontrent.

L'étude avec dix monocouches de chlorophylle *a* montrent un déplacement spectaculaire de la bande d'émission vers le rouge avec un maximum à 736 nm (voir figure 19). L'émission de huit monocouches de chlorophylle *a*-cytochrome *c* ne présente aucun déplacement significatif du sommet mais l'allure reste inchangée.

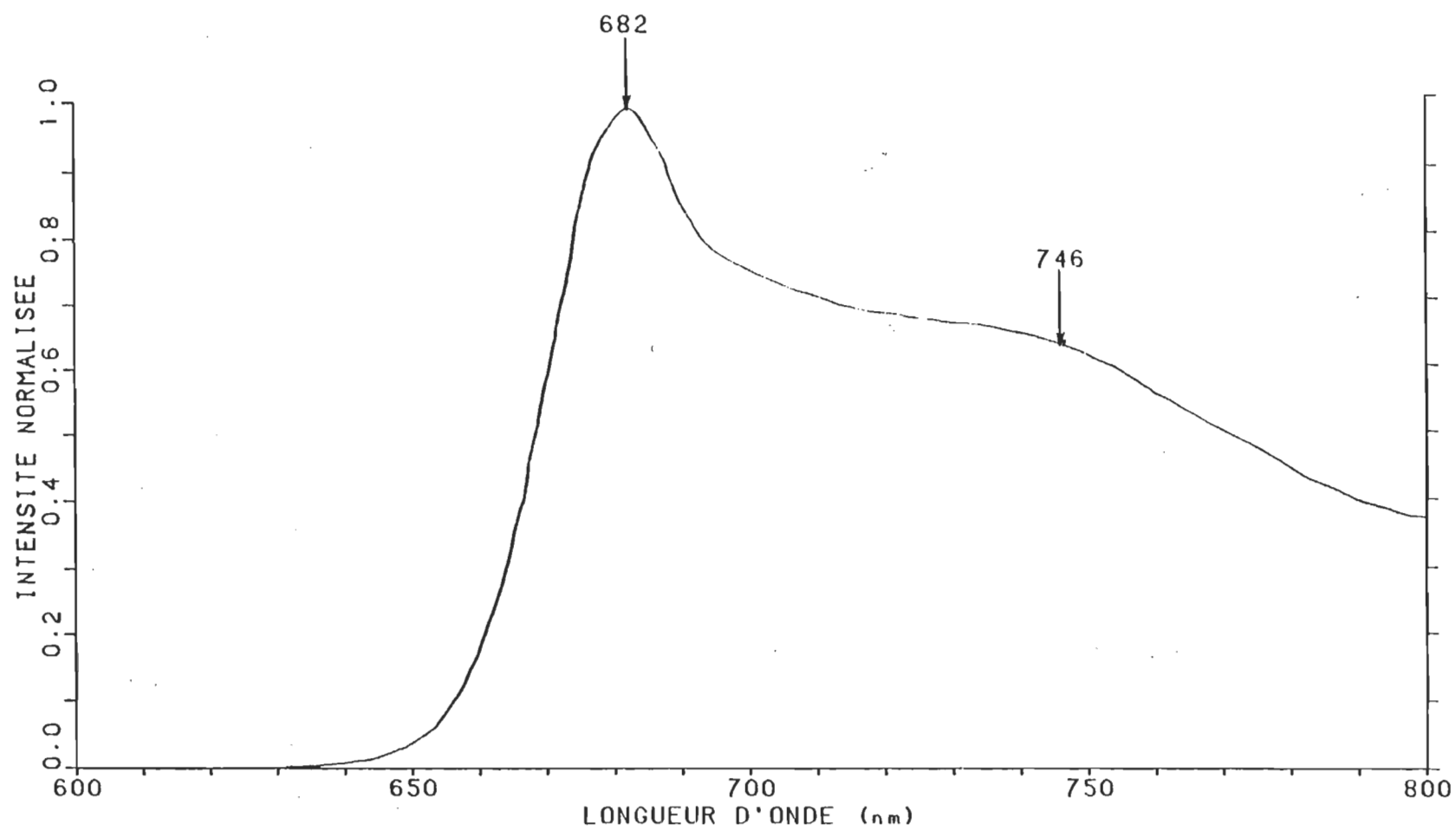


Figure 39: Spectre d'émission de la chlorophylle a en présence de cytochrome c en film de Langmuir-Blodgett.

c) Durée de vie de fluorescence des monocouches mixtes de chlorophylle *a* et de cytochrome *c*

Le déclin de fluorescence sur lame hydrophile se situe en-dessous de la limite de résolution de l'appareillage pour la chlorophylle *a* pure et le mélange chlorophylle *a*-cytochrome *c*. Dans le cas des mesures sur lames hydrophobes, on réussit à déterminer des valeurs de durées de vie de fluorescence. Pour deux monocouches de Chl *a*-Cyt *c*, on obtient 0,3 et 3,9 ns avec des contributions de 90% pour la composante rapide. Toutefois, un certain manque de reproductibilité existe.

Les deux monocouches chlorophylle *a*-cytochrome *c* montrent un comportement similaire dans la rapidité du déclin. Enfin, l'investigation faite sur dix monocouches de chlorophylle *a* pure montre deux composantes de 0,3 et 3,3 ns avec une contribution relative de 93 et 7% respectivement. Ceci illustre le peu d'effet de l'addition de huit monocouches sur le mécanisme de fluorescence.

D) MESURES À L'INTERFACE AZOTE-EAU

Cette dernière partie des résultats vise à confirmer l'ensemble des mesures expérimentales obtenues dans ce projet. Les deux composantes obtenues avec les films de Langmuir-Blodgett pouvaient être interprétées comme une cristallisation de la monocouche sur des imperfections de surface. La comparaison directe entre ces deux ensembles de résultats permettront de vérifier si le transfert de la monocouche altère l'homogénéité de la distribution des pigments à l'interface. De plus, ce nouveau

montage optique est plus versatile que celui pour les films sur lames de quartz, car il permet d'étudier en plus les liquides et l'interface liquide-gaz. Ainsi, un nouveau champ d'investigation s'offre à nous pour de futurs projets.

On présente seulement les mesures de durée de vie de fluorescence au tableau 15. Il n'y a pas de spectrofluorimètre ni de spectrophotomètre capable d'effectuer des mesures à l'interface azote-eau pour l'instant. Les mélanges choisis sont la chlorophylle *a* avec du DOPC dans un rapport molaire d'un pigment pour cent lipides.

L'autre mélange concerne la chlorophylle *a* dans le MGDG. Le tableau 15 résume tous ces résultats et les compare avec les mesures obtenues par d'autres systèmes. On constate que le transfert ne dérange en rien l'obtention de deux durées de vie de fluorescence. Les valeurs et leur contribution relative diffèrent quelque peu.

TABLEAU 15

Durée de vie de fluorescence des mélanges chlorophylle *a*-lipide
à l'interface azote-eau

Lipide	Système	τ_1 ns $\pm 0,2$	%1	τ_2 ns $\pm 0,2$	%2
MGDG	LB	5,2	80	1,7	20
MGDG	EAU	---	---	---	--
DOPC	LB	5,5	80	2,5	20
DOPC	EAU	5,5	80	2,5	20
DOPC*	EAU	5,5	100	---	--

* Agrawal *et al.*, 1985.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les mesures du déclin de fluorescence en solution reproduisent bien les valeurs de la littérature. Toutefois, le désaccord entre les résultats issus des mesures à l'interface azote-eau laisse perplexe. On détermine deux composantes: une d'environ cinq nanosecondes, attribuée au monomère, et une de deux nanosecondes, d'origine encore indéterminée. En contrepartie, le seul résultat publié par une autre équipe de chercheurs présente une seule composante de 5,5 nanosecondes (Agrawal *et al.*, 1985).

Par conséquent, des dispositions ont été prises afin d'assurer la fiabilité des résultats:

- simulation numérique pour tester le progiciel de déconvolution (II, b, 2, g);
- mesures de durée de vie de fluorescence de la chlorophylle *a* en solution pour vérification du système (III, A, 3);
- changement d'optique pour les films de Langmuir-Blodgett et tests en solution pour vérifier le bon fonctionnement (III, B, 3);
- nouveau changement pour les mesures à l'interface azote-eau et nouveaux tests en solution et en film de Langmuir-Blodgett (III, D);
- standard de durée de vie de fluorescence en film de Langmuir-Blodgett établie avec un autre laboratoire (Dick *et al.*, 1988).

De ce fait, la deuxième composante rapide, à haute dilution dans le phosphatidylcholine, origine des molécules étudiées. De là, les possibilités sont:

- proximité entre chlorophylles par le phospholipide;
- distribution statistique des distances inter-chlorophylle;
- nouvelle espèce de pigment dû à une réaction chimique;
- dimère hydraté de chlorophylle *a*;
- impuretés.

Une récente publication a traité de l'interaction entre la chlorophylle *a* et le phosphatidylcholine en solution non aqueuse (Krawczyk, 1985). Ses résultats indiquaient une interaction entre le magnésium de l'anneau porphyrine et le groupement choline. Toutefois, la grande ressemblance entre les résultats obtenus avec les galactolipides et les phosphatidylcholines indiquent que l'origine de cette composante rapide n'est pas spécifique au type de tête polaire.

La deuxième hypothèse paraît plus plausible. Un calcul statistique détaillé à l'Annexe II montre que pour une dilution 1:100, on obtient 5% des pigments en contact. Cette proximité pourrait générer un processus de désactivation supplémentaire ou même devenir un piège d'énergie.

Un fait étonne dans cet ensemble de résultats. Le spectre d'excitation de la chlorophylle *a* diluée dans le MGDG, DGDG, tous les PC et enfin, en monocouche pure reste le même. Le solvato-chromisme de la chlorophylle *a* est un fait bien connu et constitue un sujet d'étude en soi (Seely et Jensen, 1965). Par conséquent, il faut que l'environnement électronique immédiat des électrons de l'anneau porphyrine demeure constant. La seule molécule qui pourrait jouer un rôle clef dans ces diverses situations est l'eau. Son affinité pour l'atome de magnésium est bien connue en chimie minérale. Sa présence dans le film de Langmuir-Blodgett a même fait l'objet d'une publication (Chapados et Leblanc, 1983). On y décrit son affinité pour l'atome de

magnésium. Elle sert à structurer les plans porphyrines et à les maintenir à une distance de 6,8 Å.

L'effet de l'hydratation sur la chlorophylle *a* est un sujet d'étude intéressant. La mesure de son déclin de fluorescence en solution par divers groupes de chercheurs (De Wilton et Koningstein, 1983; Alfano *et al.*, 1985) nous informe que l'hydratation influe sur les propriétés spectroscopiques du pigment. Le premier groupe attribue la bande de fluorescence à 633 nm au dimère de chlorophylle *a*. Le dimère hydraté se désactive deux fois plus rapidement que le monomère selon le deuxième groupe. La présence d'eau en abondance dans la sous-phase interdit probablement la formation de dimère non hydraté. Ainsi, la petite bande de 633 nm peut être attribuée à des dimères hydratés de chlorophylle *a*.

La phéophytine *a* ne forme pas de dimère responsable d'une deuxième composante. La phéophytine *a* en film de Langmuir-Blodgett mélangée dans les mêmes proportions que la chlorophylle *a* avec le DOPC décline selon une seule composante lente de 5,7 ns. La bande à 633 nm n'est pas détectée. L'absence de magnésium ne permet pas l'association intra-moléculaire via l'eau malgré 5% de molécules en voisinage immédiat.

La chlorophylle *a* sur la surface de l'eau est sûrement hydratée. L'étude statistique démontre qu'il y aurait environ 5% de ces pigments hydratés en association (voir Annexe II). On devrait observer 5% de contribution de fluorescence à 2,2 ns. Cette valeur se rapproche des présents résultats mais les pourcentages diffèrent: la composante rapide mesurée varie entre 25 et 5%. Ceci pourrait signifier que l'agrégation est du même type, mais en proportion plus importante que celle dû au hasard.

Des mesures de durée de vie de fluorescence pour le mélange chlorophylle *a*-DOPC, 1:100, ont été réalisées à l'interface azote-eau sans compression. Les mêmes résultats ont été observés avec une compression de 20 mN/m. Sans compression, la chlorophylle *a* pure montre une composante lente au début et une seule composante de 0,2 ns après 15 minutes. Ces résultats suggèrent que la chlorophylle *a* s'agglomère naturellement et est ralentie par la présence des phospholipides. Mais avant d'être immobilisés par le transfert sur lame de quartz, un certain nombre de pigments s'accrochent les uns aux autres au-delà de la proportion statistique prévue.

La mésaventure connue avec les galactolipides nous l'enseigne: les composés organiques hors de leur milieu naturel sont d'une extrême fragilité. Ainsi, l'altération du pigment reste possible. Si tel est le cas, le composé de dégradation montre sa propre durée de vie de fluorescence. Cependant, l'ensemble des résultats en solution concordent avec les valeurs publiées dans la littérature. Ceci prouve que la qualité de nos solutions correspond aux standards acceptés.

Les impuretés complètent le portrait des dangers potentiels du mélange chlorophylle *a*-lipide. Certaines impuretés peuvent favoriser l'apparition des dimères décrits ci-haut. La variation de la concentration de ces impuretés devrait influencer la composante rapide. Ceci élimine la chlorophylle *a*, les lipides purifiés par HPLC et la phosphatidylcholine comme source potentielle en raison de leur diversité. Si la propriété de l'interface variait beaucoup, le déclin de la fluorescence varierait aussi. Les résultats attestent de la qualité de la surface du bain.

Les mesures du déclin de la fluorescence en fonction de la concentration de chlorophylle *a* en film Langmuir-Blodgett sont montrées aux figures 36 et 37. Aux concentrations de 1:100 et 1:1000, le comportement de la fluorescence est compatible

avec un modèle monomère-dimère. Comme suggéré par Alfano *et al.*, 1985, la composante du dimère est deux fois plus rapide que le monomère. L'augmentation de la concentration favorisera l'apparition d'oligomères supérieurs. Le progiciel de déconvolution n'a pas la résolution nécessaire pour isoler ces multiples composantes dus aux oligomères. Donc, les résultats à hautes concentrations sont imprécis.

Une analyse plus poussée demanderait un traitement des données basé sur un calcul de distribution des déclins de fluorescence et secondé par un calcul statistique sur la répartition de la chlorophylle à diverses concentrations.

Le rapprochement par la sous-phase de la monocouche de chlorophylle *a* par le cytochrome *c* vise à déterminer si une liaison forte est possible entre ces deux composés. Présentement, deux possibilités prévalent. Soit que les liens entre la chlorophylle *a* et la protéine sont spécifiques à un acide aminé ou que la chlorophylle adsorbe sur la région hydrophobe de la protéine.

La comparaison entre les spectres d'absorption de la chlorophylle *a* seule ou associée au cytochrome *c* en film de Langmuir-Blodgett nous montre sans équivoque une interaction. Le maximum d'absorption de la bande de Soret passe de 438 à 436 nm. Ainsi, l'action du cytochrome *c* sur la chlorophylle *a* hydratée diffère de beaucoup de la situation rencontrée avec les lipides.

Les spectres de fluorescence sont encore plus spectaculaires. Le massif caractéristique de la monocouche de pigments avec son sommet à 700 nm se transforme pour ressembler au spectre typique de la chlorophylle monomère, mais sans y parvenir. Ainsi, on peut supposer un début de dilution. Les valeurs de courtes durées de vie de fluorescence nous indiquent cependant que s'il y a un effet de dilution, il n'y a pas

découplage excitonique du pigment de la monocouche car on n'observe plus de composante lente.

Les courbes de pression de surface elles aussi montrent une interaction entre la chlorophylle *a* et la protéine. Lorsque la pression est relâchée et rétablie, l'aire moléculaire a augmentée. Cette augmentation ne peut provenir que de la protéine qui s'ajoute aux molécules en monocouches ou qu'elle s'étale à la surface.

L'ensemble de ces données proposent le scénario suivant: le cytochrome *c* solvate la chlorophylle *a* par un acide aminé. L'eau associée au magnésium est ainsi substituée. Cette nouvelle association découple excitoniquement la chlorophylle *a* de la monocouche. Elle se comporte spectroscopiquement comme un monomère et fluoresce à 683 nm. Cette longueur d'onde correspond à l'absorption de la monocouche pure. Alors, les transferts de type Förster deviennent possibles. Il est possible que la proximité d'autres chlorophylles provoque un transfert rapide de l'énergie vers le complexe pigment-protéine où l'exciton sera convertie en chaleur.

L'autre type d'association, par la région hydrophobe, serait incapable de déplacer le spectre d'absorption, mais pourrait expliquer les spectres et déclins de fluorescence. Pour que le transfert de l'interface air-eau vers la lame de quartz puisse se faire, il faut que les composés se situent en partie ou en totalité à la surface. Comme la protéine ne détache pas la chlorophylle *a* de la monocouche, elle est étalée en partie ou en totalité à la surface. La réalité d'une telle monocouche de pigments et de protéines sur une surface de quartz sans qu'il n'y ait fragmentation de film suite à un réarrangement implique que celui-ci a eu lieu avant le transfert. Ainsi, on peut postuler que l'étalement de la protéine est complété avant le transfert. Par conséquent, les régions

hydrophobes qui caractérisent le cytochrome *c* dans leur conformation refermée en milieux aqueux sont dénaturées.

En somme, l'interaction chlorophylle *a*-cytochrome *c* dans le cas actuel serait spécifique à un acide aminé. Les mesures par rayon-X du centre réactionnel d'une bactérie photosynthétique montrent que ces associations sont spécifiques avec les protéines du centre réactionnel. Si la simple présence d'une protéine et de la chlorophylle *a* amènent la spécificité, il est probable que les chlorophylles dans la membrane du thylacoïde se soit liées de la même façon aux protéines.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Il est possible de mesurer la durée de vie de fluorescence de la chlorophylle *a* en films minces, comme les monocouches et les films Langmuir-Blodgett, malgré la faiblesse du signal. Grâce à un montage optique conçu par notre laboratoire pour optimiser la collecte des photons de fluorescence et rejeter ceux de la lumière parasite, l'appareil de PRA peut mener à bien cette tâche. Le développement et la mise au point de ces optiques particulières ainsi que leurs calibrations nécessitent de nombreuses étapes décrites dans les sections II, B-E. Ces montages mesurent aussi les spectres d'excitation qui se révèlent un excellent remplacement des spectres d'absorbance aux faibles concentrations.

Cet ouvrage constitue un point de départ pour une investigation plus large. On a étudié le comportement photophysique de la chlorophylle *a* dans une membrane bio-mimétique composée de pigments, de lipides ou de protéines. On a observé que le cytochrome *c* avait une affinité particulière avec le pigment, alors que les lipides semblaient le dissoudre en monomère, dimère et oligomère selon la concentration. L'ensemble des données suggère fortement que dans la membrane du thylacoïde, l'anneau porphyrine de la chlorophylle *a* est liée spécifiquement aux acides aminés.

Dans la démarche expérimentale, la mesure de durée de vie de fluorescence prend beaucoup d'importance. Il est un fait bien connu que l'avancement du savoir humain suit de près le degré de perfectionnement de ses outils. Ainsi, il est souhaitable d'obtenir une machinerie capable de déterminer des durées de vie de l'ordre de la

femtoseconde. Ensuite, il faudrait un logiciel de déconvolution pour trouver leur distribution. Des mesures par polarisation seraient elles aussi utiles car on pourrait déterminer l'attachement de certains pigments à la protéine.

Les systèmes modèles, pour fonctionner de façon appropriée, devraient être constitués de chlorophylles et de lipides obtenus par HPLC. Les mélanges devraient s'orienter par la suite du côté des systèmes ternaires: chlorophylle *a*-galactolipide-protéine. On connaît alors la préférence des protéines.

Il faudrait aussi disposer de spectrophotomètre et de spectrofluorimètre capables de prendre des mesures directement à l'interface. Eux aussi seraient munis de polariseurs afin de déterminer l'orientation relative des pigments.

L'interprétation des mesures de durée de vie de fluorescence des mélanges chlorophylle *a*-lipide en film mince en fonction de la concentration demanderait au préalable une étude approfondie des modèles mathématiques proposés par la littérature. Toutefois, une investigation nous a permis de constater une grande disparité dans les équations de travail. Ceci résulte d'une modélisation déficiente à la base de ces calculs. Afin d'apporter une nouvelle théorie à la littérature, une étude conjointe des modèles mathématiques et des mesures expérimentales jetteraient beaucoup de lumière sur les processus photophysiques qui ont lieu à l'interface.

Enfin, une investigation spectroscopique des systèmes biologiques qui allierait la précision technique et le calcul mathématique de grande qualité rendrait possible la détermination des distances et des orientations relative des pigments impliqués dans le processus de la photosynthèse.

CHAPITRE VI

RÉFÉRENCES

- Aghion, J., Broyde, S.B. & Brody, S.S. (1969) Surface reactions of chlorophyll *a* monolayers at a water-air interface. Photochemistry and complex formation. *Biochem.* 8, 3120-3126.
- Aghion, J., Broyde, S.B. & Brody, S.S. (1970) Quelques propriétés photochimiques de monocouches de chlorophylle *a* situées à une interface eau-air. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* 103, 107-114.
- Agrawal, M.L., Chauvet, J.-P. & Patterson, L.K. (1985) Effects of molecular organization on photophysical behavior: lifetime and steady-state fluorescence of chlorophyll *a* singlets in monolayers of dioleoylphosphatidylcholine at the nitrogen-water interface. *J. Phys. Chem.* 89, 2979-2982.
- Alfano, A.J., Lytle, F.E., Showell, M.S. & Fong, F.K. (1985) Excited singlet state lifetimes of hydrated chlorophyll aggregates. *J. Chem. Phys.* 82, 758-764.
- Avarmaa, R., Soovik, T., Tamkivi, R. & Tõnissoo, V. (1977) Fluorescence lifetimes of chlorophyll *a* and some related compounds at low temperatures. *Stud. Biophys.* 65, 213-218.
- Beddard, G.S., Fleming, G.R., Porter, G., Searle, G.F.W. & Synowiec, J.A. (1979) The fluorescence decay kinetics of *in vivo* chlorophyll measured using low intensity excitation. *Biochem. Biophys. Acta* 545, 165-174.
- Bélanger, D. (1982) Étude spectroscopique de la chlorophylle *a* *in vitro*. Mémoire de maîtrise, Université Laval.

- Bellamy, W.D., Gaines jr, G.L. & Tweet, A.G. (1963) Preparation and properties of monomolecular films of chlorophyll *a* and pheophytin *a*. J. Chem. Phys. 39, 2528-2538.
- Bellamy, W.D. & Lynch, M.E. (1963) The preparation, preservation, and properties of chlorophyll and some of its derivatives. Report # 63-RL-3469G, General Electric Laboratories, Schenectady, NY 12301, USA.
- Berens, S.J., Scheele, J., Butler, W.L. & Magde, D. (1985) Kinetic modeling of time-resolved fluorescence in spinach chloroplasts. Photochem. Photobiol. 42, 59-68.
- Brewington, G.T. (1979) Studies of photosynthetic membranes using chlorophyll fluorescence lifetimes. Thèse de doctorat, Université de Californie, Berkeley.
- Brody, S.S. & Rabinovitch, E. (1957) Excitation lifetime of photosynthetic pigments *in vitro* and *in vivo*. Science 125, 555.
- Butler, W.L. & Norris, K.H. (1963) Lifetime of the long-wavelength chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophys. Acta 66, 72-77.
- Campillo, A.J., Kollman, V.H. & Shapiro, S.L. (1976) Intensity dependence of the fluorescence lifetime of *in vivo* chlorophyll excited by a picosecond light pulse. Science 193, 227-229.
- Cermak, K. & Kaplanova, M. (1980) Fluorescence lifetimes of chlorophyll *a*. Czech. J. Phys. B30, 713-716.
- Chapados, C. & Leblanc, R.M. (1983) Aggregation of chlorophylls in monolayers V. The effect of water on chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in mono and multilayer arrays. Biophys. Chem. 17, 211-244.
- Chin, P. & Brody, S.S. (1976) Mixed monomolecular films of chlorophyll and cytochromes. Z. Naturforsch 31, 44-47.
- Connolly, J.S., Janzen, A.F. & Samuel, E.B. (1982) Fluorescence lifetimes of chlorophyll *a*: solvent, concentration and oxygen dependence. Photochem. Photobiol. 36, 559-563.

- De B. Costa, S.M., Froines, J.R., Harris, J.M., Leblanc, R.M., Orger, B.H. & Porter, G. (1972) Model systems for photosynthesis III. Primary photoprocesses of chloroplast pigments in monomolecular arrays on solid surfaces. *Proc. R. Soc. Lond.* 326, 503-519.
- Désormeaux, A. & Leblanc, R.M. (1985) Electronic and photoacoustic spectroscopies of chlorophyll *a* in monolayer and multilayer arrays. *Thin Solid Films* 132, 91-99.
- De Wilton, A.C. & Koningstein, J.A. (1983) Time-resolved fluorescence spectra of chlorophyll *a* dimers and aggregates using selective photochemical bleaching. *J. Phys. Chem.* 87, 185-188.
- Dick, H.A., Picard, G., Munger, G., Leblanc, R.M. & Bolton, J.R. (1988) Fluorescence lifetime of 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-tritolylporphyrin in a mixed Langmuir-Blodgett film with dioleoylphosphatidylcholine. A proposed standard. *Langmuir* 4, 133-136.
- Ducharme, D. (1987) Construction, mise au point d'un ellipsomètre et études ellipso-métriques de phospholipides à l'interface air-eau. Thèse de doctorat, Université Laval.
- Dzagarov, B.M., Zozlov, Yu.I., Simonov, A.P. & Gurinovich, G.P. (1972) Triplet-triplet absorption of a copper complex with mesoporphyrin. *Opt. Spektrosk.* 32, 838-840.
- Evans, J.R. & Anderson, J.M. (1987) Absolute absorption and relative fluorescence excitation spectra of the five major chlorophyll-protein complexes from spinach thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 892, 75-82.
- Goedheer, J.C. (1966) Visible absorption and fluorescence of chlorophyll and its aggregates in solution. In: L.P. Vernon et G.R. Seely (Eds), *The chlorophylls*. pp. 147-184. Academic Press, New York.
- Gulotty, R.J., Mets, L., Alberte, R.S. & Fleming, G.R. (1985) Picosecond fluorescence study of photosynthetic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*: origin of the fluorescence decay kinetics of chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* 41, 487-496.

- Gurinovich, G.P., Sevchenko, A.N. & Solov'ev, K.N. (1968) Spectroscopy of chlorophyll and related compounds. 517 p.
- Heithier, H., Ballschmiter, K. & Möhwald, H. (1983) Liquid-crystalline phase transition of monomolecular layers of chlorophyll *a*. Photochem. Photobiol. 37, 201-205.
- Hodges, M. & Moya, I. (1987) Modification of room temperature picosecond chlorophyll fluorescence kinetics in photosystem II enriched particles by photochemistry. Biochim. Biophys. Acta 892, 42-47.
- Holzwarth, A.R., Haenel, W., Wenzler, J., Suter, G.W. & Ratajczak, R. (1984) Picosecond fluorescence kinetics and energy transfer in antennae chlorophylls of green algae and membrane fractions of thylakoids. In: C. Sybesma (Ed.), Advances in photosynthesis research. (Vol. 1), pp. 73-76. Nijkoff/Junk, The Hague.
- Hooper, J.K. (1984) Chloroplasts. New York; Plenum Press.
- Iriyama, K. and Yoshiura, M. (1979) Separation of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* by column chromatography with Sephadex LH-20 or powdered sugar. J. Chromatogr. 117, 154-156.
- Jacobs, E.E. & Holt, H.S. (1954) The absorption spectrum of chlorophyll *a* crystals. J. Chem. Phys. 22, 142-143.
- Kaplanova, M. & Cermak, K. (1981) Effect of reabsorption on the concentration dependence of fluorescence lifetimes of chlorophyll *a*. J. Photochem. 15, 313-319.
- Karukstis, K.K. & Sauer, K. (1985) The effects of cation-induced and pH-induced membrane stacking on chlorophyll fluorescence decay kinetics. Biochim. Biophys. Acta 806, 374-388.
- Klimov, V.V., Allakhverdiev, S.I. & Pashchenko, V.Z. (1978) Measurement of the activation energy and lifetime of fluorescence of photosystem II chlorophyll. Dokl. Akad. Nauk SSSR 242, 1204-1207.
- Krawczyk, S. (1985) Stoichiometric complexes of chlorophyll with phosphatidylcholine in solution. Photobiochem. Photobiophys. 9, 99-108.

- Lamarche, F. (1988) Une approche permettant de qualifier et de quantifier les interactions lipide-protéine et chlorophylle-protéine à l'interface air-eau. Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières.
- Lamarche, F., Picard, G., Aghion, J. & Leblanc, R.M. (1990) Emission properties of chlorophyll *a* in a proteic environment. (en préparation).
- Melhuish, W.H. (1973) Absolute spectrofluorometry. N.B.S. Special Publication 378, 137-150.
- Moya, I., Hodges, M. & Barbet, J.-C. (1986) Modification of room-temperature picosecond chlorophyll fluorescence kinetics in green algae by photosystem II trap closure. FEBS Lett. 198, 256-262.
- Müller, A., Lumry, R. & Walker, M.S. (1969) Light-intensity dependence of the *in vivo* fluorescence lifetime of chlorophyll. Photochem. Photobiol. 9, 113-126.
- Munger, G. (1979) Détermination du poids moléculaire de protéine à l'interface air-eau par un nouveau système à faible pression de surface. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières.
- Omata, T. & Murata, N. (1980) A rapid and efficient method to prepare chlorophyll *a* and *b* from leaves. Photochem. Photobiol. 31, 183-185.
- Picard, G., Le Crom, C., Aghion, J. & Leblanc, R.M. (1989) Fluorescence properties of Langmuir-Blodgett films of chlorophyll *a* mixed with membrane lipids. Thin Solid Films 180, 31-42.
- Picard, G., Munger, G., Leblanc, R.M., LeSage, R., Sharma, D.K., Siemiarczuk, A. & Bolton, J.R. (1986) Fluorescence lifetime of chlorophyll *a* in pure and mixed Langmuir-Blodgett films. Chem. Phys. Lett. 129, 41-47.
- Porter, G., Synowiec, J.A. & Tredwell, C.J. (1977) Intensity effects on the fluorescence of *in vivo* chlorophyll. Biochem. Biophys. Acta 459, 329-336.
- Roberts, G.C.K. (1981) Correction of excitation and emission spectra. In: J.N. Miller (Ed.), Standards in fluorescence spectrometry. New York, Chapman and Hall.

- Schatz, G.H. & Holzwarth, A.R. Picosecond time-resolved chlorophyll fluorescence spectra from pea chloroplast thylakoids. In: J. Biggins (Ed.), Progress in photosynthetic research, (Vol. 1). Boston: Martinus Nijhoff publisher, 1987, pp. 67-70.
- Seely, G.R. & Jensen, R.G. (1965) Effect of solvent on the spectrum of chlorophyll. Spectrochim. Acta 21, 1835-1845.
- Seibert, M. & Alfano, R.R. (1974) Probing photosynthesis on a picosecond time scale. Evidence for photosystem I and photosystem II fluorescence in chloroplasts. Biophys. J. 14, 269-283.
- Shapiro, S.L., Kollman, V.H. & Campillo, A.J. (1975) Energy transfer in photosynthesis: pigment concentration effects and fluorescent lifetimes. FEBS Lett. 54, 358-362.
- Shipman, L.L., Cotton, T.M., Norris, J.R. & Katz, J.J. (1976) An analysis of the visible absorption spectrum of chlorophyll *a* monomer, dimer, and oligomers in solution. J. Am. Chem. Soc. 98, 8222-8230.
- Singhal, G.S. & Rabinowitch, E. (1969) Measurement of the fluorescence lifetime of chlorophyll *a* *in vivo*. Biophys. J. 9, 586-591.
- Szalay, L., Singhal, G.S., Tombacz, E. & Kozma, L. (1973) Light absorption and fluorescence of highly diluted chlorophyll solutions. Acta Phys. Acad. Sci. Hung. 34, 341-350.
- Szalay, L., Tombacz, E. & Singhal, G.S. (1974) Effect of solvent on the absorption spectra and Stokes' shift of absorption and fluorescence of chlorophylls. Acta Phys. Acad. Sci. Hung. 35, 29-36.
- Terenin, A.N., Kobyshev, G. and Lyalin, G. (1966) Anomalous emission of chlorophyll, stimulated by ruby laser. Photochem. Photobiol. 5, 689-691.
- Turnit, H.J. and Colmano, G. (1959) Chloroplast studies. I. Absorption spectra of chlorophyll monolayers at liquid interfaces. Biochim. Biophys. Acta 31, 434-447.
- Tumerman, L.A. (1967) Conversion of light energy in photosynthesis. Mekk. Dykhaniya Fotosin. Fiksatsii. Azota, 219-248.

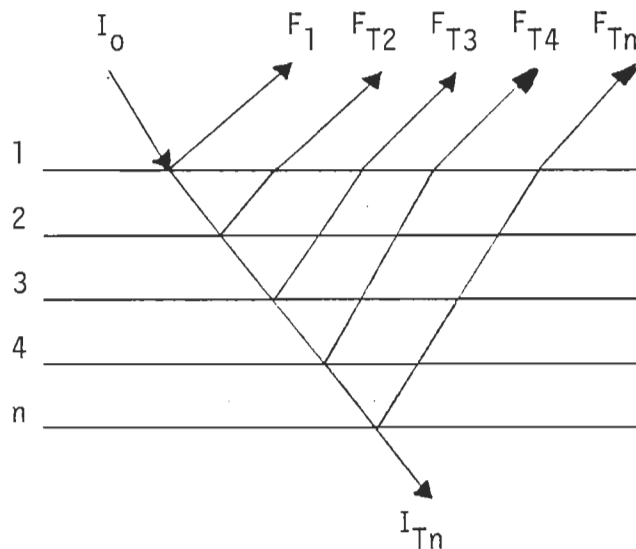
- Tweet, A.G., Gaines Jr., G.L. & Bellamy, W.D. (1964) Fluorescence of chlorophyll *a* in monolayers. *J. Chem. Phys.* 40, 2596-2600.
- Velapoldi, R.A. & Mielenz, K.D. (1980) A fluorescence standard reference material: quinine sulfate dihydrate. N.B.S. Special publication, 260-264.
- Vinter, E. (1981) Liquid absorbance standards. In: Burgess, C. and Knowles, A., *Standards in absorption spectrometry*, New York, Chapman and Hall, 48-82.
- Weis, R.M. & McConnell, H.M. (1984) Two-dimensional chiral crystals of phospholipid. *Nature* 310, 47-49.

CHAPITRE VII

ANNEXE I

Le spectre de fluorescence d'une superposition de "n" couches de chlorophylles est fortement décalé vers le rouge par rapport à celui d'une monocouche diluée (voir figure 23). Le maximum d'émission passe de 679 nm à 738 nm. Ceci pourrait être attribué à un effet de filtre qui absorberait toute la lumière à 679 nm et laisserait passer les longueurs d'onde plus élevées. Toutefois, l'analyse mathématique ci-dessous écarte cette possibilité.

Si on représente la situation par le schéma suivant:



I_0 : lumière incidente.

F_1 : fluorescence émise par la première couche.

I_{Tn} : lumière transmise après avoir traversée "n" couches.

A : absorbance d'une monocouche.

L'absorption à la première couche devient

$$A = \log (I_0/I_{T1}) = \log \frac{I_0}{I_0 - I_A} = \log \frac{1}{(1 - I_A/I_0)} = -\log (1 - I_A/I_0)$$

Après manipulation, on a

$$I_A = I_0 (1 - 10^{-A}) = I_0 \alpha$$

donc, l'absorption à la première couche est exprimée par la relation

$$I_{A1} = I_0 \alpha$$

et la lumière transmise par l'équation suivante

$$I_{T1} = I_0 - I_{A1} = I_0 - I_0 \alpha = I_0 (1 - \alpha).$$

En gardant la même approche, l'absorption à la deuxième couche est exprimée par

$$I_{A2} = I_{T1} \alpha = I_0 (1 - \alpha) \alpha$$

et la lumière transmise:

$$I_{T2} = I_{T1} - I_{A2} = I_0 (1 - \alpha)^2.$$

À la troisième couche, on a

$$I_{A3} = I_{T2} \alpha = I_0 (1 - \alpha)^2 \alpha$$

et

$$I_{T_3} = I_{T_2} - I_{A_3} = I_0 (1 - \alpha)^3.$$

À la n^e couche,

$$I_{A_n} = I_0 (1 - \alpha)^{n-1} \alpha = I_0 \cdot 10^{-A(n-1)} (1 - 10^{-A})$$

et

$$I_{T_n} = I_0 (1 - \alpha)^n = I_0 10^{-nA}$$

La fluorescence de chaque couche est donnée par la relation

$$F_n = I_{A_n} \phi = I_0 (1 - \alpha)^{n-1} \alpha \phi$$

Cette fluorescence doit retraverser n-1 couches; la fluorescence résultante de la n^e monocouche s'exprime sous la forme

$$F_{T_n} = F_n (1 - \beta)^{n-1} = I_0 [(1 - \alpha)(1 - \beta)]^{n-1} \alpha \beta$$

où $\beta = 1 - 10^{-A}$ pour la longueur d'onde de fluorescence.

Pour 10 monocouches, le rapport entre la fluorescence émise par la première et dernière couche sera donc

$$\frac{F_{T_{10}}}{F_{T_1}} = [(1 - \alpha)(1 - \beta)]^{10}$$

Si on remplace les α et β par leur équivalent, et que l'on définit A_B et A_R les absorptions dans le bleu et rouge respectivement, on obtient

$$\frac{F_{T_{10}}}{F_{T_1}} = [10^{-A_B} \cdot 10^{-A_R}]^{10} = [10^{-(A_B + A_R)}]^{10}$$

Posons le rapport d'absorbance $A_B/A_R = r$; on obtient

$$\frac{F_{T_{10}}}{F_{T_1}} = 10^{-10(r+1)A_R}$$

on sait que $r = 1,25$ et $A_R \approx 0,01$. Ainsi:

$$F_{T_{10}}/F_{T_1} \cong 10^{-0,225} \cong 0,6.$$

Ce rapport montre que le filtrage interne n'explique pas la disparition de la bande de 679 nm dans le cas des multicouches.

CHAPITRE VIII

ANNEXE II

La détermination de la distribution des distances minimales entre les molécules de chlorophylles peut s'obtenir par le calcul. La figure 40 montre le modèle utilisé: il s'agit d'une molécule de chlorophylle (cercle avec une étoile au centre) entourée par des lipides (cercles vides). Cette figure représente le pigment en monocouche dilué avec des lipides. On pose les aires moléculaires égales et une structure hexagonal compacte. On constate facilement que:

- l'hexagone C_1 contient 6 molécules;
- l'hexagone C_2 contient 12 molécules;
- l'hexagone C_3 contient 18 molécules;
- l'hexagone C_4 contient 24 molécules;
- l'hexagone C_5 contient 30 molécules;
- l'hexagone C_K contient $6k$ molécules.

Posons la densité des cellules vertes = p (exemple 1/100)

Soit $q = 1 - p$

Ainsi, la probabilité de trouver la première autre chlorophylle à une distance donnée est:

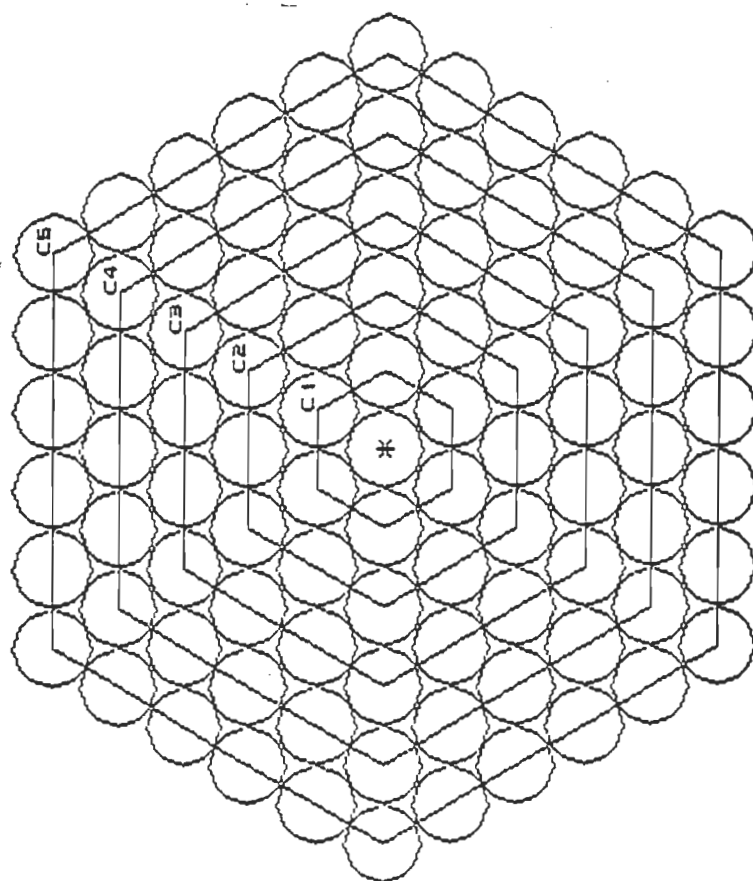


Figure 40: Modèle mathématique de distribution de molécules en film de Langmuir ou de Langmuir-Blodgett.

$$\begin{aligned}
p_0 &= p [\text{distance} = 0] = p [\text{il y a une verte sur } C_1] = 1 - q^6 \\
p_1 &= p [\text{dist} = 1] = p [\text{rien en } C_1, \text{ quelque chose en } C_2] = q^6 (1 - q^{6 \times 2}) \\
p_2 &= p [\text{dist} = 2] = p [\text{rien en } C_1, \text{ rien en } C_2, \text{ verte en } C_3] = q^6 q^{6 \times 2} (1 - q^{6 \times 3}) \\
p_K &= q^{6(1+2+\dots+K)} (1 - q^{6(K+1)}) \\
&= q^{6\left(\frac{K(K+1)}{2}\right)} (1 - q^{6(K+1)}) \\
p_K &= q^{3K(K+1)} (1 - q^{6(K+1)}) \quad K = 0, 1, 2, 3, \dots
\end{aligned}$$

une autre forme plus élégante

$$p_K = q^{3K(K+1)} - q^{3(K+1)(K+2)}$$

C'est une loi bien définie en $\sum_{K=0}^{\infty} p_K = 1$

Ainsi:

$$\begin{aligned}
p_0 &= 1 - q^6 \\
p_1 &= q^6 - q^{18} \\
p_2 &= q^{18} - q^{36} \\
p_3 &= q^{36} - q^{60}
\end{aligned}
\quad \sum_{K=0}^{\infty} p_K = 1$$

etc.

La distance moyenne est exprimée par la relation,

$$\begin{aligned}
r &= \sum_{K=0}^{\infty} K p_K = q^6 + q^{18} + q^{36} + q^{60} + q^{90} + \dots \\
&= \sum_{K=0}^{\infty} q^{3(K+1)(K+2)} = \sum_{K=1}^{\infty} q^{3K(K+1)}
\end{aligned}$$

Les figures 41, 42, et 43 montrent respectivement les distributions pour des rapports molaires de 0,1, 0,01 et 0,001.

Il faut noter que des formes géométriques diverses ont été essayées pour représenter la chlorophylle et les lipides, notamment les carrés, les hexagones et les cercles. Les deux derniers cas donnent des résultats identiques et le carré mène à des résultats très peu différents.

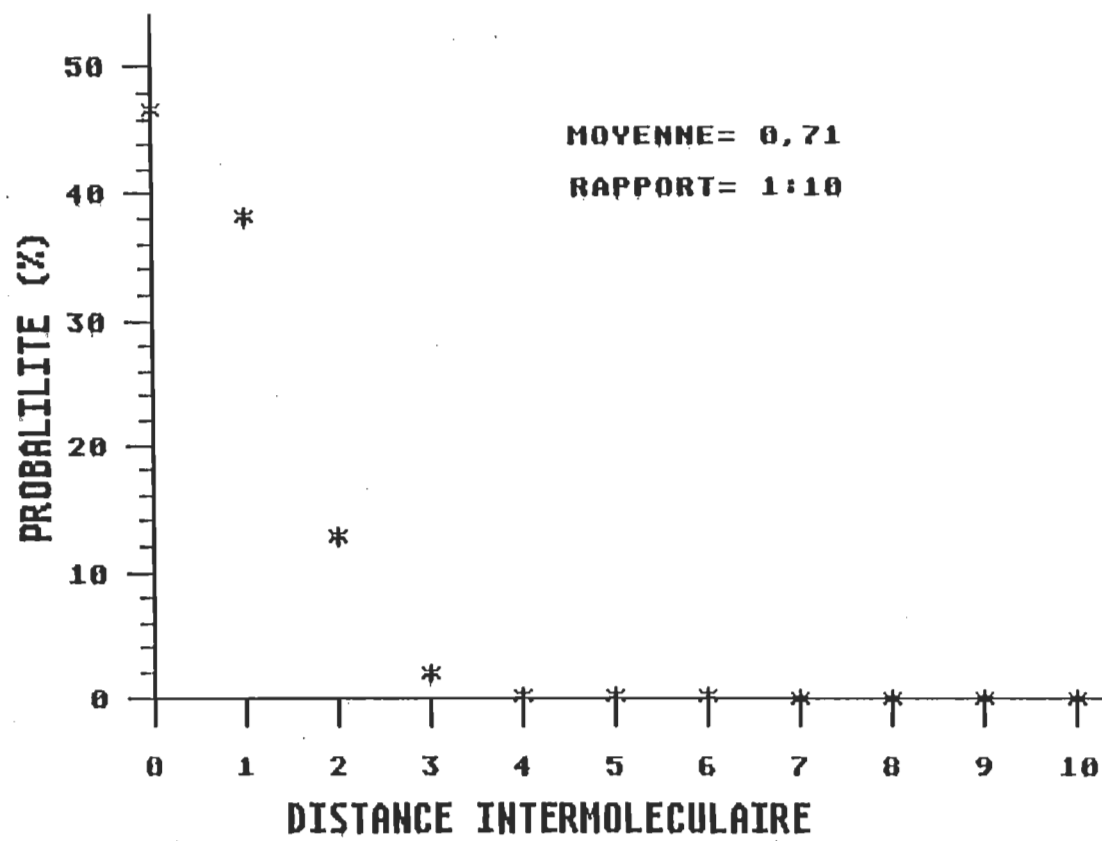


Figure 41: Distribution des distances minimales intermoléculaires (en nombre de molécules) entre les chlorophylles dans un rapport molaire de 1:10.

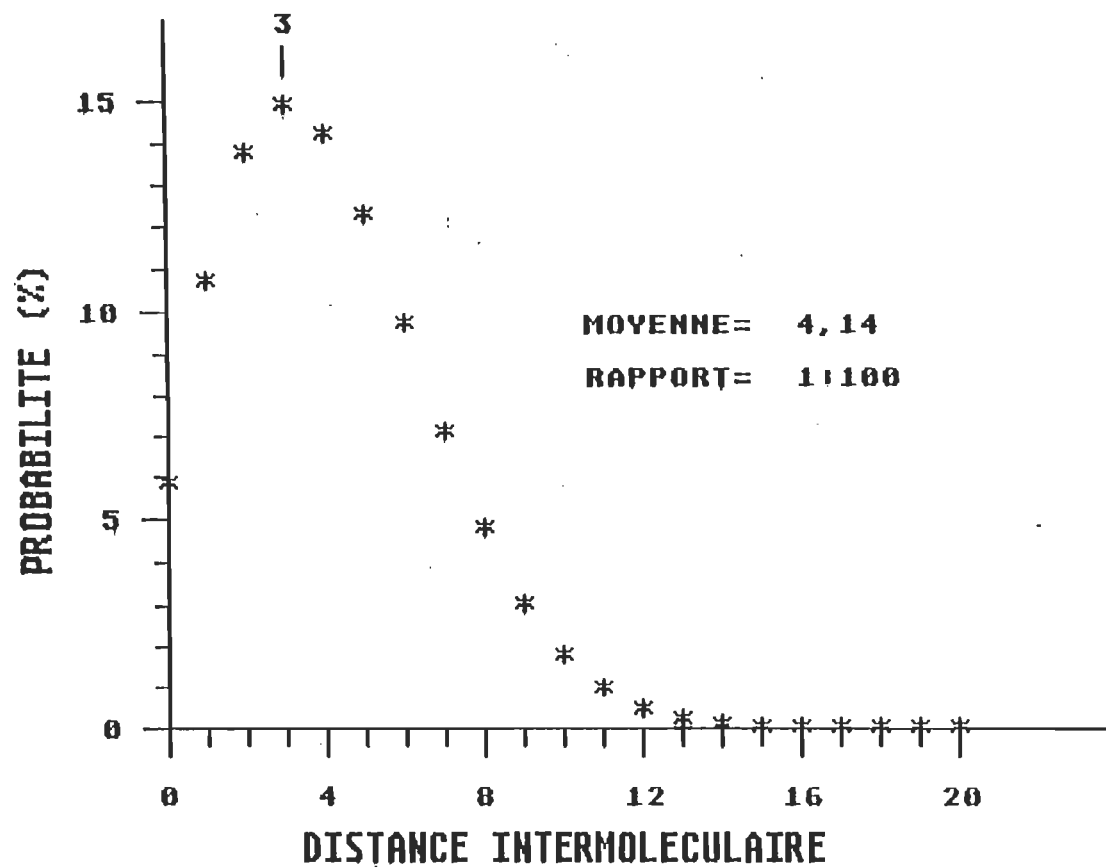


Figure 42: Distribution des distances minimales intermoléculaires (en nombre de molécules) entre les chlorophylles dans un rapport molaire de 1:100.

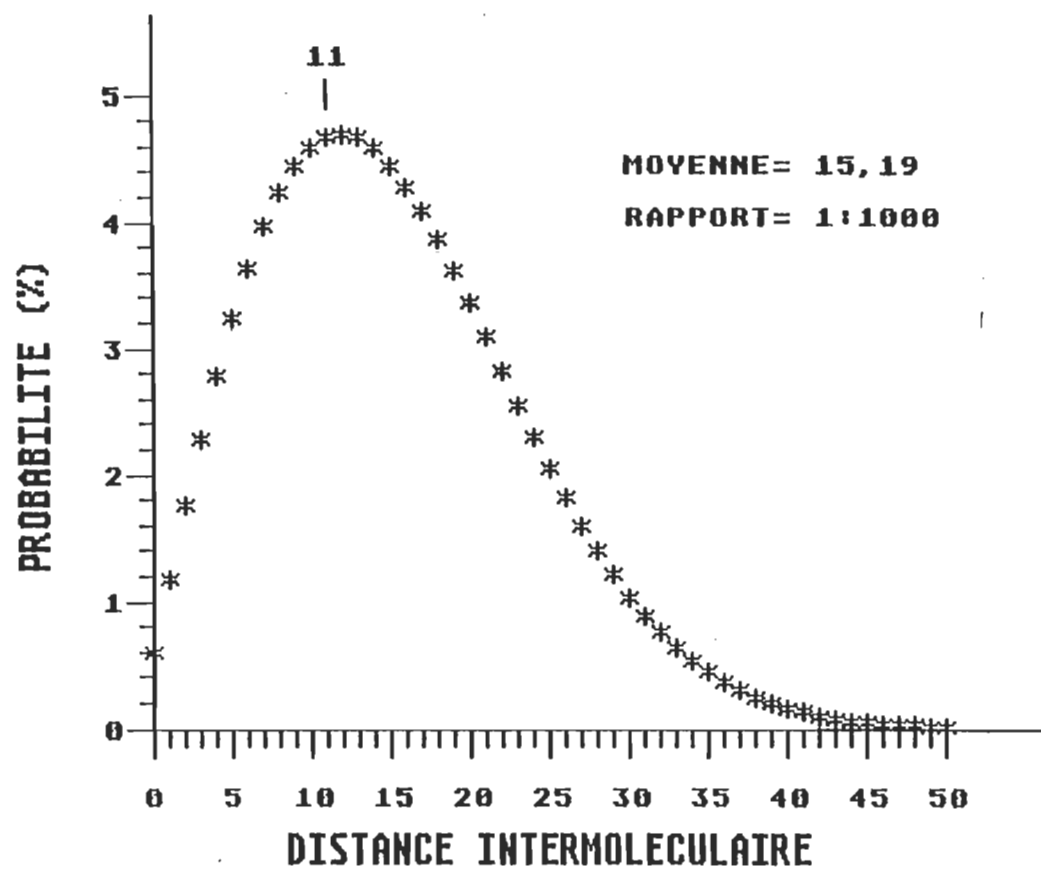


Figure 43: Distribution des distances minimales intermoléculaires (en nombre de molécules) entre les chlorophylles dans un rapport molaire de 1:1000.