

## DUREE DE VIE ET RENDEMENT DE FLUORESCENCE DE LA CHLOROPHYLLE IN VIVO

## LEUR RELATION DANS DIFFERENTS MODELES D'UNITES PHOTOSYNTHETIQUES

I. MOYA

*Laboratoire de Photosynthèse, C.N.R.S., 91190 Gif-sur-Yvette (France)*

(Reçu le 6 juin, 1974)

### SUMMARY

*Lifetime and yield of chlorophyll fluorescence in vivo: Their relationship in different models of photosynthetic units*

We have used phase fluorimetry to measure the relation between fluorescence lifetime ( $\tau$ ) and yield ( $\Phi$ ) of chlorophyll during the induction phase of photosynthesis in isolated chloroplasts and in vivo. This relationship is usually non-linear, curving slightly toward negative values of  $\tau$ , and does not extrapolate to zero. In the discussion we examine the conditions which might give rise to curvature and a non-zero intercept. A model of connected photosynthetic units, characterized by an intersystem frequency of energy exchange,  $T$ , can account for the concavity of the experimental curves when  $0.6 \leq T \leq 1 \text{ ns}^{-1}$ .

Two hypotheses are suggested to account for the non-zero intercept: the occurrence of sensitized fluorescence emission, or the existence in the initial fluorescence of a constant fraction independent of System II.

### RESUME

On mesure par fluorimétrie de phase la relation entre la durée de vie ( $\tau$ ) et le rendement ( $\Phi$ ) de la fluorescence de la chlorophylle in vivo, pendant la phase d'induction. Cette relation s'écarte le plus souvent de la stricte linéarité et on peut la caractériser par la non-extrapolation à zéro et l'existence d'une légère incurvation tournée vers les  $\tau$  négatifs. On examine dans la discussion les situations qui procurent une ordonnée positive et la signification de l'incurvation. Un modèle d'unités connectées, que l'on caractérise par le paramètre  $T$  d'échange d'énergie entre les unités, fournit une bonne approximation de la concavité des courbes expérimentales pour  $0.6 \leq T \leq 1 \text{ ns}^{-1}$ . Deux types d'explications sont avancées pour rendre compte de l'ordonnée à l'origine: l'intervention d'une émission de fluorescence sensibilisée ou l'existence dans la fluorescence initiale d'une fraction constante sans rapport avec le Système II.

## INTRODUCTION

La structure remarquable de l'appareil pigmentaire des algues et des végétaux supérieurs est à l'origine de leur excellente efficacité de collection lumineuse et de leur rendement quantique élevé: 300 molécules de chlorophylle environ coopèrent à la collection des quanta de lumière pour alimenter une molécule de chlorophylle particulière (le centre photochimique) où s'effectue la conversion d'énergie.

L'unité photosynthétique correspond-elle à une entité morphologique ou n'a-t-elle qu'une signification statistique? Aucune réponse définitive n'a pu être donnée à ce jour; cependant des faits expérimentaux bien établis montrent qu'en tout état de cause, l'énergie d'excitation peut être transférée entre les unités.

Les premières mesures simultanées de la durée de vie et du rendement de fluorescence ont été faites par Tumerman et al. [1, 2] à l'aide d'un fluorimètre de phase modulant à 13.5 MHz. Ils concluaient à la constance du rapport  $\tau/\Phi$  à quelques pour cent près. Cette propriété correspond à une situation de "quenching dynamique" qui s'interprète aisément dans le cas d'unités du type statistique. La même conclusion est reprise par Briantais et al. [3, 4], qui ont répété le même genre d'expériences à l'aide d'une source laser He-Ne modulée à la fréquence de 102.207 MHz. Leurs résultats conduisent aussi à une proportionnalité de  $\tau$  et de  $\Phi$  avec une incertitude d'environ 0.1 ns.

Cette réponse simple ne manquait pas de poser quelques problèmes, car la connaissance que nous avons de l'appareil photosynthétique suggère de nombreuses hétérogénéités parmi lesquelles on peut citer: (1) l'existence de deux systèmes photosynthétiques, dont le Système I certainement très peu fluorescent, (2) l'existence d'une fluorescence variable et d'une fluorescence constante; une partie de cette dernière étant peut-être attribuable à une fraction chlorophyllienne sans rôle actif ou au Système I, (3) l'existence, dans la fluorescence variable d'une phase photochimique suivie d'une phase thermique, (4) les différences spectrales, faibles mais décelables, entre fluorescence constante et variable, Lavorel, [5], (5) l'existence de plusieurs types de pigments parmi lesquels les caroténoïdes et la chlorophylle *b* sensibilisent la chlorophylle *a*, etc.

Il était donc prévisible que ces hétérogénéités apparaissent d'une façon ou d'une autre dans la relation entre la durée de vie de fluorescence et son rendement, pourvu que l'on ait une sensibilité suffisante pour les révéler. Un fluorimètre de phase a été construit dans cette intention. La souplesse d'emploi de la méthode permet de suivre l'évolution simultanée des deux paramètres  $\tau$  et  $\Phi$  lorsqu'elle est suffisamment lente, mais les résultats ne sont aisément interprétables que lorsqu'on est en présence d'une seule composante de la fluorescence. La durée de vie apparente est une moyenne dès qu'il s'agit de plusieurs émissions et la signification des mesures est fortement tributaire des hypothèses de fonctionnement que l'on fait sur le système étudié. Il est donc nécessaire d'examiner lors de la discussion des résultats quelques cas simples parmi les hypothèses que l'on peut faire.

## MATERIEL ET METHODES

### *Fluorimétrie de phase*

Cette méthode, qui repose sur l'examen simultané de l'amplitude et du dépha-

sage  $\psi$  de la fluorescence lorsqu'elle est excitée par une source lumineuse modulée, a été décrite par Tumerman [6]. Rappelons que si la fréquence de modulation est  $\nu$ , on doit avoir:

$$\operatorname{tg} \psi = 2\pi\nu\tau$$

$$\cos \psi = (1 + (2\pi\nu\tau)^2)^{-\frac{1}{2}}$$

$\cos \psi$  est le facteur d'amortissement de la fluorescence. Pour que  $\tau$  soit accessible à la mesure il est nécessaire que  $T = \nu^{-1}$  soit du même ordre de grandeur que  $\tau$ .

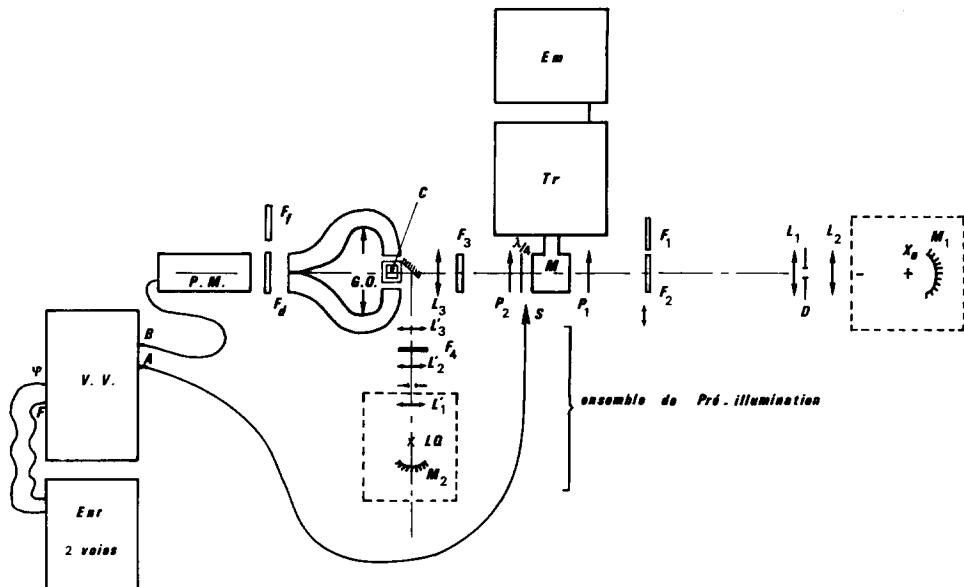


Fig. 1. Schéma synoptique du montage.

La Fig. 1 montre le schéma synoptique du montage. Une lampe à arc dans le xénon (Osram, type XBO-900 W) est la source lumineuse. Deux lentilles  $L_1$  et  $L_2$  et un diaphragme  $D$  forment le faisceau lumineux traversant l'unité de modulation  $M$ ; cette dernière est une cellule à effet Pockels (Baird-Atomic, type JX-1). L'ensemble est contenu dans un boîtier métallique qui limite le rayonnement parasite et qui permet d'ajuster la position du cristal par rapport au faisceau lumineux. Le filtre optique  $F_3$  (Corning 4.96) détermine la bande d'excitation. La courbe de mesures est de section carrée (2 mm  $\times$  2 mm) et deux guides optiques (Sovis,  $d = 6$  mm,  $L = 15$  cm) permettent l'observation symétrique de la fluorescence sous un grand angle solide. Entre le photomultiplicateur et les guides un chariot mobile permet d'interposer soit le filtre  $F_f$  d'observation de la fluorescence (Corning 20.30 C.S. 2-64) soit le filtre  $F_d$  identique à  $F_3$  pour observer la diffusion.  $F_d$  et  $F_f$  sont choisis pour que superposés ils réalisent une extinction totale. Ils n'ont pas de fluorescence propre décelable. Une commande pneumatique déplace le chariot mobile à la fréquence voulue pour observer alternativement et dans les mêmes conditions les signaux de fluorescence ou de diffusion. Le mouvement des filtres neutres  $F_1$  et  $F_2$  est couplé avec celui de  $F_f$ .

et  $F_d$  pour que les intensités de fluorescence ou de diffusion soient toujours comparables. Le photomultiplicateur employé (La Radiotechnique, type 56 TVP) est monté cathode à la masse; le câblage du pont diviseur est inspiré de la notice du constructeur pour un usage en forts courants et les derniers étages sont stabilisés par des diodes Zener. La source de fréquence  $E_m$  est un radio-émetteur (Baird-Atomic, type Valiant II). L'alimentation du modulateur se fait au moyen d'un transformateur élévateur de tension dont le blindage a été particulièrement soigné en vue d'éliminer le fort rayonnement électromagnétique que la haute tension occasionne. Un signal de référence  $R$  est prélevé par couplage capacitif au voisinage du transformateur et sert à la comparaison des phases des signaux  $\bar{F}_f$  de fluorescence et  $\bar{F}_d$  de diffusion de sorte que:

$$\psi = \psi(\bar{F}_f, R) - \psi(\bar{F}_d, R)$$

Un phasemètre-voltmètre (Hewlett-Packard, type 8405A) effectue cette comparaison et mesure au même temps l'intensité de la composante alternative. L'ensemble des expériences que nous décrivons ont été réalisées à la fréquence fixe de 7.25 MHz pour laquelle l'angle  $\psi$  correspondant à 1 ns est 2.6 degrés, par conséquent, tant que  $\tau < 4$  ns la linéarité de la réponse est assurée et l'amortissement négligeable.

Signalons enfin deux types d'erreurs systématiques. La première provient du non-achromatisme du photomultiplicateur et dépend de la différence de longueurs d'ondes entre  $\bar{F}_f$  et  $\bar{F}_d$ ; on l'estime à 0.17 ns dans nos conditions expérimentales en mesurant le déphasage entre les bandes transmises par  $F_f$  et  $F_d$  lorsqu'on observe un même faisceau de lumière blanche. La seconde provient de l'ensemble du circuit électronique, dont la phase mesurée dépend de l'amplitude du signal. L'artefact n'est jamais supérieur à 0.09 ns et on en tient compte en apportant une correction proportionnelle à  $(\bar{F}_f - \bar{F}_d)$ .

#### *Fluorimétrie d'écoulement*

La technique décrite par Lavorel [7], permet d'utiliser un faisceau lumineux d'intensité importante tout en lui conservant un caractère analytique. Cette possibilité est d'un précieux secours car des signaux d'amplitude importante sont nécessaires pour une bonne détermination de la phase. Les différents niveaux de rendement de fluorescence sont obtenus en faisant varier l'intensité de la prééclairage actinique suivant le protocole suivant:



A-B: zone de prééclairage actinique, 10 ms; B-C: zone d'obscurité, 1 ms; C-D: zone de mesure, 1 ms.

La vitesse de l'écoulement est constante (10 ml/s). En absence d'inhibiteur, le rendement de fluorescence atteint au point B est voisin du maximum, pendant BC il diminue nettement de sorte que le niveau analysé en CD est  $M \sim 0.75 P^*$  (Fig. 2A). L'intensité du faisceau analytique doit être au moins égale à une valeur minimum

\* On adopte ici la terminologie de Lavorel [7].  $O$ ,  $P$  et  $S$  désignent respectivement les niveaux de rendement de fluorescence initial (après adaptation à l'obscurité), le maximum atteint au cours de la phase d'induction et le niveau stationnaire obtenu après quelques minutes d'exposition à la lumière.

au-dessous de laquelle les mesures de  $\psi$  sont trop imprécises; mais la vitesse d'écoulement est alors insuffisante et le faisceau d'analyse produit un léger effet actinique. Le niveau initial détecté est alors, en l'absence de préillumination,  $O' \sim 1.2 O$  (cas des Figs 2A et 2D). Nos mesures sont donc intégrées sur un intervalle  $\Delta\Phi$  de rendement - mais ce fait demeure sans conséquences si la caractéristique  $\tau = f(\Phi)$  est bien approchée par une droite dans cet intervalle, et si  $\Delta\Phi$  n'est pas trop grand - ce qui est toujours le cas même en présence de 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthylurée (DCMU).

#### Matériel biologique

*Chlorella pyrenoidosa* Chick souche Emerson. Cultivée en milieu Tamiya modifiée, pH 5.4 à 23 °C. L'intensité lumineuse des cultures est de 6000 lux. Les algues sont récoltées journalièrement et sont utilisées dans leur milieu, diluées à des concentrations de chlorophylle allant de 20 à 50 µg/ml.

*Chloroplastes d'épinards.* Les chloroplastes sont préparés suivant la méthode d'Avron [8] et conservés congelés à 50 % de glycérol, 50 % de milieu Tris-maléate-saccharose, à la température de l'azote liquide (77 °K). Décongelés, ils sont centrifugés d'abord 2 min à 200×g pour éliminer les plus gros débris puis à 2000×g pendant 10 min. Ils sont utilisés à des concentrations de chlorophylle variables allant de 20 à 50 µg/ml.

#### RESULTATS

Ils sont présentés sous forme de diagramme sur la Fig. 2, où les abscisses répre-

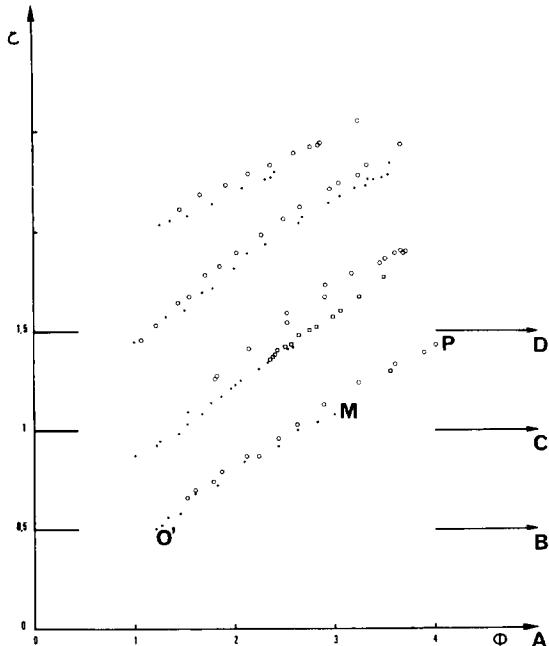


Fig. 2. Relation  $\tau = f(\Phi)$ . Les différentes courbes (A), (B), (C) et (D) ont été décalées parallèlement à l'axe des  $\tau$ , pour plus de clarté. ●, phase  $O-P$  sans inhibiteur; □, phase  $P-S$  sans inhibiteur; ○, phase  $O-P$  en présence de DCMU  $2 \cdot 10^{-5}$  M. (A), (B) chlorelles. (C) et (D) chloroplastes d'épinard.

sentent les rendements de fluorescence exprimés par rapport à l'état 0 de référence pris comme unité; les ordonnées représentent la durée de vie en ns.

#### *Algues normales et chloroplastes*

Ces deux types de matériel ne présentent pas de différences sensibles dans le cadre de nos mesures et sont par conséquent décrits ensemble. Plusieurs remarques peuvent être faites: De  $O'$  à  $M$  la courbe est monotone et croissante; une faible incurvation dirigée vers les  $\tau$  négatifs apparaît le plus souvent et jamais la courbure inverse n'est observée. Si on assimile les courbes à des droites celles-ci présentent une ordonnée à l'origine positive variant suivant le cas de 0 à 0.25 ns. Avec des chloroplastes de laitue étiolés ou avec du matériel en cours de verdissement l'ordonnée à l'origine peut atteindre 0.7 ns; les résultats concernant ce matériel seront décrits dans une prochaine publication. On essaiera donc dans la discussion de rendre compte de cette ordonnée à l'origine. Enfin la phase  $P-S$  a été observée dans un cas où son amplitude était importante (Fig. 2B) et la portion du plan  $(\bar{\tau}, \bar{\Phi})$  décrite semble être la même que celle obtenue pendant la phase  $O-P$ .

#### *Algues et chloroplastes inhibés par le DCMU $2 \cdot 10^{-5} M$*

Le DCMU bloque la réoxydation de  $Q^-$  en empêchant le transfert d'électrons entre  $Q$  et  $A$ ; dans ces conditions la préillumination permet d'atteindre  $P$  et d'analyser ce même niveau après la milliseconde d'obscurité, comme on le voit dans la Fig. 2. On remarque que l'aspect général des courbes est comparable à celui du témoin (même type d'incurvation). Il est important de remarquer que dans la plupart des cas les deux courbes sont distinctes; la courbe obtenue en présence de DCMU se situe systématiquement au-dessus de celle du témoin. Il s'agit donc d'une modification autre que celle bloquant simplement la réoxydation de  $Q$ .

### DISCUSSION

Nous nous restreignons dans cette partie à discuter deux points qui nous paraissent essentiels: L'incurvation de la caractéristique  $\tau = f(\Phi)$  et la signification d'une ordonnée à l'origine positive. Dans ce qui suit nous employons le terme d'exciton pour désigner des excitons localisés, bien qu'aucune preuve décisive n'existe contre l'hypothèse d'excitons délocalisés.

#### *Unités statistiques et quenching dynamique*

Rappelons que pour le modèle statistique, les excitons migrent dans la masse de chlorophylle collectrice et disparaissent d'une part par réactions "monomoléculaires" (fluorescence, conversion interne), d'autre part par réaction "bimoléculaires" (capture de l'exciton par un centre ouvert). Les centres fonctionnent par "tout ou rien": ouverts ils sont pièges; fermés ils se comportent comme des molécules de chlorophylle normales. Cette écriture suppose le caractère non limitant de la diffusion des excitons et néglige l'effet "flots" qui doit découler de la fixité des pièges, d'un piégeage efficace et du transfert d'excitation au premier voisin [9]. La forme de la courbe d'induction correspondant à un tel système est sigmoïde et découle de la loi "bimoléculaire" d'interaction exciton piège [10].

Après un flash faible et très court, la vitesse de disparition des excitons obéit à l'équation:

$$\dot{\varepsilon} = - \frac{1}{\tau'} \varepsilon - aQ\varepsilon$$

$\varepsilon$ , concentration des excitons à l'instant  $t$ ;  $\tau'^{-1}$ , somme des vitesses de désactivation monomoléculaires;  $a$  = constante de vitesse de la réaction "bimoléculaire";  $Q$  = concentration des centres ouverts (très faible par rapport à la chlorophylle).

L'intensité de fluorescence s'écrit:

$$F(t) = \frac{\varepsilon_0}{\tau_0} e^{-t/\tau}$$

$\tau_0$  = durée de vie naturelle

$\varepsilon_0$  = concentration des excitons au temps  $t = 0$

$$\tau = \frac{\tau'}{(1 + a\tau'Q)} = \text{durée de vie}$$

Le rendement de fluorescence a pour expression:

$$\Phi = \frac{\tau}{\tau_0}$$

C'est exactement le schéma d'un quenching dynamique. La caractéristique  $\tau = \tau_0 \cdot \Phi$  est une droite passant par l'origine. Toute modification des propriétés de quenching se traduit de façon homogène sur  $\tau$  et sur  $\Phi$ , sans changement de pente.

Pour rendre compte des deux premiers résultats: concavité négative et non extrapolation à zero, il nous faut faire des hypothèses supplémentaires. L'ambiguïté de nos mesures provient du fait que tout le spectre de fluorescence est pris en compte. Indépendamment de ce fait, une hétérogénéité des émetteurs de fluorescence est très probable. Lavorel [11] appliquant à la marche des excitons dans le continuum chlorophyllien le schéma de la diffusion montrait que dans ce cas le déclin de fluorescence cesse d'être exponentiel. Ce même auteur, simulant par la méthode de Monte Carlo, un modèle d'unités photosynthétiques connectées [12] obtient des courbes de déclin essentiellement biphasiques. Nous pouvons donc être en présence d'un mélange d'émissions, soit de part le manque de résolution spectrale de notre analyse, soit inhérent à la structure même de l'appareil photosynthétique.

Le mélange de deux émissions indépendantes [1] correspondant à une loi de déclin de la forme:

$$F(t) = F_1 e^{-t/\tau_1} + F_2 e^{-t/\tau_2}$$

conduit, en fluorimétrie de phase, à un signal d'amplitude:

$$\Phi = f_1 + f_2, \quad f_i = F_i \tau_i \quad (i = 1, 2) \quad (1)$$

et dont la phase correspond à une durée de vie apparente:

$$\tau = \frac{f_1 \tau_1 + f_2 \tau_2}{f_1 + f_2} \quad (2)$$

Différents cas peuvent être envisagés; nous nous sommes bornés à traiter ceux dont la difficulté d'expression mathématique était la moins grande.

#### Unités séparées

Dans ce modèle on suppose qu'il n'y a pas d'échange d'énergie entre les différentes unités photosynthétiques. Suivant l'état d'oxydoréduction du centre photochimique on peut définir deux états de rendement: (1) centre couvert: émission caractérisée par  $(f_1, \tau_1)$ , (Etat 1) (2) centre fermé: émission caractérisée par  $(f_2, \tau_2)$ , (Etat 2). Si  $\alpha$  désigne la proportion d'unités dans l'Etat 1, nous obtenons au moyen des Relations 1 et 2:

$$\Phi = \alpha f_1 + (1-\alpha)f_2 \quad \text{et} \quad \tau = \frac{f_2 \tau_2 - f_1 \tau_1}{f_2 - f_1} - \frac{f_1 f_2 (\tau_2 - \tau_1)}{(f_2 - f_1) \Phi}$$

C'est une branche d'hyperbole équilatère dont l'incurvation est bien négative (Fig. 3, cas  $T = 0$ ) mais beaucoup plus marquée que celle dont on voulait rendre compte. Ce modèle conduit sur le plan cinétique à une induction de fluorescence dont la forme n'est pas sigmoïde, mais exponentielle\*.

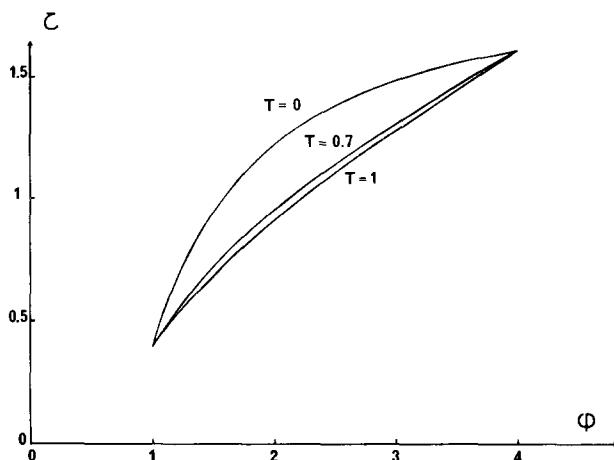


Fig. 3. Courbes théoriques obtenues pour  $\tau_1 = 0.4$  ns,  $\tau_2 = 1.6$  ns. Effet d'une variation de  $T$ .

#### Unités connectées

Entre les deux cas extrêmes des unités statistiques et des unités séparées on peut définir un modèle intermédiaire dans lequel l'exciton peut visiter plusieurs unités distinctes pendant sa durée de vie. Une façon simple de tenir compte de cette possibilité est de définir pour une unité dans un état donné, une fréquence  $T_i$  caractérisant la

\* De nombreux auteurs [13] ont interprété la forme sigmoïde de l'induction de fluorescence comme une preuve de l'échange d'énergie entre les unités photosynthétiques. Une induction de forme exponentielle devrait être associée à des unités complètement séparées et par conséquent la relation  $\tau = f(\Phi)$  correspondante devrait avoir la forme d'hyperbole équilatère décrite dans ce paragraphe. Des expériences préliminaires avec un matériel présentant une induction exponentielle ne montrent pas cependant un tel type de relation entre  $\tau$  et  $\Phi$ .

vitesse de disparition des excitons par transfert aux autres unités. L'évolution du système après un flash faible et très court se traduit par les équations suivantes:

$$\begin{aligned}\dot{\varepsilon}_1 &= -\frac{1}{\tau_1} \varepsilon_1 - T_1 \varepsilon_1 + [\alpha T_1 \varepsilon_1 + (1-\alpha) T_2 \varepsilon_2] \\ \dot{\varepsilon}_2 &= -\frac{1}{\tau_2} \varepsilon_2 - T_2 \varepsilon_2 + [\alpha T_1 \varepsilon_1 + (1-\alpha) T_2 \varepsilon_2] \\ \varepsilon &= [\alpha \varepsilon_1 + (1-\alpha) \varepsilon_2] N\end{aligned}\quad (4)$$

$\varepsilon_i$ , concentration d'excitons dans une unité de type  $i$  ( $i = 1$  ou  $2$ );  $N$ , nombre d'unités total du système;  $T_i$ , constante de vitesse de fuite pour une unité de type  $i$ . Si le transfert d'énergie ne fait intervenir que les propriétés des molécules de chlorophylle collectrice, on peut supposer  $T_1 = T_2 = T$ , par contre  $T_1$  et  $T_2$  pourront être différents si le centre photochimique intervient dans les transferts. Dans l'Expression 4 le terme  $[T_1 \alpha \varepsilon_1 + T_2 (1-\alpha) \varepsilon_2]$  désigne le nombre moyen d'excitons rentrant dans une unité quelconque à l'instant  $t$ . Cette écriture suppose une répartition homogène des excitons transférés de toutes les unités et néglige par conséquent l'effet îlots [12]. L'Annexe I détaille le calcul permettant d'obtenir à partir de l'Expression 4 la loi de déclin de la fluorescence du système considéré. La Fig. 3 montre les courbes obtenues pour différentes valeurs de  $T$  (nous avons pris, pour simplifier,  $T_1 = T_2 = T$ ) lorsqu'on fixe l'état initial  $\tau_1 = 0.4$  ns et l'état final  $\tau_2 = 1.6$  ns. La propriété remarquable du système décrit est de fournir toutes les courbures intermédiaires entre l'hyperbole équilatère ( $T = 0$ ) et la droite ( $T \gg 1$ ). La Fig. 4 reprend les points expérimentaux

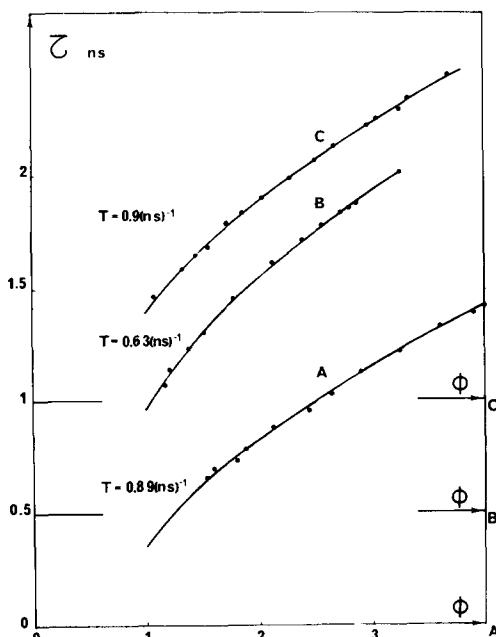


Fig. 4. Ajustement des courbes théoriques aux points expérimentaux pour les courbes (A), (B) et (C) de la Fig. 2.

de la Fig. 3 (Courbes A, B et C en présence de DCMU) et montre la façon dont on peut les approcher par un choix convenable de  $T$ . Il est nécessaire de signaler que l'approximation doit être moins bonne au voisinage de  $\Phi = 1$  (Niveau 0); en effet le modèle théorique implique des couples  $(1, \tau_{\min})$  et  $(\Phi_{\max}, \tau_{\max})$  situés sur une droite passant par zéro, ce qui n'est certainement pas toujours le cas. Ce point sera discuté plus loin (addition d'une composante constante).

#### *Ordonnée à l'origine et fluorescence sensibilisée*

L'existence de pigments accessoires (caroténoïdes et chlorophylle *b* sensibilisant la chlorophylle *a* nécessite l'examen de la relation  $\tau = f(\Phi)$  dans le cas de la participation de fluorescence sensibilisée. Lorsque deux pigments (espèce A et espèce B) peuvent échanger par transfert d'excitation leur énergie électromagnétique, on peut écrire les relations suivantes:

- a     $A + h\nu_A \rightarrow A^*$     absorption de A
- b     $A^* \rightarrow A + h\nu'_A$     fluorescence de A
- c     $A^* + B \rightarrow B^* + A$     transfert hétérogène
- d     $B + h\nu_B \rightarrow B^*$     absorption de B
- e     $B^* \rightarrow B + h\nu'_B$     fluorescence de B

D'après les étapes suivies avant d'être réémis par fluorescence, on peut classer les excitons en trois familles: ceux qui proviennent de a+b, de d+e et de a+c+e. Pour ces derniers, il est nécessaire de calculer leur durée de vie apparente et leur rendement mesurés par fluorimétrie de phase. L'Annexe II développe le calcul qui aboutit à  $\tau_B^{(T)} = \tau_A + \tau_B$ .  $\tau_A$  et  $\tau_B$  sont les temps de séjour moyens de l'excitation respectivement sur les pigments A ou B.

Supposons que le quenching photochimique ait lieu sur le pigment B, par exemple, et, pour simplifier, que le pigment A ne fluoresce pas (ce peut être le cas des caroténoïdes transférant leur énergie à la chlorophylle du Système II); la fluorescence totale peut alors être considérée comme la superposition de deux émissions caractérisées par:  $(\varepsilon_B^0 \Phi_B, \tau_B)$ , absorption directe et fluorescence de B, et  $(\varepsilon_A^0 \Phi_T \Phi_B, \tau_A + \tau_B)$ , transfert A  $\rightarrow$  B, puis fluorescence de B.  $\varepsilon_A^0$  et  $\varepsilon_B^0$  sont les concentrations initiales d'excitons respectivement sur les pigments A et B. Il est facile de voir, comme le montre l'Annexe II, que la superposition de ces deux émissions conduit à une caractéristique  $\tau = f(\Phi)$  qui se déduit de  $\tau_B = f(\Phi)$  par une translation parallèle à l'axe des  $\tau$ , dans le sens des  $\tau$  positifs et d'une valeur  $\tau_A \varepsilon_A^0 \Phi_T / (\varepsilon_A^0 \Phi_T + \varepsilon_B^0)$ .

On aurait pu obtenir un résultat du même type en supposant que le quenching photochimique a lieu sur le pigment A et que le pigment B a une absorption propre négligeable (ce pourrait être le cas d'un pigment minoritaire dans le S<sub>II</sub>, recevant l'énergie d'excitation de la chlorophylle collectrice et donc en compétition avec les centres photochimiques).

Dans les deux situations décrites ci-dessus, l'ordonnée à l'origine de la relation  $\tau = f(\Phi)$  peut s'expliquer indépendamment de la signification de l'incurvation et serait liée au temps de séjour de l'excitation sur un pigment accessoire. On devrait donc avoir une dépendance de l'ordonnée à l'origine par rapport à la longueur d'onde d'excitation dans un cas, par rapport à la longueur d'onde d'analyse dans l'autre.

Les essais préliminaires que nous avons effectués ne font pas apparaître de telles dépendances. Le cas général où les réactions a, b, c, d, et e auraient toutes lieu se déduit des cas traités par l'addition d'une composante constante dont l'effet peut être différent suivant l'émission à laquelle il se superpose.

#### *Addition d'une composante constante*

Lorsqu'on se propose de décomposer la fluorescence en plusieurs émissions distinctes, une hypothèse naturelle est de supposer qu'une partie de la fluorescence constante provient de pigments non fonctionnels ou du Système I, de sorte que le zéro réel de la fluorescence du Système II soit voisin du niveau 0; la complémentarité des variations de la fluorescence et de la photochimie serait ainsi mieux satisfaite.

Si l'on envisage de superposer à une composante qui suit la loi du quenching dynamique (relation  $\tau_2 = f(\Phi_2)$  linéaire) une composante constante ( $\Phi_1, \tau_1$ ), les Relations 1 et 2 nous conduisent à:

$$\tau = \tau_0 \Phi - 2\tau_0 \Phi_1 + \frac{\Phi_1}{\Phi} (\tau_1 + \tau_0 \Phi_1)$$

La concavité de la courbe définie par cette relation est positive puisque  $d^2\tau/d\Phi^2 > 0$ , ce qui n'est jamais observé expérimentalement.

Il est par contre possible, lorsque la courbe expérimentale présente une ordonnée à l'origine non nulle -ce qui est le plus souvent le cas- de décomposer en une émission vérifiant le Système 4 et en une fluorescence "morte" d'amplitude  $f_m$ . A chaque valeur de  $f_m$  on peut associer une valeur de  $\tau_m$  et de  $T$  telles que la superposition des deux émissions corresponde à la courbe expérimentale. Lorsque  $f_m$  augmente,  $T$  diminue, de sorte que la relation,  $\tau = f(\Phi)$  correspondant au seul Système II pourrait être moins linéaire qu'il n'apparaît, lorsqu'elle se superpose à une fluorescence constante.

Nous retenons donc cette possibilité, associée au Système 4 pour expliquer les caractéristiques  $\tau = f(\Phi)$  dans le cas où les points correspondant à Q réduit ou Q oxydé ne sont pas sur une droite passant par zéro. Dans le cas du matériel en cours de verdissement évoqué dans un paragraphe précédent, il faudrait supposer que la plus part de la fluorescence initiale est de la fluorescence constante étrangère au Système II, pour que la courbe  $\tau = f(\Phi)$  qui lui correspond présente une incurvation maximum. La faible valeur de  $T$  qui en résulte est alors en bon accord avec la forme des cinétiques d'induction.

D'une façon générale, la corrélation des relations  $\tau = f(\Phi)$  et de la cinétique, d'induction de fluorescence devrait permettre de calculer  $f_m$ ,  $\tau_m$  et  $T$ , sous les hypothèses du Système 4 et de l'existence d'une fluorescence constante indépendante du  $S_{II}$ .

#### CONCLUSION

Nous avons montré que l'incurvation observée pour la relation  $\tau = f(\Phi)$  pouvait signifier une restriction à la libre circulation de l'excitation entre les unités photosynthétiques. G. Paillotin (résultats non publié) confirme nos résultats en établissant l'expression suivante sous des hypothèses très générales:

$$\tau = \tau_0 \Phi(1 + \vartheta(\rho)); \quad \vartheta(\rho) = \left\langle \left( \frac{\rho - \langle \rho \rangle}{\langle \rho \rangle} \right)^2 \right\rangle \quad (7)$$

Cette écriture suppose la division de l'appareil photosynthétique en domaines identiques possédant n'états distincts de rendement de fluorescence  $\langle \rho \rangle$  = valeur moyenne de  $\rho = \Phi$ .

La Relation 7 a l'avantage de relier explicitement l'incurvation de la relation  $\tau = f(\Phi)$  à la variance  $\vartheta(\rho)$  du système qui est nulle en  $O$  et  $P$  et maximum pour une valeur intermédiaire. L'aplatissement des courbes que nous constatons lorsqu'on introduit le paramètre  $T$  d'échange d'énergie entre les unités s'interprète aisément dans cette optique: il signifie la répercussion sur tout le système des variations locales des propriétés, ce qui correspond bien à une diminution de la variance.

En ce qui concerne l'ordonnée à l'origine, la corrélation des cinétiques d'induction de fluorescence et de la relation  $\tau = f(\Phi)$  devrait nous permettre de choisir entre les hypothèses avancées.

#### ANNEXE I

$$\begin{aligned} \dot{\varepsilon}_1 &= -\frac{1}{\tau_1} \varepsilon_1 - T_1 \varepsilon_1 + (\alpha T_1 \varepsilon_1 + (1-\alpha) T_2 \varepsilon_2) \\ \dot{\varepsilon}_2 &= -\frac{1}{\tau_2} \varepsilon_2 - T_2 \varepsilon_2 + (\alpha T_1 \varepsilon_1 + (1-\alpha) T_2 \varepsilon_2) \\ \varepsilon &= N(\alpha \varepsilon_1 + (1-\alpha) \varepsilon_2) \end{aligned} \quad (4)$$

posons

$$\mu_1 = \frac{1}{\tau_1} + (1-\alpha) T_1; \quad \mu_2 = \frac{1}{\tau_2} + \alpha T_2$$

le Système 4 a pour solution générale:

$$\begin{aligned} \varepsilon_i &= A_i e^{-t/\nu_i} + B_i e^{-t/\nu_2} \\ A_2 &= \frac{A_1 \left( \mu_1 - \frac{1}{\nu_1} \right)}{(1-\alpha) T_2}; \quad B_2 = \frac{B_1 \left( \mu_1 - \frac{1}{\nu_2} \right)}{(1-\alpha) T_2} \end{aligned}$$

Les  $1/\nu_i$  sont les racines du polynôme caractéristiques de l'Expression 4. Les conditions initiales sont:  $t = 0$ ,  $\varepsilon_i = \varepsilon_0$  d'où l'on tire

$$A_1 = -\frac{(1-\alpha) T_2 - \left( \mu_1 - \frac{1}{\nu_2} \right)}{\left( \frac{1}{\nu_2} - \frac{1}{\nu_1} \right)} \varepsilon_0$$

$$B_1 = \varepsilon_0 (1 - A_1)$$

$$\varepsilon = N \{ [\alpha A_1 + (1-\alpha) A_2] e^{-t/\nu_1} + [\alpha B_1 + (1-\alpha) B_2] e^{-t/\nu_2} \}$$

La loi de déclin de la fluorescence est:  $F = \varepsilon/\tau_0$ . Les Relations 1 et 2 fournissent alors  $\tau$  et  $\Phi$ .

## ANNEXE II

(1) Si  $\varepsilon_A$  et  $\varepsilon_B$  sont respectivement les concentrations des excitons sur les pigments A et B, la vitesse de disparition sur B des excitons transférés de A s'écrit:

$$\dot{\varepsilon}_B = -\frac{1}{\tau_B} \varepsilon_B + T \varepsilon_A \quad (5)$$

$\varepsilon_A = \varepsilon_A^0 e^{-t/\tau_A}$ , concentration initiale d'excitons sur A;  $1/\tau_A$ , somme des constantes de vitesses de disparition des excitons sur A. L'intégration de la Relation 5 en prenant  $\varepsilon_B(0) = 0$  à  $t = 0$  fournit

$$\varepsilon_B = \frac{\varepsilon_A^0 \tau_A \tau_B T}{\tau_A - \tau_B} [e^{-t/\tau_A} - e^{-t/\tau_B}]$$

d'où la loi de déclin de la fluorescence sensibilisée.

$$F_B = \frac{\varepsilon_A^0 \tau_A T}{\tau_A - \tau_B} \Phi_B [e^{-t/\tau_A} - e^{-t/\tau_B}] \quad (6)$$

$\Phi_B$ , rendement quantique de la fluorescence de B. L'amplitude du signal détecté par fluorimétrie de phase  $f_B$  se déduit appliquant à la Relation 6 les Relations 1 et 2.

$$f_B^{(T)} = \varepsilon_A^0 \tau_A T \Phi_B = \varepsilon_A^0 \Phi_T \Phi_B$$

$\Phi_T$ , rendement quantique du transfert. La durée de vie apparente détectée par fluorimétrie de phase est:

$$\tau_B^{(T)} = \tau_A + \tau_B$$

(2) Si à l'émission définie par  $f_B^{(T)}$ ,  $\tau_B^{(T)}$ , on lui superpose une émission définie par ( $f_B = \varepsilon_B^0 \Phi_B$ ,  $\tau_B$ ) on obtient d'après les Relations 1 et 2:

$$\bar{\tau}_B = \frac{f_B \tau_B + f_B^{(T)} \tau_B^{(T)}}{f_B + f_B^{(T)}} = \tau_B + \tau_A \frac{\varepsilon_A^0 \Phi_T}{\varepsilon_A^0 \Phi_T + \varepsilon_B^0}$$

$$\bar{\Phi}_B = \Phi_B (\varepsilon_A^0 \Phi_T + \varepsilon_B^0)$$

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 Tumerman, L. A. et Sorokin, E. (1967) Mol. Biol. 1, 628-638
- 2 Sorokin, E. M. et Tumerman, L. A. (1971) Mol. Biol. 5, 753-765
- 3 Briantais, J. M., Merkolo, H. et Govindjee (1972) Photosynthetica 6, 133-141
- 4 Mar, T., Govindjee, Singhal, G. S. et Merkolo, H. (1972) Biophys. J. 12, 797-808
- 5 Lavorel, J. (1962) Biochim. Biophys. Acta 60, 510-523

- 6 Tumerman, L. A. (1951) *J. Phys.* 4, 151-166
- 7 Lavorel, J. (1959) *Plant Physiol.* 34, 204-211
- 8 Avron, M. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 40, 257-270
- 9 Lavorel, J. et Joliot, P. (1972) *Biophys. J.* 12, 815-831
- 10 Lavergne, J. et Lavorel, J. (1972) *J. Chim. Phys.* 6, 972-975
- 11 Lavorel, J. (1967) *J. Chem. Phys.* 47, 2235-2240
- 12 Lavorel, J. (1973) *Physiol. Vég.* 11, 681-720
- 13 Delosme, R. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 143, 108-128