

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE PRESENTEE A  
L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES  
COMME EXIGENCE PARTIELLE POUR L'OBTENTION  
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR  
J. CLAUDE MORISSETTE

ÉTUDE DE LA DISSIPATION DE L'ÉNERGIE LUMINEUSE  
DANS LES PLANTES ET LES MEMBRANES DU CHLOROPLASTE A L'AIDE  
D'UN THERMO-FLUORIMÈTRE INTÉGRAL

NOVEMBRE 1991

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

RESUME

Chez les plantes supérieures et les algues vertes, l'énergie lumineuse est absorbée par des pigments antennes dans le chloroplaste. La majorité de cette énergie est utilisée pour la photosynthèse. L'excès énergétique est dissipé sous forme de fluorescence et de dissipation thermique. Les cinétiques de fluorescence sont des mesures courantes en photosynthèse. Elles représentent l'état d'oxydoréduction de la chaîne de transport d'électrons. Pour leur part, les cinétiques de la dissipation thermique sont presque inexistantes mais on suppose que cette forme dissipative provient du même événement que la fluorescence. Dans le but de mieux comprendre les différentes formes dissipatives de l'énergie, cette thèse présente la conception, la réalisation et l'application d'un thermo-fluorimètre (système d'évaluation de la dissipation thermique et de la fluorescence) basé sur l'utilisation d'une sphère intégrante. Cet appareil est supporté par un système de contrôle et d'analyse informatisé donnant un bilan des principaux paramètres photosynthétiques liés à l'état "de santé" des membranes du chloroplaste. Du côté technique, cette thèse présente une nouvelle méthode de la séparation de la fluorescence dite constante et de la fluorescence variable. Pour la première fois, une étude comparative de la

fluorescence et de la dissipation thermique (sur les premières secondes d'illumination) est présentée. Ce travail met en évidence le parallélisme entre la fluorescence et la dissipation thermique ainsi que la répartition de l'énergie suivant que le photosystème II est inhibé sur son côté réduit ou oxydé.

Cette thèse présente aussi deux applications des cinétiques de fluorescence et des paramètres photosynthétiques. La première étant l'étude de l'adaptation de l'algue verte *Dunaliella tertiolecta* à des températures de croissance de 12°C et 20°C. La seconde fait l'étude de l'effet du cuivre sur la photochimie du photosystème II.

Ce travail ouvre donc la porte vers de nouvelles connaissances fondamentales et appliquées de l'utilisation de l'énergie lumineuse par les plantes supérieures et les algues vertes.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de photosynthèse de l'Université du Québec à Trois-Rivières sous la direction du Dr Radovan Popovic. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.

Je tiens à remercier mes amis et collègues de travail, Marc, Guy, Luc, Michelle, Sonia, Pascal et particulièrement Jean Pascal pour l'encouragement et l'aide lors de ce travail.

Un merci particulier au centre de recherche en photobiophysique (sous la direction du Dr Roger Leblanc), M. Yves Beaumier et M. Pierre Bergeron pour le soutien financier qui m'a permis la réalisation de ce travail. Merci de votre confiance.

Un merci au fonds F.C.A.R. pour leur soutien en bourses d'études supérieures. Merci au C.R.S.N.G. qui, par leur subvention thématique, m'a permis la réalisation du thermo-fluorimètre.

Merci à Dominique, "ma douce moitié", pour sa compréhension et sa patience durant ces années.

TABLE DES MATIERES

	page
RESUME.....	i
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIERES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xiii
CHAPITRE 1.	
<u>INTRODUCTION</u> .....	1
1.1 La photosynthèse.....	1
1.2 La membrane photosynthétique.....	3
1.3 L'absorption de l'énergie lumineuse.....	6
1.4 Le transport d'électrons.....	9
1.5 La phase obscure.....	15
1.6 La dissipation de l'énergie.....	17
1.6.1 La fluorescence.....	18
1.6.2 La dissipation thermique.....	25
1.7 Problématique et objectifs du travail.....	27
CHAPITRE 2.	
<u>LE SYSTEME D'EVALUATION DE LA FLUORESCENCE ET DE LA</u>	
<u>DISSIPATION THERMIQUE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS</u>	39

2.1	Introduction.....	39
2.2	Description du thermo-fluorimètre.....	42
2.2.1	Description de la sphère intégrante.....	42
2.2.2	Le système de contrôle et d'évaluation....	48
2.2.3	L'évaluation de la fluorescence.....	51
2.2.4	L'évaluation de la dissipation thermique...	56
2.3	L'analyse des données par le logiciel de traitement.....	64
2.4	Les échantillons.....	71
2.4.1	Culture et préparation des algues.....	72
2.4.2	Culture de l'orge et préparation des thylacoïdes.....	73
CHAPITRE 3.		
<u>EVALUATION D'UNE NOUVELLE METHODE DE SEPARATION DE LA</u>		
<u>FLUORESCENCE CONSTANTE <math>F_0</math> ET DE LA FLUORESCENCE VARIABLE</u>		
<u><math>F_v</math>.....</u>		
3.1	Introduction.....	76
3.2	Matériel et méthodes.....	77
3.3	Résultats et discussion.....	78
CHAPITRE 4.		
<u>DISSIPATION DE L'ENERGIE VIA FLUORESCENCE ET DISSIPATION</u>		
<u>THERMIQUE.....</u>		
4.1	Introduction.....	91
4.2	Matériel et méthodes.....	94
4.3	Résultats et discussion.....	94

## CHAPITRE 5.

<u>APPLICATION DE LA FLUORESCENCE A L'ETUDE DE L'ADAPTA-</u>	
<u>TION DE L'ALGUE VERTE <i>Dunaliella tertiolecta</i> A UNE</u>	
<u>CROISSANCE A BASSE TEMPERATURE.....</u>	107
5.1 Introduction.....	107
5.2 Matériel et méthodes.....	108
5.3 Résultats et discussion.....	109

## CHAPITRE 6.

<u>APPLICATION DE LA FLUORESCENCE A L'ETUDE DE L'EFFET</u>	
<u>INHIBITEUR DU CUIVRE CHEZ L'ALGUE VERTE <i>Dunaliella</i></u>	
<u><i>tertiolecta</i>.....</u>	116
6.1 Introduction.....	116
6.2 Matériel et méthode.....	117
6.3 Résultats et discussion.....	117
CONCLUSION.....	124
REFERENCES.....	128
ANNEXE I.....	135
ANNEXE II.....	139

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	page
2.1 Composition chimique des solutions pour l'extraction, la conservation et la resuspension des thylakoides d'orge.....	75
5.1 Paramètres photosynthétiques évalués des cinétiques de fluorescence chez l'algue verte <i>Dunaliella tertiolecta</i> cultivée à 12°C et 20°C.....	113

LISTE DES FIGURES

figure	page
1.1 Structure simplifiée d'un chloroplaste.....	2
1.2 Représentation schématique de la structure des membranes du chloroplaste.....	4
1.3 Spectre d'absorption des chlorophylles et des caroténoïdes chez les algues vertes et les plantes supérieures .....	7
1.4 Représentation schématique des pigments antennes du photosystème II.....	8
1.5 Représentation imagée de la chaîne de transport d'électrons.....	11
1.6 Durées de vie des réactions photochimiques entre les différents transporteurs d'électrons.....	13
1.7 Cycle de la phase obscure (cycle de Calvin).....	16
1.8 Diagramme de Jablonski des états de transitions de l'énergie et de ses formes dissipatives.....	19
1.9 Cinétiques d'induction de la fluorescence mesurées sur différentes échelles de temps.....	24
1.10 Evaluation du paramètre $\ln (F_M - F(t))$ en fonction du temps.....	31
1.11 Représentation de l'aire complémentaire A au dessus des courbes d'induction de la fluorescence.	33

2.1	Coupe du thermo-fluorimètre et de ses composantes	44
2.2	Spectre de transmission du filtre d'absorption infrarouge HAF-100 (compagnie Labsphère) .....	46
2.3	Spectre de transmission des filtres d'excitation CS 4-96 et CS 3-71.....	46
2.4	Spectre de réflexion du sulfate de baryum (Kodak #6080) recouvrant la surface interne du thermo-fluorimètre.....	48
2.5	Dispositif de contrôle et d'évaluation du thermo-fluorimètre.....	50
2.6	Réponse spectrale du détecteur Devar #539-01-5 utilisé pour l'évaluation de la fluorescence.....	53
2.7	Circuit de préamplification du détecteur utilisé pour l'évaluation de la fluorescence.....	53
2.8	Spectres de transmission des filtres CS 2-64 et CS 7-59 utilisés pour l'évaluation de la fluorescence.....	55
2.9	Réponse spectrale du détecteur P394R utilisé pour l'évaluation de la dissipation thermique....	58
2.10	Circuit de polarisation du détecteur servant à l'évaluation de la dissipation thermique.....	58
2.11	Spectre de transmission du filtre infrarouge RG780 utilisé pour l'évaluation de la dissipation thermique.....	59

2.12	Procédure de compensation de la dérive du signal de dissipation thermique.....	62
3.1	A) Accroissement initial de la cinétique d'induction de la fluorescence chez l'algue verte <i>Dunaliella tertiolecta</i> . B) Transformation linéaire de la cinétique initiale d'induction de la fluorescence.....	79
3.2	Evaluation de la fluorescence constante $F_0$ suivant trois méthodes d'extrapolation.....	83
3.3	Conséquence de l'évaluation de $F_0$ sur les valeurs de $F_v$ et $F_N$ évaluées au niveau $F_D$ . ....	84
3.4	Cinétiques d'induction de la fluorescence utilisant des chloroplastes d'orge en présence de A) BQ; B) FeCN; C) MV. D) Valeurs relatives de $F_0$ et $F_v$ .....	86
3.5	Evaluation des niveaux $F_0$ apparents 10 ms après préillumination de l'algue verte <i>D. tertiolecta</i> (durant .5 s) et des thylacoïdes d'orge (durant 2 s) en absence ou en présence de FeCN.....	88
3.6	Temps de recouvrement des niveaux $F_0$ après préillumination de l'algue verte <i>D. tertiolecta</i> (durant .5 s) et des thylacoïdes d'orge (durant 2 s, en absence d'additifs).....	90

4.1	Courbes d'induction de fluorescence mesurées sur différentes échelles de temps avec des plantules d'orge.....	95
4.2	Courbes d'induction de la dissipation thermique mesurées sur différentes échelles de temps avec des plantules d'orge.....	97
4.3	Cinétiques d'induction de fluorescence (sur des plantules d'orge) après une période de préillumination de 2 s.....	99
4.4	Cinétiques d'induction de la dissipation thermique (sur des plantules d'orge) après une période de préillumination de 2 s.....	100
4.5	Accroissement initial des cinétiques de fluorescence (sur des plantules d'orge) après une période de préillumination de 2 s.....	102
4.6	Accroissement initial des cinétiques de la dissipation thermique (sur des plantules d'orge) après une période de préillumination de 2 s.....	103
4.7	Cinétiques d'induction de fluorescence chez <i>D. tertiolecta</i> .....	104
4.8	Cinétiques d'induction de dissipation thermique chez l'algue verte <i>D. tertiolecta</i> .....	105
5.1	Courbes d'induction de fluorescence chez <i>D. tertiolecta</i> cultivée à 12°C et 20°C.....	110

5.2	Courbes d'induction de fluorescence chez <i>D. tertiolecta</i> cultivée à 12°C et 20°C en présence de DCMU.....	112
6.1	Courbes d'induction de fluorescence chez <i>D. tertiolecta</i> incubées 15 min. en présence de différentes concentrations de CuSO <sub>4</sub> .....	118
6.2	Courbes d'induction de fluorescence en présence de DCMU et d'additifs.....	120
6.3	(A) Fluorescence variable maximale (en %) en présence de DCMU et en fonction de la concentration de CuSO <sub>4</sub> . (B) Rendement photochimique de la fluorescence en fonction de la concentration de CuSO <sub>4</sub> .....	121
6.4	(A) Taux de photoréduction de Q <sub>A</sub> (K) en présence de DCMU et (B) aire complémentaire en présence de DCMU chez les algues incubées avec différentes concentrations de CuSO <sub>4</sub> .....	123

LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

- $\Phi$ : rendement quantique
- A: aire complémentaire
- ADP: adénosine diphosphate
- ATP: adénosine triphosphate
- BQ: 1-4 benzoquinone
- CCL: complexe collecteur de lumière
- CDO: complexe de dégagement d'oxygène
- Chl: chlorophylle
- Cyt: cytochrome
- DCMU: 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl urée
- DPC: diphénylcarbazine
- FeCN: ferricyanure
- $F_{max}$ : niveau de fluorescence maximal mesuré en présence de DCMU
- $F_N$ : fluorescence normalisée
- $F_0$ : fluorescence constante
- $F_V$ : fluorescence variable
- $F_{VP}$ : fluorescence variable évaluée au niveau P
- HEPES: acide N-2-hydroxyéthylpipérezine-N'-2-éthanesulfonique
- k: constante de vitesse des processus dissipatifs
- K: taux de photoréduction

min: minute

ms: milliseconde

MV: méthylviologène

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

O,I,D,P,S,M: niveaux des cinétiques de fluorescence

PQ: plastoquinone

Phéo: phéophytine

PSI: photosystème I

PSII: photosystème II

P680: centre réactionnel du PSII

P700: centre réactionnel du PSI

Q<sub>A</sub>: accepteur primaire d'électrons du PSII

Q<sub>B</sub>: accepteur secondaire d'électrons du PSII

s: seconde

T<sub>0</sub>: dissipation thermique initiale

T<sub>P</sub>: dissipation thermique évaluée au niveau P

U.A.: unités arbitraires

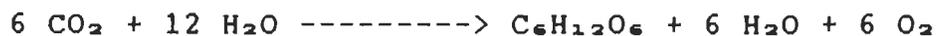
Z: donneur primaire d'électron du PSII

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

#### 1.1 La photosynthèse

On peut définir la photosynthèse comme le processus par lequel les plantes supérieures et les algues vertes utilisent l'énergie lumineuse absorbée pour synthétiser des produits riches en énergie (sous forme d'hydrates de carbone) à partir de l'eau (H<sub>2</sub>O) et du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) (Hoover 1984). Grossièrement, la relation chimique globale peut s'écrire comme suit (Hader et Tevini 1987):



Cette transformation a lieu dans une organelle de la cellule végétale connue sous le nom de chloroplaste. Chez les plantes supérieures, le chloroplaste mesure environ 4 à 8 µm de diamètre et 2 à 3 µm d'épaisseur. Leur nombre est cependant variable d'une espèce à l'autre. La figure 1.1 présente une vue simplifiée d'un chloroplaste. Celui-ci est délimité du cytoplasme de la cellule par une membrane externe, jouant un rôle de structure, et une membrane interne qui contrôle les échanges avec le cytoplasme. On retrouve à l'intérieur du chloroplaste un réseau complexe de structures membranaires fermées qu'on nomme membranes du

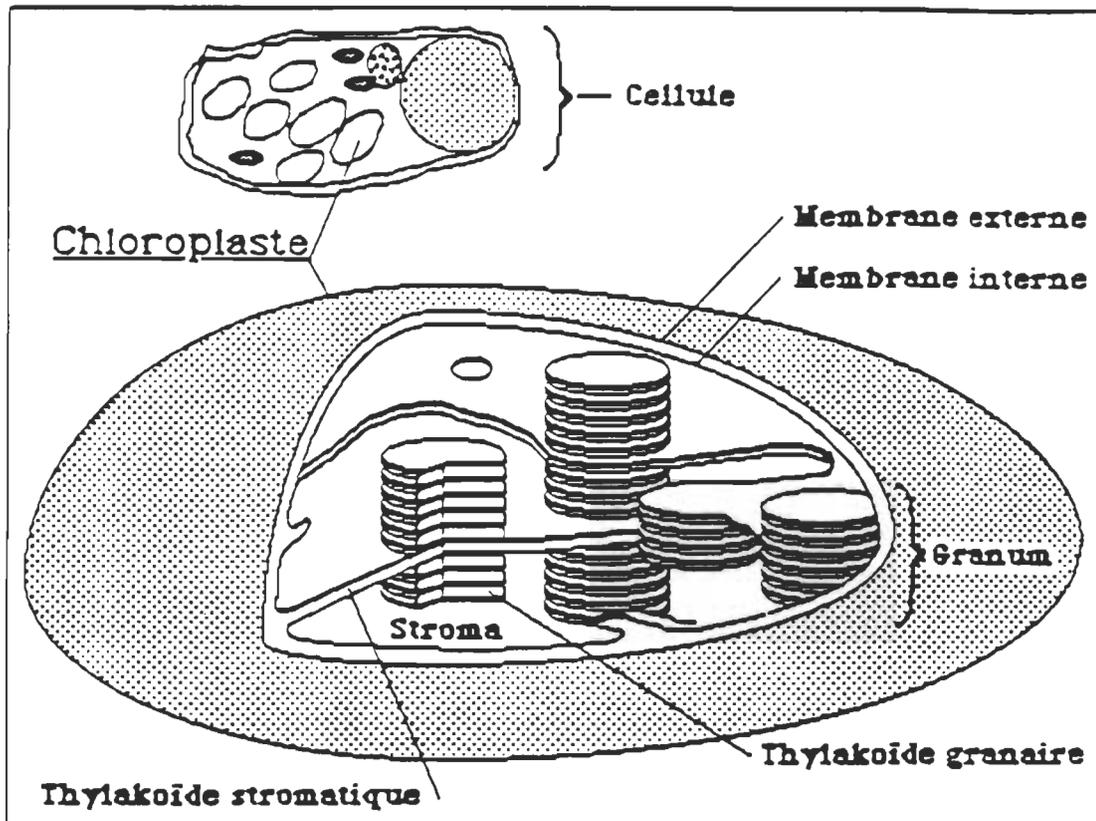


Figure 1.1 Structure tridimensionnelle du chloroplaste

thylacoïde (Ort 1986). On distingue deux types de membranes du thylacoïde selon qu'elles sont empilées (thylacoïde granaire) ou non (thylacoïde stromatique). L'empilement de 2 à 100 thylacoïdes granaires forme un granum. Les granum sont reliés entre eux par les thylacoïdes stromatiques. C'est dans ce réseau complexe de membranes qu'on retrouve les composantes protéiniques nécessaires à la phase lumineuse (absorption de la lumière, séparation de charges et transport d'électrons) de la photosynthèse. Pour leur part, les composantes enzymatiques nécessaires à la phase obscure (fixation du  $\text{CO}_2$  et emmagasinage de l'énergie sous forme d'hydrates de carbone) se situent dans le stroma.

## 1.2 La membrane photosynthétique

La première étape de l'acte photosynthétique est l'absorption de la lumière par les complexes collecteurs de lumière, la séparation de charges et le transport d'électrons pour la production d'ATP (adénosine triphosphate) et du NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) nécessaires à la fixation du CO<sub>2</sub> pour la synthèse des hydrates de carbone. Ces réactions primaires (en phase lumineuse) ont lieu dans des complexes pigments protéines se situant dans les membranes du thylacoïde. La figure 1.2 présente une vue générale d'un modèle de la structure des thylacoïdes chez les plantes supérieures. On y distingue quatre unités fonctionnelles (Hader et Tevini 1987) soit:

- 1) Les deux complexes collecteurs de l'énergie lumineuse ou complexes capteurs de lumière (CCL-II et CCL-I) formés de protéines et de pigments photosensibles.
- 2) Les deux centres photochimiques (PSII et PSI) où se produit la séparation de charges.
- 3) Un réseau de transporteurs d'électrons entre les photosystèmes II et I.
- 4) Le facteur de couplage (ATPase) responsable de la synthèse de l'ATP à partir du phosphate inorganique (P<sub>i</sub>) et de l'ADP.

Ces complexes "baignent" dans un environnement lipidique

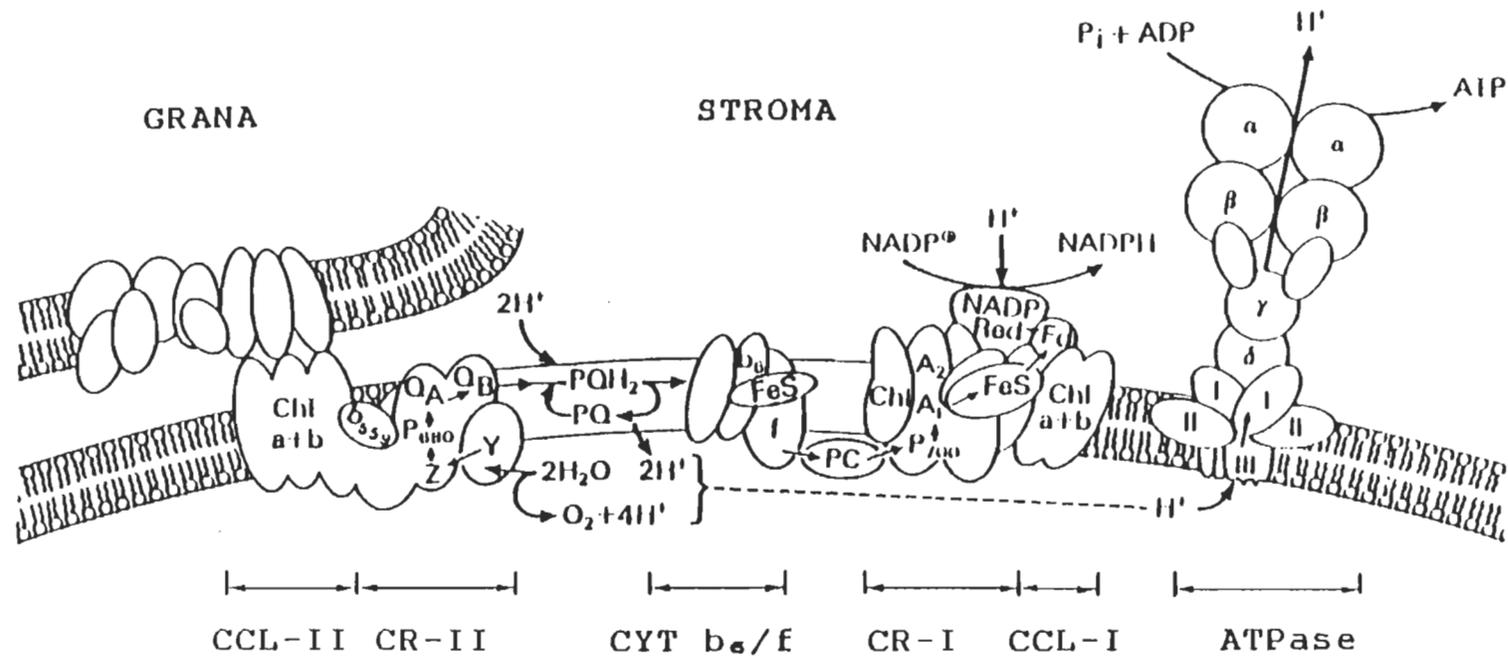


Figure 1.2 Représentation schématique de la structure des membranes du chloroplaste. CCL-II et CCL-I, complexes collecteurs de lumière du photosystème II et I; CR-II et CR-I, centres photochimiques II et I; CYT b<sub>6</sub>/f, complexes cytochromes; ATPase, complexe pour la synthèse de l'ATP. Tiré de Hader et Tevini 1987.

dont le but est de maintenir une structure favorable aux différentes fonctions des protéines responsables du processus photosynthétique (Kaplan et Arntzen 1982). Ces protéines sont distribuées différemment à l'intérieur des membranes du thylacoïde. Les CCL-II et leurs PSII correspondant sont majoritairement situés dans les régions empilées des thylacoïdes granaires tandis que les CCL-I, les PSI, les complexes cytochromes  $b_6/f$  et le facteur de couplage  $CF_0-CF_1$  (ATPase) se situent dans les thylacoïdes stromatiques.

Les PSII sont hétérogènes par leur structure et leurs fonctions (Melis et Homann 1975). Ils sont notés de type alpha ( $\alpha$ ) ou bêta ( $\beta$ ) selon leur localisation dans les thylacoïdes. Les PSII $\alpha$  se situent dans les thylacoïdes granaires et les PSII $\beta$  dans les thylacoïdes du stroma (Anderson et Melis 1983). Les PSII $\alpha$  possèdent un plus gros complexe collecteur de lumière que les PSII $\beta$  (Melis et Duysens 1979). Cette variation de l'antenne entraîne possiblement un plus faible taux de transfert de l'énergie vers les centres réactionnels chez les PSII $\beta$  comparativement au PSII $\alpha$  (Thielen et van Gorkom 1981). Nous ne connaissons pas encore très bien les fonctions des PSII $\beta$  mais on suppose maintenant que ces derniers soient des centres réactionnels en formation (Melis 1985). Il est à noter ici que dans la majorité des illustrations, on ne considère que les PSII $\alpha$ ; ces derniers étant d'une plus grande importance dans la chaîne de transport d'électrons.

### 1.3 L'absorption de l'énergie lumineuse

L'énergie lumineuse nécessaire à la formation de l'ATP et du NADPH est captée par des pigments photosensibles associés aux protéines des complexes capteurs de lumière. Chez les plantes supérieures et les algues vertes, se sont les chlorophylles a et les pigments accessoires (chlorophylles b et caroténoïdes) qui sont responsables de l'absorption lumineuse entre 400 et 700 nm (Hader et Tevini 1987). La diversification de ces pigments photosensibles a pour but principal d'élargir le spectre d'absorption de la lumière utilisée pour la photosynthèse (Clayton 1980). Les caroténoïdes ont, pour leur part, un rôle supplémentaire comme protecteur des chlorophylles contre la photooxydation (Hooper 1984).

La figure 1.3 présente les différents spectres d'absorption des pigments chlorophylles a, b et caroténoïdes entre 400 et 700 nm. La chlorophylle a absorbe principalement dans le rouge (maximum à 680 nm) et dans le bleu (maximum à 440 nm). Les pigments accessoires absorbent dans les régions où la chlorophylle a est moins efficace (Hader et Tevini 1987). Chez les plantes supérieures et les algues vertes, l'énergie absorbée par les pigments accessoires est transférée avec une certaine perte à la chlorophylle a (environ 2% pour la chlorophylle b et 40% pour les caroténoïdes). Puisqu'il y a perte d'énergie lors de la migration de l'exciton, le

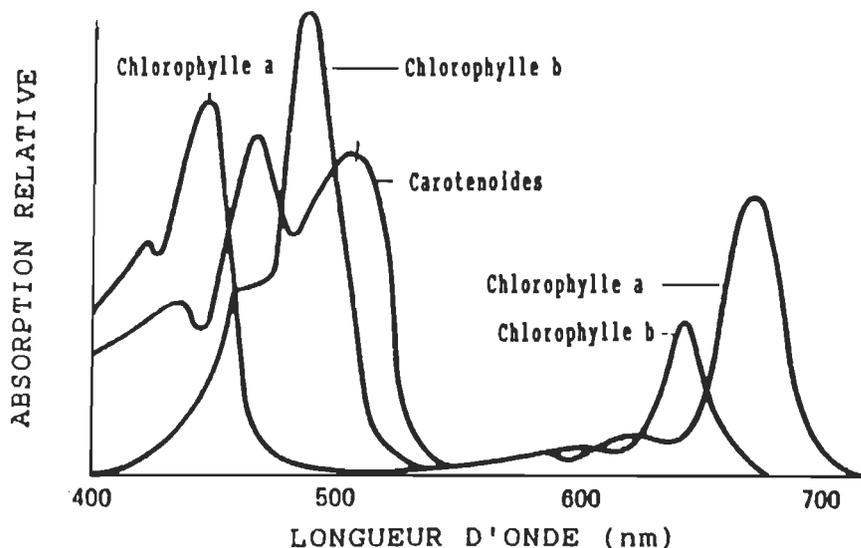


Figure 1.3 Spectre d'absorption des chlorophylles et des caroténoïdes chez les algues vertes et les plantes supérieures (Hader et Tevini 1987).

transfert de l'énergie (de l'exciton) ne se fera qu'en sens unique partant des caroténoïdes vers le centre réactionnel (une paire spéciale de chlorophylle a). L'absorption d'un photon par les pigments photosensibles implique une transition électronique du niveau fondamental vers un niveau excité. Cette transition est de l'ordre de  $10^{-15}$  s. L'état excité est alors transféré par résonance (Forster 1965) vers le centre réactionnel des PSII et PSI où il y aura séparation de charges et transport d'électrons (Foyer 1984). La figure 1.4 présente un modèle de l'organisation

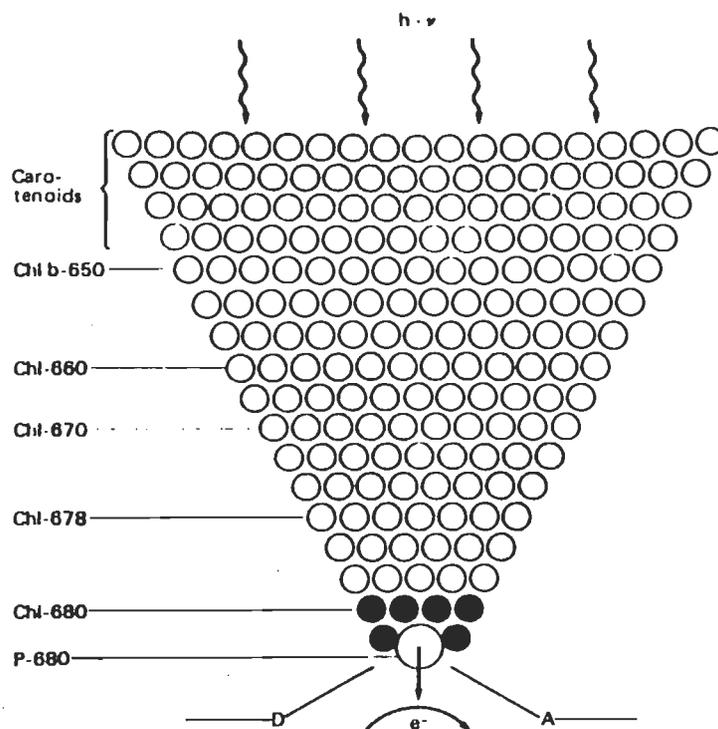


Figure 1.4 Représentation schématique des différents pigments antennaires du photosystème II (pour plus de détails, voir Hader et Tevini 1987).

hétérogène des pigments photosensibles associés au complexe collecteur de lumière du PSII (CCL II) ainsi que le processus de transfert de l'énergie absorbée partant des caroténoïdes vers les pigments de chlorophylle a au niveau du centre photochimique (PSII).

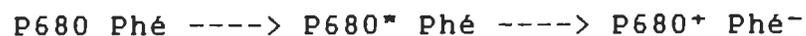
La perte de l'exciton lors du transfert de l'énergie des pigments accessoires vers la chlorophylle a associé au centre photochimique (PSII) est dissipée sous forme de fluorescence constante (au niveau de l'antenne) et de désactivation sous forme de dissipation thermique. L'énergie

transférée au centre photochimique PSII dont le maximum d'absorption est à 680 nm sera utilisée principalement pour la photochimie (séparation de charges) ou dissipée sous forme de fluorescence (par recombinaison de charges) et de dégagement de chaleur.

#### 1.4 Le transport d'électrons

L'énergie transférée aux centres réactionnels des PSII (P680) et PSI (P700), se situant proche de la surface interne des membranes (figure 1.5), provoque une transition électronique des photosystèmes vers un état excité P680\* et P700\* respectivement. Cet état possédant une plus grande énergie est utilisé pour produire une séparation de charges entre le centre réactionnel et une molécule voisine (un accepteur). Au niveau du photosystème II, cet accepteur serait une phéophytine et au niveau du PSI, un dimère de chlorophylle a (Gregory 1989). Cette séparation de charges est la première transformation de l'énergie lumineuse en énergie électrochimique (Papageorgiou 1975). Sous forme abrégée, ce processus s'écrit:

Pour le PSII



Pour le PSI



Légende de la figure 1.5

A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> : accepteurs d'électrons du PSI  
 ADP : adénosine diphosphate  
 ATP : adénosine triphosphate  
 ATPase : complexe pour la synthèse de l'ATP  
 Cyt b<sub>6</sub> : cytochrome b<sub>6</sub>  
 Cyt f : cytochrome f  
 Fd : ferredoxine  
 FeS : complexes fer-soufre  
 LHC : complexes collecteurs de lumière  
 NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
 NADP red : enzyme NADP réductase  
 P<sub>680</sub> : centre réactionnel du PSII  
 P<sub>700</sub> : centre réactionnel du PSI  
 PC : plastocyanine  
 Phaeo : phéophytine  
 PQ : bassin de plastoquinones membranaires  
 PSI : photosystème I  
 PSII : photosystème II  
 Q<sub>A</sub> : premier accepteur d'électrons du PSII (quinone)  
 Q<sub>B</sub> : site des herbicides  
 Y : complexe de dégagement d'oxygène  
 Z : donneur d'électrons au PSII (résidu de tyrosine)

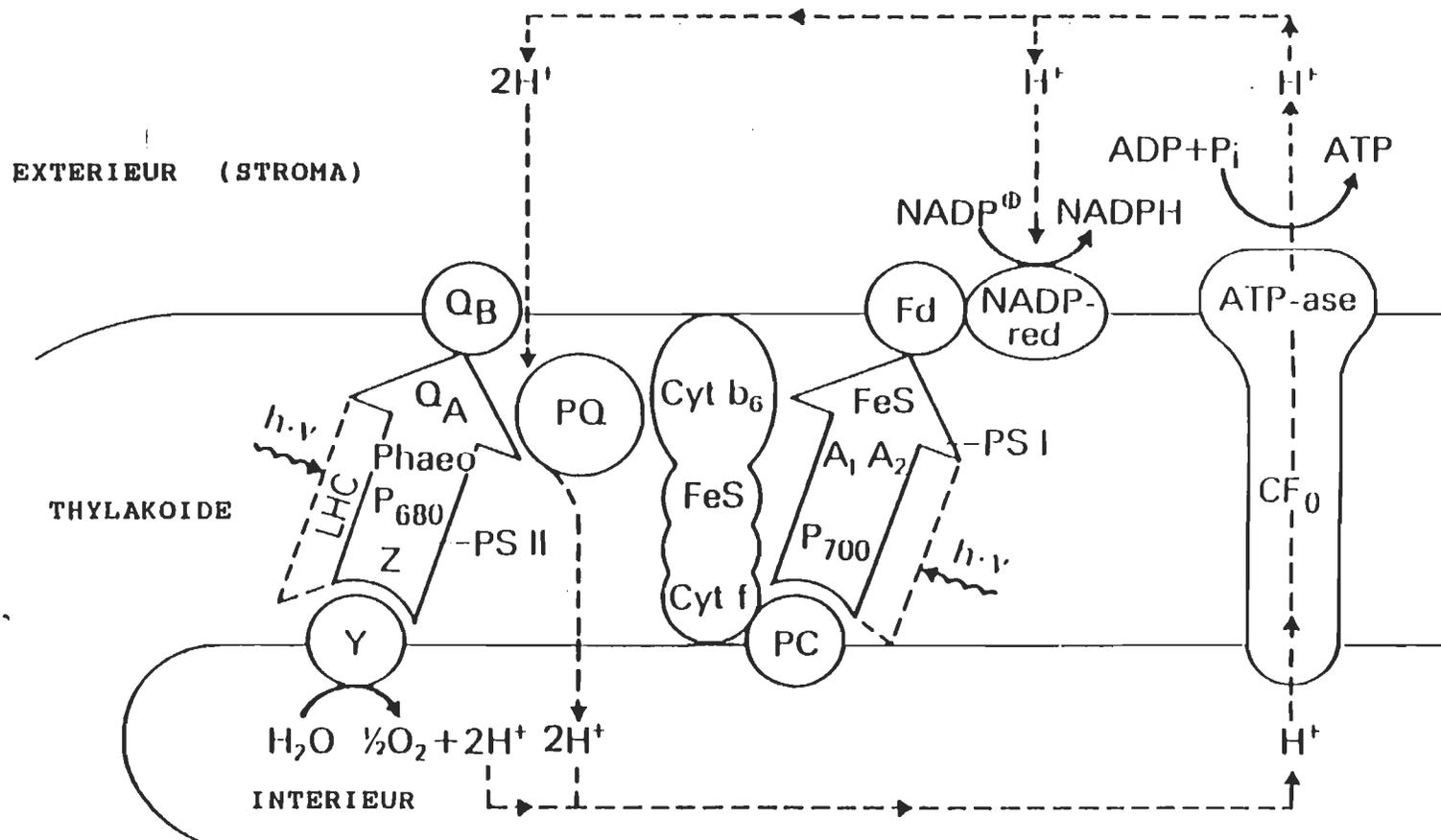


Figure 1.5 Représentation imagée de la chaîne de transport d'électrons. Pour la légende, voir la page précédente. Tiré de Hader et Tevini 1987.

P680<sup>+</sup> et P700<sup>+</sup> étant de très forts oxydants, ces derniers iront chercher un électron de leur donneur respectif afin de stabiliser la séparation de charges. Au niveau du PSII, ce donneur noté Z serait un résidu de tyrosine (Barry et Badcoch 1987). Le centre réactionnel du PSII, après l'oxydation de Z en moins de 50 ns, passe de la forme P680<sup>+</sup> à P680 et Z passe à la forme Z<sup>+</sup>. Z<sup>+</sup> est un fort oxydant pour l'eau, il reviendra donc à sa forme initiale en prenant un électron d'une molécule d'eau au niveau du système de dégagement d'oxygène (Govindjee *et al.* 1985, Rutherford 1989)). Ce complexe (noté Y) se situe à la surface interne du thylacoïde (figure 1.5). Il est caractérisé par un mécanisme à quatre étapes où chaque étape supérieure correspond à un degré supérieur d'oxydation de l'eau. A l'étape quatre, une molécule d'oxygène est dégagée et le cycle recommence. Au cours de ce cycle, quatre protons sont injectés dans la membrane interne du thylacoïde créant ainsi un gradient de pH entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane (Delrieu 1983).

L'électron qui a été capté par la phéophytine lors de la séparation de charges est transféré à un bassin de plastoquinone (PQ) par l'intermédiaire de la quinone Q<sub>A</sub> et du site Q<sub>B</sub>. Les différentes durées de vie des réactions photochimiques entre les différents transporteurs sont résumés à la figure 1.6. Deux électrons sont nécessaires afin de réduire une plastoquinone fixée au site Q<sub>B</sub>. Lors de ces deux réductions successives, la plastoquinone prend deux

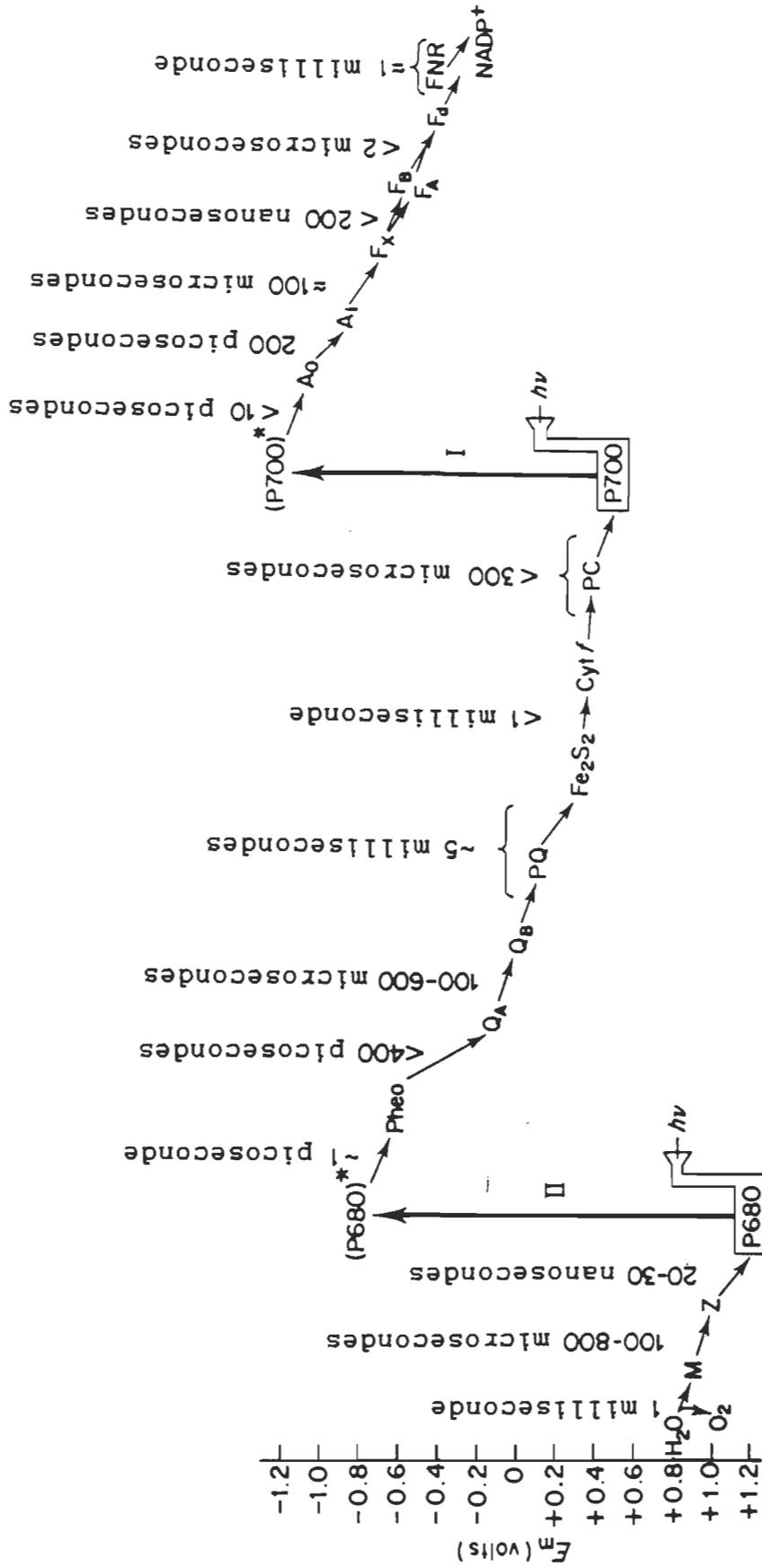


Figure 1.6 Durées de vie des réactions photochimiques entre les différents transporteurs d'électrons (Tiré de Lavorel 1986).



Calvin) pour la fixation du  $\text{CO}_2$  et la synthèse d'hydrates de carbone.

Lors de ce transport linéaire, deux protons sont transférés de l'extérieur de la membrane vers l'intérieur. Cette accumulation de protons avec celle causée par l'oxydation de l'eau entraîne un gradient de pH qui déclenche la synthèse de l'ATP (Gregory 1989).

L'enzyme responsable de cette synthèse est le facteur de couplage  $\text{CF}_0\text{-CF}_1$  (ou ATPase) composé de deux sections (figure 1.5) dont l'une hydrophobe ( $\text{CF}_0$ ) et l'autre hydrophile ( $\text{CF}_1$ ) (Nelson 1988). C'est la section hydrophile qui est responsable de la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et du  $\text{P}_i$  (phosphate inorganique) tandis que la partie hydrophobe sert de canal pour laisser passer les protons de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane (Gregory 1989). La synthèse de l'ATP sert ainsi à diminuer le gradient de protons dû au transport d'électrons dans la membrane photosynthétique (Hooper 1984).

### 1.5 La phase obscure

L'énergie emmagasinée sous forme d'ATP et de NADPH est utilisée dans les réactions de la phase obscure ou cycle de Calvin (Benson et Calvin 1950). Elle est dite phase obscure car elle n'a pas besoin directement d'énergie lumineuse pour fonctionner. Ce cycle est représenté à la figure 1.7 et est situé dans le stroma à l'intérieur du chloroplaste. La



fonction de ce cycle est la synthèse des sucres ( $C_6H_{12}O_6$ ) à partir de la fixation du dioxyde de carbone  $CO_2$  et d'énergie emmagasinée sous forme d'ATP et de NADPH. Pour chaque molécule de  $CO_2$  fixée, 3 ATP et 2 NADPH sont utilisées. Pour synthétiser une molécule de sucre, le cycle utilisera 18 ATP et 12 NADPH (Lehninger 1982).

### 1.6 La dissipation de l'énergie

L'absorption d'un photon (énergie lumineuse) au niveau des complexes collecteurs de lumière produit une transition électronique des pigments vers des niveaux supérieurs d'énergie. Suivant l'énergie absorbée, la molécule excitée fera une transition de son niveau fondamental ( $S_0$ ) au premier ( $S_1$ ) ou à un niveau supérieur ( $S_2, S_3, \dots, S_n$ ) d'énergie (Hader et Tevini 1987). Cet état fait suite à l'absorption d'un seul photon d'énergie  $E=hc/l$  où  $h$  est la constante de Planck,  $c$  la vitesse de la lumière et  $l$  la longueur d'onde équivalente du photon. Une molécule ne peut s'élever à un état excité que si l'énergie qu'elle a absorbée correspond au minimum à l'énergie de cet état. Cette absorption se fait dans l'ordre de  $10^{-15}$  s. Si l'énergie dans l'état excité n'est pas utilisée à la photochimie, la molécule se relaxe et revient à son état fondamental en utilisant différentes formes dissipatives. Les trois principales formes sont la dissipation thermique (chaleur), la fluorescence et la phosphorescence.

La figure 1.8 montre un diagramme de Jablonski des différentes transitions électroniques possibles suite à l'absorption d'un photon et des moyens de dissipation de l'énergie absorbée. Il est à noter qu'à la température de la pièce, la dissipation de l'énergie sous forme de phosphorescence est négligeable par rapport à l'énergie absorbée (Vanderkooi et Berger 1989) et peut donc, dans notre cas, être exclue.

### 1.6.1 La fluorescence

La fluorescence (dans la photosynthèse) est un processus par lequel une molécule à l'état excité  $S_1$  dissipe l'énergie absorbée pour revenir à l'état fondamental ( $S_0$ ) par l'émission d'un photon (figure 1.8) (Yavorski et Detlaf 1980). Due aux lois quantiques, l'énergie émise par fluorescence ne peut être supérieure à celle absorbée. La longueur d'onde d'émission du photon sera donc égale ou supérieure (énergie égale ou inférieure) à celle du photon absorbée. Cette émission de fluorescence est de l'ordre de  $10^{-9}$  à  $10^{-6}$  s après l'absorption du photon d'excitation et correspond à un temps de vie apparent ( $\tau$ ). Ce temps de vie apparent est dû à la compétition entre la dissipation de l'énergie sous forme de fluorescence et la dissipation de l'énergie sous les autres formes possibles (figure 1.8). On relie donc le temps de vie apparent et le temps de vie

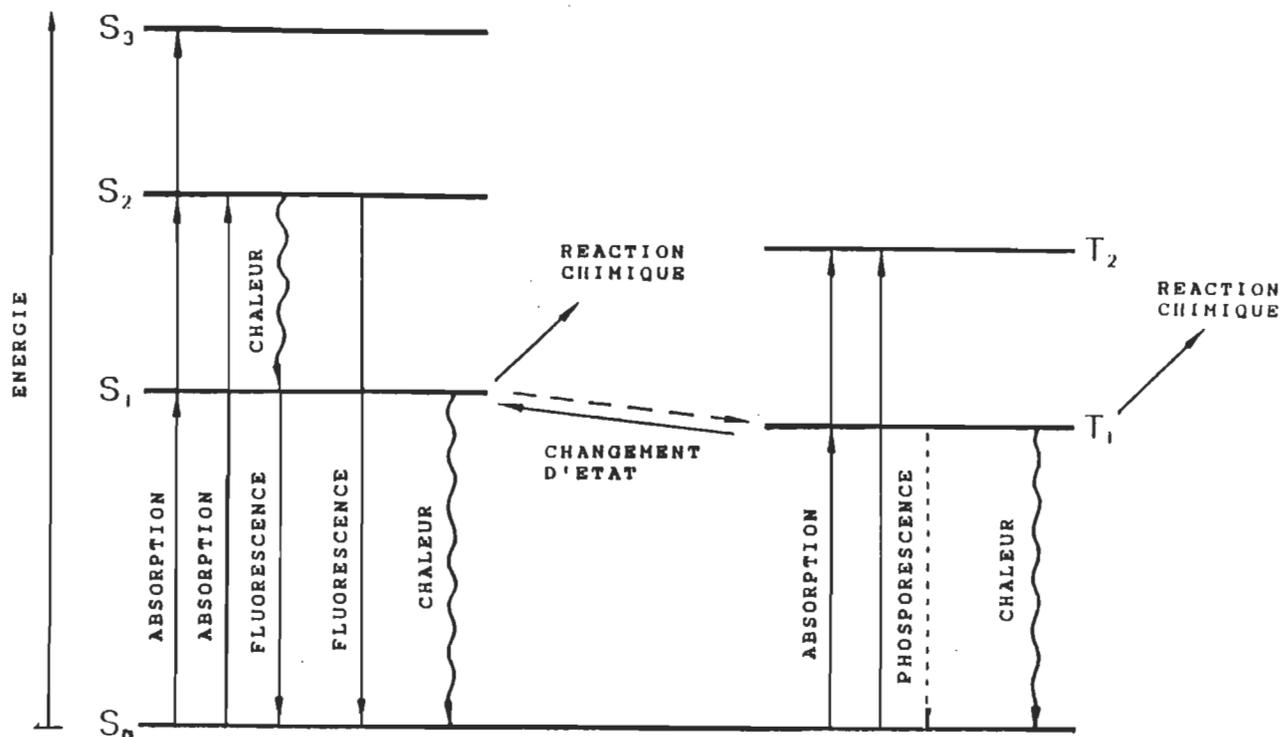


Figure 1.8 Diagramme de Jablonski des niveaux d'énergie et de ses formes dissipatives.

propre ( $\tau_0$ ) de la fluorescence par la relation:

$$\tau = \tau_0 \Phi_F \quad 1.1$$

où l'on définit  $\Phi_F$  comme étant le rendement quantique de fluorescence et correspondant au nombre de photons émis sous forme de fluorescence par rapport au nombre de photons absorbés (Lakowicz 1986). Utilisant les différents processus dissipatifs de l'énergie, le rendement quantique de

fluorescence peut être décrit comme:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_C + k_P} \quad 1.2$$

où  $k_F$ ,  $k_C$  et  $k_P$  représentent les constantes de vitesse des processus de fluorescence (F), chaleur (C) et photochimie (P) respectivement (Munday et Govindjee 1969).

Etant donné que la fluorescence émise est fonction de l'intensité de la lumière absorbée (I) par la molécule et du rendement quantique de fluorescence  $\Phi_F$ , la fluorescence émise sera donc donnée par:

$$F = I \Phi_F \quad 1.3$$

De façon analogue, le rendement quantique de l'émission thermique peut s'écrire:

$$\Phi_C = \frac{k_C}{k_F + k_C + k_P} \quad 1.4$$

En émettant l'hypothèse que  $k_P$  change tout en laissant  $k_F$  et  $k_C$  constant, l'intensité thermique émise ( $C = I \Phi_C$ ) devient proportionnelle à celle de la fluorescence (F) (Munday et Govindjee 1969). Donc, si  $F + C + P = I$  et qu'on suppose P égal à l'intensité de lumière absorbée I fois K (la probabilité que le photon soit utilisé pour la photochimie et qui est égale au rendement quantique des réactions photochimiques  $\Phi_P$ ), on peut écrire de Munday et Govindjee en

1969 et Butler en 1980:

$$F + c F + \Phi_D I = I \quad 1.5$$

où  $c$  est la constante de proportionnalité entre  $C$  et  $F$ . La fluorescence émise peut maintenant s'écrire:

$$F = (I/c_1) (1-\Phi_D) \quad 1.6$$

où  $c_1 = c + 1$ . Cette relation n'est valable que pour les PSII oxydés. A la température de la pièce, la fluorescence émise provient majoritairement des pigments du complexe collecteur de lumière et du PSII.

La fluorescence provenant du complexe collecteur de lumière est due à la perte d'énergie (au niveau des pigments) lors de la migration de l'exciton vers le centre photochimique PSII (Papageorgiou 1975). Cette fluorescence n'est pas liée au transport d'électrons dans la membrane, donc aux réactions photochimiques, et elle est dite fluorescence morte ou fluorescence constante  $F_0$ .

L'énergie arrivant au centre réactionnel du PSII est utilisée pour la séparation de charges. Si le transport d'électron est effectif, c'est-à-dire qu'il y a transfert de l'électron à l'accepteur primaire  $Q_A$  (puisque ce dernier est oxydé) après séparation de charges, l'énergie ne sera utilisée que pour les réactions photochimiques. Le système est alors considéré à l'état "ouvert". L'émission de

fluorescence sera minimale (réactions photochimiques maximales) et ne proviendra que de la perte d'énergie provenant des antennes (niveau  $F_0$ ):

$$F = F_0 = I/c_1 (1-\Phi_{P_0}) \quad 1.7$$

où  $\Phi_{P_0}$  (équivalent à  $K_0$ ) désigne le rendement photochimique lorsque tous les accepteurs  $Q_A$  sont oxydés au temps  $t=0$ . Après un temps  $t$ , l'accepteur primaire  $Q_A$  peut devenir réduit (état "fermé"). L'électron est ainsi bloqué au niveau de la phéophytine qui ne peut plus être oxydée par  $Q_A$ . Il se produit donc dissipation de l'énergie par recombinaison de charges entre la phéophytine et le centre réactionnel (Klimov *et al.* 1977) avec émission de fluorescence. D'après la relation 1.6 l'émission de fluorescence au temps  $t$  sera donnée par :

$$F(t) = I/c_1 (1-\Phi_P(t)) \quad 1.8$$

où  $\Phi_P(t)$  désigne le rendement photochimique des PSII après un temps  $t$ . Cette fluorescence inclue la valeur de  $F_0$ . La fluorescence qui provient de la recombinaison de charges est donc liée à l'état d'oxydoréduction de l'accepteur primaire  $Q_A$  (Van Gorkom 1986, Krause et Weis 1984, Briantais *et al.* 1986).

Lorsqu'on illumine des chloroplastes ou des algues adaptés au noir, la fluorescence émise par le PSII varie en

intensité dans le temps dû aux changements dans la capacité de transport d'électrons qui contrôle l'état d'oxydoréduction de  $Q_A$ . L'évaluation ou la mesure de cette fluorescence temporelle ( $F(t)$ ) sous le nom d'effet Kautsky (de l'auteur) s'avère donc une sonde très efficace pour la mesure de l'état d'oxydoréduction de la chaîne de transport d'électrons. La figure 1.9 illustre les variations typiques (effet Kautsky) de l'intensité de la fluorescence à différentes échelles de temps.

Ces cinétiques sont caractérisées par plusieurs niveaux notés O-I-D-P-S-M-T (Krause et Weis 1984) regroupés en une phase rapide (niveaux O-I-D-P) suivie d'une phase lente (niveaux S-M-T). La phase rapide s'effectue en quelques secondes tandis que la phase lente s'étend à plusieurs minutes. Le cheminement dans le temps des différents niveaux composant l'effet Kautsky est dépendant de l'état d'oxydoréduction de la membrane photosynthétique.

Le niveau O ( $F_0$ ) sous le nom de fluorescence morte (Lavorel *et al.* 1986) provient de la perte d'énergie (au niveau des antennes) lors de la migration de l'exciton vers les centres réactionnels. La montée O-I correspond à une réduction partielle des accepteurs primaires  $Q_A$  du PSII. L'inflexion I-D est la conséquence de l'oxydation des  $Q_A^-$  par le PSI. La montée D-P survient quand le photosystème I est saturé (dû à un blocage de son côté réduit) et devient incapable d'accepter d'autres électrons. Le bassin de plastoquinone devient plus réduit et se traduit par une augmentation de

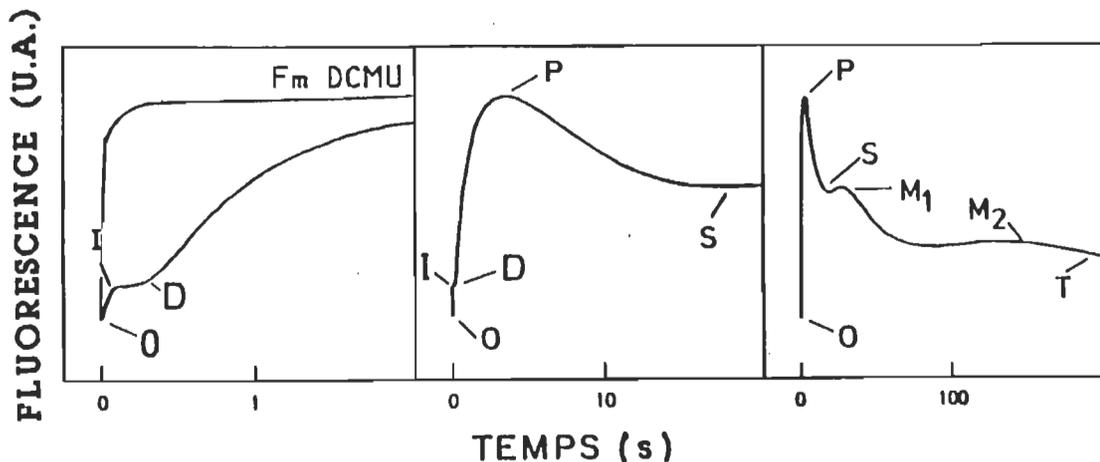


Figure 1.9 Cinétiques d'induction de la fluorescence mesurées sur différentes échelles de temps

fluorescence au niveau P. Les oscillations S-M conduisant au niveau T sont aussi dues à l'état d'oxydoréduction de  $Q_A$  mais décrivent aussi le gradient de protons à l'intérieur de la membrane, la concentration en ATP et en NADPH ainsi que le taux de fixation du  $CO_2$  par le cycle de Calvin. Au niveau T, le rendement quantique de la fluorescence et le dégagement d'oxygène demeurent constants.

L'effet Kautsky est donc composé d'une fluorescence constante ( $F_0$ ) et d'une fluorescence variable ( $F_v(t)$ ) correspondant à l'état d'oxydoréduction de la chaîne de transport d'électrons.  $F_v(t)$  va donc croître et décroître selon l'état réduit ou oxydé (respectivement) des accepteurs

d'électrons du PSII. La fluorescence totale mesurée  $F(t)$  (effet Kautsky) est donc la superposition de ces fluorescences:

$$F(t) = F_v(t) + F_o \quad 1.9$$

En présence de l'herbicide DCMU (3-(3',4'-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée) qui isole le photosystème II par inhibition du transport d'électrons au niveau du site  $Q_B$ , la fluorescence atteint rapidement un niveau maximal noté  $F_M$  (figure 1.9) causé par la réduction des accepteurs d'électrons  $Q_A$  du photosystème II. Dans cette condition,  $\Phi_p(t) = 0$  (idéalement) et la fluorescence  $F_M$  devient égale à  $I/c_1$ . L'inflexion I-D des cinétiques de fluorescence est ici inexistante puisque ces niveaux sont fonction de la photochimie du PSI (Melis et Homann 1975, Krause et Weis 1984).

#### 1.6.2 La dissipation thermique

La dissipation de l'énergie sous forme de chaleur est la seconde forme de relaxation des molécules après une transition électronique vers les niveaux excités (figure 1.8). Cette forme de relaxation a lieu en  $10^{-12}$  s après absorption du photon d'excitation. Elle est mesurable dans la région du spectre électromagnétique allant d'environ 800 à 100,000 nm.

Cette forme dissipative est la plus importante (en proportion) dans la photosynthèse puisqu'elle provient de toutes les voies de relaxation de l'énergie. On suppose (Papageorgiou 1975, Foyer 1984, Hooper 1984, Carpentier *et al.* 1989) que lors des réactions primaires de la photosynthèse, la dissipation de l'énergie sous forme thermique proviendrait des centres collecteurs de lumière (pigments antennes) (chlorophylles a, b et caroténoïdes) ainsi que de la perte d'énergie due à la recombinaison de charges au niveau des centres photochimiques.

Dans la majorité des publications, la dissipation thermique est mesurée en utilisant un spectromètre photoacoustique (Buschmann *et al.* 1984). Cette technique utilise une lumière d'excitation modulée permettant de produire un changement de température à l'intérieur de l'échantillon et au même rythme que la lumière d'excitation. Ce changement de température crée une variation de pression dans la cellule de mesure pouvant être mesurée à l'aide d'un microphone. Cependant, à cause de l'instrumentation utilisée, les variations temporelles rapides (sur les premières secondes après le début de l'illumination) sont très difficiles à obtenir et n'ont pas été observées.

Il n'existe donc que très peu d'informations sur les cinétiques de dissipation thermique. On suppose que cette forme de relaxation est proportionnelle à la fluorescence

(Munday et Govindjee 1969). En 1984, Katoh et Yagamishi démontrèrent, pour la première fois, l'existence d'une relation étroite entre les cinétiques de la fluorescence et de la dissipation thermique. A ce stade, aucune interprétation moléculaire ne fut avancée. Les auteurs n'ont fait que décrire les cinétiques (les différents niveaux) sur plusieurs secondes après le début de l'illumination et les comparer à celles obtenues en fluorescence. Il semble d'après ces travaux que la dissipation thermique suit les mêmes variations que celles obtenues en fluorescence.

### 1.7 Problématique et objectifs du travail

L'analyse des cinétiques d'induction de fluorescence est donc un outil indispensable afin de caractériser l'état d'oxydoréduction de la chaîne de transport d'électrons dans le temps. Cet état est grandement influencé par les divers facteurs environnementaux tels l'effet de la température de croissance, l'utilisation d'herbicides et polluants qui inhibent la chaîne de transport d'électrons soit au niveau du système d'oxydation de l'eau, au niveau d'un intermédiaire de la chaîne de transport d'électrons ou des réactions de la phase obscure (Samson et Popovic 1988, Griffith *et al.* 1984, Moody *et al.* 1983, Govindjee *et al.* 1981) . Le rendement et la cinétique de fluorescence variable étant des indicateurs très sensibles caractérisant ces effets, deviennent par le fait même un outil afin de

caractériser l'état physiologique des plantes supérieures et des algues vertes (Papageorgiou 1975).

L'analyse des cinétiques d'induction de fluorescence sans et avec DCMU permet l'évaluation de différents paramètres photosynthétiques liés à l'état physiologique du système (Briantais 1986, Lavorel *et al.* 1986, Butko et Szalay 1985).

Le premier paramètre indispensable est l'évaluation de la fluorescence constante  $F_0$  (au temps  $t=0$ ). Ce niveau de fluorescence est utilisé pour séparer la portion variable (liée uniquement à la photochimie) des cinétiques de fluorescence  $F(t)$ . La cinétique de fluorescence  $F(t)$  étant la superposition de  $F_0$  et  $F_v(t)$ , cette portion variable sera évaluée par  $F_v(t) = F(t) - F_0$ . En se basant sur les équations 1.7 et 1.8, ce niveau variable dans le temps devient égal à:

$$F_v(t) = F(t) - F_0$$

$$F_v(t) = I/c_1 (\Phi_{P_0} - \Phi_P(t)) \quad 1.10$$

Cette relation caractérise le nombre de séparations de charges au temps  $t$  lié à l'état d'oxydoréduction de  $Q_A$ . Actuellement, il existe plusieurs systèmes pour l'évaluation de la fluorescence mais aucune technique "unifiée" (aucune méthode standard) de l'évaluation de la fluorescence constante  $F_0$ . De plus, dans la majorité des cas, les laboratoires évaluent le niveau  $F_i$  ( $i$  pour initiale)

correspondant souvent au niveau I des cinétiques Kautsky, ce qui est très différent de la fluorescence constante  $F_0$  (Cao et Govindjee 1990). Afin de comparer différents échantillons, il est nécessaire d'utiliser la fluorescence normalisée  $F_{VN}(t)$  définie comme étant le rapport de la fluorescence variable sur la fluorescence constante :

$$F_{VN}(t) = \frac{F_V(t)}{F_0} = \frac{\Phi_{P_0} - \Phi_P(t)}{1 - \Phi_{P_0}} \quad 1.11$$

L'avantage de cette relation est son indépendance par rapport à l'intensité de la lumière absorbée. De plus, elle est fonction du nombre de séparations de charges. Elle permet donc une meilleure comparaison des niveaux de fluorescence entre chaque échantillon. Elle est cependant fonction de  $F_0$ .

En présence de DCMU, la fluorescence  $F(t)$  s'élève rapidement à un maximum noté  $F_M$  (section 1.6.1). Ce type de mesure permet d'isoler le photosystème II d'où provient majoritairement la fluorescence à la température ambiante et permet d'évaluer de nouveaux paramètres associés à la photochimie du photosystème II soit:

1 ) Le temps moyen d'induction de fluorescence (Malkin et Kok 1966) et défini (en se basant sur les relations 1.7 et 1.8) comme:

$$\begin{aligned}
 T &= \int_0^{\infty} \frac{F_M - F(t)}{F_M - F_0} dt \\
 &= \int_0^{\infty} \frac{\Phi_P(t)}{\Phi_{P_0}} dt
 \end{aligned}
 \tag{1.12}$$

La valeur  $F_M$  correspond au niveau maximal des cinétiques de fluorescence en présence de DCMU. Ce niveau est atteint très rapidement et ne varie plus après quelques secondes d'illumination. Il demeure stable après cette période et est donc considéré comme une constante.

2 ) Le taux de transport d'électrons (ou taux de photoréduction en présence de DCMU) par le photosystème II et correspondant à la vitesse de photoréduction de l'accepteur  $Q_A$ . Ce taux est directement fonction de l'état physiologique des plantes et des algues (Samson *et al.* 1988, Mandori et Melis 1986). On définit ce taux par la relation:

$$\begin{aligned}
 K &= d/dt \ln [F_M - F(t)] \\
 &= d/dt \ln [I/c_1 \Phi_P(t)]
 \end{aligned}
 \tag{1.13}$$

Cette relation correspond au nombre de séparations de charges effectuées par unité de temps à une intensité donnée en supposant que pour chaque séparation de charges s'effectue la réduction d'une  $Q_A$  (figure 1.10).

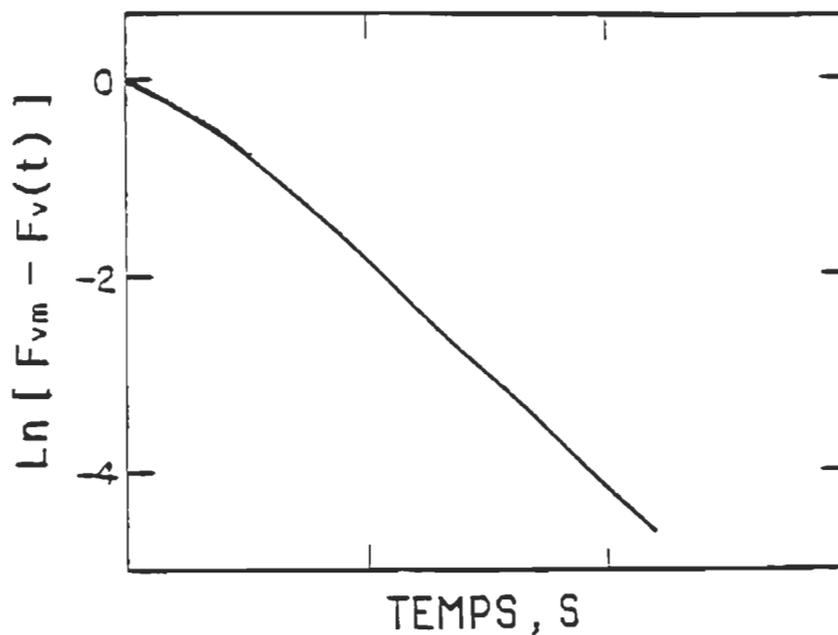


Figure 1.10 Evaluation du paramètre  $\text{Ln} (F_M - F(t))$  en fonction du temps. La pente de ce graphique correspond au taux de photoréduction ( $K$ ) de l'accepteur  $Q_A$ .

3 ) Le nombre et la nature des accepteurs (Lavorel *et al.* 1986, Malkin *et al.* 1981, Malkin et Kok 1966) photochimiquement actifs du photosystème II (en présence de DCMU) soit à une constante près:

$$n = I \Phi_{P_0} T = I \Phi_{P_0} \int_0^{\infty} \frac{F_M - F(t)}{F_M - F_0} dt$$

$$n = I \int_0^{\infty} \Phi_P(t) dt \quad 1.14$$

Etant donné que chaque séparation de charges correspond à la réduction d'une seule  $Q_A$ , cette relation nous indique le nombre de centres réactionnels du PSII.

De plus, l'intégrale correspondant à la surface complémentaire (noté A) au-dessus des courbes d'induction de fluorescence (figure 1.11) est étroitement liée à la nature des centres réactionnels, en particulier les centres PSII $\alpha$  et PSII $\beta$  situés dans les membranes granaires et stromatiques respectivement (Melis et Homann 1975). L'analyse semilogarithmique de l'accroissement de cette surface dans le temps nous permet d'isoler les phases correspondantes à chacun de ces centres réactionnels (Melis et Homann 1975, Owens 1986). Ce traitement donne aussi une évaluation de la vitesse de fermeture (état ouvert à état fermé) et de la contribution de chacun de ces centres à la fluorescence et à la photochimie du PSII.

4 ) Le rendement photochimique maximal (Malkin *et al.* 1981) ou l'efficacité des plantes à transformer l'énergie en réactions photochimiques et défini comme:

$$\begin{aligned}\Phi_M &= 1 - (F_0/F_M) \\ &= \Phi_{P_0}\end{aligned}\quad 1.15$$

Tous ces paramètres évalués à partir des cinétiques d'induction de fluorescence nous indiquent un bilan

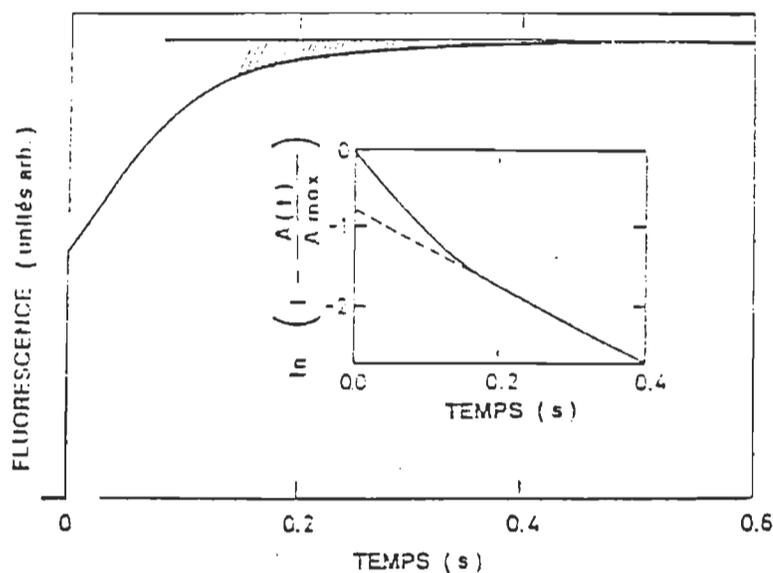


Figure 1.11 Représentation de l'aire complémentaire A au dessus des courbes d'induction de la fluorescence. L'analyse semilogarithmique de l'accroissement de cette surface (graphique intérieur) dans le temps est fonction du nombre et de la nature des centres réactionnels de type PSII $\alpha$  et PSII $\beta$ .

énergétique associé à l'état physiologique du spécimen.

Il est à noter que les paramètres exposés ici peuvent s'appliquer avec les cinétiques de fluorescence sans traitement avec l'herbicide DCMU. Cependant, afin de comparer les résultats obtenus avec le DCMU, le niveau  $F_D$  (évalué au niveau P sans DCMU) doit être égal au niveau  $F_M$  des cinétiques avec traitement au DCMU. La comparaison des différents paramètres sans et avec DCMU nous permet

d'étudier l'effet de la photochimie du PSI sur la photochimie du PSII puisque l'influence du PSI est présent en absence de DCMU.

Actuellement, il n'existe pas (selon les recherches bibliographiques effectuées) de système nous donnant un tel bilan énergétique de fluorescence du processus photosynthétique. Dans la plupart des laboratoires, ce bilan énergétique se fait manuellement et amène souvent plusieurs imprécisions dans l'évaluation des paramètres photosynthétiques. L'aire complémentaire et le taux de photoréduction sont sans doute les plus vulnérables. En fait, en présence de DCMU, il arrive fréquemment que la montée de fluorescence est si rapide qu'une évaluation manuelle de la pente initiale et de l'aire complémentaire rend difficiles et même indistinctes les différences entre deux mesures. Il devient donc important d'implanter des méthodes informatiques efficaces pour le calcul de ces paramètres.

Pour leur part, les cinétiques de dissipation thermique sont peu nombreuses bien qu'elles soient d'une grande importance pour évaluer les différentes contributions de la dissipation de l'énergie au bilan total. La méthode photoacoustique est sans contredit la plus utilisée pour les mesures non-radiatives (dissipations thermiques ou autres désactivations conduisant à une dissipation thermique) (Carpentier *et al.* 1989, Buschmann *et al.* 1984, Buschmann et Prehn 1981). Cependant, cette technique ne permet pas des mesures sur des

plantules entiers permettant des essais non destructifs des échantillons et rend difficiles les mesures avec des échantillons en suspension telles que les algues intactes dans leur milieu de croissance ou des solutions de fractions membranaires (Buschmann *et al.* 1984).

De plus, le spectre ou la cinétique observée sont perturbés par l'évolution du dégagement d'oxygène résultant de la modulation de la lumière d'excitation (Bults *et al.* 1982). Bien qu'il soit possible d'éliminer cet effet par l'utilisation d'une seconde lumière continue et saturante ou par augmentation de la fréquence de modulation de l'énergie d'excitation, il est avantageux de connaître le taux de dissipation thermique en lumière non-saturante comme dans le milieu naturel.

Cependant, la fréquence de modulation influence aussi la cinétique observée. Une diminution de la fréquence entraîne une augmentation de l'épaisseur de la couche cellulaire qui contribue au signal photoacoustique (Buschmann 1984). Selon la fréquence utilisée, la contribution au signal d'un des pigments sera visible ou inexistant. La fréquence de modulation devient donc un point critique et discutable mais apporte cependant des précisions quant à la localisation de l'émission ainsi que les paramètres optiques et thermiques de l'échantillon. Il devient donc important de développer une technique qui complète les mesures photoacoustiques en évitant les problèmes énoncés.

Actuellement, il n'existe que très peu de littérature reliant les deux principales formes de dissipation de l'énergie (outre la dissipation sous forme de réactions photochimiques) dans le domaine du temps (effet Kautsky) à l'état physiologique d'échantillons photosynthétiques *in vivo* ou *in vitro*. En fait, on suppose que (Papageorgiou 1975) la dissipation thermique provient des antennes et de la perte d'énergie aux centres réactionnels mais personne n'a encore été en mesure de confirmer de façon directe ces hypothèses, en particulier sur les niveaux O-I-D-P de l'effet Kautsky. Si la dissipation thermique est parallèle à la dissipation sous forme de fluorescence (figure 1.9), il est plausible de penser que pour un niveau  $F_0$  doit correspondre un niveau  $T_0$  (dissipation thermique constante) et que ce dernier devrait varier de la même façon, sous les mêmes conditions. De plus, aucune cinétique de la montée rapide (dans les premières secondes de l'illumination) de la dissipation thermique ne figure dans la littérature sur le sujet. Il est donc ici intéressant de vérifier si cette cinétique possède les mêmes caractéristiques que celles observées en fluorescence, et quelles en sont les relations.

Dans ces ordres d'idées, le travail présenté ici a pour premier but, de définir et caractériser les relations possibles qui existent entre les niveaux de cinétiques de dissipation thermique et de fluorescence en relation avec

les conditions expérimentales qui influencent l'état physiologique des plantes supérieures et des algues vertes. De plus, ce travail doit vérifier l'existence d'un parallélisme entre ces cinétiques en caractérisant les différents niveaux (O-I-D-P) et portions de la dissipation thermique ( $T_o$  et  $T_v$ ) en relation à celle obtenue en fluorescence ( $F_o$  et  $F_v$ ).

Le second but est de vérifier la dépendance entre la dissipation thermique et la fluorescence lorsque l'accepteur  $Q_A$  est partiellement réduit. Cette réduction partielle ainsi que le temps de recouvrement (ou de réoxydation) de cet accepteur me donnera (en relation avec la première étape) une indication du lieu principal de l'émission. Finalement, des inhibiteurs du transport d'électrons seront utilisés afin de mieux comprendre la distribution et l'utilisation de l'énergie selon la localisation de l'inhibition. Cette étape permettra de confirmer les résultats précédents.

Pour ces études, il est essentiel de développer un système d'évaluation de la cinétique de fluorescence et de la dissipation thermique. Il est à noter que ce système doit être conçu de façon à le rendre (dans le futur) portatif. Il se doit d'être le plus simple possible, mais le plus complet pour une utilisation générale en laboratoire ou (dans le futur) sur le terrain.

Parallèlement à ce système d'évaluation, il est essentiel de développer une nouvelle technique de séparation de la fluorescence constante  $F_0$  (ou thermique  $T_0$ ) et de la fluorescence variable  $F_v(t)$  (ou thermique  $T_v(t)$ ) afin idéalement d'unifier les résultats provenant des différents laboratoires. Cette technique devra être simple, précise et rapide pour une utilisation sur un micro-ordinateur. Cette technique devra être vérifiée afin d'en connaître ses limites.

Ce système d'évaluation devra aussi être supporté par un logiciel informatique d'acquisition et de traitement des données nous donnant un bilan (le plus complet possible) de l'état physiologique (paramètres photosynthétiques) à l'aide des cinétiques de fluorescence ou de dissipation thermique. De plus, ce logiciel devra inclure différentes options de réduction du bruit ou compensation du signal servant à l'amélioration du traitement des données.

A partir de ce système, il sera possible de démontrer quelques applications des cinétiques de fluorescence et des paramètres photosynthétiques à des études environnementales.

## CHAPITRE 2

### SYSTEME D'EVALUATION DE LA FLUORESCENCE ET DE LA DISSIPATION THERMIQUE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS.

#### 2.1 Introduction

Les variations dans les réponses spatiale et angulaire des spécimens biologiques sous illumination, se traduisent en général par des fluctuations dans les résultats. En fait, plus les variations des radiations arrivant au système de détection sont grandes et plus les fluctuations entre les résultats seront prononcées. Ces variations sont généralement dues à la forme de l'échantillon, à la répartition angulaire des radiations émises ou même aux variations de l'environnement de l'échantillon. La solution la plus avantageuse afin de résoudre ou de diminuer le problème est l'utilisation d'un système qui intègre le signal provenant de toutes les parties de l'échantillon diminuant ainsi les variations dues à sa forme ou à la répartition angulaire de l'émission du signal.

Un des grands avantages de l'utilisation d'une sphère intégrante est la détection du signal indépendamment de la direction ou de la localisation de l'émission à l'intérieur de la sphère. La conception d'un système d'évaluation de la fluorescence temporelle et de la dissipation thermique, nommé thermo-fluorimètre, basé sur l'utilisation d'une

sphère intégrante s'avère donc être tout désigné quand l'évaluation de ces formes dissipatives provenant de l'échantillon ne doit pas être fonction d'une surface spécifique mais bien provenant de la surface totale. Une sphère creuse (deux hémisphères), recouverte à l'intérieur d'une couche d'un produit hautement réfléchissant, est utilisée à cette fin. Un réflecteur placé à l'intérieur de la sphère est ajusté de manière à rendre aléatoire le parcours optique d'un photon arrivant ou émis dans la sphère, de telle sorte que ce dernier puisse provenir d'une position quelconque. Cette technique donne une meilleure reproductibilité des résultats puisque le signal est indépendant de la position exacte de l'échantillon à l'intérieur de la sphère. Cet avantage est convoité en photosynthèse puisque le signal mesuré est une moyenne de toutes les parties de l'échantillon, en particulier pour les essais non-destructifs sur des plantules entiers.

L'utilisation d'échantillons solides (plantules) et liquides (algues, chloroplaste) sont couramment utilisés en photosynthèse. Cependant, la majorité des systèmes de mesures ou d'évaluations sont orientés vers des échantillons soient solides ou liquides ne permettant pas une utilisation générale. Un système pouvant évaluer la fluorescence et le dégagement thermique de ces échantillons et non uniquement de plantules serait donc d'un grand atout. L'utilisation en photosynthèse d'agents chimiques tels que des agents

inhibiteurs, des donneurs et accepteurs d'électrons est devenue courante. L'addition de ces agents permet le contrôle de l'état d'oxydoréduction de la chaîne de transport d'électrons durant l'évaluation de la fluorescence et de la dissipation thermique (Lavorel *et al.* 1986). L'utilisation d'un système informatique est donc requis pour le calcul et la présentation complète du bilan énergétique (de la section 1.7) ou de différents traitements usuels tels que le lissage des résultats par utilisation de filtres numériques, la normalisation, etc. Aucun système regroupant ces avantages et ces possibilités n'est cité dans la littérature. Le présent chapitre expose pour la première fois un tel système qui regroupe les principales caractéristiques suivantes :

1) L'évaluation de la fluorescence et de la dissipation thermique d'échantillons *in vitro* et *in vivo* d'algues, de plantes supérieures ou de fractions membranaires sous différentes conditions expérimentales variant l'intensité de la lumière, la longueur d'onde de la lumière d'excitation, la température, l'humidité, la concentration d'éléments nutritifs, la concentration des polluants et herbicides.

2) Evaluations assistées par ordinateur et donnant un bilan général des différents traitements et paramètres photosynthétiques tels que:

- Evaluation des portions constantes et variables.

- Evaluation des niveaux maximaux et normalisés
- Normalisation des points et lissage des cinétiques
- Rendement photochimique maximal
- Taux de photoréduction
- Evaluation de la surface complémentaire
- Evaluation du nombre et de la nature des accepteurs secondaires du PSII

Il est aussi à noter que le système doit aussi être conçu de façon à le rendre, dans le futur, "portatif" (Morissette et al. 1988).

## 2.2 Description du thermo-fluorimètre

### 2.2.1 Description de la sphère intégrante

La figure 2.1 présente une coupe du thermo-fluorimètre actuel et de ses composantes. La sphère est composée de deux hémisphères creux pouvant être ouverts pour permettre l'installation d'un système de mesure ou d'évaluation quelconque à l'intérieur de la sphère. Celle-ci est construite de multiples couches de feuilles de fibres de verre totalisant une épaisseur d'environ 5 mm. Le diamètre interne de la sphère est d'environ 15 cm. Cette sphère, adaptée pour l'évaluation de la fluorescence et de la dissipation thermique, peut être divisée en deux

Légende de la Figure 2.1

- 1 : tresse de fibres optiques
- 2 : filtre infrarouge HAF-100 (compagnie Labsphère)
- 3 : canal de circulation d'air
- 4 : lentille de Fresnel (distance focale: 2.2 cm)
- 5 : obturateur électronique
- 6 : filtres d'excitation (CS 4-96 et/ou CS 3-71)
- 7 : cône de dispersion
- 8 : détecteur de fluorescence (Devar #539-01-5)
- 9 : filtres pour la fluorescence (CS 4-96 et CS 7-59)
- 10 : détecteur thermique (P394R, compagnie Hamamatsu)
- 11 : filtre de transmission infrarouge RG780
- 12 : ouverture pour échantillons solides (plantules)
- 13 : éprouvette pour les mesures en solution
- 14 : ouverture pour échantillons liquides
- 15 : bouchon scellant
- 16 : ouverture pour essais par fumigation

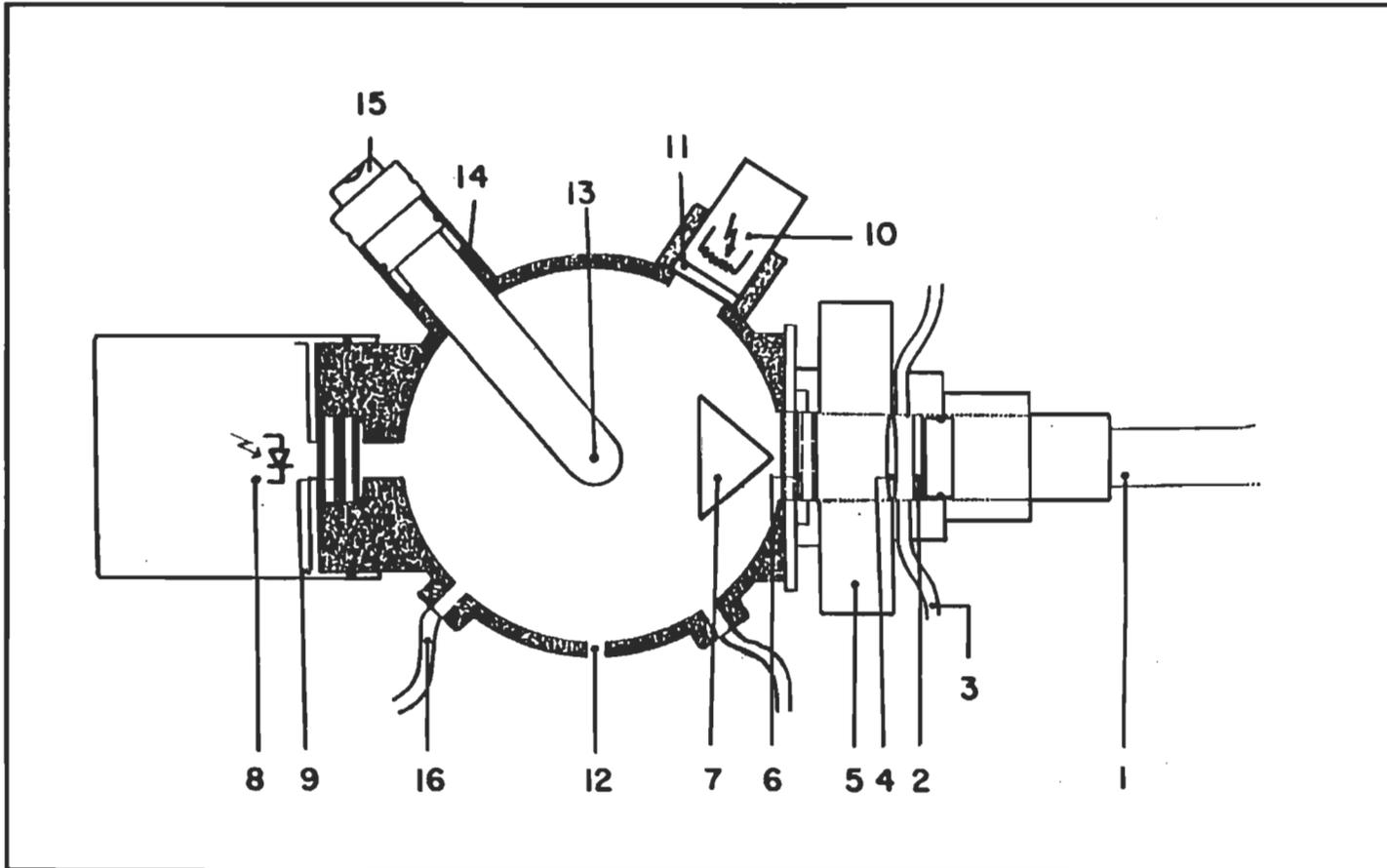


Figure 2.1 Coupe du thermo-fluorimètre et de ses composantes. Pour la légende, voir la page précédente.

parties distinctes; la première étant l'excitation et la seconde, la détection. La partie d'excitation est composée d'une tresse de fibres optiques (1) de 20 mm de diamètre et 60 cm de longueur et possédant une transmission de 60%. Cette tresse canalise une lumière polychromatique (blanche) jusqu'à un filtre infrarouge (HAF-100, Labsphère) (2) dont le spectre de transmission est présenté à la figure 2.2. A ce niveau, une circulation permanente d'air (3) aide à diminuer l'effet des radiations infrarouges, en particulier sur les parois des filtres optiques. Afin de minimiser les pertes de la lumière qui entre dans la sphère, une lentille de Fresnel (4) de 2.2 cm de distance focale est placée entre le canal de circulation d'air et l'obturateur électronique (5) (Uniblitz, modèle #225L) qui contrôle l'entrée du faisceau de lumière à l'intérieur de la sphère. La lumière est alors filtrée à l'aide de 2 filtres optiques de couleur (6) avant d'atteindre l'intérieur de la sphère. Tous les filtres peuvent être changés afin de varier la longueur d'onde d'excitation des échantillons. Les longueurs d'ondes habituellement utilisées sont dans la région du bleu et du vert. Une lumière bleue est obtenue par l'utilisation de deux filtres de type Corning CS 4-96 dont le spectre de transmission est illustré à la figure 2.3. La lumière verte est obtenue par superposition du filtre bleu (CS 4-96) et d'un filtre jaune de type CS 3-71 (figure 2.3).

La surface interne de la sphère est totalement recouverte de sulfate de baryum (White reflectance coating, Kodak Chemical

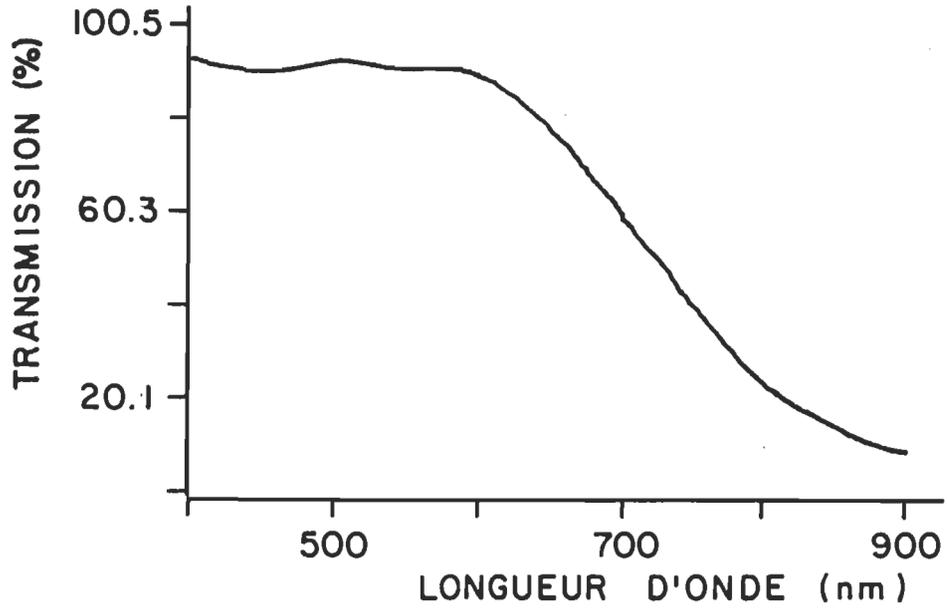


Figure 2.2 Spectre de transmission du filtre d'absorption infrarouge HAF-100 (compagnie Labsphère).

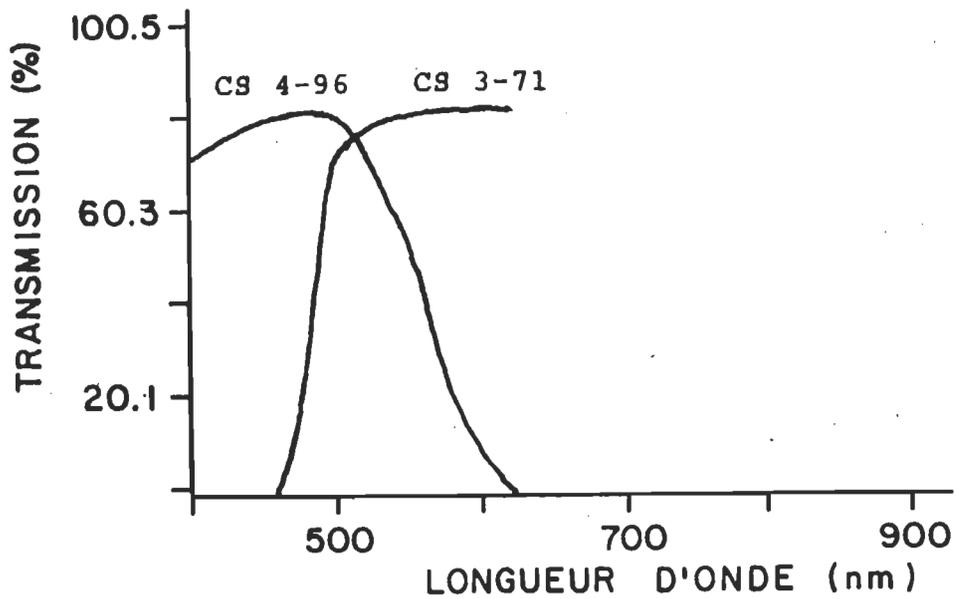


Figure 2.3 Spectre de transmission des filtres d'excitation CS 4-96 et CS 3.71.

No 6080), une substance neutre hautement réfléchissante entre 200 et 2000 nm. Son spectre de réflexion est présenté à la figure 2.4. Cette substance rugueuse permet une réflexion presque parfaite d'un photon arrivant sur la surface interne de la sphère. La rugosité du produit permet aussi une réflexion aléatoire du photon, de telle sorte que l'effet global est d'uniformiser l'intensité de la lumière d'excitation à l'intérieur de la sphère.

Afin d'éviter une illumination directe de l'échantillon et augmenter le parcours aléatoire des photons, un cône de dispersion (7) est installé à l'entrée de l'ouverture interne de la sphère.

L'évaluation de la fluorescence (8,9) et de la dissipation thermique (10,11) sont faites à l'aide de détecteurs optiques de haute sensibilité et feront l'objet des sections 2.2.3 et 2.2.4 de ce chapitre. Dans le cas de mesures utilisant des plantules (pour des essais non destructifs), une ouverture de 3 mm à la base de la sphère (12) est utilisée pour laisser passer la tige du plantule qui ne devrait pas dépasser 15 cm de hauteur correspondant au diamètre interne de la sphère. Les échantillons liquides comme une suspension d'algues, de chloroplastes, de thylacoïdes ou une solution de membranes enrichies en PSII, sont déposées dans une éprouvette (13) de verre ou de quartz qui est placée à l'intérieur de la sphère utilisant l'ouverture à échantillons liquides (14). Cette ouverture est scellée à l'aide d'un bouchon de caoutchouc (15) de type

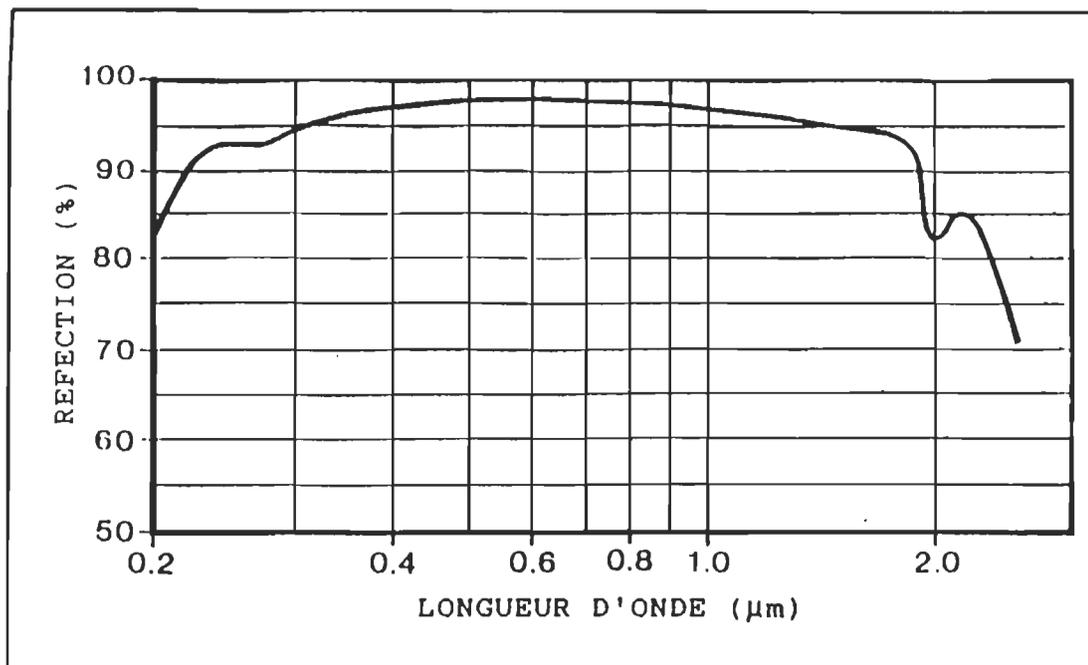


Figure 2.4 Spectre de réflexion du sulfate de baryum (Kodak #6080) recouvrant la surface interne du thermofluorimètre.

"Venoject" (Kimble Terumo Company). Ce bouchon permet le passage de l'aiguille d'une seringue contenant différents agents chimiques. Dans le cas de plantules, des études environnementales par fumigation sont possibles par l'utilisation des ouvertures à gaz (16). Il est donc possible d'injecter à l'intérieur de la sphère, un gaz et d'étudier l'effet de ce dernier sur la photosynthèse au cours du temps.

### 2.2.2 Le système de contrôle et d'évaluation

La figure 2.5 présente le dispositif de contrôle et d'évaluation du thermo-fluorimètre. Il est à noter dans ce montage que tous les connecteurs et câbles électriques reliant les instruments sont blindés afin de minimiser le bruit de lignes (60Hz). La durée de l'excitation des échantillons peut varier de quelques millisecondes (20 ms) à plusieurs minutes. Ce temps est ajusté à l'aide d'un contrôleur électronique d'obturateur (Uniblitz, #SD-1000) (1). Ce contrôleur déclenche l'ouverture de l'obturateur électronique (2) en 2,5 ms laissant ainsi passer la lumière canalisée par la tresse de fibres optiques (3) reliée à un illuminateur (4) à double faisceaux (Labsphere, QH 300). Afin d'éliminer le signal alternatif (60 Hz) provenant des deux lampes tungstènes halogènes de 21 V, 150 W chacune, les transformateurs d'alimentation des lampes ont été enlevés et remplacés par un bloc d'alimentation variable (5) en courant continu (Kepco ATE 3615M) permettant la stabilité requise pour l'évaluation en continue (sans modulation) de la fluorescence et de la dissipation thermique des échantillons. Cette alimentation variable permet une illumination de 0 à plus de 35 W/m<sup>2</sup> à la surface interne de la sphère.

L'ouverture de l'obturateur par le contrôleur déclenche simultanément, par impulsion électrique, l'acquisition des données à l'aide d'un oscilloscope numérique (Scope 85, Northwest Instrument System) à l'intérieur d'un ordinateur APPLE IIe (6). Etant donné qu'aucune entrée de

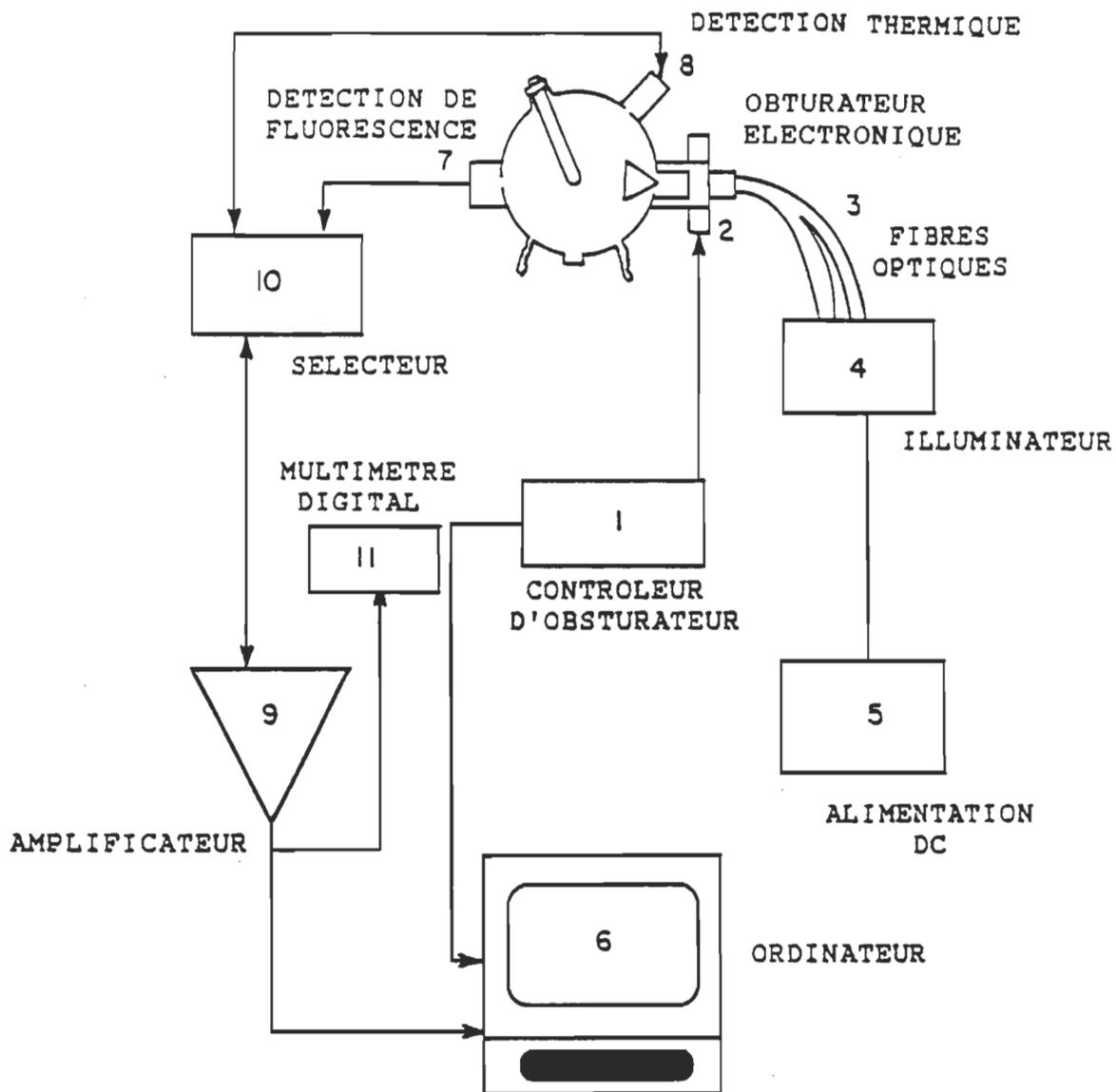


Figure 2.5 Dispositif de contrôle et de mesure du thermo-fluorimètre

synchronisation n'est disponible sur ce type d'oscilloscope, le canal 2 de ce dernier est utilisé pour déclencher l'acquisition, sur le canal 1.

Le signal électrique provenant du système de détection de fluorescence (7) et de dissipation thermique (8) est amplifié (9) et filtré à l'aide d'un amplificateur universel (Gould, #1125S) relié au canal 1 de l'oscilloscope.

L'évaluation de la fluorescence ou de la dissipation thermique est choisie par un sélecteur (10) relié aux deux systèmes de détection et à l'amplificateur universel. Les données acquises par l'oscilloscope sont enregistrées sur disquette pour leur analyse future. Afin de permettre une lecture directe des niveaux de tension provenant de l'amplificateur avant la prise des mesures (pour la calibration) et lors de l'acquisition des données, un multimètre (11) numérique (Radio Shack, #QH120) est relié en permanence à la sortie de l'amplificateur universel. Ceci permet l'ajustement des différents niveaux de base ou de référence requis lors des mesures.

### 2.2.3 L'évaluation de la fluorescence

Le système de détection de la fluorescence (#7, figure 2.5) est composé de filtres optiques de couleurs et d'un détecteur optique jumelé à un préamplificateur de signal. Le détecteur (Devar, # 539-01-5) utilisé ici est un détecteur à semiconducteur (photodiode) à base de silicium jumelé à un

préamplificateur intégré dans le boîtier du détecteur. La réponse spectrale de ce type de détecteur est présentée à la figure 2.6. Sa détectivité maximale se situe à 950 nm. La sensibilité du détecteur est d'au moins  $10^{-10}$  W avec un bruit équivalent (NEP) d'environ  $10^{-12}$  W pour une bande passante de 1 Hz. Le temps de réponse à la détection est de quelques nanosecondes, ce qui est largement suffisant pour le type d'évaluations recherché ici.

Ce détecteur convertit les radiations incidentes à sa surface en un signal électrique proportionnel à l'intensité des radiations. Ce signal étant très faible, il est indispensable de le préamplifier avant d'être reçu par l'amplificateur universel. Cette préamplification diminue la possibilité d'un bruit de ligne (en général du 60 Hz) et permet une adaptation d'impédance entre le détecteur et l'amplificateur.

Le système de préamplification du signal est illustré à la figure 2.7. Il comprend un amplificateur à conversion courant-tension et un amplificateur d'isolation. Le signal de sortie est un signal négatif proportionnel à l'intensité lumineuse. Etant donné qu'il existe un niveau de tension constant à la jonction du détecteur et ce, même en absence de lumière, un signal négatif sera toujours présent à la sortie du système de détection. Afin d'éliminer ce niveau parasite à la mesure, un signal inverse et de même amplitude est ajusté au moyen de l'amplificateur universel pour donner une ligne de base de 0 volt lorsqu'il n'y a aucune lumière à

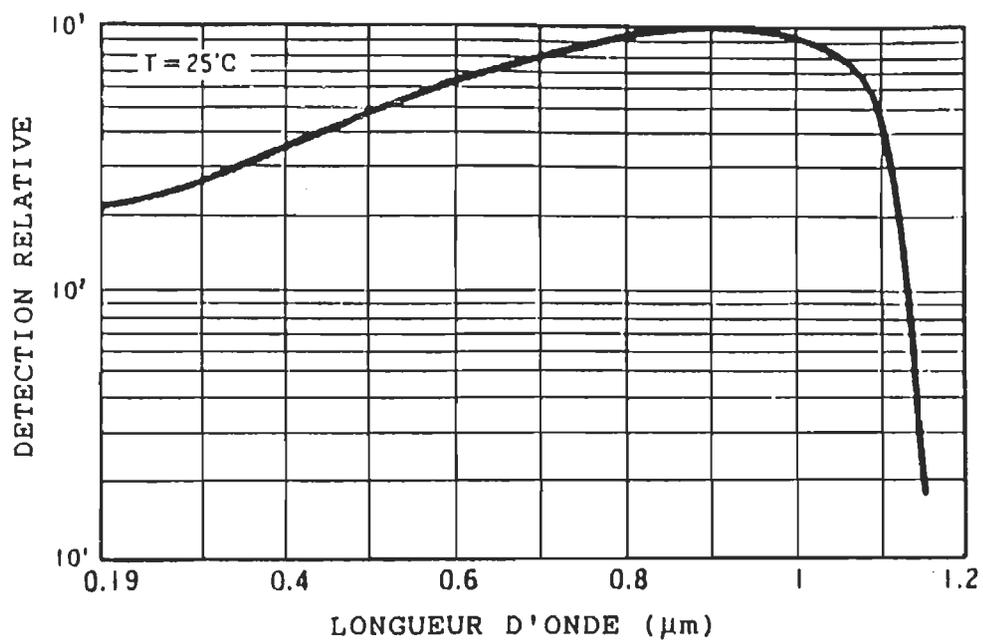


Figure 2.6 Réponse spectrale du détecteur Devar #539-01-5 utilisé pour l'évaluation de la fluorescence.

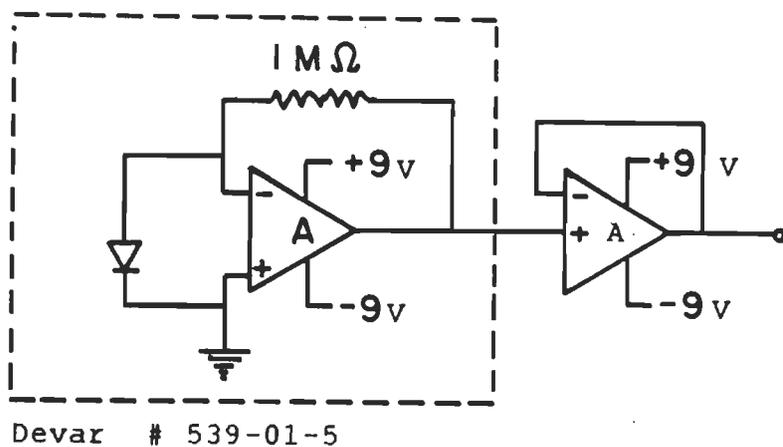


Figure 2.7 Circuit de préamplification du détecteur utilisé pour l'évaluation de la fluorescence.

l'intérieur de la sphère. L'alimentation du système de détection se fait à partir de 2 piles de 9 volts. Ces piles permettent une meilleure stabilité dans le signal de sortie du détecteur ainsi qu'un meilleur rapport signal sur bruit. Le système de détection ayant une réponse de 0 à 10 KHz, les différents signaux mesurés ne sont pas influencés par ce type d'appareillage.

Afin d'évaluer la fluorescence de l'échantillon et de diminuer l'effet de la lumière d'excitation, une combinaison de deux filtres optiques de couleurs (#9, figure 2.1) est placée entre le détecteur et l'ouverture pour l'évaluation de la fluorescence et est située à l'opposé de l'ouverture du faisceau d'excitation. Ces filtres peuvent être changés permettant l'étude de la fluorescence à une longueur d'onde ou une région plus restreinte. Les filtres actuels sont de type Corning CS 2-64 et CS 7-59 dont la transmission lumineuse est présentée à la figure 2.8. Le spectre de fluorescence de la chlorophylle a à la température de la pièce (20-25°C) est aussi présenté sur cette figure. La région hachurée correspond à la région d'évaluation de la fluorescence.

Cette évaluation se fait en deux étapes, la première en quelques millisecondes (20 ms) suivie par une seconde acquisition de 20 ms ou plus (pouvant aller à plusieurs minutes). La première acquisition se fait à une fréquence de 12800 Hz et correspond à 256 points d'acquisition. Cette première acquisition est utilisée à l'évaluation de la

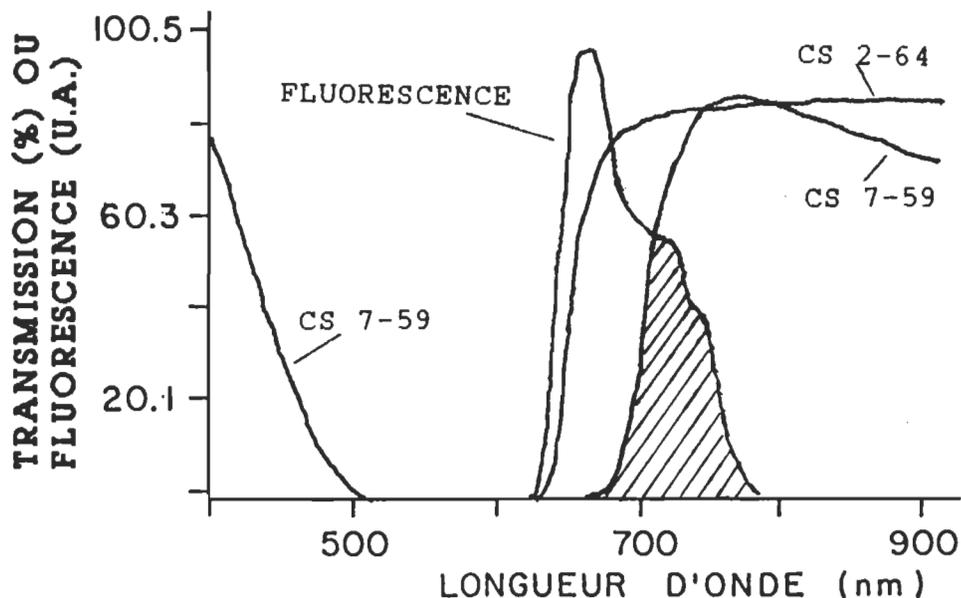


Figure 2.8 Spectres de transmission des filtres CS 2-64 et CS 7-59 utilisés pour l'évaluation de la fluorescence. La région hachurée présente la portion mesurée de la fluorescence à la température ambiante (tiré de Toivonen et Vidaver 1984).

fluorescence constante  $F_0$  dont l'analyse fera l'objet d'une discussion détaillée au chapitre 3. La seconde acquisition s'effectue sur une plus grande échelle de temps mais à une fréquence donnant toujours 256 points d'acquisition correspondant à la capacité de balayage d'un canal de l'oscilloscope numérique. Cette acquisition servira de complément à la première pour la visualisation de la cinétique de fluorescence et l'évaluation des différents paramètres photosynthétiques. Chaque point acquis possède

une précision d'une partie sur 128 quelque soit l'échelle de mesure utilisée sur l'oscilloscope. Lors de la mesure, le niveau  $F_p$  des cinétiques de fluorescence d'un échantillon sans traitement est ajusté pour atteindre le centième point (environ) sur les 128 possibles. Toutes les mesures avec traitement sont relatives par rapport à celles obtenues sans traitement. Le programme d'acquisition des données et de contrôle de l'oscilloscope numérique est donné à l'annexe 1 de ce travail.

#### 2.2.4 L'évaluation de la dissipation thermique

Le système de détection de la dissipation thermique (#8, figure 2.5) comprend un filtre optique (RG780) laissant passer les radiations infrarouges, un détecteur infrarouge (P394R) et un système de polarisation du détecteur. Pour une utilisation d'un système (dans le futur) portatif, le détecteur devait posséder les caractéristiques suivantes:

- 1 ) Fonctionnement à la température ambiante (20 à 25° C).
- 2 ) Bonne sensibilité.
- 3 ) Temps de réponse permettant des évaluations comparables à celles obtenues en fluorescence soit au minimum de 20 ms.
- 4 ) Fonctionnement en mode continu, c'est-à-dire sans modulation du faisceau incident au détecteur.

La seule famille de détecteurs possédant les caractéristiques requises sont à base de plomb, soit de types PbS et PbSe. Ces détecteurs sont des photoconducteurs, en particulier des photorésistances qui donnent un signal proportionnel à l'intensité des radiations incidentes. Le détecteur choisi est le P394R de la compagnie Hamamatsu dont la réponse spectrale efficace se situe entre 1000 et 3000 nm avec un maximum de sensibilité à 2500 nm (figure 2.9). Cette sensibilité est de l'ordre de  $10^{-11}$  W/cm(Hz)<sup>1/2</sup> avec un bruit équivalent d'environ  $10^{-9}$  W/Hz<sup>1/2</sup>. Il est à remarquer que la sensibilité et le bruit de ces détecteurs sont fonction de la bande passante (en Hz). Plus cette bande est large et plus le bruit sera grand. En mode continu (sans modulation), la sensibilité du détecteur est diminuée par un facteur entre 10 et 100 (selon les spécifications de la compagnie). Le rapport signal sur bruit est alors entre 5 et 10 au minimum.

Ce type de détecteur requiert un niveau de polarisation de très haute stabilité. La figure 2.10 présente la polarisation actuelle du détecteur. Ce niveau de polarisation est fourni à partir de la sortie de polarisation pour capteur sur l'amplificateur universel. Afin d'évaluer uniquement l'intensité des radiations infrarouges de plus de 800 nm, un filtre optique infrarouge (RG780) est inséré entre l'intérieur de la sphère et le détecteur thermique. La transmission optique de ce détecteur est présentée à la figure 2.11.

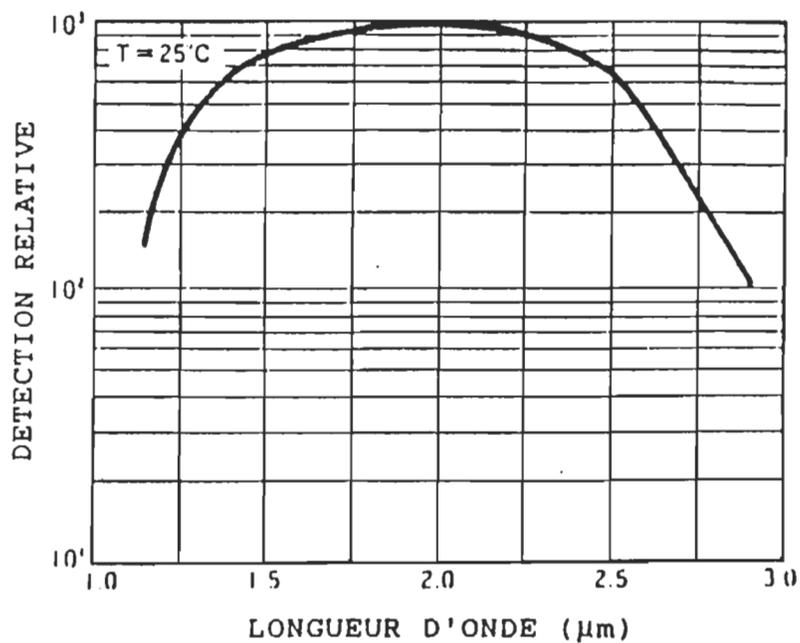


Figure 2.9 Réponse spectrale du détecteur Hamamatsu P394R utilisé pour l'évaluation de la dissipation thermique.

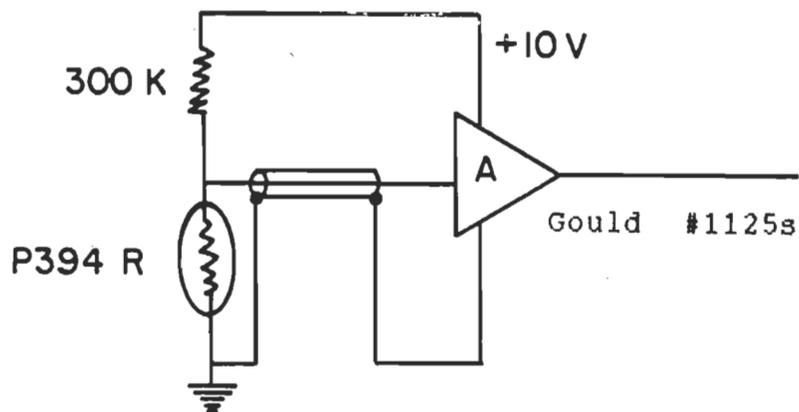


Figure 2.10 Circuit de polarisation du détecteur servant à l'évaluation de la dissipation thermique.

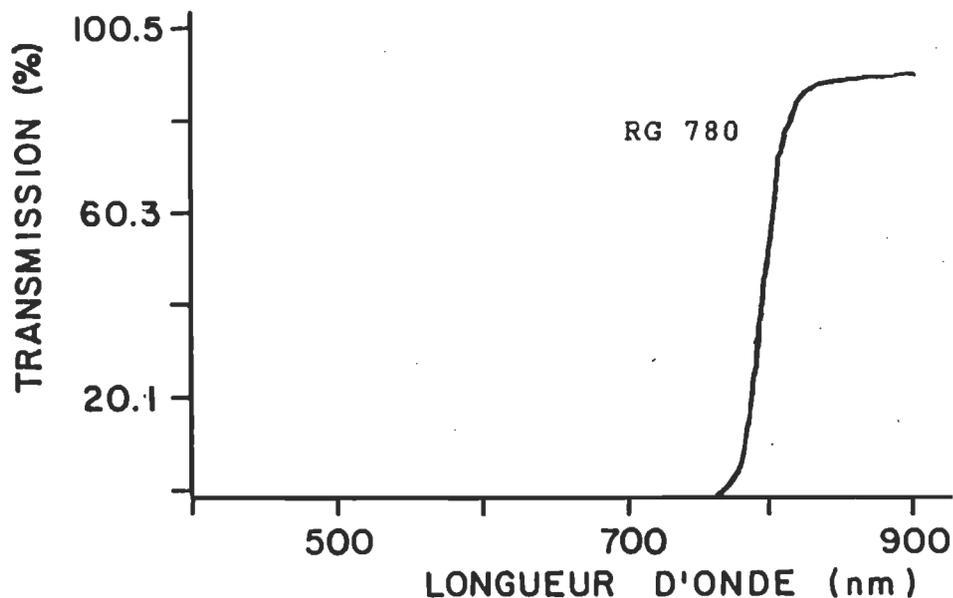


Figure 2.11 Spectre de transmission du filtre infrarouge RG780 utilisé pour l'évaluation de la dissipation thermique.

L'évaluation de la dissipation thermique se fait généralement en deux étapes comme celle de la fluorescence, c'est-à-dire une mesure sur 20 ms pour l'évaluation d'une dissipation thermique constante, suivie d'une mesure sur une plus grande échelle de temps pour l'évaluation des différents paramètres photosynthétiques. La précision sur chacun des points mesurés est équivalente à celle de la fluorescence.

Afin de s'assurer que le système de détection était sensible à la variation thermique, des échantillons d'eau distillée et déminéralisée, comme témoins non-fluorescents (vérifiés à

l'aide du fluorimètre intégral), à différentes températures furent utilisés. En présence d'eau chaude (25°C), le signal provenant du système d'amplification augmentait considérablement par rapport au témoin (à une température de 20°C). En présence d'eau froide (15°C), le signal diminuait du même écart qu'en présence d'eau chaude. Cette expérience simple démontre donc la fiabilité du système de détection pour la mesure en infrarouge.

Il est à noter que plusieurs problèmes sont présents en spectroscopie infrarouge temporelle. Le premier est dû à ce que les mesures sont faites à la température ambiante. En fait, à cette température, toutes les surfaces émettent des radiations infrarouges, de telle sorte que le signal du détecteur, même en absence de lumière, a tendance à dériver dans le temps. Ce problème peut être résolu partiellement par un circuit électronique qui maintient un niveau continu de la ligne de base pendant la mesure. Cependant, cette ligne de base est maintenue constante par l'utilisation d'une capacité qui agit comme filtre passe haut, c'est-à-dire qui élimine les variations lentes du signal. Cette façon de procéder limite l'acquisition à quelques secondes (environ 3 s pour la majorité des dispositifs), ce qui est trop court pour nos évaluations de dissipation thermique. De plus, les variations lentes du signal de fluorescence seront éliminées par la capacité du filtre, ce qui modifie les mesures et les évaluations. La solution la plus simple mais efficace quelque soit le temps d'acquisition est la

compensation informatique du signal, c'est-à-dire la soustraction de la dérive, du signal acquis (Figure 2.12). Cette procédure est couramment utilisée en spectroscopie infrarouge. Elle consiste premièrement à faire l'acquisition de la dérive temporelle du signal (Figure 2.12, courbe a) et de soustraire cette dérive du signal provenant de l'échantillon (Figure 2.12, courbe b). Le résultat sera donc le signal désiré sans la dérive (Figure 2.12, courbe c). Ceci suppose que la dérive subie la même variation en absence et en présence de l'échantillon.

Le second problème est la présence d'eau dans les échantillons. Ce problème est d'envergure en photosynthèse puisque tous les échantillons possèdent une grande quantité d'eau. De plus, la dissipation thermique provenant des réactions photochimiques de la photosynthèse, peut être absorbée par l'eau du milieu de culture dans le cas d'algues microscopiques. L'eau absorbe les radiations principalement à 2900 nm se situant exactement dans la région efficace du détecteur. Cependant, l'absorption due à la présence d'eau est constante dans les mêmes conditions de mesures. Donc la présence d'eau ne fera que diminuer l'amplitude des cinétiques observées mais préservera la forme et les caractéristiques en présence d'agents inhibiteurs. Les mesures n'étant que relatives, les résultats obtenus seront valables à une constante près.

Un autre problème rejoint les deux précédents, par le fait

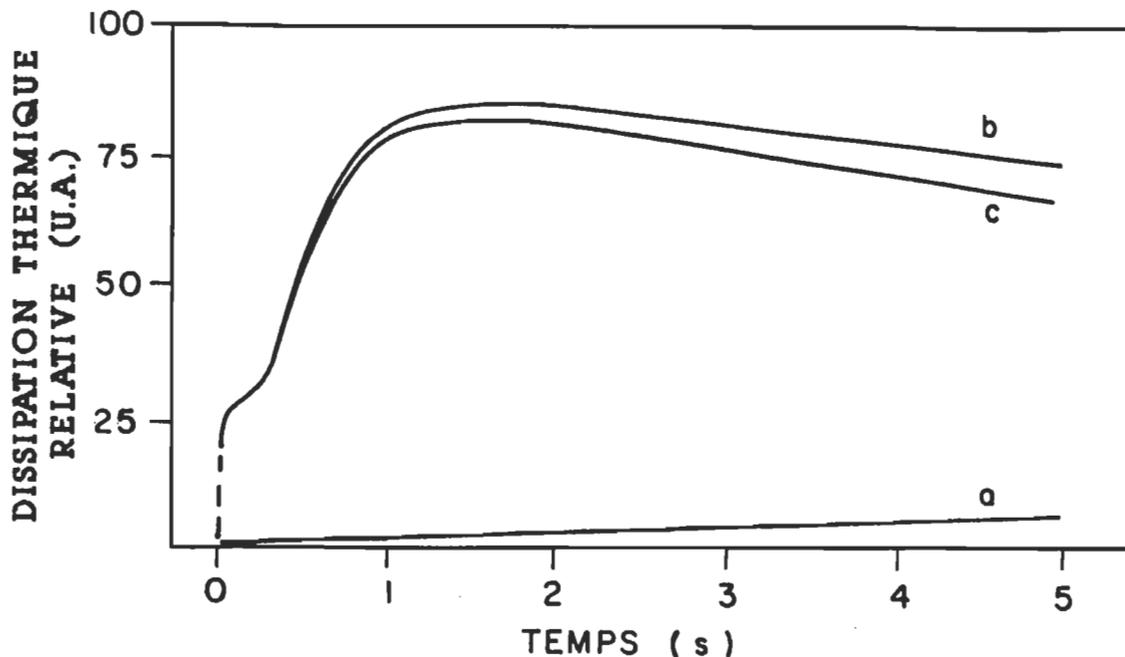


Figure 2.12 Procédure de compensation de la dérive du signal de dissipation thermique. a: dérive du signal; b: cinétique acquise; c: cinétique sans l'effet de la dérive ( $c = a - b$ ).

que la couche de sulfate de baryum et les filtres optiques ne sont pas parfaits. Lors de l'illumination, un niveau de fond (dû aux radiations infrarouges) important est généré à l'intérieur de la sphère. Ce niveau provient de la réémission des radiations par la surface interne et les filtres optiques. Ce signal diminue en présence d'eau et varie en fonction de sa température. Il est donc ici important de calibrer correctement le système avant de prendre les mesures afin de compenser l'effet de l'absorption de l'eau.

Cette calibration se fait en présence d'une quantité définie d'eau à une température donnée. Cette température est celle du spécimen étudié. Dans le cas de plantules, la température est généralement entre 20 et 25°C et dans le cas d'algues microscopiques, entre 18 et 20°C correspondant au milieu de croissance des algues. La quantité d'eau utilisée lors de la calibration correspond, pour les algues, à celle de l'échantillon. Pour les plantules, une quantité d'environ 5 ml est suffisante. Dans ce cas, la quantité d'eau du plantule est négligeable par rapport à la calibration. L'eau du plantule n'a donc pas un effet important sur cette mesure.

La mesure se fait en deux étapes, la première étant la calibration et la seconde, la mesure avec l'échantillon. On illumine premièrement l'intérieur de la sphère pour obtenir le niveau de base en présence de l'eau de référence. Cette ligne de base est ramenée à 0 volt par l'amplificateur universel. Après fermeture de l'obturateur, le niveau obtenu au multimètre numérique devient le niveau de la référence pour la mesure. Il suffit maintenant de placer l'échantillon à l'intérieur de la sphère et de prendre la mesure comme en fluorescence, en prenant soin d'ajuster la ligne de base (avant la mesure) au même niveau lu au multimètre numérique après fermeture de l'obturateur électronique lors de la calibration. L'ajustement du niveau  $F_p$  est obtenu de la même façon que pour les mesures de fluorescence. Toutes les

mesures sont relatives par rapport à l'échantillon sans traitement.

Il est à noter que cette calibration doit se faire à plusieurs reprises puisque la ligne de base dérive dans le temps. De plus, pour la mesure avec un plantule, l'eau de référence est en permanence dans la sphère. Pour des temps d'acquisition de plus de 2 s, la dérive du signal devient importante et doit être enlevée du signal acquis. Dans le cas de temps de mesure inférieur à 2 s, la dérive est généralement négligeable par rapport au signal et n'intervient pas lors de l'analyse. Cette limite est cependant relative puisque la dérive est fonction de l'environnement (température) immédiat du détecteur. Il est donc probable à certaines occasions que la dérive (pour des acquisitions inférieures à 2 s) soit à considérer.

### 2.3 L'analyse des données par le logiciel de traitement

Après la prise des mesures, les données sont traitées avant d'établir le bilan énergétique général des échantillons étudiés. Ce bilan est établi en se basant sur les différents paramètres présentés dans la section 1.7 de ce travail. C'est par l'utilisation d'un logiciel de traitement qu'il est possible d'analyser les données et d'évaluer ces paramètres. Ce logiciel a été développé pour le thermo-fluorimètre actuel et peut être utilisé pour les données de fluorescence ou de dissipation thermique. Ce logiciel donné

en annexe 2 est écrit en langage BASIC et fonctionne sur le APPLE IIe. Les différents paramètres et traitements possibles (Morissette *et al.* 1988) sont disponibles sous forme d'un menu. La première partie du menu est sous la forme suivante:

\*\*\*\*\*

MENU PRINCIPAL

\*\*\*\*\*

Choisir une option

- <1> Lecture des données
- <2> Calcul des niveaux  $F_0$
- <3>  $F(t)-F_0$
- <4> Lissage des courbes
- <5> Paramètres calculés
- <6> Graphiques
- <7> Max. et surface vivo
- <8> Moins dérive
- <0> autres

Choix ? \_

Cette section du menu est d'ordre général. Elle est utilisée pour des pré-traitements des cinétiques acquises, c'est-à-dire soustraction de la dérive, lissage, impression

graphique ou autres. Elle comprend aussi les sous-programmes utilisés pour l'évaluation des paramètres photosynthétiques en absence de DCMU (voir section 1.7).

L'option <1> fait la lecture des données acquises et les enregistre sur disquette. Toutes les données (sauf celles provenant de la dérive du signal thermique) doivent être lues par cette option avant qu'une analyse quelconque soit faite. Cette option ajuste automatiquement le niveau de base des cinétiques. En fait, si l'utilisateur n'a pas ajusté convenablement la ligne de base lors des mesures, cette option compensera le signal pour obtenir une ligne de base de 0 volt.

L'option <2> évalue les niveaux constants  $F_0$  et  $T_0$  des cinétiques obtenues sur 20 ms (Morissette et Popovic 1987) et lues par l'option <1>. Cette évaluation étant un des buts de ce travail, elle fera l'objet d'une analyse détaillée au chapitre 3.

L'option <3> sépare la portion variable des cinétiques acquises, par la soustraction de la portion constante  $F_0$ . Cette soustraction est basée sur la relation 1.10. Dans le cas où l'utilisateur n'a pas évalué la portion constante à l'option <2>, son niveau est demandé pour procéder à la séparation.

L'option <4> diminue le bruit des cinétiques par un lissage à point flottant utilisant la méthode de convolution. Le lissage est rendu optimum par la méthode des moindres carrés pondérés, c'est-à-dire en donnant un poids statistique sur chaque point convolué (Savitzky et Golay 1964). La largeur de la bande de convolution est de 5 ou 9 points (2 ou 4 points de chaque côté du point lissé). Cette technique est particulièrement utilisée en spectroscopie (à cause de son efficacité et de sa rapidité d'exécution) et diminue le bruit sur les données par plus de 50% (Savitzky et Golay 1964).

L'option <5> donne le résumé du bilan global obtenu par les différentes options du logiciel. Cette option peut être demandée en tout temps lors de l'analyse et donne le résumé de toutes les étapes faites par l'utilisateur et des résultats obtenus.

L'option <6> trace à l'écran ou sur imprimante les différentes cinétiques des fichiers de données. Si l'utilisateur a utilisé au préalable l'option <3>, les sorties résultantes seront les composantes variables des cinétiques.

L'option <7> évalue le maximum ( $F_p$  ou  $F_M$  et  $T_p$  ou  $T_M$ ) et l'aire complémentaire au-dessus des cinétiques non-traitées au DCMU ou autres agents isolant le photosystème II. Cette aire complémentaire correspond géométriquement à la surface

au-dessus de la courbe de fluorescence entre les niveaux O et P délimités par l'axe vertical au temps  $t=0$  et l'axe horizontal correspondant au niveau  $F_P$  ( $T_P$ ) ou  $F_M$  ( $T_M$ ). Cette surface serait un indicateur fiable de la phytotoxicité d'une vaste gamme de polluants (Samson 1989, Samson et Popovic 1988, Samson *et al.* 1988, Beauregard 1988) puisqu'elle est proportionnelle à la capacité photochimique du PSII (Lavorel *et al.* 1986, Malkin *et al.* 1981, Melis et Schreiber 1979). Les niveaux O ont été évalués à l'option <2> ou introduits directement à cette étape.

La dernière option <8> de cette partie du menu est utilisée uniquement avec les évaluations de la dissipation thermique. Cette option soustrait la dérive thermique (lue à partir de cette option) des fichiers lus à l'option <1>. De façon générale, cette option est utilisée immédiatement après l'option de lecture des données thermiques.

La seconde partie du menu est affiché par la demande de l'option <0> et apparait comme suit:

- <10> Soustraction du  $F_0$  avec DCMU
- <11> Max. et surface DCMU
- <12> Norm. et Mult. DCMU
- <13> Calcul du Ln ( $F_{VM}-F_t$ )
- <14> RC Alpha et Beta

- <15> RC Alpha
- <16> Delta A Vs F(t) DCMU

Choix ? \_

Cette seconde partie du menu est utilisée pour l'évaluation des différents paramètres photosynthétiques avec traitement au DCMU ou autres composés isolant le photosystème II.

L'option <10> est, comme dans le menu précédent, la première étape d'un traitement. Elle consiste simplement à la soustraction de la portion constante  $F_0$  ou  $T_0$  des cinétiques avec DCMU. Cette étape est très importante puisque cette soustraction sépare la composante variable des cinétiques. L'utilisateur doit donc passer par cette option avant l'évaluation de toute autre option de cette seconde partie du menu.

L'option <11> calcule le maximum et la surface des cinétiques avec traitement au DCMU basée sur la relation 1.14. Cette surface correspond géométriquement à l'aire complémentaire au-dessus des cinétiques entre les niveaux  $F_0$  ( $T_0$ ) et  $F_{MAX}$  ( $T_{MAX}$ ) délimités sur l'axe vertical au temps  $t=0$  et l'axe horizontal correspondant au maximum de la cinétique. Ce maximum est évalué par balayage et lissage pondéré utilisant la méthode de l'option <4>.

L'option <12> fait la normalisation des cinétiques par rapport au niveau  $F_D$  d'une cinétique de base (sans traitement) ou d'un niveau  $F_D$  (maximum de 128) fixé par l'utilisateur. Ce type de traitement est quelquefois utile pour des comparaisons visuelles des niveaux de fluorescence (Griffith *et al.* 1984) ou de dissipation thermique et est utilisé conjointement à l'option d'impression (graphique) des cinétiques.

L'option <13> évalue le taux de photoréduction des accepteurs primaires d'électrons du photosystème II et est basée sur la relation 1.13. Ce taux correspond à la charge de travail maximal pouvant être supportée par le photosystème II en nombre de photons utilisés par unité de temps (Samson *et al.* 1988, Mandori et Melis 1986). En émettant l'hypothèse qu'un seul photon entraîne la réduction d'un accepteur d'électrons, ce taux correspond au nombre de séparation de charges par unité de temps en lumière continue. Cette option possède son propre sous-programme d'impression graphique.

Les options <14> et <15> sont utilisées conjointement pour l'évaluation de l'hétérogénéité des centres réactionnels du photosystème II (Samson 1989, Beauregard 1988, Melis et Homann 1975). Cette hétérogénéité est évaluée par l'analyse de l'accroissement de la surface complémentaire. Elle permet l'évaluation de la proportion des centres réactionnels de

type PSII $\alpha$  et PSII $\beta$  correspondant à la variation des dimensions des complexes capteurs de lumière entre ces deux types de centres réactionnels. L'option <14> évalue le logarithme de l'accroissement de la surface complémentaire permettant le calcul du taux d'énergie d'excitation (vitesse de fermeture) canalisé par le complexe PSII $\beta$  et de sa proportion (Owens 1986). L'option <15> utilise les résultats de l'option précédente pour isoler le taux et la contribution des centres PSII $\alpha$  (Sinclair et Spence 1988). Ces options possèdent leurs propres sous-programmes d'impression graphique.

L'option <16> évalue l'accroissement de la surface complémentaire en relation à l'accroissement des cinétiques dans le temps. Cette analyse permet l'évaluation de la coopérativité du transfert de l'énergie entre les centres réactionnels et est basée sur une théorie écrite par Butler (1980). Cette option est moins utilisée mais offre des informations supplémentaires sur la distribution de l'énergie lorsque l'appareil photosynthétique est en condition de stress (Griffith *et al.* 1984, Hodges *et Barber* 1983).

#### 2.4 Les échantillons

Les échantillons utilisés pour les évaluations de l'activité photosynthétique sont des plantules d'orge, des thylacoïdes d'orge ou du phytoplancton.

#### 2.4.1 Culture et préparation des algues

Les algues *Dunaliella tertiolecta* sont des algues vertes unicellulaires (Aoki *et al.* 1986). Ces algues ne contiennent qu'un seul chloroplaste dont le volume correspond à environ 50% du volume de la cellule. Les cellules sont séparées du milieu externe par une membrane plasmique. Ces algues ne contiennent pas de membranes cellulosesiques. Elles proviennent de la "North East Pacific Culture Collection" de l'université de la Colombie-Britannique à Vancouver. Elles sont cultivées dans le milieu de culture de Harrison *et al.* (1980) avec addition de 10mM du tampon HEPES qui maintient le pH de la culture à environ 7.5. La culture est gardée sous illumination de 10 W/m<sup>2</sup> provenant de tubes fluorescents ( de type Gro et Sho).

Pour les expériences, les algues sont récoltées après quatre jours de croissance. L'isolation des algues se fait par centrifugation pendant 5 minutes à 3000g. Le culot recueilli est resuspendu et lavé deux fois dans un milieu de culture frais ne contenant pas de vitamine ni de micro-élément afin d'éviter l'interaction de ces éléments avec les produits de traitement. La teneur en chlorophylle totale est déterminée

dans l'acétone à 80% utilisant la méthode de Strain *et al.* (1972).

Le système d'évaluation actuel donne des résultats fiables pour des concentrations minimales en chlorophylle totale de 1.5 µg chl/ml pour la fluorescence et de 15 µg chl/ml pour les mesures de dissipation thermique. Dans la majorité des expériences d'évaluation de la fluorescence, la concentration en chlorophylle totale est ajustée à environ 7 µg chl/ml. Dans le cas des évaluations de la dissipation thermique, la concentration totale est d'environ 25 µg chl/ml.

#### 2.4.2 Culture de l'orge et préparation des thylacoïdes.

Les grains d'orge utilisés proviennent d'un producteur local de semences. Les grains sont stérilisés avec du peroxyde d'hydrogène à 3% pendant 15 minutes avant d'être semés dans des bacs contenant de la vermiculite. Ces bacs sont placés dans une chambre de croissance à une température entre 22 et 24°C sous une illumination provenant de lampes au sodium à haute pression. Les plantules sont arrosés quotidiennement avec de l'eau du robinet et gardés pendant huit jours dans la chambre de croissance.

L'isolation des chloroplastes est basée sur la méthode de Walker (1971) en utilisant les solutions de Deng et Melis (1986) sauf pour le milieu de resuspension. Les plantules sont lavés et coupés en gardant la partie supérieure du

plantule (environ huit centimètres de long pour huit jours de croissance). Cette partie est coupée en morceaux et mélangée dans 250 ml d'une solution de broyage (voir tableau 2.1) à une température de 0°C. Ce mélange est broyé rapidement et filtré à l'aide d'un premier filtre à pores de 1 mm, pour enlever les gros résidus des feuilles, et d'un second à pores de 25 µm. Le filtrat est rapidement centrifugé à 3000g pendant 5 minutes. Le culot recueilli, contenant les chloroplastes, est resuspendu dans un milieu de lavage ne contenant pas de sucrose (voir tableau 2.1). Ce milieu brise, par choc osmotique, l'enveloppe des chloroplastes en libérant le stroma et les membranes des thylacoïdes. Cette suspension est centrifugée pendant 5 minutes à 5000g. Le culot recueilli et contenant les thylacoïdes est resuspendu dans une solution de conservation (voir tableau 2.1). Les thylacoïdes sont conservés à une température de -130°C avant leur utilisation.

Trente minutes avant les traitements, les thylacoïdes sont dégelés sur de la glace. La concentration en chlorophylle totale est ajustée par la méthode de Strain *et al.* (1972) en utilisant le milieu de resuspension (voir tableau 2.1) (Beauregard 1988).

---

Tableau 2.1 Composition chimique des solutions  
d'extraction, de conservation et de resuspension des  
thylacoïdes.

---

Milieu de broyage	Tricine-NaOH (pH 7.8).....	50 mM
	Sucrose.....	400 mM
	NaCl.....	10 mM
	MgCl <sub>2</sub> .....	5 mM
Milieu de lavage	Tricine-NaOH (pH 7.8).....	20 mM
	NaCl.....	10 mM
	MgCl <sub>2</sub> .....	5 mM
Milieu de conservation	HEPES-NaOH (pH 7.5).....	20 mM
	Sucrose.....	400 mM
	NaCl.....	10 mM
	Ethylène-glycol.....	30 % v/v
Milieu de resuspension	HEPES-NaOH (pH 7.5).....	20 mM
	Sucrose.....	100 mM
	NaCl.....	10 mM
	MgCl <sub>2</sub> .....	5 mM

---

### CHAPITRE 3

#### EVALUATION D'UNE NOUVELLE METHODE DE SEPARATION DE LA FLUORESCENCE CONSTANTE $F_0$ ET DE LA FLUORESCENCE VARIABLE $F_v$

##### 3.1 Introduction

Sous illumination, après une période d'adaptation au noir, les algues et les plantes supérieures montrent des variations de la fluorescence qu'on nomme effet Kautsky (voir section 1.6.1). Ces variations sont la superposition de deux composantes dont l'une est constante ( $F_0$ ) et l'autre variable ( $F_v$ ).  $F_0$  n'est pas fonction du transport d'électrons. L'étude des réactions photochimiques après la séparation de charges nécessite donc l'isolation de la fluorescence constante des cinétiques de fluorescence mesurées.

De façon générale, les cinétiques de fluorescence sur quelques millisecondes sont prises avec une instrumentation utilisant des obturateurs électroniques qui contrôlent le temps d'illumination du spécimen étudié. La plupart de ces obturateurs s'ouvrent en 2 à 3 millisecondes. Certains possèdent un diaphragme pouvant diminuer le temps d'ouverture mais implique aussi une diminution de l'intensité lumineuse. L'utilisateur a donc le choix entre le temps d'ouverture et l'intensité lumineuse. Durant l'ouverture de l'obturateur, il est impossible de distinguer

entre les deux composantes de la cinétique de fluorescence. Habituellement, les techniques d'évaluation de la fluorescence constante à partir des cinétiques totales utilisaient des extrapolations linéaires sur les 10 à 15 premières millisecondes après que l'obturateur soit pleinement ouvert (Malkin *et al.* 1978, Toivonen *et al.* 1984). Or, il a été rapporté par Butler en 1975 que durant cette période, les cinétiques de fluorescence n'étaient pas linéaires mais possédaient une certaine courbure plus ou moins prononcée, et qui était fonction de l'intensité lumineuse et des différents traitements utilisés. Une mauvaise évaluation de la fluorescence constante par extrapolation linéaire sur cette courbure peut donc entraîner de très grandes variations sur la composante variable du signal et contribuer à d'énormes erreurs sur l'évaluation des paramètres photosynthétiques introduits à la section 1.7.

Le thermo-fluorimètre présenté à la section 2.2 utilise lui aussi un obturateur électronique dont le temps d'ouverture est de 2.5 ms. Il a donc été important de développer une nouvelle méthode de séparation de la fluorescence constante  $F_0$  à partir des cinétiques de fluorescence ou de dissipation thermique sur les premières 20 ms d'acquisition.

### 3.2 Matériel et méthodes

La culture et la préparation des algues vertes *Dunaliella tertiolecta* et des thylacoïdes d'orge sont décrites à la section 2.4 (chapitre 2). Les cinétiques d'induction de fluorescence ont été mesurées par le thermo-fluorimètre décrit à la section 2.2. Les différents paramètres photosynthétiques ont été évalués en utilisant le logiciel de traitement décrit à la section 2.3 et basé sur les relations des paramètres photosynthétiques de la section 1.7 (chapitre 1). Les additifs utilisés dans les expériences de ce chapitre sont ajoutés 1 min. avant la mesure.

### 3.3 Résultats et discussion

La figure 3.1a présente une acquisition typique d'une cinétique de fluorescence sur 20 ms chez l'algue verte *Dunaliella tertiolecta* avec une illumination constante de  $3.5 \text{ mW/cm}^2$ . Le trait hachuré (deux premières millisecondes) correspond au temps d'ouverture de l'obturateur électronique. Dans cette région, les composantes constante et variable des cinétiques sont superposées. Il est à remarquer que le système d'amplification du signal n'influence pas les cinétiques observées puisque ce système possède une bande passante plus large que le temps d'ouverture de l'obturateur électronique (voir chapitre 2). Le niveau  $F_0$  représente la fluorescence constante extrapolée à partir de l'ouverture complète de l'obturateur électronique (niveau  $F_{\square}$ ) jusqu'au début de l'ouverture de

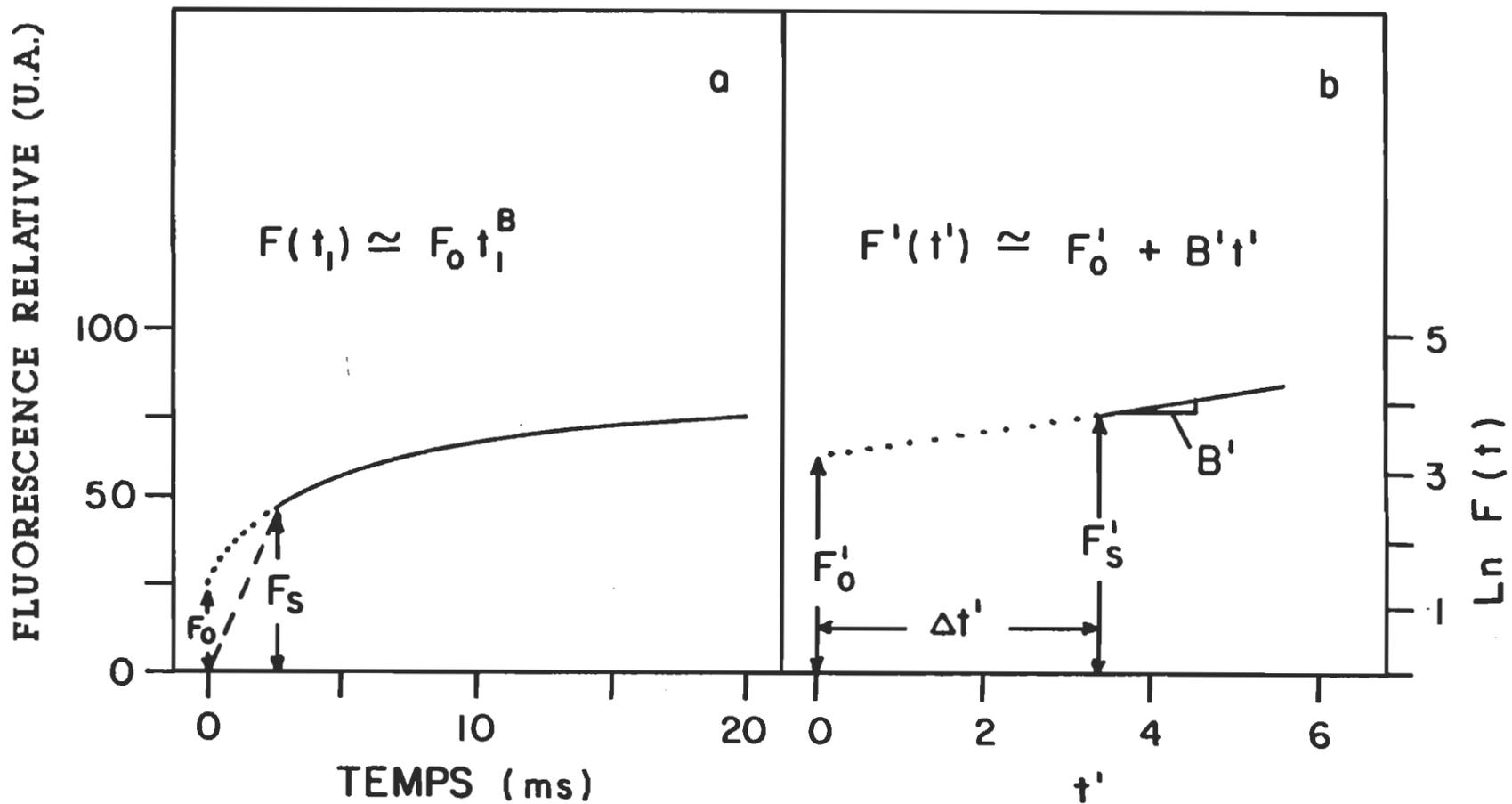


Figure 3.1 A) Accroissement initial de la cinétique d'induction de la fluorescence chez l'algue verte *Dunaliella tertiolecta*. B) Transformation linéaire de la cinétique initiale d'induction de la fluorescence.

l'obturateur électronique. Cette extrapolation est basée sur une technique de régression utilisant la méthode des moindres carrés (Scherrer 1984, Gerald et Wheatley 1985). L'hypothèse émise afin d'utiliser cette technique est que le bruit et l'erreur sur la mesure de la cinétique de fluorescence ou de dissipation thermique dans le temps, ainsi que la déviation par rapport à la forme théorique de l'équation utilisée, possédaient une variance égale pour chacun des points acquis.

Il est ici très important de souligner que le but n'est pas d'évaluer la relation exacte de l'accroissement des cinétiques de fluorescence, mais d'évaluer le plus près possible, la fluorescence constante  $F_0$  et ce, en un temps de calcul raisonnable pour un ordinateur de type APPLE IIe. Il est à noter que la précision du  $F_0$  serait accrue s'il existait une relation théorique de l'évolution temporelle du début des cinétiques et tenant compte des différents traitements possibles (Renger et Schulze 1985), mais cette relation n'est pas encore très bien définie et demande un temps de calcul trop long pour son évaluation. De plus, les relations existantes demandent trop de paramètres ne pouvant être évalués facilement à partir des résultats de fluorescence variable.

Compte tenu de cette limitation et de la forme de la cinétique obtenue, celle-ci peut être approximée par une fonction de puissance:

$$F(t_1) \approx F_0 t_1^B \quad (3.1)$$

où  $F(t_1)$  représente la fluorescence dans le temps  $t_1$ . Ce temps est défini par la relation " $Kt+1$ " où  $t$  représente le temps d'acquisition réel en secondes et  $K$ , la constante de proportionnalité. Cette constante est le rapport du nombre total de points acquis (256 points) sur le temps d'acquisition, soit de 20 ms.  $B$  représente le facteur de croissance de la cinétique. Plus la courbure est prononcée et plus cette valeur sera élevée. La méthode d'extrapolation utilisée est basée sur une régression linéaire utilisant les moindres carrés. Cette technique ne peut être utilisée que sur des relations linéaires ou linéarisables.

Afin de linéariser les points acquis, les transformations suivantes sont utilisées:

$$F'(t') = \text{Ln } F(t_1) \quad (3.2)$$

$$t' = \text{Ln } t_1 \quad (3.3)$$

$$F_0' = \text{Ln } F_0 \quad (3.4)$$

$$B' = B \quad (3.5)$$

La cinétique de fluorescence ou de dissipation thermique pour les premières millisecondes suivant l'ouverture complète de l'obturateur, peut maintenant être approximée par:

$$F'(t') \approx F_0' + B' t' \quad (3.6)$$

où  $F'(t')$ ,  $F_0'$ ,  $t'$  et  $B'$  sont les paramètres linéarisés ayant le même sens que pour  $F(t_1)$ ,  $F_0$ ,  $t$  et  $B$  respectivement. La figure 3.1b présente la transformation linéaire de la cinétique de fluorescence obtenue à la figure 3.1a.

Au début de l'ouverture de l'obturateur électronique, les points linéarisés sont caractérisés par l'intercepte  $F_0'$  et la pente  $B'$ . Utilisant cette pente et le point  $F_0'$ , la droite obtenue par linéarisation des points expérimentaux est extrapolée sur un temps  $\Delta t'$ , correspondant au temps d'ouverture de l'obturateur électronique. Au début de l'ouverture de l'obturateur, le point  $F_0'$  correspond au logarithme de  $F_0$ , la fluorescence constante cherchée sera donc l'inverse de la transformation, soit l'exponentiel de  $F_0'$  ( $F_0 = \text{Exp } F_0'$ ). La courbe en pointillé de la figure 3.1a présente cette transformation. L'erreur de la régression du  $F_0$ , obtenue à partir de cette nouvelle technique, est en général de 2% ou moins. L'erreur résultante sur la valeur du  $F_0$  est au maximum 10% (évaluée à partir des déviations standards).

La figure 3.2 présente des résultats de deux niveaux de fluorescence constante  $F_0$ , évalués à partir d'une régression linéaire ( $F_{02}$  et  $F_{03}$ ) en comparaison à un résultat ( $F_{01}$ ) obtenu à l'aide de la nouvelle technique introduite dans ce

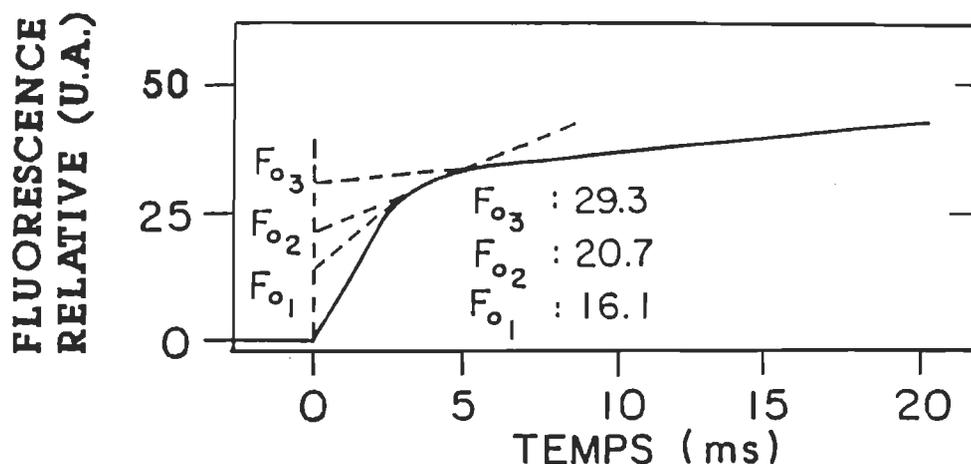


Figure 3.2 Evaluation de la fluorescence constante  $F_o$  suivant trois méthodes d'extrapolation.  $F_{o1}$ : extrapolation utilisant une fonction de puissance.  $F_{o2}$  et  $F_{o3}$ : extrapolations linéaires sur 2 et 10 ms respectivement.

chapitre. Les valeurs de  $F_{o2}=20.7$  et  $F_{o3}=29.3$  ont été évaluées sur les 2 et 10 premières millisecondes respectivement, après l'ouverture complète de l'obturateur (niveau  $F_s$  de la figure 3.1a). La valeur  $F_{o1}=16.1$  est évaluée en utilisant tous les points expérimentaux de la cinétique de fluorescence. On peut remarquer que les valeurs de  $F_{o2}$  et  $F_{o3}$  diffèrent par 22% et 45% respectivement de la valeur calculée  $F_{o1}$ . Il est donc évident ici que les choix de la méthode d'évaluation et des bornes du calcul influencent beaucoup les valeurs obtenues.

La figure 3.3 présente les conséquences sur la fluorescence

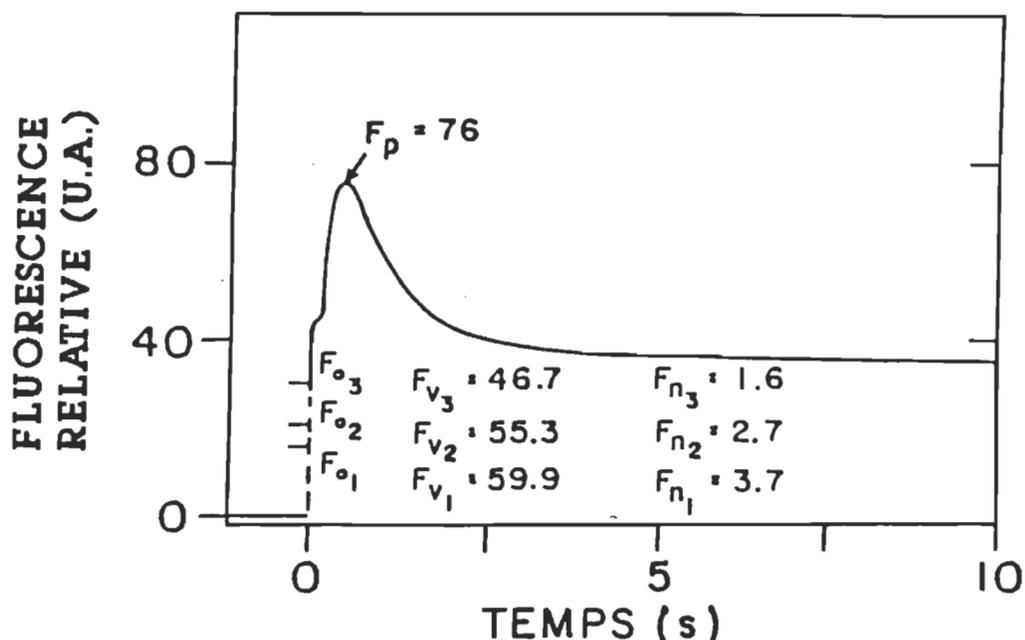


Figure 3.3 Conséquence de l'évaluation de  $F_o$  sur les valeurs de  $F_v$  et  $F_N$  évalué au niveau  $F_p$ . Voir le texte pour plus de détail.

variable  $F_v$  et sur la fluorescence normalisée  $F_N$  (évaluées au niveau  $F_p$ ) des résultats obtenus à la figure 3.2. On remarque un écart de 8% et 22% entre les niveaux de fluorescence variable  $F_{v2}$  et  $F_{v3}$  respectivement, par rapport au résultat  $F_{v1}$ . Cet écart est beaucoup plus prononcé dans le cas des fluorescences normalisées, soit de 22% pour  $F_{N2}$  et 57% pour  $F_{N3}$  en comparaison à  $F_{N1}$ .

Les résultats présentés ci-haut justifient donc l'importance d'une bonne évaluation du  $F_o$  et de l'utilisation de la méthode de régression par les moindres carrés appliquée sur une fonction de puissance, comparativement aux anciennes méthodes d'extrapolation linéaire. Cette méthode a l'avantage d'être plus précise puisqu'elle tient compte de

tous les points expérimentaux, donc de la forme réelle du début de la cinétique. Elle permet aussi une meilleure comparaison entre les résultats provenant de différents laboratoires.

Cependant, suivant les conditions expérimentales telles l'intensité de la lumière d'excitation, la longueur d'onde, l'utilisation d'accepteurs d'électrons artificiels ou d'un temps de préillumination des échantillons, les cinétiques sur les premières millisecondes n'auront pas la même progression (Sato et Katoh 1981, Munday et Govindjee 1969)). Etant donné que la méthode introduite utilise tous les points expérimentaux de la cinétique, la valeur calculée sera fonction de la courbure, et donc des conditions expérimentales. Afin de vérifier la validité et la reproductibilité des niveaux de fluorescence constante estimés avec la nouvelle méthode, différents accepteurs d'électrons sont utilisés pour changer la progression des cinétiques de fluorescence. En fait, si en présence d'additifs le niveau  $F_0$ , extrapolé à partir de la méthode présentée, ne varie pas, ce niveau est considéré comme étant la vraie fluorescence constante  $F_0$  (Cao et Govindjee 1990).

Les figures 3.4a, b et c présentent des cinétiques d'induction de fluorescence obtenues à partir de thylacoïdes d'orge en présence de différentes concentrations des accepteurs d'électrons 1-4 benzoquinone (BQ), ferricyanure de potassium (FeCN) et méthyl viologène (Mv).

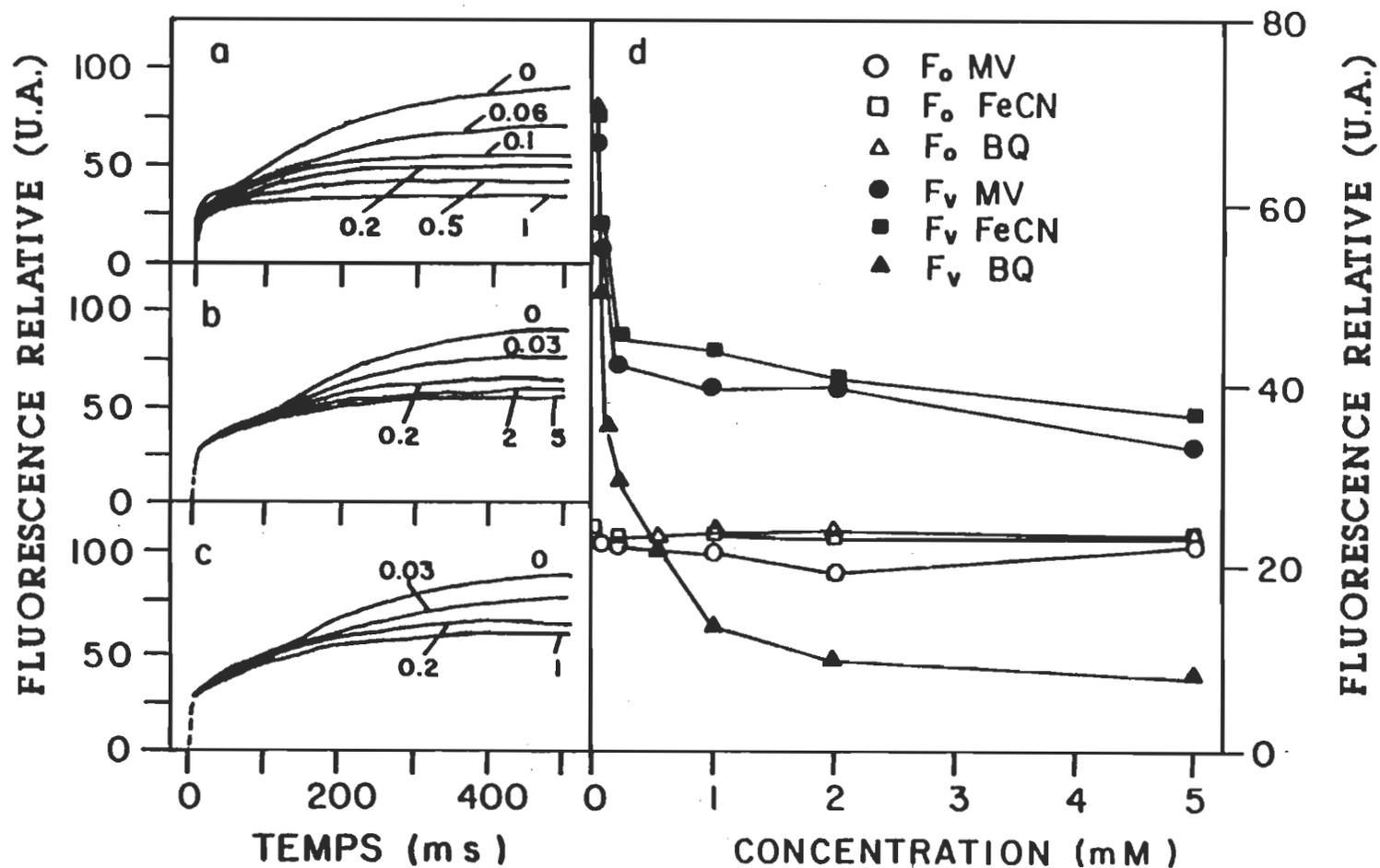


Figure 3.4 Cinétiques d'induction de la fluorescence utilisant des chloroplastes d'orge en présence de A) BQ; B) FeCN; C) MV. Les valeurs indiquent la concentration en mM d) Valeurs relatives de F<sub>0</sub> et F<sub>v</sub> des cinétiques en A, B et C.

Comme on peut le constater sur les figures, l'augmentation de la concentration des accepteurs d'électrons entraîne une diminution des niveaux des cinétiques de fluorescence dans le temps. Ces diminutions des niveaux de fluorescence résultent d'une plus faible accumulation d'accepteurs réduits au niveau du photosystème II et entraînent ainsi une variation de la progression initiale des cinétiques de fluorescence.

La figure 3.4d présente les valeurs numériques relatives de la fluorescence constante et de la fluorescence variable obtenues des figures 3.4a, b et c. Comme on peut le constater, une diminution des niveaux de fluorescence variable n'entraîne aucune diminution de la fluorescence constante évaluée à partir de la méthode présentée. Ceci indique que lorsque les échantillons sont préalablement adaptés au noir, cette méthode donne des résultats fiables et reproductibles de la fluorescence constante en présence des différents accepteurs d'électrons.

Il est connu qu'une réduction partielle de l'accepteur d'électron  $Q_A$  entraîne une montée rapide des cinétiques de fluorescence (Papageorgiou 1975). Il est donc important ici de connaître les limites de la technique et de son utilisation lorsque l'accepteur  $Q_A$  est partiellement réduit. Cette réduction partielle est obtenue par préillumination des échantillons durant une période de temps déterminée. La figure 3.5 présente les résultats numériques relatifs des

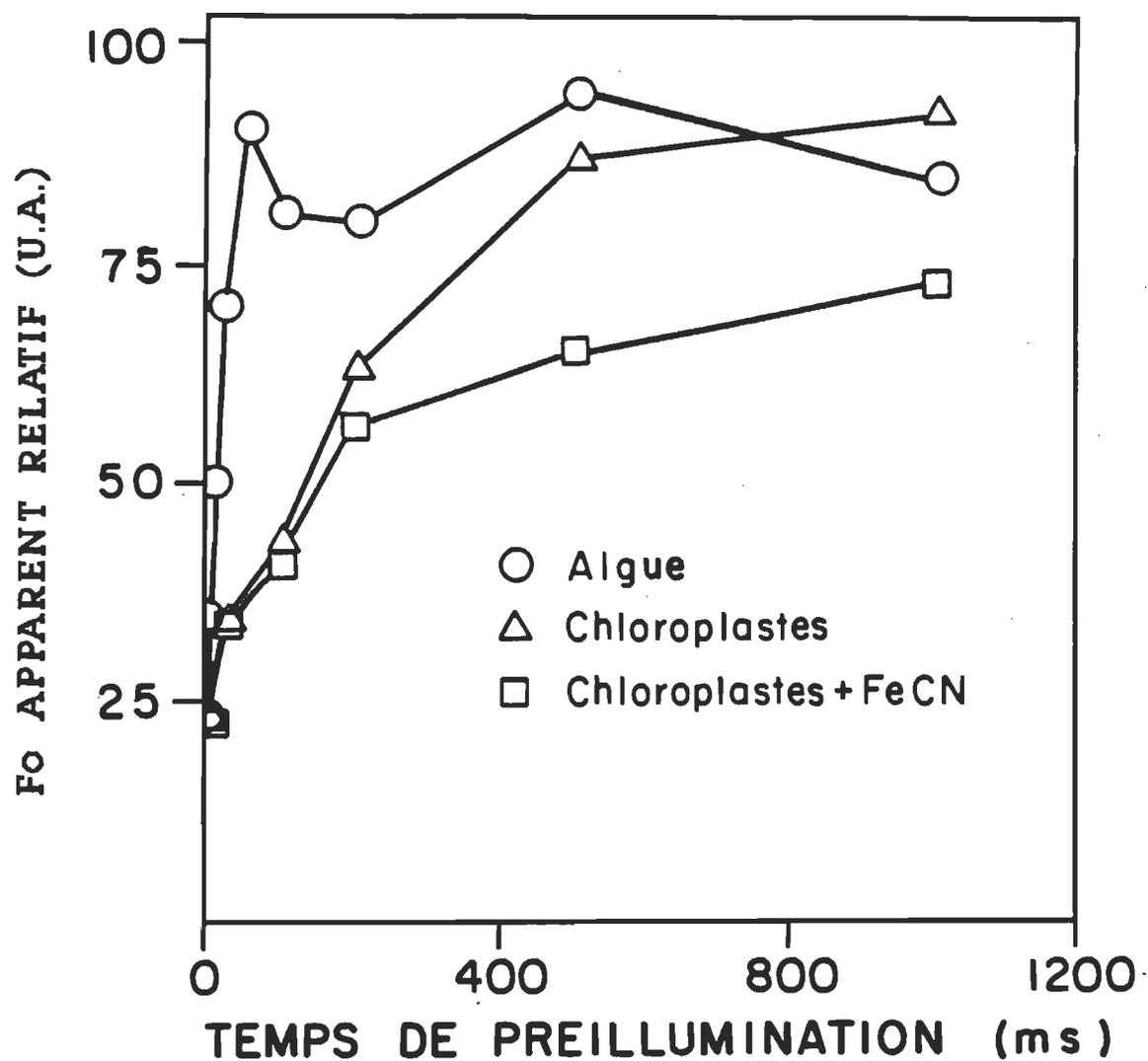


Figure 3.5 Evaluation des niveaux  $F_0$  apparents 10 ms après préillumination de l'algue verte *Dunaliella tertiolecta* (durant .5 s) et des thylacoïdes d'orges (durant 2 s, en absence ou en présence de FeCN).

niveaux de fluorescence constante "apparents" évalués 10 ms après différents temps de préillumination sur des algues vertes et des thylacoïdes d'orge (en absence et en présence de FeCN). Comme on peut le constater, les valeurs des niveaux de fluorescence constante obtenues après préillumination augmentent en suivant la même forme que les cinétiques de fluorescence sans traitement.

On peut donc conclure, à partir de ces résultats, que la méthode utilisée est limitée par la réduction partielle de l'accepteur  $Q_A$  et qu'il est nécessaire, même après préillumination, de réadapter au noir les échantillons avant de procéder à une nouvelle évaluation des niveaux de fluorescence constante.

La figure 3.6 présente le temps de recouvrement des niveaux  $F_0$  "apparents", après préillumination des algues vertes et des thylacoïdes d'orge. Les niveaux  $F_0$  sont évalués à différents temps entre la fin de la période de préillumination et la mesure. Le temps de préillumination a été choisi afin d'obtenir une réduction complète des accepteurs  $Q_A$ , soit de 500 ms pour les algues vertes et de 2 s pour les thylacoïdes d'orge (non montré sur la figure). Comme indiqué à la figure 3.6, les temps de recouvrement des niveaux sont de 10 s dans le cas des algues et de 90 s dans le cas des thylacoïdes. Seulement après cette période de réadaptation au noir, lorsque les accepteurs d'électrons  $Q_A$  sont totalement réoxydés, la méthode présente donne des résultats reproductibles de la fluorescence constante  $F_0$ .

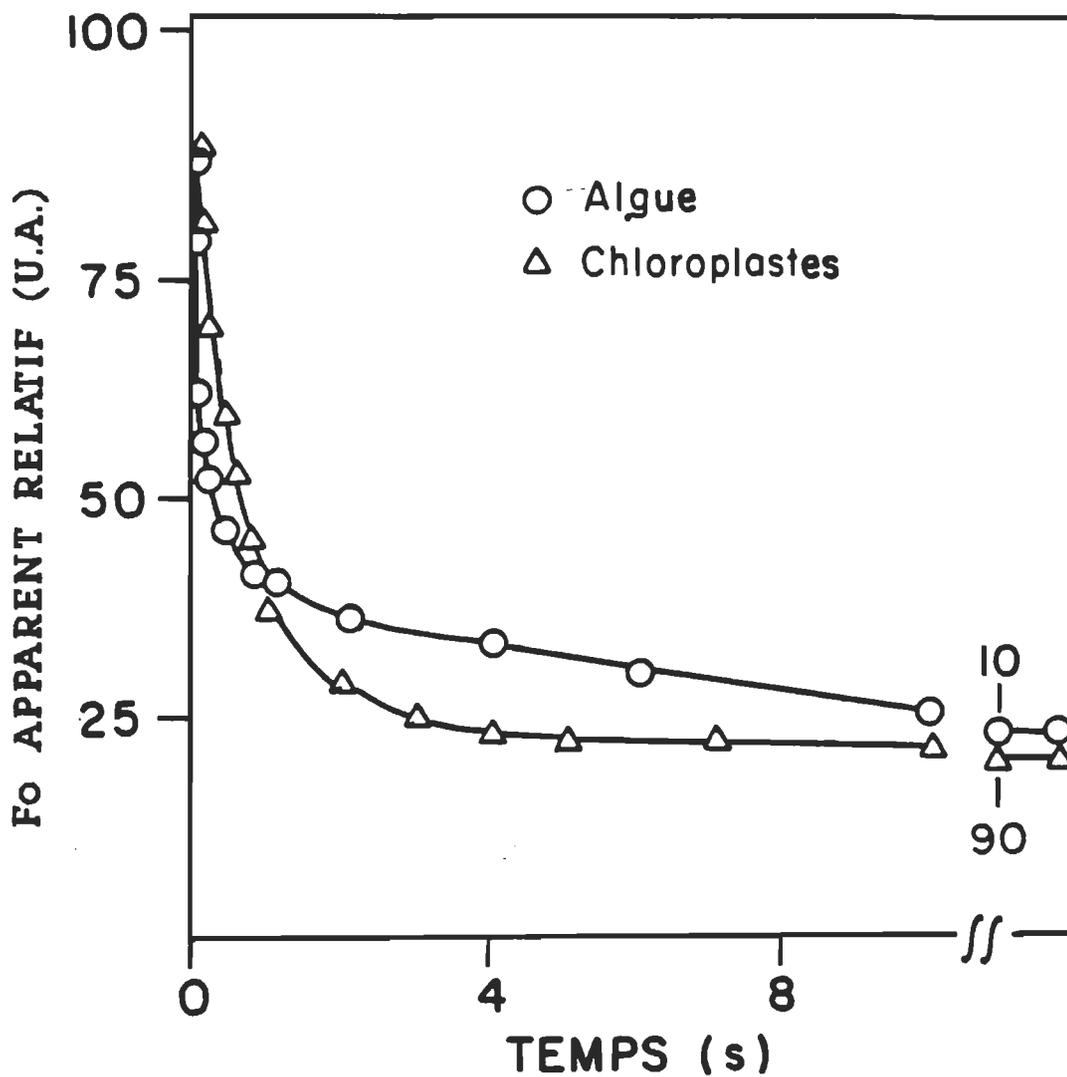


Figure 3.6 Temps de recouvrement des niveaux  $F_0$  après préillumination de l'algue verte *Dunaliella tertiolecta* (durant .5 s ) et des thylacoïdes d'orge (durant 2 s, en absence d'additif). Les numéros indiquent des temps en secondes. Voir le texte pour plus de détails.

## CHAPITRE 4

### DISSIPATION DE L'ENERGIE VIA FLUORESCENCE ET DISSIPATION THERMIQUE

#### 4.1 Introduction

Comme il a été introduit au chapitre 1, l'énergie lumineuse qui a été absorbée par les pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes) élève ces molécules à un état excité (Gregory 1989). L'énergie que possède les molécules est généralement transférée à d'autres molécules avoisinantes pour atteindre les centres réactionnels. Elle est alors utilisée pour la photosynthèse ou émise sous forme de fluorescence et de dissipation non radiative causant une émission thermique.

Il est connu que la réémission de l'énergie sous forme de fluorescence provient principalement du transfert de l'énergie entre les pigments et de la perte d'électron au niveau du centre réactionnel par recombinaison de charges. On suppose que la dissipation d'énergie sous forme thermique proviendrait aussi des mêmes phénomènes (Papageorgiou 1975, Kanstad *et al.* 1983, Buschmann et Prehn 1984, Buschmann *et al.* 1986, Carpentier *et al.* 1989)

Lorsqu'un échantillon (photosynthétique) est illuminé après une période d'adaptation au noir, la fluorescence et la

dissipation thermique décroissent en fonction du temps. Après 3 à 5 minutes, quand l'état stationnaire est atteint, ces formes dissipatives sont minimales (Buschmann *et al.* 1984). Par opposition, la fluorescence et la dissipation thermique sont maximales lorsque le rendement en photosynthèse est minimal et ce, pour la même énergie absorbée (Kanstad *et al.* 1983).

Le rendement quantique de la dissipation de l'énergie sous forme thermique (chaleur) a été défini au chapitre 1 comme étant égal à (Strasser et Reto 1986):

$$\phi_c = \frac{k_c}{k_c + k_f + k_p} \quad (4.1)$$

où  $k_c$ ,  $k_f$ , et  $k_p$  représentent les constantes de vitesse des processus thermique, de fluorescence et de photochimie respectivement. L'intensité émise sous forme de dissipation thermique étant fonction du rendement quantique et de l'intensité lumineuse absorbée, on peut écrire la relation:

$$C = I \phi_c = I \frac{k_c}{k_c + k_f + k_p} \quad (4.2)$$

où "I" est l'intensité de la lumière absorbée. Sachant que la dissipation d'énergie sous forme thermique est liée étroitement à la fluorescence (Munday et Govindjee 1969), il est maintenant possible d'écrire:

$$C = c F = c I \Phi_{\mathcal{F}} = c I \frac{k_{\mathcal{F}}}{k_{\mathcal{C}} + k_{\mathcal{F}} + k_{\mathcal{D}}} \quad (4.3)$$

et utilisant les relations 4.2 et 4.3:

$$\Phi_{\mathcal{C}} = c \Phi_{\mathcal{F}} = \frac{k_{\mathcal{C}}}{k_{\mathcal{F}}} \Phi_{\mathcal{F}} \quad (4.4)$$

où  $c$  est le facteur de proportionnalité entre  $C$  et  $F$  et est égal à  $k_{\mathcal{C}}/k_{\mathcal{F}}$ .

S'il existe un lien aussi étroit entre la fluorescence et l'émission thermique, il est plausible d'imaginer une relation étroite entre un système ouvert où la dissipation thermique serait minimale, et un système fermé où la dissipation thermique serait maximale. Il est donc possible, dans les premières secondes après l'illumination, qu'il existe les mêmes niveaux (cinétiques) que dans le cas de la fluorescence.

La première tentative réelle de l'obtention des cinétiques de la dissipation thermique fut rapportée par Katoh et Yamagishi en 1984 à l'aide d'un spectromètre photoacoustique modifié. De ces travaux, Katoh et Yamagishi confirmèrent l'existence d'un lien entre les cinétiques de dissipation thermique et de fluorescence sur une échelle de temps de 60 s et 20 min.. Cependant, aucune information n'est disponible sur les variations initiales (sur quelques secondes) des cinétiques de dissipation thermique. L'existence d'un  $T_0$

analogue à  $F_0$  n'a jamais été mentionnée (à ma connaissance) dans la littérature.

DU à ce manque d'information, ce chapitre présente les relations qui existent entre les cinétiques de fluorescence et de dissipation sous forme de chaleur sur des échelles de temps variant de quelques millisecondes (20 ms) à quelques secondes (10 s) ainsi que les propriétés liant ces deux formes dissipatives.

#### 4.2 Matériel et méthodes

Pour les mesures, les plantules d'orge et les algues vertes *Dunaliella tertiolecta* ont été cultivés et préparés selon la méthodologie présentée à la section 2.4.

Les cinétiques d'induction de la fluorescence et de la dissipation thermique ont été mesurées à l'aide du thermofluorimètre présenté à la section 2.2. La concentration de DCMU utilisée dans les mesures était de 20  $\mu\text{M}$  et les échantillons sont incubés pendant 1 min.

#### 4.3 Résultats et discussion

La figure 4.1 présente une série de courbes d'induction de fluorescence mesurées sur différentes échelles de temps à une intensité de 3.5  $\text{mW}/\text{cm}^2$  en lumière bleue. Les échantillons utilisés ici sont des plantules d'orge adaptées

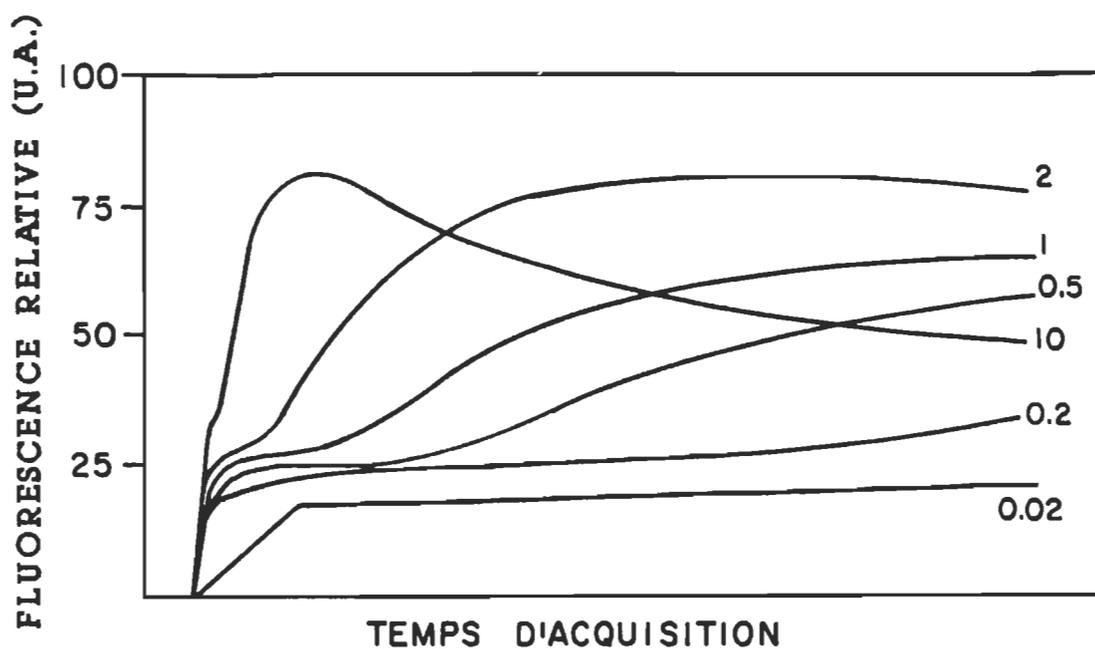


Figure 4.1 Courbes d'induction de fluorescence mesurées sur différentes échelles de temps avec des plantules d'orge. Les numéros indiquent le temps d'acquisition (s). Voir texte pour plus de détails.

au noir durant une période de 60 min. Comme on peut le constater, les cinétiques observées sont caractéristiques des différents niveaux des variations rapides de l'effet Kautsky (Gregory 1989). Après l'ouverture de l'obturateur électronique, la fluorescence s'élève d'un niveau constant (Fluorescence constante  $F_0$ ) vers un maximum ( $F_p$ ) en passant par des niveaux intermédiaires (I et D). Après avoir atteint le niveau maximum, la cinétique de l'effet Kautsky diminue pour atteindre après plusieurs secondes, un niveau stationnaire (non montré sur cette figure). Ces variations

dans le domaine du temps correspondent aux différentes étapes dans l'état d'oxydoréduction de l'accepteur primaire d'électrons  $Q_A$  et de la réduction progressive du bassin de plastoquinone (chapitre 1).

La figure 4.2 présente sur différentes échelles de temps, les cinétiques d'induction de la dissipation thermique dans les mêmes conditions décrites à la figure 4.1. Il est très intéressant de constater la grande similitude de ces cinétiques à celles obtenues en fluorescence. De fait, dès le début de l'illumination (ouverture de l'obturateur électronique), les cinétiques de dissipation thermique s'élèvent d'un niveau constant  $T_0$  (équivalent à  $F_0$ ) pour atteindre un maximum noté  $T_p$  (équivalent à  $F_p$ ) en passant par des niveaux intermédiaires et ce, pour les mêmes échelles de temps.

Ces cinétiques indiquent qu'il existe un parallélisme parfait entre les cinétiques d'induction de la fluorescence et de la dissipation thermique dans les premières secondes de l'effet Kautsky. Ces deux formes de dissipation sont donc antiparallèles au rendement photochimique. Il semble donc exister un partage de l'énergie entre la fluorescence et la dissipation thermique et ce en relation avec le rendement photochimique.

De plus, par la présence d'un niveau de dissipation thermique de base constant, on peut conclure que, de façon analogue à la fluorescence, les cinétiques de dissipation thermique sont composées de la superposition de deux

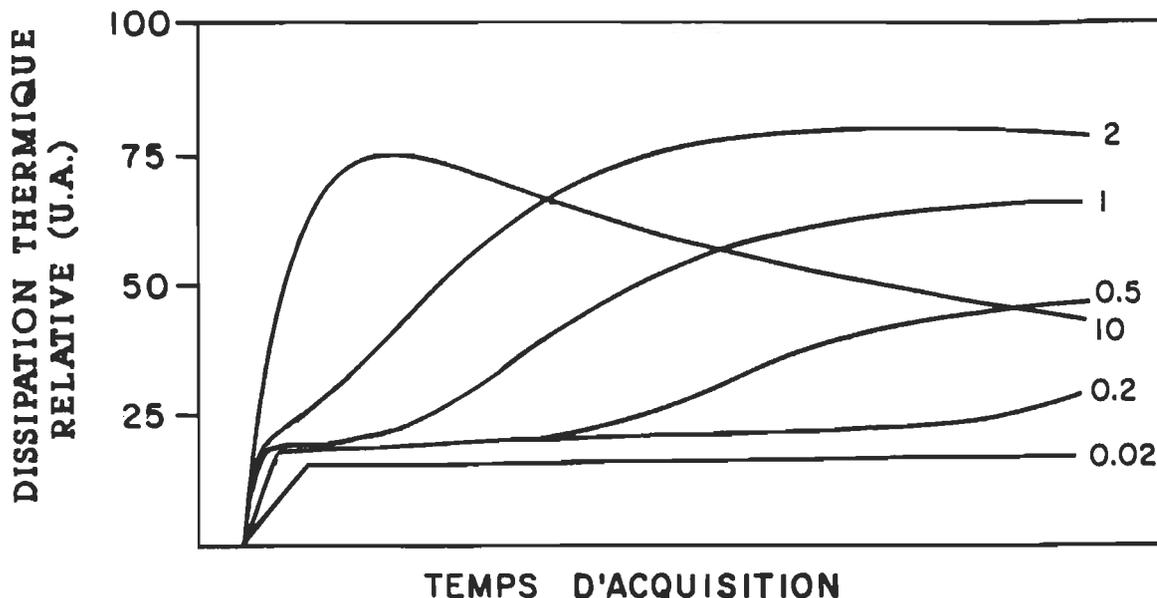


Figure 4.2 Courbes d'induction de la dissipation thermique sur différentes échelles de temps avec des plantules d'orge. Les numéros indiquent le temps d'acquisition (s). Voir le texte pour plus de détails.

phénomènes. La partie constante provient possiblement de la perte d'énergie (dans les complexes collecteurs de lumière) lors de sa migration vers les centres photochimiques. La portion variable provient possiblement de la recombinaison de charges au niveau du centre réactionnel et est contrôlée par l'état d'oxydoréduction des accepteurs d'électrons du PSII. La portion constante n'est donc pas liée à la photochimie contrairement à la seconde. Les relations et hypothèses émises dans l'introduction de ce chapitre semblent donc valables.

Puisque la réduction partielle des accepteurs d'électrons entraîne une élévation rapide des cinétiques de fluorescence (Munday et Govindjee 1969, Lavorel et Etienne 1977), le même effet a été vérifié sur les cinétiques de la dissipation thermique afin d'évaluer le temps de recouvrement de ces cinétiques après une réduction partielle en relation avec celui obtenu en fluorescence. La réduction est obtenue en préillumination les plantules d'orge pendant 2 s dans les conditions de la figure 4.1. Ce temps de préillumination permet d'atteindre le niveau P des cinétiques de fluorescence et de dissipation thermique (figures 4.1 et 4.2).

La figure 4.3 présente les résultats du temps de recouvrement des cinétiques de fluorescence après différents laps de temps avant la mesure. Comme l'indique la figure, une préillumination de 2 s (délai de 50 ms avant la mesure) entraîne une élévation rapide de la cinétique de fluorescence due à la réduction des accepteurs d'électrons du PSII, suivie d'une réoxydation plus lente du bassin de plastoquinones par le PSI. Plus le délai (avant la mesure) augmente, et plus la réoxydation des accepteurs d'électrons du PSII est prononcée, atteignant la cinétique initiale après 5 s de délai.

De façon analogue à la figure 4.3, la figure 4.4 présente les résultats du temps de recouvrement des cinétiques de la dissipation thermique. Comme dans le cas des cinétiques de fluorescence, on peut remarquer une montée rapide de la

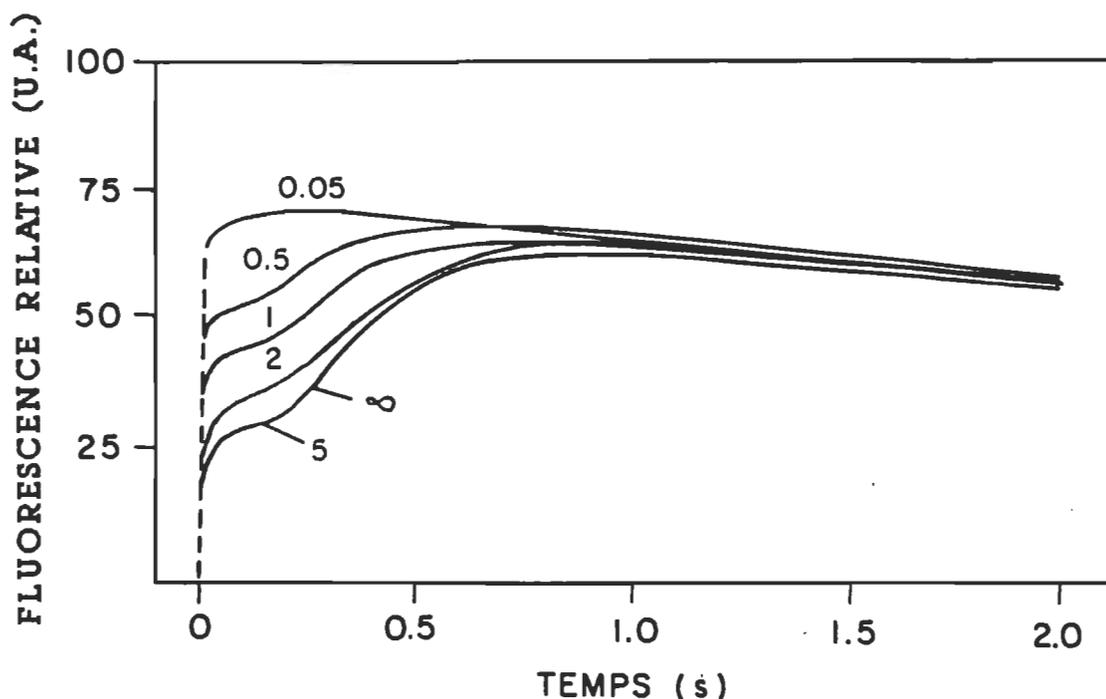


Figure 4.3 Cinétiques d'induction de fluorescence (sur des plantules d'orge) après une période de préillumination de 2 s. Les numéros indiquent le délai (s) entre la fin de la période de préillumination et la mesure. Voir le texte pour plus de détails.

dissipation thermique après la réduction des accepteurs d'électrons par une préillumination, suivie d'une réoxydation des accepteurs du PSII. Plus le délai entre la préillumination et la mesure augmente, et plus les accepteurs deviennent oxydés pour atteindre la cinétique initiale après 5 s de réadaptation au noir. Le recouvrement des cinétiques de fluorescence étant causé par la réoxydation des accepteurs d'électrons au niveau du PSII, le parallélisme entre les temps de recouvrement des cinétiques de la dissipation thermique et de la fluorescence

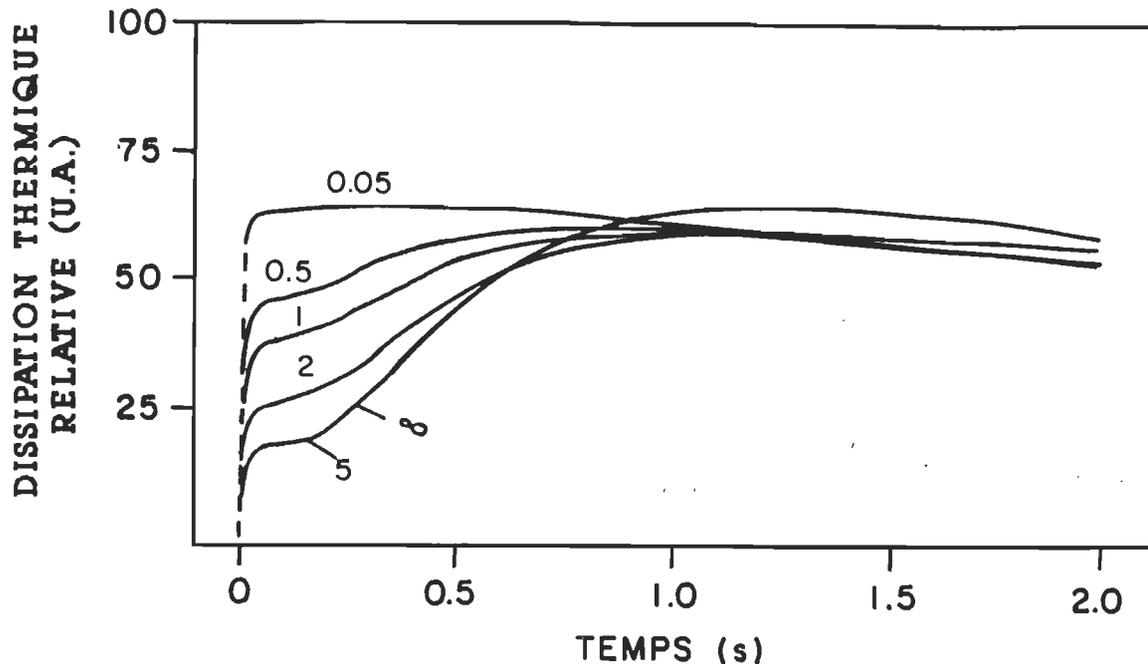


Figure 4.4 Cinétiques d'induction de la dissipation thermique (sur des plantules d'orge) après une période de préillumination de 2 s. Les numéros indiquent le délai (s) entre la fin de la période de préillumination et la mesure. Voir le texte pour plus de détails.

indique que la dissipation thermique provient du même événement que la fluorescence; soit à la réoxydation des accepteurs du PSII.

Une période de préillumination entraîne aussi une augmentation apparente du niveau constant ( $F_0$ ) des cinétiques de fluorescence (voir chapitre 3). Cette préillumination sera donc utilisée pour mesurer son effet sur le début des cinétiques de la dissipation thermique en relation avec celles obtenues en fluorescence.

La figure 4.5 présente les résultats du temps de recouvrement des cinétiques de fluorescence sur 20 ms (servant à l'évaluation de la fluorescence constante "apparente") après une période de préillumination de 2 s, suivie de différents délais avant la mesure.

Il semble d'après cette figure que la fluorescence constante suit les mêmes variations que les cinétiques initiales de la fluorescence présentées à la figure 4.3, soit une décroissance des niveaux rapides due à la réoxydation des accepteurs d'électrons du PSII.

Le même type de variations est obtenue par la mesure de la dissipation thermique (figure 4.6), ce qui implique encore une fois que la fluorescence et la dissipation thermique sont des manifestations différentes de la dissipation de l'énergie provenant d'un même événement. De plus, comme dans le cas de la fluorescence, la mesure de la dissipation thermique constante doit être faite après une période d'adaptation au noir quand tous les accepteurs du PSII sont oxydés (Cao et Govindjee 1990).

Les agents chimiques inhibiteurs de la chaîne de transport d'électrons sont grandement utilisés en photosynthèse. Ces agents permettent d'isoler certaines composantes de l'appareil photosynthétique ou d'isoler leurs sites d'action (Hader et Tevini 1987). En présence de DCMU qui isole le photosystème II, les cinétiques de fluorescence s'élèvent rapidement pour atteindre un niveau maximal (Chapitre 1). Cet accroissement correspond à la réduction complète des

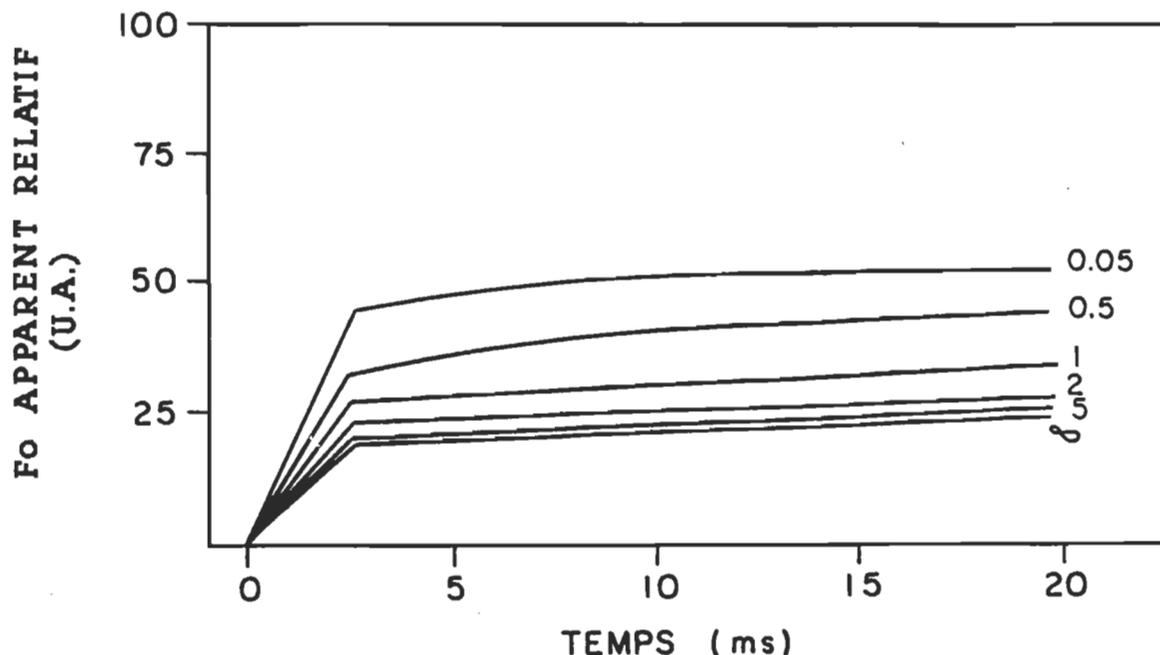


Figure 4.5 Accroissements initiaux des cinétiques de fluorescence (sur des plantules d'orge) après une période de préillumination de 2 s. Les numéros indiquent le délai (s) entre la fin de la période de préillumination et la mesure. Voir le texte pour plus de détails.

accepteurs d'électrons du PSII. La figure 4.7 présente un exemple de cinétiques d'induction de fluorescence en absence (courbe a) et en présence (courbe c) de DCMU. Ces cinétiques ont été obtenues avec l'algue verte *Dunaliella tertiolecta* sous une illumination de  $3.5 \text{ mW/cm}^2$  en lumière bleue. La concentration en chlorophylle totale était de  $7 \mu\text{g chl/ml}$  et la concentration du DCMU à  $20 \mu\text{M}$ .

Il est connu que le mercure agit comme inhibiteur de la chaîne de transport d'électrons au niveau du PSI (Hader et

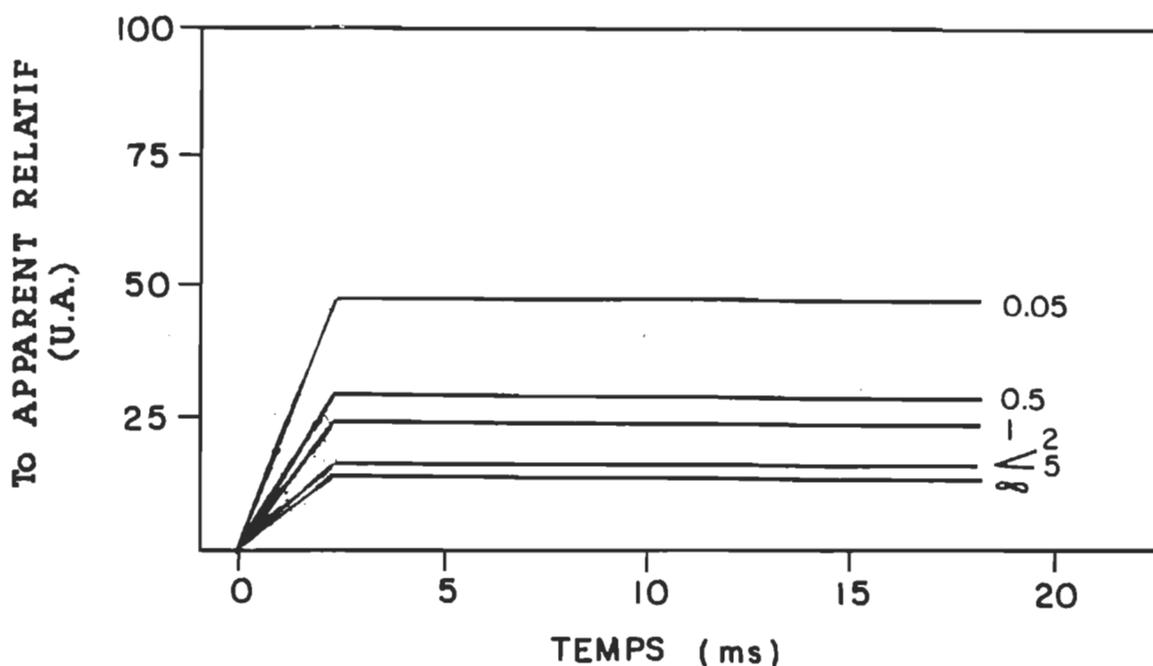


Figure 4.6 Accroissements initiaux des cinétiques de la dissipation thermique (sur des plantules d'orge) après une période de préillumination de 2 s. Les numéros indiquent le délai (s) entre la fin de la période de préillumination et la mesure. Voir le texte pour plus de détails.

Tevini 1987, De Filippis *et al.* 1981, Yocum et Guikema 1977) et du côté oxydant du PSII (De Filippis *et al.* 1981). Cette inhibition entraîne une diminution de la fluorescence variable (figure 4.7, courbe b) et de la fluorescence en présence de DCMU (figure 4.7, courbe d) en n'affectant pas la fluorescence constante  $F_0$ . La concentration de mercure utilisée ici était de  $150 \mu\text{M}$  et les algues sont incubées dans le noir pendant 30 min. La présence de mercure n'affecte pas les antennes collectrices de lumière mais

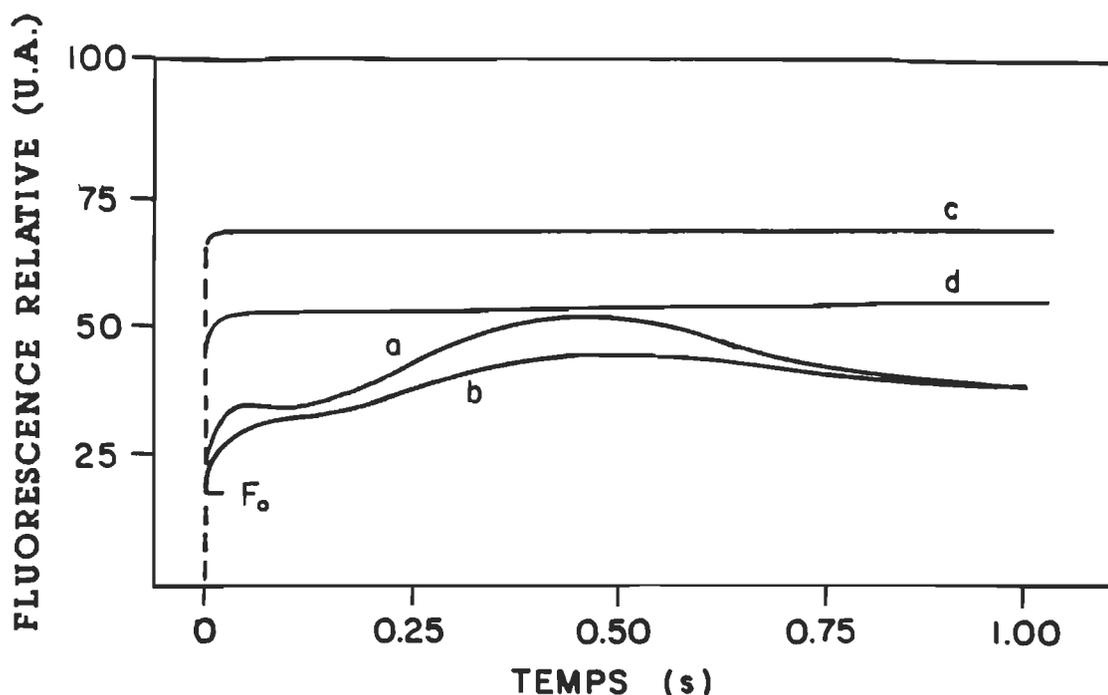


Figure 4.7 Cinétiques d'induction de fluorescence chez l'algue verte *D. tertiolecta*. (a) témoin sans traitement; (b) addition de 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$ ; (c) témoin avec 20  $\mu\text{M}$  de DCMU; (d) 20  $\mu\text{M}$  DCMU + 150  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ . Voir le texte pour plus de détails.

diminue la quantité d'électrons arrivant et utilisés au niveau du PSII par inhibition de son côté oxydant.

L'abaissement des cinétiques de fluorescence en présence de DCMU est caractéristique d'une inhibition du côté oxydant du PSII. Le DCMU et le mercure seront donc utilisés comme agents inhibiteurs afin d'étudier l'effet d'une inhibition du côté réduit du PSII (par le DCMU) et du côté oxydant (par le mercure) sur les cinétiques de la dissipation thermique.

La figure 4.8 présente les résultats de cette analyse. Ces

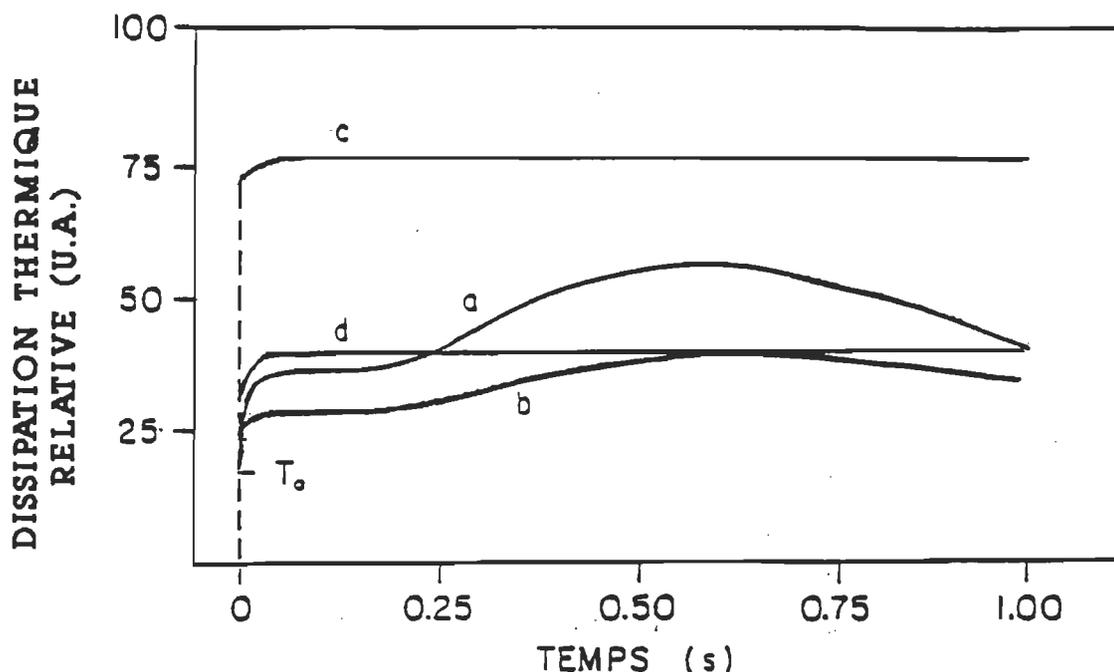


Figure 4.8 Cinétiques d'induction de la dissipation thermique chez l'algue verte *D. tertiolecta*. (a) témoin sans traitement; (b) addition de 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$ ; (c) témoin avec DCMU; (d) 10  $\mu\text{M}$  DCMU + 150  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ . Voir le texte pour plus de détails.

derniers ont été obtenus dans les mêmes conditions que la figure 4.7 sauf pour la concentration en chlorophylle totale utilisée qui était de 25  $\mu\text{g chl/ml}$ . Il est intéressant de constater que la présence de mercure sur les échantillons (figure 4.8, courbe c) diminue la cinétique de la dissipation thermique de référence (figure 4.8, courbe a). En présence de DCMU, qui isole le PSII, la cinétique de dissipation thermique atteint rapidement un maximum correspondant (par rapport aux résultats antérieurs) à la réduction des accepteurs  $\text{Q}_\text{A}$  du PSII (figure 4.8, courbe c).

En présence de mercure et de DCMU (figure 4.8, courbe d), le niveau maximum diminue comme en fluorescence.

Il semble donc par rapport à ces résultats que les cinétiques de la dissipation de chaleur et de la fluorescence sont parallèles quelque soit la localisation de l'inhibition, confirmant une fois de plus que l'émission thermique est une manifestation différente provenant du même processus que la fluorescence.

## CHAPITRE 5

### APPLICATION DE LA FLUORESCENCE A L'ETUDE DE L'ADAPTATION DE L'ALGUE VERTE *Dunaliella tertiolecta* A UNE CROISSANCE A BASSE TEMPERATURE.

#### 5.1 Introduction

Outre la lumière et l'apport d'éléments nutritifs, la température est certes le plus important facteur pouvant influencer la physiologie du phytoplancton. Pour cette raison, plusieurs auteurs ont tenté de déterminer les effets sur la physiologie à court (quelques minutes à quelques heures) et à long terme (plus d'un jour) de l'effet des basses températures (Goldman 1977, Morris et Glover 1974, Jorgensen 1968). En dépit de ces efforts, le mécanisme exact de l'adaptation à une faible température de croissance (à long terme) n'est pas bien compris (Li 1980).

Les réactions de la phase lumineuse sont généralement considérées comme indépendantes de la température. De plus, le taux de fixation du carbone par unité de chlorophylle a ne semble que très peu affecté par une courte exposition à de faibles températures (Rhee 1982).

D'un autre point de vue, il semble que l'exposition à long terme à de faibles températures peut affecter la structure et la dynamique de l'appareil photosynthétique. Pour

beaucoup d'espèces d'algues, la croissance à faible température résulte en une perte de l'efficacité à fixer le carbone indiquant que les réactions de la phase lumineuse étaient aussi affectées (Collins et Boylen 1982, Miller et Kamykowski 1986). L'augmentation ou la décroissance du contenu en chlorophylle a à faible température suggère aussi que la structure de l'appareil photosynthétique peut être affectée (Rhee 1982). La nature exacte et l'effet de la température sur les réactions de la phase lumineuse ne sont pas encore connus.

Puisque les réactions de la phase lumineuse et de la phase obscure sont intimement liées (Lawlor 1987), il est possible que la structure et les composantes de l'appareil photosynthétique à faible température soient des façons d'ajuster la demande en ATP et NADPH de la cellule.

Le but de ce chapitre est d'analyser l'adaptation à long terme, de la structure de l'appareil photosynthétique chez *Dunaliella tertiolecta* cultivée à 12°C et 20°C utilisant les cinétiques d'induction de la fluorescence.

## 5.2 Matériel et méthodes

Pour cette expérience, les algues vertes *Dunaliella tertiolecta* ont été cultivées dans le milieu de culture décrit par Harrison *et al.* (1980) pendant une période de 25

jours à des températures de 12°C et 20°C. Les cultures sont gardées en phase exponentielle de croissance (mesurée par un fluorimètre de type Turner Designs<sup>®</sup> Model 10) par dilution dans le milieu de culture frais. Toutes les cultures sont illuminées en permanence à un taux de 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Biospherical instrument QSL 100 4 quantum sensor).

L'isolation et l'estimation du contenu en chlorophylle a sont effectuées par la méthode décrite à la section 2.4. La concentration en chlorophylle a a cependant été ajustée à 1.2  $\mu\text{g chl a/ml}$ .

Les cinétiques de fluorescence ont été évaluées par le thermo-fluorimètre décrit à la section 2.2 de ce travail. Les différents paramètres photosynthétiques (bilan énergétique) ont été évalués en utilisant le logiciel de traitement décrit à la section 2.3 et basés sur les relations des paramètres photosynthétiques de la section 1.7.

### 5.3 Résultats et discussion

La figure 5.1 présente les cinétiques d'induction de fluorescence chez *Dunaliella tertiolecta* adaptée aux températures de croissance citées plus haut. Comme l'indique la figure, le niveau de fluorescence au point P est retardé pour les algues à 12°C. On peut noter aussi que les algues à 20°C possèdent un plus faible niveau de la fluorescence constante que celles à 12°C. Ces résultats démontrent que la

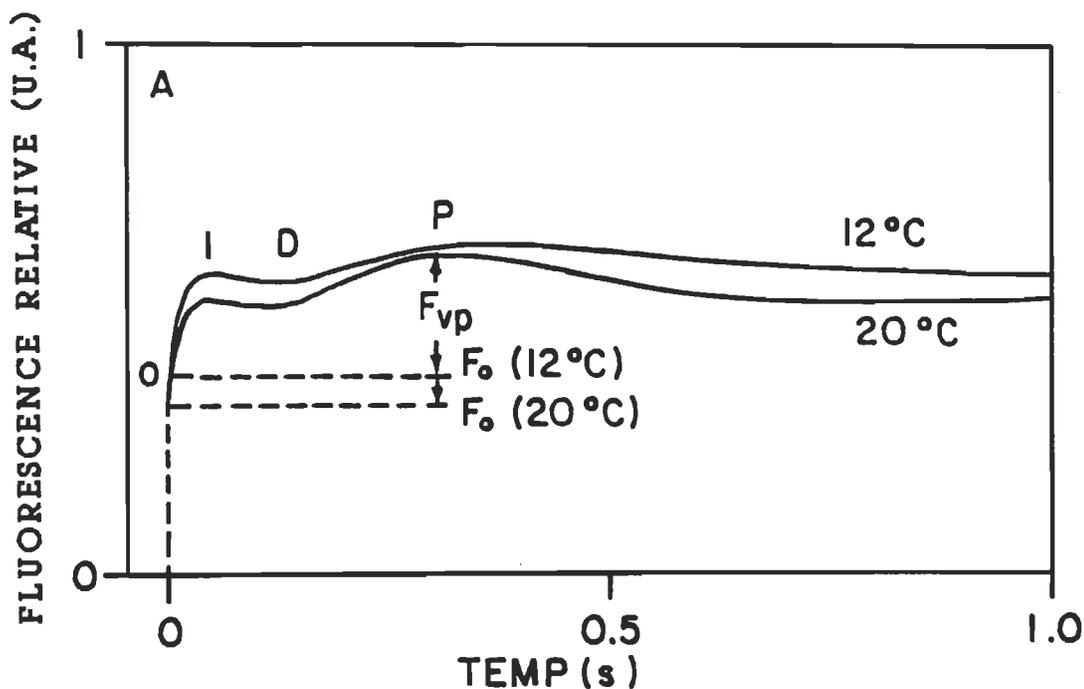


Figure 5.1 Courbes d'induction de fluorescence chez *D. tertiolecta* cultivée à 12°C et 20°C. Voir le texte pour plus de détail.

fluorescence variable  $F_{vp}$  évaluée au niveau P est plus faible à 12°C comparativement à 20°C. Pour leur part, les niveaux I et D sont similaires pour les deux températures de croissance utilisées. Il est aussi à noter que la fluorescence  $F_p$  (évaluée au niveau P) est moins atténuée à 12°C comparativement aux algues à une température de croissance de 20°C. Ce comportement des cinétiques indique une décroissance dans le taux d'oxydation du complexe transporteur d'électrons PSII-PSI par l'accepteur terminal d'électrons et ce, pour les algues à une température de

croissance de 12°C.

Les niveaux de fluorescence en présence de DCMU sont présentés à la figure 5.2. Les deux cinétiques atteignent le même niveau maximal de fluorescence  $F_M$ . Cependant, la fluorescence variable  $F_{VM}$  en présence de DCMU est plus haute pour les algues dont la température de croissance est à 20°C comparativement à celle à 12°C. Ces différences dans les niveaux de fluorescence variable (en présence de DCMU) reflètent la capacité maximale du transport d'électrons. D'après les résultats obtenus, il semble que les algues à une température de croissance de 20°C possèdent une plus grande capacité dans le transport d'électrons que celles à 12°C.

Les différents paramètres photosynthétiques et les valeurs numériques des niveaux de fluorescence des figures 5.1 et 5.2, évalués à partir des courbes d'induction de fluorescence à ces deux températures, sont présentés au tableau 5.1. Chaque valeur représente la moyenne plus ou moins l'écart type de trois échantillons indépendants. Les moyennes obtenues pour chacune des températures sont comparées avec le test "t" de Student en supposant que les valeurs sont réparties de façon normale autour de la moyenne.

Il est évident d'après ces résultats que la fluorescence constante  $F_0$  augmente de 22% pour les algues à 12°C comparativement à 20°C. Cette plus haute valeur du niveau de fluorescence  $F_0$  à 12°C indique une plus faible facilité dans

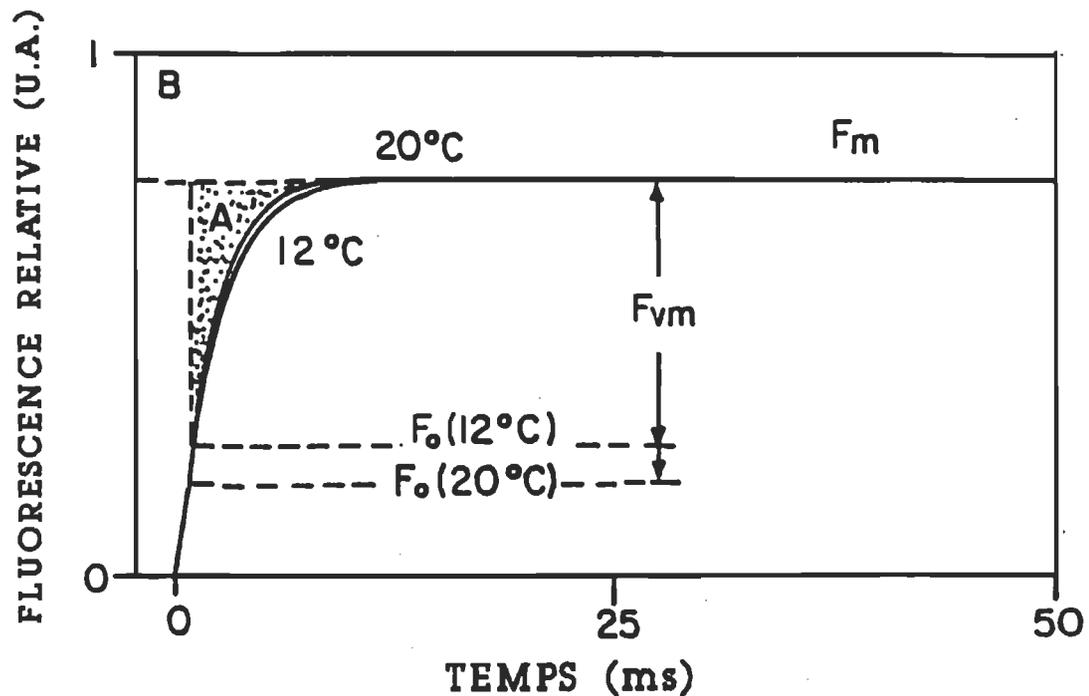


Figure 5.2 Courbes d'induction de fluorescence chez *D. tertiolecta* cultivée à 12°C et 20°C en présence de DCMU. La région ombragée représente l'aire complémentaire. Voir le texte pour plus de détail.

le transfert d'énergie entre les antennes et les centres réactionnels du PSII. Des résultats similaires ont été obtenus par Griffith *et al.* en 1984 utilisant des plantes supérieures. Cette décroissance dans l'efficacité du transfert de l'énergie peut résulter d'une séparation entre les complexes capteur de lumière (CCL) et les centres réactionnels du PSII (Prézelin 1981).

Pour sa part, la fluorescence variable  $F_v$  est 11% plus faible à 12°C comparativement à 20°C. Comme il est expliqué plus haut, cette diminution, avec un effet de retard (figure 5.1), indique une décroissance dans l'oxydation des

Tableau 5.1 Paramètres photosynthétiques évalués des cinétiques de fluorescence chez l'algue verte *Dunaliella tertiolecta* cultivée à 12°C et 20°C

PARAMETRES PHOTOSYNTHETIQUES	TEMPERATURE DE CROISSANCE		TEST DE STUDENT P
	12°C	20°C	
<u>SANS DCMU</u>			
FLUORESCENCE CONSTANTE (F <sub>0</sub> )	41.1 ± 1.0	31.9 ± 0.6	< 0.01
FLUORESCENCE VARIABLE (F <sub>v</sub> )	37.3 ± 1.6	42.0 ± 0.8	< 0.01
<u>AVEC DCMU</u>			
FLUOR. VARIABLE MAX. (F <sub>vM</sub> )	55.6 ± 2.2	62.5 ± 2.2	< 0.01
RENDEMENT QUANTIQUE (Φ)	0.57 ± .01	0.66 ± .01	< 0.01
DIMENSION DE Q <sub>A</sub> (A/F <sub>vM</sub> )	9.8 ± 0.4	8.8 ± 0.2	N.S.
TAUX DE PHOTOREDUCTION (K)	772 ± 0	816 ± 0	< 0.01

$$F_v = F_p - F_0 \quad : \quad F_{vM} = F_M - F_0$$

$$\Phi = 1 - (F_0 / F_M) \quad : \quad K = d/dt \ln (F_{vM} - F(T))$$

A = AIRE COMPLEMENTAIRE

N.S. VALEUR NON SIGNIFICATIVE

transporteurs d'électrons.

Les valeurs numériques du tableau 5.1 indiquent une diminution de 11% des niveaux  $F_{VM}$  (en présence de DCMU) pour les algues à 12°C comparativement à 20°C et sont expliquées par une diminution de la capacité du transport d'électrons (figure 5.2). Cette diminution entraîne une baisse du rendement quantique de 14% chez les algues adaptées à 12°C comparativement à celles adaptées à 20°C. La croissance des algues à une température de 12°C ne semble pas entraîner de variations majeures dans la dimension de l'appareil photosynthétique chez l'algue *Dunaliella tertiolecta*. De fait, l'aire complémentaire normalisée ( $A/F_{VM}$ ) des cinétiques de fluorescence avec DCMU n'est pas significativement différente entre les deux températures de croissance. Puisque les valeurs de  $A/F_{VM}$  sont proportionnelles au nombre d'accepteurs primaires d'électrons  $Q_A$  (Lavorel *et al.* 1986), nous pouvons conclure que les algues adaptées à 12°C possèdent le même nombre de centres réactionnels du PSII par unité de chlorophylle que celles adaptées à 20°C.

Le taux de photoréduction de l'accepteur primaire  $Q_A$  (paramètre K) est 7% plus faible à 12°C qu'à 20°C. Cette décroissance est probablement le résultat de la diminution de l'efficacité du transfert d'énergie entre les antennes et les centres réactionnels du PSII. La décroissance du transfert de l'énergie à 12°C est possiblement une

conséquence d'un mécanisme de protection empêchant une photoinhibition.

Les analyses biochimiques (non montrées) sur les échantillons révèlent (à 12°C) une augmentation de la quantité d'enzymes utilisée pour la réduction du CO<sub>2</sub> mais une diminution de sa vitesse de fixation. On observe aussi à 12°C, une réduction de la vitesse de croissance de l'algue. Donc, d'une façon générale, l'algue verte *Dunaliella tertiolecta* semble utiliser l'énergie lumineuse pour augmenter la quantité d'enzymes afin de compenser la diminution de la vitesse de fixation du CO<sub>2</sub>. Cette utilisation de l'énergie entraîne une diminution de la croissance afin d'optimiser l'efficacité à 12°C. Etant donné que la chaîne de transport d'électrons semble intacte, la diminution de la vitesse de fixation du CO<sub>2</sub> entraîne une diminution du rendement photochimique. La diminution dans le transfert de l'énergie vers les centres réactionnels est possiblement un moyen de protection pour éviter une photoinhibition.

## CHAPITRE 6

### APPLICATION DE LA FLUORESCENCE A L'ETUDE DE L'EFFET INHIBITEUR DU CUIVRE CHEZ L'ALGUE VERTE *Dunaliella* *tertiolecta*.

#### 6.1 Introduction

L'effet inhibiteur du cuivre sur la chaîne de transport d'électrons fût rapporté par plusieurs auteurs en utilisant des plantes supérieures et des algues microscopiques. De ces travaux, il a été démontré que le cuivre affectait la chaîne des transporteurs d'électrons à plusieurs sites, dont un du côté réduit du photosystème I au niveau de la ferredoxine (Shioi *et al.* 1978a, Bonher *et al.* 1980), et l'autre du côté oxydant du photosystème II (Singh et Singh 1987). Shioi *et al.* (1978b) proposèrent que le cuivre bloquait le transport d'électrons après le site de donation d'électrons par le DPC (diphénylcarbazine). Cependant, Vierke et Struckmeier (1977) identifiaient un second site d'inhibition situé avant le site d'action du DPC.

Par rapport à ces travaux, le but de ce chapitre est de décrire par fluorescence l'effet et le site d'action du cuivre sur la photochimie du photosystème II.

## 6.2 Matériel et méthodes

Les algues vertes *Dunaliella tertiolecta* ont été cultivées et préparées par la méthode décrite à la section 2.4. Les cinétiques de fluorescence ont été mesurées par le thermofluorimètre décrit à la section 2.2 de ce travail. Les différents paramètres photosynthétiques (bilan énergétique) ont été évalués en utilisant le logiciel de traitement décrit à la section 2.3 et basé sur les relations des paramètres photosynthétiques de la section 1.7. Pour l'évaluation des paramètres photosynthétiques, une concentration de 5  $\mu\text{M}$  de DCMU a été utilisée et les échantillons sont incubés pendant 5 min. avant la mesure.

## 6.3 Résultats et discussion

La figure 6.1a présente l'effet du cuivre sur les cinétiques d'induction de la fluorescence. Comme on peut le constater, une augmentation de la concentration de cuivre (de 25 à 100  $\mu\text{M}$ ) entraîne une diminution progressive des cinétiques de fluorescence. Cet effet est beaucoup plus prononcé au niveau P ( $F_p$ ) des cinétiques. Il est à noter que la fluorescence constante  $F_0$  n'a pas changé lors des mesures, indiquant que les concentrations de cuivre utilisées ici n'affectaient pas les complexes capteurs de lumière. Des résultats similaires furent rapportés par Shioi *et al.* (1978b) et Bohner *et al.* (1980).

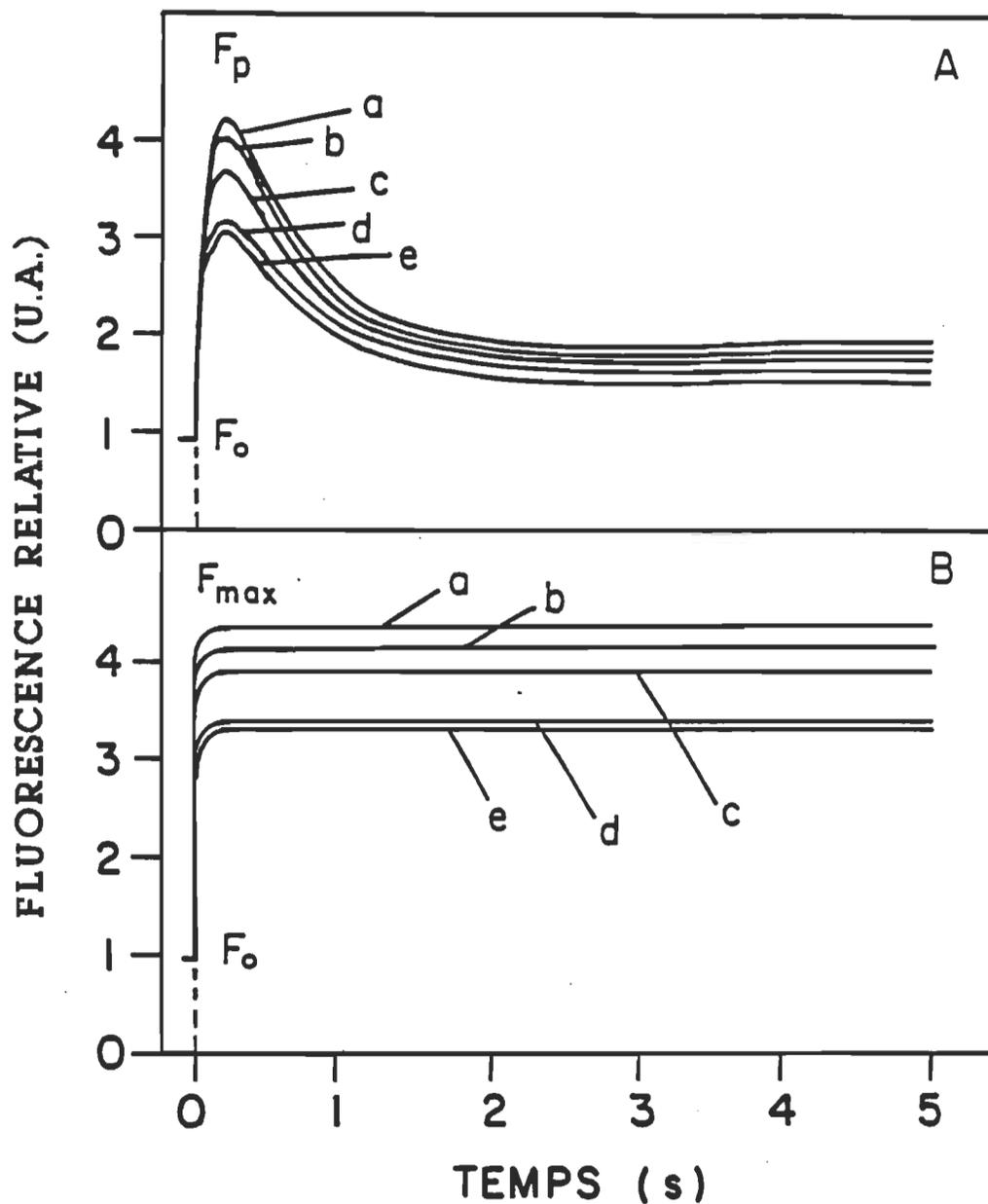


Figure 6.1 Courbes d'induction de fluorescence chez *D. tertiolecta* incubées 15 min. en présence de différentes concentrations de CuSO<sub>4</sub>. (A) Cellules intactes; (a) contrôle (sans addition de cuivre); (b) 25  $\mu\text{M}$  (c) 50  $\mu\text{M}$  (d) 75  $\mu\text{M}$  (e) 100  $\mu\text{M}$  et (B) cellules traitées au DCMU; a, b, c, d et e correspondent aux concentrations comme en (A).

Afin de visualiser l'effet du cuivre sur l'activité du PSII, les échantillons furent traités par l'herbicide DCMU. Il semble que l'effet du cuivre sur la fluorescence maximale ( $F_{MAX}$ ) est similaire (figure 6.1b) à celui de la fluorescence variable au niveau  $F_D$ . Cette diminution des cinétiques de fluorescence sans et avec DCMU démontre bien l'effet inhibiteur du cuivre au niveau du PSII.

Afin d'isoler le site d'action du cuivre au niveau du PSII, des cinétiques d'induction de fluorescence furent mesurées (en présence de cuivre) lorsque le donneur d'électrons au niveau du PSII est l'eau ou l'hydroxylamine. L'hydroxylamine est un composé analogue à l'eau qui agit (à une concentration de 10 mM) comme inhibiteur du système de dégagement d'oxygène et comme donneur d'électrons à Z au niveau du PSII (Bennoun, 1970).

La figure 6.2 présente les cinétiques d'induction de fluorescence en présence de cuivre et/ou  $NH_2OH$ . Il est évident que le niveau maximal induit par le DCMU (courbe a) ou par l'addition de  $NH_2OH+DCMU$  (courbe b), est grandement diminué en présence de cuivre (courbe c et d). En se basant sur le rôle du  $NH_2OH$  décrit plus haut, les résultats de la figure 6.2 indiquent que l'effet du cuivre est bien situé au niveau du côté oxydant du PSII et agit après le site de donation d'électrons par l'hydroxylamine (Hsu et Lee 1988). L'effet de la concentration de cuivre sur le niveau  $F_{VMAX}$  est présenté à la figure 6.3a. Comme on peut le constater,

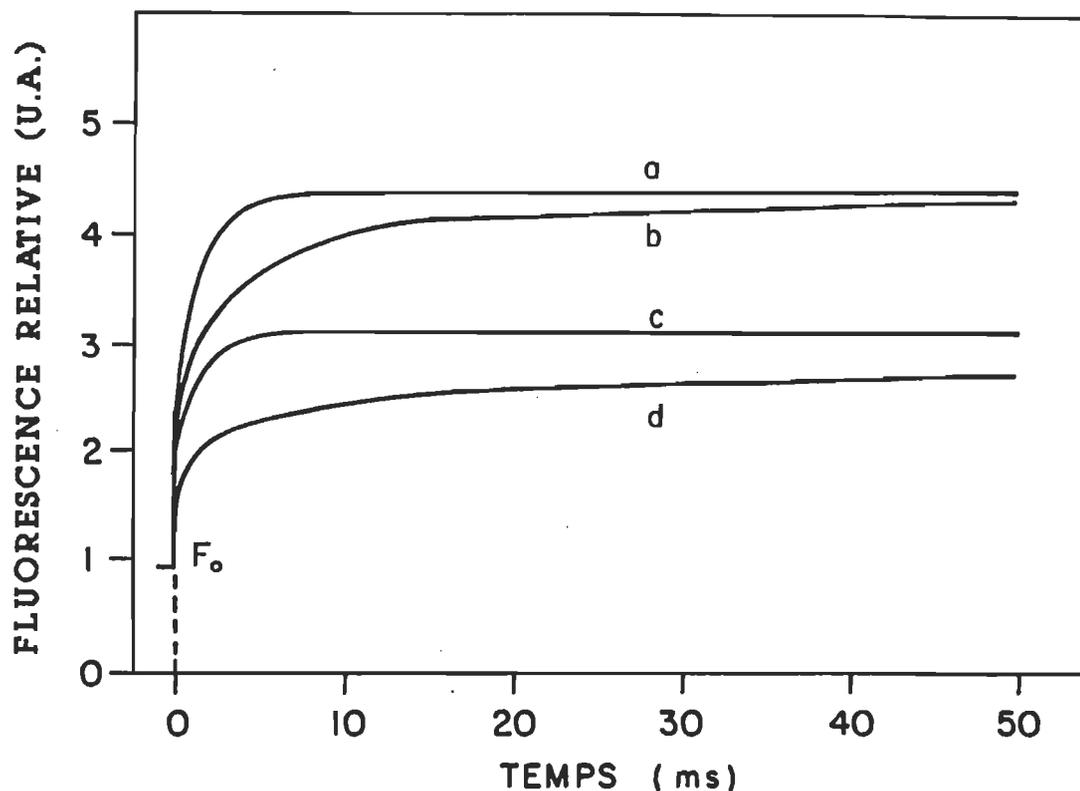


Figure 6.2 Courbes d'induction de fluorescence (en unités arbitraires) en présence de DCMU et d'additifs (a) DCMU comme contrôle; (b) 10 mM  $\text{NH}_2\text{OH}$ ; (c) 70  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ; (d) 10 mM  $\text{NH}_2\text{OH}$  + 70  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ .

une augmentation de la concentration de cuivre entraîne une baisse graduelle du niveau maximum des cinétiques d'induction de fluorescence en présence de DCMU. Comme la fluorescence variable maximale représente la capacité du transport d'électrons, une réduction de ce niveau, sans changement de la fluorescence constante  $F_0$ , implique une diminution du rendement photochimique  $\Phi$  (section 2.3 et

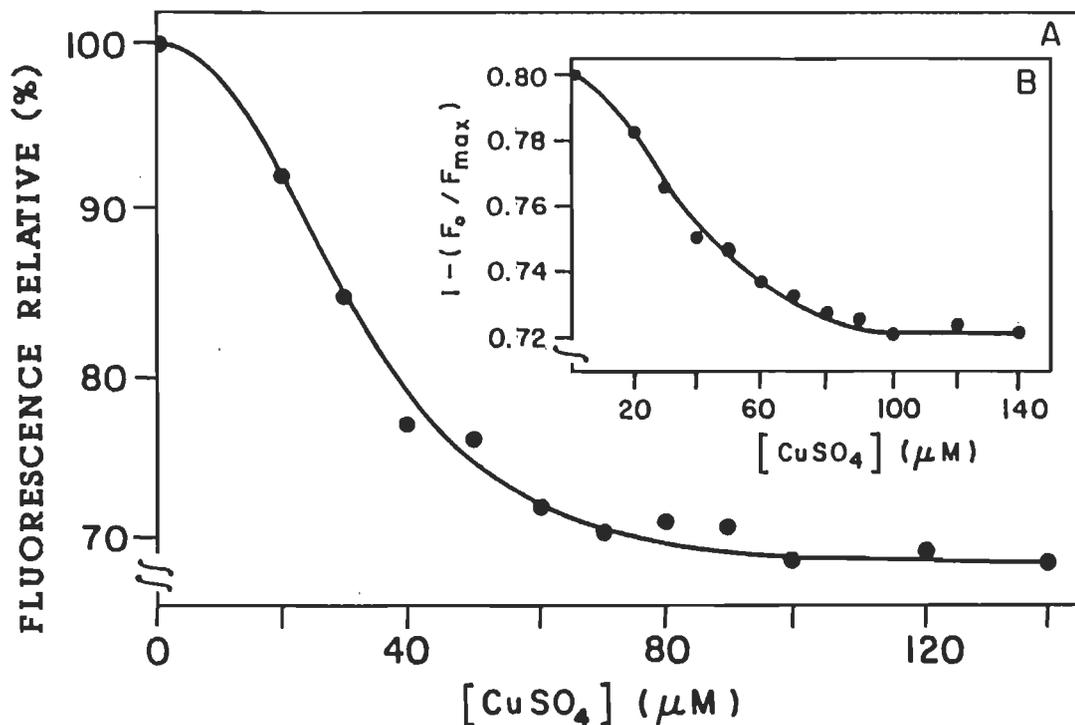


Figure 6.3 (A) Fluorescence variable maximale (en %) en présence de DCMU et en fonction de la concentration de  $\text{CuSO}_4$ . (B) Rendement photochimique de la fluorescence en fonction de la concentration de  $\text{CuSO}_4$ .

1.7). Cette diminution présentée à la figure 6.3b, est due à l'inhibition du transport d'électrons du côté oxydant du photosystème II par le cuivre.

En vue de mieux comprendre le mode d'action du cuivre en relation au bilan énergétique, le taux (vitesse) de photoréduction (K) de l'accepteur primaire  $Q_A$  et l'aire

complémentaire (section 2.3 et 1.7) furent mesurés en présence de DCMU à différentes concentrations de cuivre. Les résultats de ces analyses sont présentés à la figure 6.4. Il est intéressant de constater que le taux de photoréduction de l'accepteur  $Q_A$ , noté  $K$ , ne varie pas en fonction des concentrations de cuivre utilisées ici (courbe a). Par contre, l'augmentation de la concentration de cuivre entraîne une diminution drastique de la surface complémentaire (figure 6.4, courbe b) correspondant aux nombres de centres réactionnels photochimiquement actifs. Puisque le rendement photochimique  $\Phi$  du PSII diminue parallèlement à l'aire complémentaire et ce, pour un taux de photoréduction constant en fonction de la concentration de cuivre, les résultats obtenus ici permettent de conclure qu'une partie des centres réactionnels est inactivée par la présence de cuivre. De plus, cet effet semble être de type tout ou rien. Les résultats obtenus suggèrent donc que les centres réactionnels du PSII sont de nature hétérogène par leur sensibilité à l'effet du cuivre.

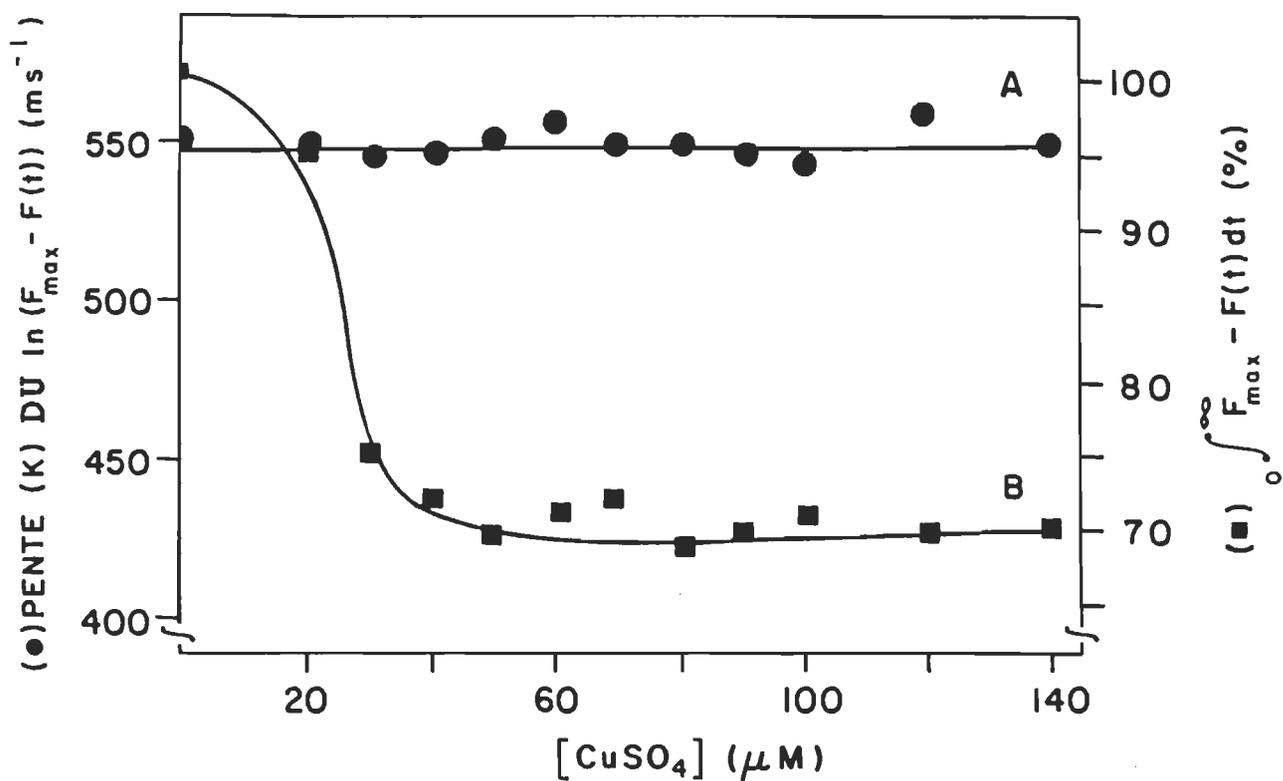


Figure 6.4 (A) Taux de photoréduction de  $Q_A$  (K) en présence de DCMU et (B) aire complémentaire en présence de DCMU chez les algues incubées avec différentes concentrations de  $\text{CuSO}_4$ .

## CONCLUSION

Cette thèse a présenté des résultats originaux de recherches fondamentales et appliquées dans le domaine de la photosynthèse. Les résultats présentés dans ce travail ont été obtenus à l'aide d'un système d'évaluation de la fluorescence et de la dissipation thermique d'échantillons *in vitro* et *in vivo*. L'acquisition et le traitement des données sont effectués par un micro-ordinateur jumelé à un oscilloscope digital. Le temps d'acquisition peut varier de quelques millisecondes (20 ms) à plusieurs minutes. Ce domaine de temps permet la visualisation des variations rapides (niveaux O-I-D-P) de l'effet Kautsky en fluorescence et pour la première fois, en dissipation thermique. L'analyse de ces cinétiques nous indiquent l'état d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons de la membrane du chloroplaste. Le logiciel de traitement des données présenté au chapitre 2 (et donné en annexe 2) évalue les principaux paramètres photosynthétiques suivants: les portions constantes et variables, le taux de photoréduction de l'accepteur  $Q_A$ , le rendement photochimique, le nombre et la nature des centres réactionnels du PSII.

Le chapitre 3 a démontré que l'évaluation de la fluorescence constante  $F_0$  était plus précise et plus reproductible par l'utilisation d'une extrapolation basée sur une fonction de

puissance comparativement à une fonction linéaire. Les limites de la méthode furent obtenues par réduction partielle de l'accepteur  $Q_A$ . Ce chapitre présente aussi le temps d'adaptation, après une préillumination de 2 s, sur des algues intactes *Dunaliella tertiolecta* (adaptation minimale de 10 s) et sur des thylacoïdes d'orge (adaptation minimale de 90 s) en absence d'accepteurs d'électrons. C'est uniquement après ces temps d'adaptation que la valeur de  $F_0$  est précise et reproductible.

Le chapitre 4 a présenté pour la première fois, des mesures directes des cinétiques de la dissipation thermique parallèlement aux cinétiques de fluorescence et ce, pour les premières secondes (ou moins) après le début de l'illumination. De ces mesures, il appert que pour un  $F_0$  (en fluorescence) correspond un  $T_0$  (en mesure thermique). De plus, la cinétique de la dissipation thermique possède les mêmes niveaux caractéristiques que la cinétique de fluorescence. Les résultats démontrent que ces deux formes dissipatives provenaient du même phénomène et qu'il y a partage de l'énergie entre les formes dissipatives. Une inhibition du côté réduit (par le DCMU) du PSII entraîne une augmentation de la fluorescence et de la dissipation thermique. Une inhibition du côté oxydant (par le mercure) et du côté réduit (par le DCMU) entraîne une diminution de fluorescence ainsi qu'une diminution de la dissipation thermique.

Le chapitre 5 présentait une application du thermo-fluorimètre à l'étude de l'adaptation de l'algue verte *Dunaliella tertiolecta* à une température de croissance de 20°C et 12°C. Les cinétiques de fluorescence et les résultats obtenus d'une analyse biochimique ont démontré que l'algue verte à une température de croissance de 12°C utilisait l'énergie lumineuse pour augmenter sa quantité d'enzymes afin de compenser une diminution de la vitesse de fixation du CO<sub>2</sub>. Cette utilisation de l'énergie entraîne une diminution de la vitesse de croissance mais semble ainsi optimiser son efficacité à cette température. De plus, il semble que la chaîne de transport d'électrons demeure intacte pour ce type d'algue. En fait, aucune différence sur le nombre de centres réactionnels a été observée. L'intégrité des composantes de l'appareil photosynthétique parallèlement à la diminution de la vitesse de fixation du CO<sub>2</sub> entraîne une diminution du rendement photochimique. Cette diminution provoque possiblement un détachement partiel des antennes collectrices de lumière pour empêcher une photoinhibition.

Le chapitre 6 présentait une seconde application du thermo-fluorimètre et des paramètres photosynthétiques pour l'étude de l'effet du cuivre sur la photochimie du PSII chez l'algue verte *Dunaliella tertiolecta*. Cette étude est aussi basée sur les cinétiques d'induction de la fluorescence. D'après les résultats obtenus, 30% de la fluorescence variable est

diminuée en présence de  $70 \mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ . Ce chapitre confirme aussi que l'effet du cuivre sur la photochimie du PSII était situé sur son côté oxydant. De plus, il semble que la surface complémentaire diminue en présence de cuivre. Puisque le rendement photochimique diminue sans affecter le taux de photoréduction de l'accepteur d'électrons  $\text{Q}_\lambda$ , les résultats du bilan énergétique indiquent qu'une partie des centres réactionnels est touchée par la présence de cuivre.

La connaissance complète du fonctionnement du processus photosynthétique et de ses modifications face au milieu amène encore beaucoup d'interrogations. C'est par le développement de nouvelles techniques et de nouvelles théories que nous serons en mesure de mieux comprendre et de maîtriser son mode de fonctionnement. La thèse présentée ici apporte de nouvelles techniques de mesure et d'évaluation ainsi que des connaissances fondamentales et appliquées, en particulier sur la façon par laquelle les plantes supérieures et les algues vertes utilisent l'énergie lumineuse absorbée pour la photosynthèse. L'utilisation de paramètres précis aide à l'interprétation des résultats appelé le "bilan énergétique".

## REFERENCES

- Anderson, J.M. et Melis, A. (1983) Localization of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 745-749.
- Andreasson, L.E., et Vangard, T. (1988) Electron transport in photosystem II and I. Ann. Rev. Plant Physiol. 39, 379-411.
- Aoki, K., Ideguchi, T., Kakuno, T., Yamashita, J., et Horio, T. (1986) Effects of NaCl and glycerol on photosynthetic oxygen-evolving activity with thylacoids membranes for halophilic green alga Dunaliella tertiolecta. J. Biochem 100, 1223-1230.
- Barry, B.A., et Babcoch, G.T. (1987) Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 7099-7103.
- Beauregard, M. (1988) Modulation de l'activité et de la structure du photosystème II par les ions sulfite et sulfate. Thèse de doctorat. U.Q.T.R. 145 pp.
- Bennoun, P. (1970) Réoxydation du quencher de fluorescence "Q" en présence de 3-(3,4-dichlorophéyl)-1,1-diméthylurée. Biochim. Biophys. Acta. 216, 357-363.
- Benson, A.A., et Calvin, M. (1950) Carbon Dioxide fixation by green plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 1, 25-42.
- Bohner, H., Bohme, H. et Boger, P. (1980) Reciprocal formation of plastocyanin and cytochrome c-553 and the influence of cupric ion on photosynthetic electron transport. Biochim. Biophys. Acta. 592, 103-112.
- Breton, J. (1983) The emission of chlorophyll in *vivo*. Antenna fluorescence or ultrafast luminescence from the reaction center pigments. FEBS. 159(1,2), 1-5.
- Briantais, J.M., Vermotte, C., Krause, H.G., et Weis, E. (1986) Chlorophyll a fluorescence of higher plants, chloroplasts and leaves. In Light emission by plants and bacteria. J. Barber Ed., Academic Press, New York, pp. 539-583.
- Bults, G., Horwitz, B.A., Malkin, S., et Cahen, D. (1982) Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in whole leaves photochemistry and gas exchange. Biochim. Biophys. Acta. 679, 452-465.
- Bults, G., Nordal, P.E., et Kanstad, S.O. (1982) In Vivo studies of gross photosynthesis in attached leaves by means of photothermal radiometry. Biochim. Biophys. Acta. 682, 234-237.
- Buschmann, C. et Prehn, H. (1986) Photosynthetic parameters as measured via non-radiative de-excitation. In Biological control of photosynthesis. Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands, pp. 83-91.
- Buschmann, C. et Prehn, H. (1983) In vivo spectra of *Raphanus* and *Tradescantia* leaves taken at different

- chopping frequencies of the excitation light. Photobiochem. Photobiophys. 5, 63-69.
- Buschmann, C., et Prehn, H. (1981) In vivo studies of radiative and non-radiative de-excitation processes of pigments in *Raphanus seedlings* by photoacoustic spectroscopy. Photobiochem. Photobiophys. 2, 209-215.
- Buschmann, C., Prehn, H., et Lichtenthaler, H. (1984) Photoacoustic spectroscopy (PAS) and its application in photosynthesis research. Photosynth. Res. 5, 29-46.
- Butko, P., et Szalay, L. (1985) Photosystem II and its connection to the electron transport chain during the life cycle of *Chlorella*. Photobiochem. Photobiophys. 10, 93-103.
- Butler, W.L. (1980) Energy transfer between photosystem II units in a connected package model of the photochemical apparatus of photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 4697-4701.
- Butler, W.L., et Kitajima, M. (1975) Energy transfer between photosystem II and photosystem I in chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 396, 72-85.
- Cao, J. et Govindjee (1990) Chlorophyll *a* fluorescence transient as an indicator of active and inactive Photosystem II in thylakoid membranes. Biochim. Biophys. Acta. 1015, 180-188.
- Carpentier, R., Leblanc, R.M., et Mimeault, M (1989) Photoacoustic detection of photosynthetic energy storage in photosystem II submembrane fraction. Biochim. Biophys. Acta. 975, 370-376.
- Clayton, R.K. (1980) Photosynthesis. Physical mechanisms and chemical patterns. Cambridge University Press. Cambridge.
- Collins, C.D., et Boylen, C.W. (1982) Physiological responses of *Anabaena variabilis* (cyanophyceae) to instantaneous exposure to various combination of light intensity and temperatures. J. Phycol. 18, 206-211.
- De Filippis, L.F., Hampp, R., et Ziegler, H. (1981) The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*. Arch. Microbiol. 128, 407-411.
- Delrieu, M.J. (1983) Evidence for unequal misses in oxygen flash yield sequence in photosynthesis. Z. Naturforsch. 38C, 247-258.
- Deng, X., et Melis, A. (1986) Phosphorylation of the light harvesting complex II in higher plant chloroplasts: effect on photosystem II and photosystem I absorption cross-section. Photobiochem. Photobiophys. 13, 41-52.
- Forster, T. (1965) Delocalized excitation and excitation transfer. In O. Sinanogulu (Ed.) Modern Quantum Chemistry (Vol.3) New York. Academic Press. pp. 97-137.
- Foyer, C.H. (1984) Photosynthesis. John Wiley & Sons, New York.
- Gerald, C.F. et Wheatley, P.O. (1985) Curve-fitting and approximation of functions. In Applied Numerical analysis, Addison-Wesley publishing company, London, pp. 530-560.

- Goldman, J.C. (1977) Temperature effects on phytoplankton growth in continuous culture. *Limnol. Oceanogr.* 22, 932-936.
- Govindjee, Downton, W.J.S., Fork, D.C., et Armond, P.A. (1981) Chlorophyll *a* fluorescence as an indicator of water potential in leaves. *Plant Sci. Lett.* 20, 191-194.
- Govindjee, Kambara, T. et Coleman, W. (1985) The electron donor side of photosystem II: the oxygen evolving complex. *Photochem. Photobiol.* 42, 187-210.
- Gregory, R.P.F. (1989) The green plant: Photosystem II. In Biochemistry of photosynthesis, John Wiley & Sons, New-York, pp. 98-121.
- Griffith, M., Huner, N.P.A., et Kyles, D.J. (1984) Fluorescence properties indicate that photosystem II reaction centers and light-harvesting complex are modified by low temperature growth in Winter Rye. *Plant Physiol.* 76, 381-385.
- Hader D.P. et Tevini M. (1987) General Photobiology. Pergamon Press, Oxford
- Harrisson, P.J., Waters, R.E., et Taylor, F.J.R. (1980) A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* 16, 28-35.
- Hodges, M. et Barber, J. (1986) Analysis of chlorophyll fluorescence induction kinetics exhibited by DCMU-inhibited thylakoids and the origin of  $\alpha$  and  $\beta$  centers. *Biochim. Biophys. Acta.* 848, 239-246.
- Hodges, M. et Barber, J. (1983) The significance of the kinetic analysis of fluorescence induction in DCMU-inhibited chloroplasts in terms of photosystem 2 connectivity and heterogeneity. *FEBS Lett.* 160, 177-181.
- Hooper, J.K. (1984) Chloroplasts. New York: Plenum Press, pp. 20-89.
- Hsu, B.D. et Lee, J.Y. (1988) Toxic effects of copper on photosystem II in spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 87, 116-119.
- Jorgensen, E.G. (1968) The adaptation of plankton algae II. Aspects of the temperature adaptations of *Skeletonema costatum*. *Physiol Plant.* 21, 423-427.
- Kanstad, S.O., Kahen, D. et Malkin, S. (1983) Simultaneous detection of photosynthetic energy storage and oxygen evolution in leaves by photothermal radiometry and photoacoustics. *Biochim. Biophys. Acta.* 722, 182-189.
- Kaplan, S., et Arntzen, C.J. (1982) Photosynthetic membrane structure and function. In Photosynthesis Vol. 1. Govindjee (ed.), Academic Press, New York, pp. 65-152.
- Katoh, S., et Yamagishi, A. (1984) Parallel inductive kinetics of fluorescence and photoacoustic signal in dark-adapted thalli of *Bryopsis maxima*. *Biochim. Biophys. Acta* 767, 185-191.
- Klimov, V.V., Klevanik, A.V., et Shuvalov, V.A. (1977) Reduction of pheophytin in the primary light reaction of photosynthesis. *FEBS Lett.*, 82, 183-186.

- Krause, G.H., et Weis, E. (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II, Interpretation of fluorescence signals. *Photosynth. Res.* 5, 139-157.
- Lakowicz, J.R. (1986) Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press. New York.
- Lavorel, J., Breton, J., et Lutz, M. (1986) Methodological principles of measurement of light emitted by photosynthetic system. In Light emission by plants and bacteria. J.Barber Ed., Academic Press, New York, pp. 57-99.
- Lavorel, J. et Etienne (1977) In Primary processes in photosynthesis. J.Barber ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 206-268.
- Lawlor, D.W. (1987) Photosynthesis: metabolism, control and physiology. Longman Scientific & Technical, New-York, 262 pp.
- Lehninger, A.L. (1982) Principles of biochemistry. Worth publishers inc., New York, pp. 645-680.
- Li, W.K.W. (1980) Temperature adaptation in phytoplankton: cellular and photosynthetic characteristics. In Falkowski, P.G. (Ed.) Primary productivity in the sea. Plenum Press, New-York, pp. 259-279.
- Malkin, S., Armond, P.A., Mooney, H.A., et Fork, D.C. (1981) Photosystem II photosynthetic unit sizes form fluorescence induction in leaves. Correlation to photosynthetic capacity. *Plant Physiol.* 67, 570-579.
- Malkin, S., Ford, G.A., et Fork, D.C. (1978) Computer-assisted measurements of parameters of the rise curve of fluorescence. Year book Carnegie Institution Washington. 199-201.
- Malkin, S. et Kok (1966) Fluorescence induction studies in isolated chloroplast I. Number of components involved in the reaction and quantum yield. *Biochim. Biophys. Acta.* 126, 413-432.
- Mandori, A. et Melis, A. (1986) Cyanobacterial acclimatation to photosystem I or photosystem II light. *Plant Physiol.* 82, 185-189.
- Melis, A. (1985) Functional properties of photosystem IIB in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 808, 334-342c
- Melis, A., et Duysens, L.N.M. (1979) Biphasic energy conversion kinetics and absorbance difference spectra of photosystem II of chloroplasts. Evidence for two different photosystem II reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta.* 29, 373-382.
- Melis, A., et Homann, P.H. (1975) Kinetic analysis of the fluorescence in 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea poisoned chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* 21, 431-437.
- Melis, A., et Schreiber, U. (1979) The kinetic relationship between the C-550 absorbance change, the reduction of Q and the variable fluorescence yield change in chloroplasts at room temperature. *Biochim. Biophys. Acta.* 547, 47-57.
- Miller, R.L., et Kamykowski, D.L. (1986) Effects of temperature, salinity, irradiance and diurnal periodicity

- on growth and photosynthesis in the diatom *Nitzschia americana* : Light saturated growth. *J. Phycol.* 22, 339-348.
- Moody, R.P., Weinberger, P. et Greenhalgh, R. (1983) Algal fluorometric determination of the potential phytotoxicity of environmental pollutants. In Aquatic toxicology (J.O. Nriagu Ed.), New-York, Vol. 13, pp. 504-512.
- Morissette, J.C., Meunier, P.C., et Popovic, R. (1988) Automatic integrating fluorometer using an Apple II and Scope-85. *Rev. Sci. Instrum.* 59(6), 934-936.
- Morissette, J.C. et Popovic, R. (1987) A new method for the separation of the constant and variable fluorescence of chlorophyll in in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149, 385-390.
- Morris, I., et Glover, H.E. (1974) Questions on the mechanisms of temperature adaptation in marine phytoplankton. *Mar. Biol.* 24, 147-154.
- Munday, J.C., et Govindjee (1969) Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll a in vivo. IV. The effect of preillumination on the fluorescence transient of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biophys. J.* 9, 22-35.
- Nelson, N. (1988) Structure, function, and evolution of proton ATPase. *Plant Physiol.* 86, 1-3.
- Nitsch, C. Braslavsky E.E. et Schatz, G. (1988) Laser-induced optoacoustic calorimetry of primary processes in isolated photosystem I and photosystem II particles. *Biochim. Biophys. Acta.* 934, 201-212.
- Ort, D.R. (1986) Energy transduction in oxygenic photosynthesis: an overview of structure and mechanism. In Photosynthesis III. "Photosynthetic Membranes and light Systems". *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 19. Eds Pirson A. et Zimmermann M.H. Springer-Verlag, Berlin pp. 143-196.
- Owens, T.G. (1986) Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. II Distribution of excitation energy between the photosystems. *Plant Physiol.* 80, 739-746.
- Papageorgiou, G. (1975) Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. In Govindjee (Ed.) Bioenergetic of photosynthesis. Academic Press, New York. pp. 319-371.
- Prézelin, B.B. (1981) Light reaction in photosynthesis. In Physiological bases of phytoplankton ecology. Platt, T. (ed.) *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 210, 346 pp.
- Renger, G. et Schulze, A. (1985) Quantitative analysis of fluorescence induction curves in isolated spinach chloroplasts. *Photobiochem. Photobiophys.* 9, 79-87.
- Rhee, G.Y. (1982) Effects of environmental factors and their interactions on phytoplankton growth. *Adv. Microbial Ecol.* 6, 33-74.
- Rutherford, A.W. (1989) Photosystem II, the water splitting enzyme. *TIBS.* 14, 227-232.

- Samson, G. (1989) Modifications du transport d'électrons dans le photosystème II inhibé par le mercure et le cuivre. Thèse de doctorat. U.Q.T.R. 137 pp.
- Samson, G., Morissette, J.C., et Popovic, R. (1988) Copper quenching in *Dunaliella tertiolecta*. New evidence for a copper inhibition effect on PSII photochemistry. *Photochem. Photobiol.* 48(3), 329-332.
- Samson, G., et Popovic, R. (1988) Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 16, 272-278.
- Satoh, K, et Katoh, S. (1981) Fluorescence induction in chloroplasts isolated from the green alga *Bryopsis maxima* IV. The I-D Dip. *Plant & Cell Physiol.* 22(1), 11-21.
- Savitzki, A., et Golay, M.J.E. (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry.* 36(8), 1627-1639.
- Scherrer, Bruno (1984) La régression. dans Biostatistique, Gaetan Morin Editeur, Chicoutimi, pp.423-724.
- Shioi, Y., Tamai, H., et Sasa, T. (1978a) Effects of copper on photosynthetic electron transport in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 19, 203-209.
- Shioi, Y., Tamai, H., et Sasa, T. (1978b) Inhibition of Photosystem II in the green alga *Anskintrodesmus falcatus* by copper. *Physiol. Plant* 44, 434-438.
- Sinclair, J., et Spence, S.M. (1988) The analysis of fluorescence induction transients from dichlorophenyldimethylurea-poisoned chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 935, 184-194.
- Singh, D.P., et Singh, S.P. (1987) Action of heavy metal on Hill activity and O<sub>2</sub> evolution in *Anacytis nidulas* *Plant Physiol.* 83, 12-14.
- Strain, H.H., Cope, B.T., et Svec, W.A. (1972) Analytical procedure for the isolation, identification, estimation, and investigation of the chlorophylls. In *Meth. Enzymol.* 23, 452-476.
- Strasser, Reto J. (1986) Mono- Bi- Tri- and Polypartite models in photosynthesis. *Photosynth. Res.* 10, 255-276.
- Thielen, A.P.G.M., et van Gorkom, H.J. (1981) Energy transfer and quantum yield in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta.* 637, 439-446.
- Tolvonen, P., et Vidaver, W. (1984) Integrating fluorometer for the measurement of chlorophyll fluorescence induction in intact plants. *Rev. Sci. Instrum.* 55(10), 1687-1690.
- Vanderkool, J.M., Berger, J. (1989) Excited triplet states used to study biological macromolecules at room temperature. *Biochim. Biophys.* 976, 1-27.
- van Gorkom, H. (1986) Fluorescence measurements in the study of photosystem II electron transport. In Light emission by plants and bacteria. J.Barber Ed., Academic Press, New York. pp. 267-289.
- Vierke, G., et Struckmeier, P. (1977) Binding in copper (II) to proteins of the photosynthetic membranes and its

- correlation with inhibition of electron transport in class II chloroplasts of spinach. *Z. Naturforsch.* 32c, 605-610.
- Walker, D.A. (1971) Chloroplasts (and grana): Aqueous (including high carbon fixation ability). *Meth. Enzymol.* 23, 211-220.
- Walker, D.A., Cerovic, Z.G., et Robinson, S.P. (1987) Isolation of intact chloroplasts: General principles and criteria of integrity. In *Meth. Enzymol.* 148, 145-157.
- Weis, E. (1985) Chlorophyll fluorescence at 77°K in intact leaves: Characterization of a technique to eliminate artifacts related to self-absorption. *Photosynth. Res.* 6, 73-86.
- Yavorski, B. et Detlaf, A. (1980) Aide-mémoire de physique. Ed. Mir, Moscou, pp. 736-741.
- Yocum, F.Y., et Guikema, J.A. (1977) Photophosphorylation associated with photosystem II cyclic photophosphorylation catalyzed by p-phenylenediamine. *Plant Physiol.* 49, 33-37.

ANNEXE I

Cette annexe présente le programme d'acquisition des données sur l'oscilloscope digital Scope 85 de la compagnie Northwest instruments.

```

JLOAD FSTAC
JLIST

```

```

10 PRINT
20 PRINT "*** ACQUISITION DES DONNEES ***"
30 PRINT
40 CLEAR
50 HOME
60 HCOLOR= 3
70 DIM YS(15),PS(19)
80 FOR I = 1 TO 10
90 YS(I) = 19 + I
100 NEXT I
110 FOR I = 1 TO 12
120 PS(I) = 19 + I
130 NEXT I
140 REM
150 REM INITIALISATION
160 REM
170 REM GRATICULE
180 POKE - 27356,128
190 REM TRIGGER
200 POKE - 27344,0
210 POKE - 27332,1
220 POKE - 27320,140
230 REM TIME BASE
240 POKE - 27308,19
250 REM CH1.
260 POKE - 27296,1
270 POKE - 27284,0
280 POKE - 27172,0
290 POKE - 27260,1
300 POKE - 27248,128
310 POKE - 27236,22
320 POKE - 27171,128
330 POKE - 27335,0
340 REM CH2.
350 POKE - 27224,1
360 POKE - 27200,0
370 POKE - 27188,1
380 POKE - 27164,28
390 POKE - 27334,0
400 POKE - 27170,128
410 POKE - 27176,128
420 POKE - 27212,0
422 PRINT : PRINT "ACQUISITION DES DONNEES SUR SCOPE-85"
423 PRINT : PRINT : PRINT
424 PRINT "ACQUISITION DE"
425 PRINT
426 PRINT " <1> FLUORESCENCE"
427 PRINT " <2> DISSIPATION THERMIQUE"
428 PRINT : INPUT "OPTION ? ";AQ
435 PRINT : PRINT : PRINT
436 PRINT "ACQUISITION SUR "
437 PRINT
438 PRINT " <1> 20 MS"
439 PRINT " <2> > 20 MS"
440 PRINT : INPUT "OPTION ? ";TEMPS
445 INPUT "NB. DE PREILLUMINATION (O-X) ? ";NB
446 NB = NB + 1
450 IF TEMPS = 2 THEN GOTO 700
460 REM

```

```

470 REM ACQUI. EN MS
480 REM
490 HOME : PRINT : PRINT "ACQUISITION EN MS"
500 PRINT : PRINT "CHOISIR L'ECHELLE DE MESURE"
550 GOSUB 3000
630 GOSUB 1000
640 GOSUB 2000
650 HOME
660 REM
670 REM ACQUI. EN S
680 REM
690 POKE - 27320,135
700 PRINT : PRINT "ACQUISITION EN S "
710 POKE - 27308,PS(CHOIX)
750 HOME : PRINT : PRINT "ACQUISITION EN S"
760 PRINT : PRINT "CHOISIR L'ECHELLE DE MESURE"
770 PRINT
772 PRINT " <1> 50 MS : <2> 100 MS"
774 PRINT " <3> 200 MS : <4> 500 MS"
776 PRINT " <5> 1 S : <6> 2 S"
778 PRINT " <7> 5 S : <8> 10 S"
780 PRINT " <9> 20 S : <10> 50 S"
782 PRINT " <11> 100 S : <12> 200 S"
784 PRINT
785 INPUT "CHOIX ? ";CHOIX
790 POKE - 27308,PS(CHOIX)
800 HOME : PRINT : PRINT "ACQUISITION EN S"
802 PRINT : PRINT "CHOISIR L'ECHELLE DE MESURE"
803 GOSUB 3000
830 GOSUB 1000
840 GOSUB 2000
850 STOP
860 END
1000 REM
1010 REM MEMORISATION SUR DISQUETTE
1020 REM
1025 PRINT
1030 PRINT "MEMORISATION SUR DISQUETTE"
1040 INPUT "NOM DU FICHIER ? ";FICHIER$
1050 CD$ = CHR$(4)
1060 PRINT CD$"OPEN "FICHIER$
1070 PRINT CD$"WRITE "FICHIER$
1080 PRINT YS(CHOIX)
1090 FOR I = 2048 TO 2303
1100 PRINT PEEK (I)
1110 NEXT I
1120 PRINT CD$"CLOSE "
1130 RETURN
1140 END
2000 REM
2010 REM SUB. GRAPHIQUE
2020 REM
2030 HOME
2040 HGR2
2050 GTICULE = - 29419
2060 C1 = 2048
2070 CALL GTICULE
2080 FOR I = 0 TO 255
2085 Y = INT ((255 - PEEK (C1 + I)) * 5 / 8)
2100 HPLOT I,Y
2110 NEXT I
2120 GET A$
2130 TEXT
2140 HOME
2150 RETURN
2160 END

```

```
3000 REM
3010 REM ECHELLE DE MESURE
3020 REM
3030 PRINT
3040 PRINT " <1> 5 MV/DIV."
3045 PRINT " <2> 10 MV/DIV."
3050 PRINT " <3> 20 MV/DIV."
3060 PRINT " <4> 50 MV/DIV."
3070 PRINT " <5> 100 MV/DIV."
3080 PRINT " <6> 200 MV/DIV."
3090 PRINT " <7> 500 MV/DIV."
3092 PRINT " <8> 1 V/DIV."
3094 PRINT " <9> 2 V/DIV."
3096 PRINT " <10> 5 V/DIV."
3100 PRINT
3110 INPUT "CHOIX ? ";CHOIX
3120 POKE - 27236,VB(CHOIX)
3140 POKE - 27350,0
3150 SWALT = - 27287
3160 DIGITIZER = - 28432
3162 PRINT : PRINT " *** PRET POUR L'IMPULSION ***"
3165 FOR I = 1 TO NB
3170 POKE SWALT,128
3180 CALL DIGITIZER
3185 NEXT I
3190 RETURN
```

JPR#0

## ANNEXE II

Cette annexe présente le logiciel de traitements des données. Il est écrit en langage BASIC et fonctionne sur un APPLE IIe. Voir la section 2.3 pour les détails sur chacune des options.

LIST

```
10 HOME
20 PRINT "*****"
30 PRINT "*"
40 PRINT "*   APPLE IIe   DOS 3.3 PROG. BASIC   *"
50 PRINT "*"
60 PRINT "*           PROGRAMME DE TRAITEMENT           *"
70 PRINT "*   ( FLUORESCENCE ET CHALEUR )   *"
80 PRINT "*"
90 PRINT "*   J. CLAUDE MORISSETTE M.Sc   V.3.0   *"
100 PRINT "*"
110 PRINT "*****"
120 HTAB 1: VTAB 14: PRINT "CHOISIR UNE DES OPTIONS"
130 HTAB 9: VTAB 16: PRINT "<1> TRAITEMENT DE DONNEES"
140 HTAB 9: VTAB 17: PRINT "<2> FIN "
150 VTAB 19: INPUT "CHOIX ? ";CC
160 IF CC = 2 THEN END
170 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520"
180 CALL 520"MENU"
190 END
```

JPR#0  
JLIST

```

10 HOME
20 TEXT
25 VTAB 1
30 PRINT "*****"
40 PRINT "*"
50 PRINT "* MENU PRINCIPAL *"
60 PRINT "*"
70 PRINT "*****"
80 VTAB 7: PRINT "CHOISIR UNE OPTION"
90 HTAB 9: VTAB 9: PRINT "<1> LECTURE DES DONNEES"
100 HTAB 9: PRINT "<2> CALCUL DES NIVEAUX F0"
110 HTAB 9: PRINT "<3> F(t)-F0"
120 HTAB 9: PRINT "<4> LISSAGE DES COURBES"
130 HTAB 9: PRINT "<5> PARAMETRES CALCULES"
140 HTAB 9: PRINT "<6> GRAPHIQUES"
150 HTAB 9: PRINT "<7> MAX. ET SURFACE VIVO"
152 HTAB 9: PRINT "<8> MOINS DERIVE (THERMIQUE)"
160 HTAB 9: PRINT "<0> AUTRES"
170 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";CHOIX
180 IF CH < > 0 THEN GOTO 300
190 HOME
200 PRINT "** SUITE **"
210 VTAB 5
220 HTAB 8: PRINT "<10> SOUSTR. F0 DCMU"
240 HTAB 8: PRINT "<11> MAX. ET SURFACE DCMU"
250 HTAB 8: PRINT "<12> NORM. ET MULT. DCMU"
260 HTAB 8: PRINT "<13> LOG (Fv-Ft)"
270 HTAB 8: PRINT "<14> RC ALPHA ET BETA"
280 HTAB 8: PRINT "<15> RC ALPHA"
290 HTAB 8: PRINT "<16> DELTA A VS F(t) DCMU"
295 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";CHOIX
300 IF CHOIX = 1 THEN GOTO 445
310 IF CHOIX = 2 THEN GOTO 560
320 IF CHOIX = 3 THEN GOTO 480
330 IF CHOIX = 4 THEN GOTO 500
340 IF CHOIX = 5 THEN GOTO 520
350 IF CHOIX = 6 THEN GOTO 460
360 IF CHOIX = 7 THEN GOTO 700
362 IF CHOIX = 8 THEN GOTO 730
370 IF CHOIX = 10 THEN GOTO 580
390 IF CHOIX = 11 THEN GOTO 620
400 IF CHOIX = 12 THEN GOTO 540
410 IF CHOIX = 13 THEN GOTO 660
420 IF CHOIX = 14 THEN GOTO 640
430 IF CHOIX = 15 THEN GOTO 680
440 IF CHOIX = 16 THEN GOTO 750
445 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
450 CALL 520"LECTURE DES DONNEES,D1"
460 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
470 CALL 520"VISUALISATION,D1"
480 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
490 CALL 520"FLUOVAR,D1"
500 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
510 CALL 520"LISSAGE,D1"
520 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
530 CALL 520"PARAMETRES,D1"
540 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
550 CALL 520"NORMALISATION,D1"
560 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
570 CALL 520"F0,D1"

```

```
580 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"  
590 CALL 520"MOIN FO,D1"  
600 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"  
610 CALL 520"PENTE DCMU,D1"  
620 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"  
630 CALL 520"SURFACE DCMU,D1"  
640 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"  
650 CALL 520"ALPHA BETA,D1"  
660 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"  
670 CALL 520"Fvm-Ft,D1"  
680 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"  
690 CALL 520"ALPHA,D1"  
700 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"  
710 CALL 520"SURFACE VIVO,D1"  
750 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"  
760 CALL 520"DELTA A DCMU,D1"  
780 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"  
790 CALL 520"DERIVE,D1"  
800 END
```

```

JLOAD LECTURE DES DONNEES
JLIST

```

```

20 HOME
40 CLEAR
60 CD# = CHR# (4)
90 PRINT "*****"
100 PRINT "*"
120 PRINT "* LECTURE DES DONNEES *"
140 PRINT "*"
160 PRINT "*****"
180 PRINT : PRINT : PRINT
200 PRINT "CHOISIR UNE OPTION"
220 PRINT
240 PRINT " <1> FLUORESCENCE"
260 PRINT " <2> CHALEUR "
280 PRINT
300 INPUT "OPTION ? ";SB
320 HOME
340 REM
360 REM CONDITIONS D'ENTREE
380 REM
400 VTAB 7: INPUT "NOMBRE DE FICHIERS (MAX. 6) ? ";N1
420 IF N1 < 1 OR N1 > 6 THEN GOTO 20
440 INPUT "# FICH. AVEC DCMU OU EQUIV. ? ";N4
460 IF N4 > 0 AND N4 < > N1 THEN GOTO 20
480 IF N1 = N4 THEN GOTO 580
500 INPUT "# FICH. SUR 20 MS ? ";N2
520 IF N2 = 0 THEN GOTO 640
540 IF N2 < > N1 AND N2 < > (N1 / 2) THEN GOTO 20
560 GOTO 640
580 PRINT "ACQUISITION <1> < 500 MS"
600 PRINT " <2> >= 500 MS"
620 INPUT " CHOIX ? ";TA
640 IF N2 = N1 / 2 THEN N3 = N2
660 IF N2 = N1 THEN N3 = 0
680 IF N4 = N1 THEN N2 = N4
700 IF N4 = N1 THEN N3 = 0
720 IF N2 = 0 THEN N3 = N1
760 DIM T(256)
780 IF N2 > 0 THEN GOSUB 940
800 IF N3 > 0 THEN GOSUB 1180
820 GOSUB 3940
840 PRINT : PRINT " *** LECTURE EN COURS ***"
860 IF N2 > 0 THEN GOSUB 1400
880 IF N3 > 0 THEN GOSUB 1880
900 IF SB = 1 THEN GOSUB 2440
920 GOSUB 2380
940 REM
960 REM FICHIERS EN MS ET DCMU
980 REM
1000 PRINT
1020 DIM MS%(256,6)
1040 IF N1 = N4 THEN PRINT "NOM DES FICHIERS DCMU"
1060 IF N1 = N4 THEN GOTO 1100
1080 PRINT "NOM DES FICHIERS EN MS"
1100 FOR I = 1 TO N2
1120 HTAB 5: INPUT "FICHIER ? ";FM#(I)
1140 NEXT I
1160 RETURN
1180 REM
1200 REM FICHIERS EN S
1220 REM

```

```

1240 PRINT
1260 DIM S%(255,6)
1280 PRINT "NOM DES FICHIERS EN S"
1300 FOR I = 1 TO N3
1320 HTAB 5: INPUT "FICHER ? ";FS$(I)
1340 NEXT I
1360 RETURN
1380 PRINT : PRINT "   ***   LECTURE EN COURS   ***"
1400 REM
1420 REM  LECTURE EN MS
1440 REM
1460 FOR I = 1 TO N2
1480 PRINT CD#"OPEN "FM$(I)",D2"
1500 PRINT CD#"READ "FM$(I)
1520 INPUT TM%(I)
1540 FOR J = 0 TO 255
1560 INPUT MS%(J,I)
1580 MS%(J,I) = MS%(J,I) - 128
1600 NEXT J
1620 PRINT CD#"CLOSE "FM$(I)
1640 IF TM%(I) = 20 THEN TM%(I) = 20
1660 IF TM%(I) = 21 THEN TM%(I) = 40
1680 IF TM%(I) = 22 THEN TM%(I) = 80
1700 IF TM%(I) = 23 THEN TM%(I) = 200
1720 IF TM%(I) = 24 THEN TM%(I) = 400
1740 IF TM%(I) = 25 THEN TM%(I) = 800
1760 IF TM%(I) = 26 THEN TM%(I) = 2000
1780 IF TM%(I) = 27 THEN TM%(I) = 4000
1800 IF TM%(I) = 28 THEN TM%(I) = 8000
1820 IF TM%(I) = 29 THEN TM%(I) = 20000
1840 NEXT I
1860 RETURN
1880 REM
1900 REM  LECTURE EN S
1920 REM
1940 FOR I = 1 TO N3
1960 PRINT CD#"OPEN "FS$(I)",D2"
1980 PRINT CD#"READ "FS$(I)
2000 INPUT TS%(I)
2020 FOR J = 0 TO 255
2040 INPUT S%(J,I)
2060 S%(J,I) = S%(J,I) - 128
2080 NEXT J
2100 PRINT CD#"CLOSE "FS$(I)
2120 IF TS%(I) = 20 THEN TS%(I) = 20
2140 IF TS%(I) = 21 THEN TS%(I) = 40
2160 IF TS%(I) = 22 THEN TS%(I) = 80
2180 IF TS%(I) = 23 THEN TS%(I) = 200
2200 IF TS%(I) = 24 THEN TS%(I) = 400
2220 IF TS%(I) = 25 THEN TS%(I) = 800
2240 IF TS%(I) = 26 THEN TS%(I) = 2000
2260 IF TS%(I) = 27 THEN TS%(I) = 4000
2280 IF TS%(I) = 28 THEN TS%(I) = 8000
2300 IF TS%(I) = 29 THEN TS%(I) = 20000
2320 NEXT I
2340 RETURN
2360 REM
2380 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
2400 CALL 520"MENU,D1"
2420 END
2440 REM
2460 REM  SOUSTRACTION DE L'OFFSET
2480 REM
2500 IF N1 = N4 THEN GOTO 3040
2520 IF N2 = 0 THEN GOTO 2800
2540 FOR I = 1 TO N2

```

```

2560 SS(I) = 0:SO = 0
2580 FOR J = 1 TO 25
2600 SO = SO + MS%(J,I)
2620 NEXT J
2640 SS(I) = INT ((SO / 25) + .5)
2660 NEXT I
2680 FOR I = 1 TO N2
2700 FOR J = 0 TO 255
2720 MS%(J,I) = MS%(J,I) - SS(I)
2740 IF MS%(J,I) < 0 THEN MS%(J,I) = 0
2760 NEXT J
2780 NEXT I
2800 IF N3 = 0 THEN GOTO 3000
2820 FOR I = 1 TO N3
2840 CN(I) = S%(0,I)
2860 NEXT I
2880 FOR I = 1 TO N3
2900 FOR J = 0 TO 255
2920 S%(J,I) = S%(J,I) - CN(I)
2940 IF S%(J,I) < 0 THEN S%(J,I) = 0
2960 NEXT J
2980 NEXT I
3000 GOSUB 3300
3020 RETURN
3040 FOR I = 1 TO N4
3060 IF TA = 1 THEN SS(I) = INT ((MS%(1,I) + MS%(2,I) + MS%(3,I)) / 3 +
.5)
3080 IF TA = 2 THEN SS(I) = MS%(1,I)
3100 NEXT I
3120 FOR I = 1 TO N4
3140 FOR J = 0 TO 255
3160 MS%(J,I) = MS%(J,I) - SS(I)
3180 IF MS%(J,I) < 0 THEN MS%(J,I) = 0
3200 NEXT J
3220 NEXT I
3240 GOSUB 3300
3260 RETURN
3280 END
3300 REM
3320 REM PARAMETRES DE DEPART
3340 REM
3360 HOME
3380 PRINT "LES 'OFFSETS' SUIVANT SONT ENLEVES DES FICHIERS"
3400 IF N1 = N4 THEN GOTO 3740
3420 IF N2 = 0 THEN GOTO 3560
3440 PRINT : PRINT "PARAMETRES DES FICHIERS DCMU OU 20 MS"
3460 PRINT
3480 FOR I = 1 TO N2
3500 PRINT "OFFSET= ";SS(I);" SCALE MAX= ";TM%(I)
3520 NEXT I
3540 IF N3 = 0 THEN GOTO 3660
3560 PRINT : PRINT "PARAMETRES EQ. DES FICHIERS S"
3580 PRINT
3600 FOR I = 1 TO N3
3620 PRINT "OFFSET= ";CN(I);" SCALE MAX= ";TS%(I)
3640 NEXT I
3660 PRINT : PRINT "PRESSER UNE TOUCHE POUR LE MENU"
3680 GET A$
3700 PRINT : PRINT
3720 RETURN
3740 PRINT : PRINT "PARAMETRES DES FICHIERS DCMU"
3760 PRINT
3780 FOR I = 1 TO N4
3800 PRINT "OFFSET= ";SS(I);" SCALE MAX= ";TM%(I)
3820 NEXT I
3840 PRINT : PRINT "PRESSER UNE TOUCHE POUR LE MENU"

```

```
3870 PRINT : PRINT "PUSSEZ-VOUS TOUJOURS VOUS LE NERF"  
3880 GET A#  
3880 PRINT : PRINT  
3900 RETURN  
3920 END  
3940 REM  
3960 REM      CORRECTIONS DES ERREURS  
3980 REM  
4000 IF N2 = 0 THEN GOTO 4200  
4020 HOME : PRINT : PRINT "FICHIERS DCMU OU 20 MS": PRINT  
4040 FOR I = 1 TO N2  
4060 PRINT " # ";I;" : ";FM$(I)  
4080 NEXT I  
4100 PRINT : INPUT "CORRECTION, 0 OUI, 1 NON ? ";MO  
4120 IF MO = 1 THEN GOTO 4200  
4140 INPUT "# DU FICHER ? ";NF  
4160 INPUT "NOUVEAU NOM ? ";FM$(NF)  
4180 GOTO 4020  
4200 IF N3 = 0 THEN RETURN  
4220 HOME : PRINT : PRINT "FICHIERS S": PRINT  
4240 FOR I = 1 TO N3  
4260 PRINT " #";I;" : ";FS$(I)  
4280 NEXT I  
4300 PRINT : INPUT "CORRECTION, 0 OUI, 1 NON ? ";MO  
4320 IF MO = 1 THEN RETURN  
4340 INPUT "# DU FICHER ? ";NF  
4360 INPUT "NOUVEAU NOM ? ";FS$(NF)  
4380 GOTO 4220  
4400 END
```

```

BLIST

10 HOME
20 PRINT "*****"

30 PRINT "*"

40 PRINT "*"   CALCUL DES Fd   "*"

50 PRINT "*"

60 PRINT "*****"

70 PRINT : PRINT
80 IF N1 = N4 THEN GOTO 270
90 IF N2 = 0 THEN GOTO 270
100 PRINT : PRINT
170 INPUT "POINTS A REGRESSER (7
5-250) ? ";FD
172 INPUT "NIVEAU DE FOND (0-128
) ? ";DD
175 INPUT "IMPRESSION, 0 OUI, 1
NON ? ";IM
180 PRINT
190 PRINT : PRINT "   ***   ATTE
NDRE S.V.P.   ***"
200 GOSUB 300
210 FO$ = "FO"
220 INPUT "SATISFAIT ?, <0> OUI,
<1> NON ? ";ST
230 IF ST = 1 THEN GOTO 10
240 PRINT : PRINT "   ***   PRES
SER POUR LE MENU   ***"
250 GET A$
260 PRINT
270 PRINT CHR$(4);"BLDAD CHAIN
,A520,D1"
280 CALL 520"MENU,D1"
290 END
300 REM
310 REM  EXTRAPOLATION POUR LE F
0
320 REM
330 IF N3 < > 0 THEN FOR I = 1
TO N3
340 IF N3 = 0 THEN FOR I = 1 TO
N2
350 X = 0:Y = 0:XY = 0:X2 = 0:Y2 =
0
360 FF = FD - 55 + 1
370 FOR J = 55 TO FD
380 DJ = MS$(J,I) - MS$(54,I)
390 IF DJ < 1 THEN DJ = 1
400 GOSUB 820
410 YI = DI
420 X = X + XI:X2 = X2 + XI * XI
430 Y = Y + YI:Y2 = Y2 + YI * YI
440 XY = XY + XI * YI
450 NEXT J

```

```

440 S1 = X2 - (X * X) / FF
450 S2 = Y2 - (Y * Y) / FF
460 S3 = XY - (X * Y) / FF
470 B2 = S3 / S1
500 B0 = (Y - X * B2) / FF
510 B = B2
520 R2 = (S3 * S3) / (S1 * S2)
530 S4 = (S2 - B2 * B2 * S1) / (F - 2)
540 S5 = SQR (S4)
550 S6 = S5 / (SQR (S1))
560 S7 = S5 * SQR ((1 / FF) + (X / FF) * (X / FF) / S1)
562 EX = 27
565 S8 = S5 * SQR (1 + (1 / FF) + ((X / FF + EX) * (X / FF + EX)) / S1))
570 RR(I) = R2
580 RS(I) = S4
590 RA(I) = B2
600 RB(I) = B0
610 EA(I) = S6
620 EB(I) = S7
625 CV(I) = SQR (RS(I)) * 100 / (Y / FF)
630 GOSUB 900
640 NEXT I
650 HOME
660 PRINT "PARAMETRES CALCULES"
665 IF IM = 1 THEN GOTO 670
667 PR# 1
670 PRINT
690 IF N3 < > 0 THEN FOR I = 1 TO N3
690 IF N3 = 0 THEN FOR I = 1 TO N2
700 PRINT "A= ";RA(I);" ERR. A= ";(EA(I) / RA(I)) * 100;" %"
710 PRINT "B= ";RB(I);" ERR. B= ";(EB(I) / RB(I)) * 100;" %"
715 PRINT "DELTA Y EXTR.= ";FF(I)
720 PRINT "R CARRE= ";RR(I)
730 PRINT "S CARRE= ";RS(I)
735 PRINT "C. VARIATION= ";CV(I)
740 PRINT "Y SHUTTER= ";MS%(S4, I)
745 PRINT "NIVEAU DE FOND= ";DD
760 PRINT "Fo' = ";FO(I)
770 PRINT "Fo = ";FO(I) - DD;" ERR. Fo= ";(EF(I) / (FO(I) - DD)) * 100" %"
775 PRINT
780 NEXT I
790 PRINT
795 PR# 0
800 RETURN
810 END
820 REM
830 REM LINEARISATION
840 REM
850 XI = LOG (J - 54):DI = LOG (DJ)

```

```
890 RETURN
900 REM
910 REM EXTRAPOLATION
920 REM
930 EX = 27
940 FD(I) = MS%(S4,I) - EXP (S0 +
      B * LOG (EX))
980 REM
990 REM CALCUL DE L'ERREUR
1000 REM
1010 FF(I) = S0 + B * LOG (EX)
1025 A3 = MS%(S4,I)
1030 A1 = FF(I) + S8:A2 = FF(I) -
      S8
1040 A1 = A3 - EXP (A1):A2 = A3 -
      EXP (A2)
1080 EF(I) = ABS (A1 - (A1 + A2)
      / 2)
1090 RETURN
```

ILOAD FLUOVAR  
 ILIST

```

10 HOME
20 PRINT "*****"
30 PRINT "*"
40 PRINT "* DYNAMIQUE DES COURBES *"
50 PRINT "*"
60 PRINT "*****"
70 PRINT : PRINT
75 IF N3 = 0 THEN GOTO 330
80 IF N1 = N4 THEN GOTO 330
100 FV$ = "FV"
110 PRINT "CHOISIR UNE OPTION"
120 PRINT
130 PRINT " <1> Fv-Fo"
140 PRINT " <2> MENU"
150 PRINT
160 INPUT "CHOIX ? ";CH
161 IF CH < 1 OR CH > 2 THEN GOTO 10
162 IF CH = 2 THEN GOTO 330
165 IF FO$ < > "FO" THEN GOSUB 500
180 PRINT : PRINT " *** ATTENDRE SVP ***"
190 FOR I = 1 TO N3
200 FOR J = 0 TO 255
210 S%(J,I) = INT (S%(J,I) - FO(I) + .5)
215 IF S%(J,I) < 0 THEN S%(J,I) = 0
220 NEXT J
230 NEXT I
330 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
340 CALL 520"MENU,D1"
350 END
500 REM
510 REM ENTREE DU FO
520 REM
530 HOME : PRINT
540 PRINT "SCUSTRACTION <1> VARIABLE"
545 PRINT " <2> FIXE"
570 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";CX
580 IF CX = 1 THEN GOTO 800
585 PRINT : INPUT "NIVEAU DE FOND ? ";DD
590 INPUT "VALEUR DU F'o ? ";FO
600 FOR I = 1 TO N3:FO(I) = FO: NEXT I
610 GOTO 840
800 PRINT
805 INPUT "NIVEAU DE FOND ? ";DD
810 FOR I = 1 TO N3
820 INPUT "VALEUR DU F'o ? ";FO(I)
830 NEXT I
840 RETURN
850 END

```

JLOAD LISSE  
JLIST

```

10 HOME
20 HTAB 5: PRINT "*****"
30 HTAB 5: PRINT "*"
40 HTAB 5: PRINT "* LISSAGE DES DONNEES *"
50 HTAB 5: PRINT "*"
60 HTAB 5: PRINT "*****"
70 PRINT
80 PRINT "CHOISIR UNE OPTION"
90 PRINT : PRINT " <1> 5 POINTS CUBIC"
100 PRINT " <2> 9 POINTS CUBIC"
110 PRINT " <3> MENU"
120 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";LT
125 IF LT < 1 OR LT > 3 THEN GOTO 10
130 IF LT = 3 THEN GOTO 420
140 PRINT : PRINT
150 PRINT " *** VEILLER ATTENDRE S.V.P. ***"
160 IF LT = 2 THEN GOTO 450
170 IF N2 = 0 THEN GOTO 300
180 FOR I = 1 TO N2
190 TT = 0
200 FOR J = 3 TO 252
210 TT = MS%(J - 2,I) * - 3 + MS%(J - 1,I) * 12 + MS%(J,I) * 17 + MS%(J +
1,I) * 12 + MS%(J + 2,I) * - 3
220 T(J) = TT / 35
230 NEXT J
260 FOR J = 3 TO 252
270 MS%(J,I) = T(J)
280 NEXT J
290 NEXT I
300 IF N3 = 0 THEN GOTO 420
310 FOR I = 1 TO N3
320 FOR J = 3 TO 252
330 TT = S%(J - 2,I) * - 3 + S%(J - 1,I) * 12 + S%(J,I) * 17 + S%(J + 1,
I) * 12 + S%(J + 2,I) * - 3
340 T(J) = TT / 35
350 NEXT J
380 FOR J = 3 TO 252
390 S%(J,I) = T(J)
400 NEXT J
410 NEXT I
420 PRINT CHR$( 4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
430 CALL 520"MENU,D1"
440 END
450 IF N2 = 0 THEN GOTO 570
460 FOR I = 1 TO N2
470 FOR J = 4 TO 251
480 TT = MS%(J - 4,I) * - 21 + MS%(J - 3,I) * 14 + MS%(J - 2,I) * 39 + M
S%(J - 1,I) * 54 + MS%(J,I) * 59 + MS%(J + 1,I) * 54 + MS%(J + 2,I) *
39 + MS%(J + 3,I) * 14 + MS%(J + 4,I) * - 21
490 T(J) = TT / 231
500 NEXT J
530 FOR J = 4 TO 251
540 MS%(J,I) = T(J)
550 NEXT J
560 NEXT I
570 IF N3 = 0 THEN GOTO 420
580 FOR I = 1 TO N3
590 FOR J = 4 TO 251
600 TT = S%(J - 4,I) * - 21 + S%(J - 3,I) * 14 + S%(J - 2,I) * 39 + S%(J

```

```
      T(J) = S%(J+3,I) * 14 + S%(J+4,I) * 21  
610 T(J) = TT / 231  
620 NEXT J  
650 FOR J = 4 TO 251  
660 S%(J,I) = T(J)  
670 NEXT J  
680 NEXT I  
690 GOTO 420  
700 END
```

3LOAD PARAMETRES  
3LIST

```

10 HOME
20 PRINT "*****"
30 PRINT "*"
40 PRINT "*   PARAMETRES CALCULES   *"
50 PRINT "*"
60 PRINT "*****"
70 PRINT : PRINT "CHOISIR UNE OPTION"
80 PRINT
90 PRINT "  <1> A L'ECRAN"
100 PRINT "  <2> SUR IMPRIMANTE"
110 PRINT
120 INPUT "CHOIX ? ";PA
130 IF PA < 1 OR PA > 2 THEN GOTO 10
140 PRINT : PRINT "   ***   ATTENDRE S.V.P.   ***"
150 IF N1 = N4 THEN GOTO 940
160 IF N3 = 0 THEN GOTO 250
170 FOR I = 1 TO N3
180 MAX = 0:M1 = 0:M2 = 0
190 FOR J = 0 TO 255
200 IF S%(J,I) > MAX THEN MAX = S%(J,I)
210 IF S%(J,I) = MAX THEN M2 = J
220 VP(I) = INT (MAX + .5):PP(I) = M2
230 NEXT J
240 NEXT I
250 GET A$
260 IF PA = 1 THEN GOTO 280
270 PR# 1
280 GOSUB 390
290 PR# 0
300 GET A$
310 IF PA = 1 THEN GOTO 330
320 PR# 1
330 GOSUB 560
340 PR# 0: PRINT
350 PRINT : GET A$
360 PRINT : PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
370 CALL 520"MENU,D1"
380 END
390 REM
400 REM IMPRESSION DES FICHIERS
410 REM
420 HOME
430 IF N2 = 0 THEN GOTO 490
440 PRINT "FICHIERS EN MS"
450 FOR I = 1 TO N2
460 HTAB 5: PRINT FM$(I)
470 NEXT I
480 PRINT
490 IF N3 = 0 THEN GOTO 550
500 PRINT "FICHIERS EN S"
510 FOR I = 1 TO N3
520 HTAB 5: PRINT FS$(I)
530 NEXT I
540 PRINT
550 RETURN
560 REM
570 REM IMPRESSION DIVERSES
580 REM
590 HOME
600 IF FV$ = "FV" THEN GOTO 750

```

```

610 IF N3 < 1 THEN GOTO 840
620 FOR I = 1 TO N3
630 PRINT "FICHER ";I;" (PARAMETRES VARIABLES)"
640 HTAB 10: PRINT "OFFSET S = ";CN(I)
650 HTAB 10: PRINT "F'o (AVEC FOND) = ";VP(I)
660 IF FO$ < > "FO" THEN GOTO 680
670 HTAB 10: PRINT "Fp (SANS FOND) = ";VP(I) - DD
680 HTAB 10: PRINT "POS. p = ";PP(I)
690 IF FO$ < > "FO" THEN GOTO 730
700 HTAB 10: PRINT "Fvp = "; INT (VP(I) - FO(I) + .5)
710 HTAB 10: PRINT "F'np = "; (VP(I) - FO(I)) / FO(I)
720 HTAB 10: PRINT "Fnp = "; (VP(I) - FO(I)) / (FO(I) - DD)
730 NEXT I
740 GOTO 840
750 FOR I = 1 TO N3
760 PRINT "FICHER ";I;" (PARAMETRES VARIABLES)"
770 HTAB 10: PRINT "F'p (AVEC FOND) = "; INT (VP(I) + FO(I) + .5)
780 HTAB 10: PRINT "Fp (SANS FOND) = "; INT (VP(I) + FO(I) - DD + .5)
790 HTAB 10: PRINT "POS. p = ";PP(I)
800 HTAB 10: PRINT "Fvp = ";VP(I)
810 HTAB 10: PRINT "F'np = ";VP(I) / FO(I)
820 HTAB 10: PRINT "Fnp = ";VP(I) / (FO(I) - DD)
830 NEXT I
840 IF N2 < 1 THEN GOTO 920
850 IF FO$ < > "FO" AND FV$ < > "FV" THEN GOTO 920
860 FOR I = 1 TO N2
865 PRINT "FICHER ";I;" (PARAMETRES CONSTANTS)"
870 HTAB 10: PRINT "NIVEAU DE FOND = ";DD
880 HTAB 10: PRINT "F'o (AVEC FOND) = ";FO(I)
890 HTAB 10: PRINT "Fp (SANS FOND) = ";FO(I) - DD
900 HTAB 10: PRINT "R^2 = ";RR(I)
910 NEXT I
920 REM
930 RETURN
940 REM
950 REM PARAMETRES AVEC DCMU
960 REM
970 GET A$
980 IF PA = 1 THEN GOTO 1000
990 PR# 1
1000 HOME
1010 PRINT "FICHIERS AVEC DCMU"
1020 FOR I = 1 TO N4
1030 HTAB 5: PRINT FM$(I)
1040 NEXT I
1050 PR# 0
1060 GET A$
1070 HOME
1080 IF DC$ < > "DC" THEN GOTO 1220
1090 IF PA = 1 THEN GOTO 1110
1100 PR# 1
1110 FOR I = 1 TO N4
1120 PRINT "FCHIER ";I
1130 HTAB 10: PRINT "OFFSET = ";SS(I)
1140 HTAB 10: PRINT "F'o (AVEC FOND) = ";NS(I)
1150 HTAB 10: PRINT "Fp (SANS FOND) = ";NS(I) - DD
1160 HTAB 10: PRINT "F'm (AVEC FOND) = "; INT (VM(I) + NS(I) + .5)
1170 HTAB 10: PRINT "Fm (SANS FOND) = "; INT (VM(I) + NS(I) - DD + .5)
1180 HTAB 10: PRINT "Fvm = ";VM(I)
1190 HTAB 10: PRINT "SURFACE A = ";SC(I)
1200 HTAB 10: PRINT "A/Fvm = ";SC(I) / VM(I)
1210 NEXT I
1220 PR# 0: GOTO 340
1230 END

```

```

JLOAD VISUALISATION
JLIST

```

```

10 HOME
20 HCOLOR= 3
30 PRINT "*****"
40 PRINT "*"
50 PRINT "* VISUALISATION / IMPRESSION *"
60 PRINT "*"
70 PRINT "*****"
71 PRINT : PRINT
72 PRINT "CHOISIR UNE OPTION": PRINT
73 PRINT "  <1> VISUALISATION"
74 PRINT "  <2> MENU"
75 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";CX
76 IF CX < 1 OR CX > 2 THEN GOTO 10
77 IF CX = 2 THEN GOTO 550
90 IF N1 = N4 THEN GOTO 960
110 PRINT : INPUT "FACTEUR DE MULTIPLICATION ? ";FA
120 INPUT "SUPERPOSE; <0> OUI, <1> NON ? ";SU
130 GOSUB 1510
140 PRINT : PRINT : PRINT "***  PRET A COMMENCER  ***"
150 GET A$
160 IF N2 = N3 OR N3 = 0 THEN B0 = N2
170 IF N2 = 0 THEN B0 = N3
180 US = 1
190 FOR I = 1 TO B0
192 IF N2 > 0 THEN GOSUB 2000
194 IF N3 > 0 THEN GOSUB 3000
200 IF US = 0 THEN GOTO 240
210 HGR2
220 HPLLOT 0,0 TO 279,0 TO 279,190 TO 0,190 TO 0,0
230 GOSUB 1390
240 IF N3 = 0 THEN GOTO 340
250 FOR J = 0 TO 255
260 X1 = INT (J * 1.08984375) - (PR(I) - 13)
270 IF X1 > 279 THEN X1 = 279
271 IF X1 < 0 THEN X1 = 0
280 Y1 = INT (S%(J,I) * 1.484375 * FA)
290 IF Y1 < 0 THEN Y1 = 0
300 IF Y1 > 190 THEN Y1 = 190
310 Y1 = ABS (Y1 - 190)
320 HPLLOT X1,Y1
330 NEXT J
340 IF N2 = 0 THEN GOTO 460
350 FOR J = 0 TO 255
360 X2 = INT (J * 1.08984375) - (PT(I) - 13)
370 IF TS%(I) = 0 THEN TS%(I) = TM%(I)
380 Y2 = INT (MS%(J,I) * 1.484375 * FA / (TS%(I) / TM%(I)))
390 IF X2 < 0 THEN X2 = 0
395 IF X2 > 279 THEN X2 = 279
400 IF Y2 < 0 THEN Y2 = 0
410 IF Y2 > 190 THEN Y2 = 190
420 Y2 = ABS (Y2 - 190)
430 HPLLOT X2,Y2
440 NEXT J
450 GOSUB 1300
460 IF SU = 0 AND I < > B0 THEN GOTO 520
470 IF IM = 1 THEN GOTO 520
480 PR# 1
490 IF II = 1 THEN PRINT CHR$(9);"G2E"
500 IF II = 2 THEN PRINT CHR$(9);"G2D"
510 PR# 0
---
```

```

520 GET A#
530 US = SU
540 NEXT I
545 GET A#
550 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
560 CALL 520"MENU,D1"
570 END
950 REM
960 REM VISUALISATION DES FICHIERS DCMU
970 REM
980 PRINT : PRINT "VISUALISATION DES FICHIERS DCMU. PRESSER UNE TOUCHE E
    NTRÉ CHAQUE FICHIERS."
990 PRINT : INPUT "FACTEUR DE MULTIPLICATION ? ";FA
1000 INPUT "SUPERPOSE; <0> OUI, <1> NON ? ";SU
1010 GOSUB 1510
1020 PRINT : PRINT "    ***    PRÉ A COMMENCER    ***"
1030 GET A#
1040 US = 1
1050 FOR I = 1 TO N4
1055 GOSUB 2000
1060 IF US = 0 THEN GOTO 1090
1070 HGR2 : HPLLOT 0,0 TO 279,0 TO 279,190 TO 0,190 TO 0,0
1080 GOSUB 1390
1090 FOR J = 0 TO 255
1100 X = INT (J * 1.08984375) - (PT(I) - 13)
1110 Y = INT (MS%(J,I) * 1.484375 * FA)
1120 IF X > 279 THEN X = 279
1125 IF X < 0 THEN X = 0
1130 IF Y < 0 THEN Y = 0
1140 IF Y > 190 THEN Y = 190
1150 Y = ABS (Y - 190)
1160 HPLLOT X,Y
1170 NEXT J
1180 IF SU = 0 AND I < > N4 THEN GOTO 1240
1190 IF IM = 1 THEN GOTO 1240
1200 PR# 1
1210 IF II = 1 THEN PRINT CHR$(9);"G2E"
1220 IF II = 2 THEN PRINT CHR$(9);"G2D"
1230 PR# 0
1240 GET A#
1250 US = SU
1260 NEXT I
1270 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
1280 CALL 520"MENU,D1"
1290 END
1300 REM
1310 REM SHUTTER OPENNING TIME
1320 REM
1330 YY = 180;X2 = 55 * 1.08984375 - 15
1340 HPLLOT X2,YY TO X2,YY + 10
1350 HPLLOT X2,YY TO X2 + 3,YY + 3
1360 HPLLOT X2,YY TO X2 - 3,YY + 3
1370 RETURN
1380 END
1390 REM
1400 REM GRADUATION
1410 REM
1420 FOR K = 12 TO 242 STEP 23
1430 KK = K * 1.08984375
1440 HPLLOT KK,187 TO KK,190
1450 NEXT K
1460 FOR K = 0 TO 190 STEP 19
1470 HPLLOT 0,K TO 4,K
1480 NEXT K
1490 RETURN
1500 END

```

```
1510 REM
1520 REM  CHOIX DE L'IMPRESSION
1530 REM
1540 INPUT "IMPRESSION; <0> OUI, <1> NON ?";IM
1550 IF IM = 1 THEN GOTO 1590
1560 PRINT "  <1> 1X"
1570 PRINT "  <2> 2X"
1580 INPUT "CHOIX ? ";II
1590 RETURN
1600 END
2000 REM
2010 REM  CALCUL DU DEPART
2020 REM
2030 PT(I) = 0
2040 FOR J = 1 TO 255
2060 IF MS%(J,I) > 1 THEN GOTO 2080
2070 NEXT J
2080 PT(I) = J - 1
2090 RETURN
2100 END
3000 REM
3010 REM  CALCUL DEPART EN S
3020 REM
3030 PR(I) = 0
3040 FOR J = 0 TO 255
3050 IF SX%(J,I) > 1 THEN GOTO 3070
3060 NEXT J
3070 PR(I) = J - 1
3080 RETURN
3090 END
```

BLOAD SURFACE VIVO  
JLIST

```

10 HOME
20 PRINT "*****"
30 PRINT "*"
40 PRINT "* SURFACE VIVO *"
50 PRINT "*"
60 PRINT "*****"
65 IF FV# < > "FV" THEN GOTO 370
70 PRINT : PRINT "CHOISIR UNE OPTION"
80 PRINT : PRINT " <1> ANALYSE DES SURFACES"
90 PRINT " <2> MENU"
100 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";CX
104 IF CX < 1 OR CX > 2 THEN GOTO 10
110 IF CX = 2 THEN GOTO 360
115 HOME
120 PRINT
127 HOME : PRINT
130 INPUT "AVEC GRAPHIQUE, <0> OUI, <1> NON ? ";GG
140 IF GG = 1 THEN GOTO 260
150 INPUT "IMPRESSION, 0 OUI, 1 NON ? ";IM
160 IF IM = 1 THEN GOTO 200
165 PRINT : PRINT "ECHELLE": PRINT
170 PRINT " <1> 1X"
180 PRINT " <2> 2X"
185 PRINT
190 INPUT "CHOIX ? ";II
200 INPUT "SUPERPOSITION, 0 OUI, 1 NON ? ";SU
210 PRINT : PRINT "ACCROISSEMENT DES SURFACES"
220 PRINT : PRINT " <1> REELLE"
230 PRINT " <2> LOG."
240 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";CC
250 IF CC = 2 THEN INPUT "ORDONNEE (O-(Y)) ? ";YM
255 YM = ABS (YM)
260 PRINT : PRINT
270 PRINT " *** ATTENDRE S.V.P. ***"
280 GOSUB 400
290 GOSUB 520
300 US = 1
305 FOR I = 1 TO N3
310 GOSUB 640
320 IF GG = 1 THEN GOTO 345360
330 GOSUB 880
340 GOSUB 1010
345 NEXT I
350 HOME : TEXT
360 GET A$: PRINT
370 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
380 CALL 520"MENU,D1"
390 END
400 REM
410 REM RECHERCHE DU MAX.
420 REM
430 FOR I = 1 TO N3
440 PM(I) = 0
450 SM(I) = 0:MAX = 0
460 FOR J = 0 TO 255
470 IF S%(J,I) > MAX THEN MAX = S%(J,I):PM(I) = J
480 NEXT J
490 SM(I) = MAX
500 NEXT I
501 MX = 0

```

```

502 FOR I = 1 TO N3
503 IF PM(I) < 3 OR PM(I) > 252 THEN GOTO 515
504 MX = S%(PM(I) - 2, I) * - 3 + S%(PM(I) - 1, I) * 12 + S%(PM(I), I) * 17
      + S%(PM(I) + 1, I) * 12 + S%(PM(I) + 2, I) * - 3
505 SM(I) = MX / 35
506 MX = 0
515 NEXT I
519 RETURN
520 REM
530 REM RECHERCHE DU DEPART
540 REM
550 FOR I = 1 TO N3:PT(I) = 0: NEXT I
560 FOR I = 1 TO N3
570 FOR J = 0 TO 255
580 IF S%(J, I) > 1 THEN GOTO 610
600 NEXT J
610 PT(I) = J - 1.
620 NEXT I
630 RETURN
640 REM
650 REM INTEGRATION
660 REM
670 FOR J = 0 TO 255:T(J) = 0: NEXT J
680 SC(I) = 0:ADD = 0
690 IF PT(I) = 0 THEN PT(I) = 1
700 FOR J = (PT(I) + 1) TO PM(I)
710 ADD = (SM(I) - S%(J - 1, I)) + (SM(I) - S%(J, I))
720 ADD = ADD / 2
730 IF ADD < 0 THEN ADD = 0
740 SC(I) = ADD + SC(I)
750 T(J) = SC(I)
760 NEXT J
780 HOME : PRINT
800 PRINT "AIRE A ";I;" = ";SC(I)
810 PRINT "A/Fp ";I;" = ";SC(I) / SM(I)
820 PRINT
840 IF GG = 1 THEN GOTO 870860
850 PRINT "*** PRESSER POUR LES GRAPHIQUES ***"
860 GET A$
870 RETURN
880 REM
890 REM CALCUL SURFACE POUR GRAPH.
900 REM
920 FOR J = PT(I) TO PM(I)
930 IF CC = 2 THEN GOTO 960
940 T(J) = (SC(I) - T(J)) / SC(I) * 190
950 GOTO 980
960 IF (SC(I) - T(J)) < = 0 THEN GOTO 980
970 T(J) = LOG ((SC(I) - T(J)) / SC(I)) * (190 / YM)
980 NEXT J
1000 RETURN
1010 REM
1020 REM GRAPHIQUE
1030 REM
1040 FOR I = 1 TO N3
1050 IF US = 0 THEN GOTO 1100
1060 HCOLOR= 3
1070 HGR2
1080 HPLLOT 0,0 TO 279,0 TO 279,190 TO 0,190 TO 0,0
1090 GOSUB 1300
1100 FOR J = PT(I) TO PM(I)
1110 Y = T(J)
1130 Y = ABS (Y)
1140 IF Y < 0 THEN Y = 0
1150 IF Y > 190 THEN Y = 190
1155 IF Y > 279 THEN Y = 279

```

```
1160 X = J * 1.08984375
1170 IF CC = 1 THEN Y = 190 - Y
1171 IF CC = 2 THEN Y = Y
1180 HPLOT X,Y
1190 NEXT J
1200 GET A#
1210 IF SU = 0 AND I : > N4 THEN GOTO 1270
1220 IF IM = 1 THEN GOTO 1270
1230 PR# 1
1240 IF II = 1 THEN PRINT CHR# (9);"G2E"
1250 IF II = 2 THEN PRINT CHR# (9);"G2D"
1260 PR# 0
1270 US = SU
1280 NEXT I
1290 RETURN
1300 REM
1310 REM SCALE
1320 REM
1330 FOR K = 0 TO 190 STEP 19
1340 HPLOT 0,K TO 4,K
1350 NEXT K
1360 FOR K = 0 TO 280 STEP 28
1370 IF K > 279 THEN K = 279
1380 HPLOT K,187 TO K,190
1390 NEXT K
1400 RETURN
1410 END
```

```

JLOAD DERIVE
JLIST

```

```

10 HOME
20 PRINT "*****"
30 PRINT "*"
40 PRINT "* SOUSTR. DE LA DERIVE *"
50 PRINT "*"
60 PRINT "*****"
70 PRINT : PRINT
75 IF N3 = 0 THEN GOTO 1000
80 PRINT "CHOISIR UNE OPTION"
90 PRINT
100 PRINT " <1> SOUSTR. DE LA DERIVE"
110 PRINT " <2> MENU"
120 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";CT
130 IF CT > 2 OR CT < 1 THEN GOTO 10
142 REM
143 REM LECTURE DU FICHIER DERIVE
144 REM
150 HOME : PRINT : PRINT
160 INPUT "NOM DU FICHIER DE LA DERIVE ? ";FI$
170 PRINT : PRINT "*** ATTENDRE S.V.P. ***"
180 PRINT CD$"OPEN "FI$",D2"
190 PRINT CD$"READ "FI$"
200 INPUT T1%
210 FOR I = 0 TO 255
220 INPUT V%
230 T(I) = V% - 128
240 NEXT I
250 PRINT CD$"CLOSE "FI$"
254 GOSUB 300
260 GOSUB 500
270 GOTO 1000
300 REM
305 REM MOIN OFFSET
310 REM
320 FOR I = 1 TO 6
330 P0 = P0 + T(I)
340 NEXT I
350 P0 = P0 / 6
355 FOR I = 0 TO 255
360 T(I) = T(I) - P0
370 NEXT I
380 RETURN
500 REM
510 REM ANALYSE DE LA DERIVE
520 REM
530 FOR I = 1 TO 6
540 P1 = P1 + T(I)
550 P2 = P2 + T(244 + I)
560 NEXT I
570 P1 = P1 / 6:P2 = P2 / 6
580 P3 = (P2 - P1) / 254
590 REM
600 REM SOUSTR. DE LA DERIVE
610 REM
620 FOR I = 1 TO N3
630 FOR J = 0 TO 255
640 S%(J,I) = INT (S%(J,I) - ((P3 * J) + P1) + .5)
650 NEXT J
660 NEXT I

```

```
670 RETURN
1000 REM
1010 PRINT CHR# (4); "BLDAD CHAIN, A520, D1"
1020 CALL 520 "MENU, D1"
1030 END
```

```

1LOAD MOIN FO
1LIST

```

```

10 HOME
20 PRINT "*****"
30 PRINT "*"
40 PRINT "* SOUSTRACTION DU Fo *"
50 PRINT "*"
60 PRINT "*****"
70 IF N1 < > N4 THEN GOTO 290
75 PRINT : PRINT
80 PRINT "SOUSTRACTION <1> VARIABLE"
90 PRINT "      <2> FIXE"
92 PRINT "      <3> MENU"
110 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";NG
112 IF NG < 1 OR NG > 3 THEN GOTO 10
115 IF NG = 3 THEN GOTO 290
120 IF NG = 1 THEN GOTO 320
130 PRINT
140 INPUT "NIVEAU DE FOND ? ";DD
150 INPUT "NIVEAU Fo' ? ";NS
160 FOR I = 1 TO N4
170 NS(I) = NS
190 NEXT I
200 PRINT : PRINT
210 PRINT " *** ATTENDRE S.V.P. ***"
220 FOR I = 1 TO N4
230 FOR J = 1 TO 255
240 MS%(J,I) = INT (MS%(J,I) - NS(I) + .5)
250 IF MS%(J,I) < 0 THEN MS%(J,I) = 0
260 NEXT J
270 NEXT I
280 DC# = "DC"
290 PRINT CHR# (4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
300 CALL 520"MENU,D1"
310 END
320 REM
330 REM SOUSTRACTION VARIABLE
340 REM
350 PRINT : PRINT
355 INPUT "NIVEAU DE FOND ? ";DD
360 FOR I = 1 TO N4
380 INPUT "NIVEAU Fo'(I) ? ";NS(I)
390 PRINT
400 NEXT I
410 GOTO 200
420 END

```

JLOAD SURFACE DCMU  
JLIST

```

10 HOME
20 PRINT "*****"
30 PRINT "*"
40 PRINT "* SURFACE DCMU *"
50 PRINT "*"
60 PRINT "*****"
70 IF N1 < > N4 THEN GOTO 220
80 IF DC$ < > "DC" THEN GOTO 220
90 PRINT
100 PRINT "CALCUL PAR"
105 PRINT
110 PRINT " <1> POINT MAX."
120 PRINT " <2> PLATEAU MOYEN"
140 PRINT " <3> RIEN"
150 PRINT
160 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";CX
170 IF CX = 3 THEN GOTO 260
180 GOSUB 800
190 IF CX = 1 THEN GOSUB 290
200 IF CX = 2 THEN GOSUB 920
210 GOSUB 580
220 S1$ = "S1"
230 PRINT : PRINT " *** PRESSER POUR LE MENU ***"
240 GET A$
250 PRINT
260 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
270 CALL 520"MENU,D1"
280 END
290 REM
300 REM RECHERCHE DU POINT MAX.
310 REM
320 PRINT
330 PRINT " *** ATTENDRE S.V.P. ***"
340 FOR I = 1 TO N4
350 PO(I) = 0
360 VM(I) = 0:MAX = 0
370 FOR J = 1 TO 255
380 IF MS%(J,I) > MAX THEN MAX = MS%(J,I)
390 IF MS%(J,I) = MAX THEN PO(I) = J
400 NEXT J
410 VM(I) = MAX
420 NEXT I
430 MX = 0
440 FOR I = 1 TO N4
450 IF PO(I) < 3 THEN GOTO 490
460 IF PO(I) > 252 THEN GOTO 490
470 MX = MS%(PO(I) - 2,I) * - 3 + MS%(PO(I) - 1,I) * 12 + MS%(PO(I),I) *
17 + MS%(PO(I) + 1,I) * 12 + MS%(PO(I) + 2,I) * - 3
480 VM(I) = MX / 35
490 MX = 0
500 NEXT I
510 HOME
520 PRINT
530 FOR I = 1 TO N4
540 PRINT "POINT MAX. ";I;" ";VM(I)
550 NEXT I
560 PRINT
570 RETURN
580 REM

```

```

590 REM INTEGRATION PAR SIMPSON (N=1)
600 REM
610 FOR I = 1 TO N4
620 SC(I) = 0:ADD = 0
630 FOR J = (PN(I) + 1) TO 255
640 ADD = (VM(I) - MS%(J - 1,I)) + (VM(I) - MS%(J,I))
650 ADD = ADD / 2
660 IF ADD < 0 THEN ADD = 0
670 SC(I) = SC(I) + ADD
680 NEXT J
690 NEXT I
700 FOR I = 1 TO N4
710 PRINT "SURFACE ";I;" = ";SC(I)
720 NEXT I
730 PRINT
740 FOR I = 1 TO N4
750 PRINT "A/Fvm ";I;" = ";SC(I) / VM(I)
760 NEXT I
770 RETURN
780 END
790 END
800 REM
810 REM RECHERCHE DU DEPART
820 REM
830 FOR I = 1 TO N4:PN(I) = 0: NEXT I
840 FOR I = 1 TO N4
850 FOR J = 1 TO 255
860 IF MS%(J,I) < 1 THEN PN(I) = J
870 IF MS%(J,I) > 1 THEN GOTO 890
880 NEXT J
890 PN(I) = J - 1
900 NEXT I
910 RETURN
920 REM
930 REM CALCUL DU PLATEAU MOYEN
940 REM
950 PRINT
960 PRINT "BORNES DE CALCUL (0-256)"
970 INPUT " MIN. ? ";K1
980 IF K1 < 0 OR K1 > 255 THEN GOTO 970
990 INPUT " MAX. ? ";K2
1000 IF K2 < 0 OR K2 > 255 THEN GOTO 990
1010 PRINT
1020 PRINT " *** ATTENDRE S.V.P. ***"
1030 FOR I = 1 TO N4
1040 MX = 0
1050 IF K1 < PN(I) THEN K1 = PN(I)
1060 FOR J = K1 TO K2
1070 MX = MX + MS%(J,I)
1080 NEXT J
1090 VM(I) = MX / (K2 - K1 + 1)
1100 NEXT I
1110 HOME
1120 PRINT
1130 FOR I = 1 TO N4
1140 PRINT "VALEUR MAXIMUM ";I;" = ";VM(I)
1150 NEXT I
1160 RETURN
1170 END

```

1LOAD NORMALISATION  
1LIST

```

10 HOME
20 PRINT "*****"
30 PRINT "*"
40 PRINT "*   NORM. ET MULT.   *"
50 PRINT "*"
60 PRINT "*****"
70 PRINT : PRINT
80 IF N1 < > N4 THEN GOTO 270
90 IF DC$ < > "DC" THEN GOTO 270
100 IF S1$ < > "S1" THEN GOTO 270
110 PRINT "CHOISIR UNE OPTION"
120 PRINT
130 PRINT "  <1> P/R AU MAX. DES COURBES"
140 PRINT "  <2> P/R A UNE COURBE"
150 PRINT "  <3> P/R A UNE CONSTANTE"
160 PRINT "  <4> MULT. PAR UNE CONSTANTE"
170 PRINT "  <5> MENU "
180 PRINT
190 INPUT "CHOIX ? ";CX
200 IF CX < 1 OR CX > 5 THEN GOTO 10
210 IF CX = 5 THEN GOTO 270
220 IF CX = 1 THEN GOSUB 300
230 IF CX = 2 THEN GOSUB 430
240 IF CX = 3 THEN GOSUB 560
250 IF CX = 4 THEN GOSUB 690
270 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
280 CALL 520"MENU,D1"
290 END
300 REM
310 REM   P/R MAX. DES COURBES
320 REM
325 PRINT : PRINT "   *** ATTENDRE SVP   ***"
330 Y = 0
340 FOR I = 1 TO N4
350 IF VM(I) = > Y THEN Y = VM(I)
360 NEXT I
370 FOR I = 1 TO N4
380 FOR J = 0 TO 255
390 MS$(J,I) = MS$(J,I) * (Y / VM(I))
400 NEXT J
410 NEXT I
420 RETURN
430 REM
440 REM   P/R A UNE COURBE
450 REM
460 PRINT
470 INPUT "QUEL EST LA COURBE ? ";CR
480 IF CR > N4 THEN GOTO 470
490 Y = VM(CR)
495 PRINT : PRINT "   *** ATTENDRE SVP   ***"
500 FOR I = 1 TO N4
510 FOR J = 0 TO 255
520 MS$(J,I) = MS$(J,I) * (Y / VM(I))
530 NEXT J
540 NEXT I
550 RETURN
560 REM
570 REM   P/R A UNE CONSTANTE
580 REM

```

```
590 PRINT
600 INPUT "QUEL EST LE MAX. (100-175) ? ";CB
610 IF CB < 100 OR CB > 175 THEN GOTO 600
620 Y = CB
625 PRINT : PRINT "    *** ATTENDRE SVP ***"
630 FOR I = 1 TO N4
640 FOR J = 0 TO 255
650 MS%(J,I) = MS%(J,I) * (Y / VM(I))
660 NEXT J
670 NEXT I
680 RETURN
690 REM
700 REM MULT. PAR UNE CONSTANTE
710 REM
720 PRINT
730 INPUT "FACTEUR DE MULT. ? ";Y
735 PRINT : PRINT "    *** ATTENDRE SVP ***"
740 FOR I = 1 TO N4
750 FOR J = 0 TO 255
760 MS%(J,I) = MS%(J,I) * Y
770 IF MS%(J,I) > 190 THEN MS%(J,I) = 190
780 NEXT J
790 NEXT I
800 RETURN
810 END
```

```

3LOAD Fvm-Ft
JLIST

```

```

10 HOME
20 PRINT "*****"
30 PRINT "*"
40 PRINT "* LOG (Fvm-F(t)) *"
50 PRINT "*"
60 PRINT "*****"
70 IF N1 < > N4 THEN GOTO 300
80 IF DC$ < > "DC" THEN GOTO 300
90 IF S1$ < > "S1" THEN GOTO 300
100 PRINT
105 PRINT "CHOISIR UNE OPTION "
106 PRINT
107 PRINT " <1> CALCUL LOG(Fvm-Ft)"
108 PRINT " <2> MENU"
109 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";CX
110 IF CX < 1 OR CX > 2 THEN GOTO 10
120 IF CX = 2 THEN GOTO 300
130 PRINT
140 INPUT "SUR IMPRIMANTE, 0 OUI, 1 NON ? ";IM
160 IF IM = 1 THEN GOTO 200
165 PRINT " PRINT "ECHELLE" : PRINT
170 PRINT " <1> 1X"
180 PRINT " <2> 2X"
190 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";II
200 INPUT "SUPERPOSITION, 0 OUI, 1 NON ? ";SU
205 INPUT "ORDONNEE Y (0-(-Y)) ? ";YM
207 IF YM > 0 THEN YM = - YM
210 PRINT : PRINT : PRINT "*** ATTENDRE S.V.P. ***"
220 US = 1
230 FOR I = 1 TO N4
240 GOSUB 420
250 GOSUB 330
260 GOSUB 500
270 NEXT I
280 HOME : TEXT
290 PRINT : PRINT " *** ATTENDRE S.V.P. ***"
300 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
310 CALL 520"MENU,D1"
320 END
330 REM
340 REM CALCUL DE LOG(Fvm-F(t))
350 REM
360 FOR J = 1 TO 255
370 ST = 1 - T(J)
380 IF ST < = 0 THEN GOTO 400
390 T(J) = LOG (ST)
400 NEXT J
410 RETURN
420 REM
430 REM TRANSFERT ET NORMALISATION
440 REM
450 FOR J = 1 TO 255
460 T(J) = MS$(J,I) / VM(I)
470 NEXT J
480 RETURN
490 END
500 REM
510 REM GRAPHIQUE
520 REM
530 IF US = 0 THEN GOTO 570

```

```
530 IF SU = 0 THEN GOTO 670
540 HCOLOR= 3
550 HGR2
560 HPLOT 0,0 TO 279,0 TO 279,190 TO 0,190 TO 0,0
570 FOR J = 1 TO 255
580 Y = T(J) * (190 / ABS (YM))
590 Y = ABS (Y)
600 IF Y < 0 THEN Y = 0
610 IF Y > 190 THEN Y = 190
620 X = J * 1.06984375
630 HPLOT X,Y
640 NEXT J
650 GET A#
660 IF SU = 0 AND I < > N4 THEN GOTO 720
670 IF IM = 1 THEN GOTO 720
680 PR# 1
690 IF II = 1 THEN PRINT CHR# (9);"G2E"
700 IF II = 2 THEN PRINT CHR# (9);"G2D"
710 PR# 0
720 US = SU
730 GET A#
740 RETURN
750 END
```

```

3LOAD ALPHA BETA
3LIST

```

```

10 HOME
20 PRINT "*****"
30 PRINT "*"
40 PRINT "* RC ALPHA ET BETA *"
50 PRINT "*"
60 PRINT "*****"
70 IF N1 < > N4 THEN GOTO 390
80 IF DC$ < > "DC" THEN GOTO 390
90 IF S1$ < > "S1" THEN GOTO 390
100 PRINT
110 PRINT "CHOISIR UNE OPTION"
111 PRINT
112 PRINT " <1> CALCUL RC ALPHA-BETA"
113 PRINT " <2> MENU"
114 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";CX
115 IF CX < 1 OR CX > 2 THEN GOTO 10
120 IF CX = 2 THEN GOTO 390
125 PRINT
130 INPUT "SUR IMPRIMANTE, 0 OUI, 1 NON ? ";IM
135 IF IM < 0 OR IM > 1 THEN GOTO 130
140 IF IM = 1 THEN GOTO 190
145 PRINT
150 PRINT "ECHELLE"
155 PRINT
160 PRINT " <1> 1X"
170 PRINT " <2> 2X"
175 PRINT
180 INPUT "CHOIX ? ";II
190 INPUT "SUPERPOSITION, 0 OUI, 1 NON ? ";SU
195 HOME
200 INPUT "ORDONNEE Y (0-(-Y)) ? ";AY
205 IF AY > 0 THEN AY = - AY
210 INPUT "MAX. X (1-256) ? ";AX
212 IF AX < 1 OR AX > 256 THEN GOTO 210
215 PRINT
220 PRINT "MAX. DES COURBES"
225 PRINT
230 PRINT " <1> AUTOMATIQUE"
240 PRINT " <2> MANUEL"
245 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";MP
247 IF MP < 1 OR MP > 2 THEN GOTO 215
250 IF MP = 2 THEN GOSUB 1000
260 IF MP = 1 THEN GOSUB 1080
270 PRINT : PRINT
280 RC$ = "RC"
290 PRINT " *** ATTENDRE S.V.P. ***"
300 GOSUB 420
310 US = 1
320 FOR I = 1 TO N4
330 GOSUB 540
340 GOSUB 660
350 GOSUB 750
360 NEXT I
370 HOME : TEXT
380 PRINT : PRINT "*** ATTENDRE S.V.P. ***"
390 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
400 CALL 520"MENU,D1"
410 END
420 GCM

```

```

720 REM
430 REM RECHERCHE DU DEPART
440 REM
450 FOR I = 1 TO N4:PT(I) = 0: NEXT I
460 FOR I = 1 TO N4
470 FOR J = 1 TO 255
480 IF MS%(J,I) < 1 THEN PT(I) = J
490 IF MS%(J,I) > 1 THEN GOTO 510
500 NEXT J
510 PT(I) = J - 1
520 NEXT I
530 RETURN
540 REM
550 REM INTEGRATION
560 REM
570 SC(I) = 0:ADD = 0
580 FOR J = (PT(I) + 1) TO 255
590 ADD = (SM(I) - MS%(J - 1,I)) + (SM(I) - MS%(J,I))
600 ADD = ADD / 2
610 IF ADD < 0 THEN ADD = 0
620 SC(I) = ADD + SC(I)
630 T(J) = SC(I)
640 NEXT J
650 RETURN
660 REM
670 REM CALCUL DE LOG(SC-U%)/SC
680 REM
690 FOR J = PT(I) TO 255
700 T(J) = (SC(I) - T(J)) / SC(I)
710 IF T(J) < = 0 THEN GOTO 730
720 T(J) = LOG (T(J))
730 NEXT J
740 RETURN
750 REM
760 REM GRAPHIQUE
770 REM
780 IF US = 0 THEN GOTO 820
790 HCOLOR= 3
800 HGR2
810 HPLOT 0,0 TO 279,0 TO 279,190 TO 0,190 TO 0,0
820 FOR J = PT(I) TO AX
830 Y = T(J) * (190 / ABS (AY))
840 Y = ABS (Y)
850 IF Y < 0 THEN Y = 0
860 IF Y > 190 THEN Y = 190
870 X = J * (279 / AX)
880 HPLOT X,Y
890 NEXT J
900 GET A$
910 IF SU = 0 AND I < > N4 THEN GOTO 970
920 IF IM = 1 THEN GOTO 970
930 PR# 1
940 IF II = 1 THEN PRINT CHR$(9);"G2E"
950 IF II = 2 THEN PRINT CHR$(9);"G2D"
960 PR# 0
970 US = SU
980 GET A$
990 RETURN
1000 REM
1010 REM INPUT MANUEL DES MAX.
1020 REM
1030 FOR I = 1 TO N4
1040 INPUT "MAX.= ";SM(I)
1050 NEXT I
1060 RETURN
1070 END
1080 REM

```

```
1089 REM  
1090 REM INPUT AUTO. DES MAX.  
1100 REM  
1110 FOR I = 1 TO N4  
1120 SM(I) = VM(I)  
1130 NEXT I  
1140 RETURN  
1150 END
```

```

JLOAD ALPHA
JLIST

10 HOME
20 PRINT "*****"
30 PRINT "*"
40 PRINT "* CALCUL DU RC ALPHA *"
50 PRINT "*"
60 PRINT "*****"
70 IF N1 < > N4 THEN GOTO 250
75 PRINT
76 PRINT "CHOISIR UNE OPTION"
77 PRINT
78 PRINT " <1> CALCUL DU ALPHA "
79 PRINT " <2> MENU"
80 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";CX
81 IF CX < 1 OR CX > 2 THEN GOTO 10
82 IF CX = 2 THEN GOTO 250
90 PRINT : INPUT "SUR IMPRIMANTE, 0 OUI, 1 NON ? ";IM
91 IF IM = 1 THEN GOTO 100
92 PRINT : PRINT "ECHELLE": PRINT
93 PRINT " <1> 1X"
94 PRINT " <2> 2X"
95 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";II
100 INPUT "SUPERPOSITION, 0 OUI, 1 NON ? ";SU
110 GOSUB 1130
120 PRINT : PRINT
130 PRINT " *** ATTENDRE S.V.P. ***"
160 GOSUB 580
170 US = 1
180 FOR I = 1 TO N4
190 GOSUB 700
200 GOSUB 810
210 GOSUB 910
220 NEXT I
230 HOME : TEXT
240 PRINT : PRINT "*** ATTENDRE S.V.P. ***"
250 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
260 CALL 520"MENU,D1"
270 END
580 REM
590 REM RECHERCHE DU DEPART
600 REM
610 FOR I = 1 TO N4:PT(I) = 0: NEXT I
620 FOR I = 1 TO N4
630 FOR J = 1 TO 255
640 IF MS%(J,I) < 1 THEN PT(I) = J
650 IF MS%(J,I) > 1 THEN GOTO 670
660 NEXT J
670 PT(I) = J - 1
680 NEXT I
690 RETURN
700 REM
710 REM INTEGRATION
720 REM
730 SC(I) = 0:ADD = 0
740 FOR J = PT(I) TO 255
750 ADD = (VM(I) - MS%(J - 1,I)) + (VM(I) - MS%(J,I))
760 ADD = ADD / 2
765 IF ADD < 0 THEN ADD = 0
770 SC(I) = ADD + SC(I)
780 T(J) = SC(I)

```

```

790 NEXT J
800 RETURN
810 REM
820 REM   CALCUL DE (SC-T)/SC
830 REM
840 FOR J = PT(I) TO 255
850 T(J) = (SC(I) - T(J)) / SC(I)
860 T(J) = T(J) - (BM * (1 - EXP (- PB * J)))
870 IF T(J) < = 0 THEN GOTO 890
880 T(J) = LOG (T(J))
890 NEXT J
900 RETURN
910 REM
920 REM   GRAPHIQUE
930 REM
940 IF US = 0 THEN GOTO 980
950 HCOLOR= 3
960 HGR2
970 HPLOT 0,0 TO 279,0 TO 279,190 TO 0,190 TO 0,0
980 FOR J = PT(I) TO 255
990 Y = T(J) * (190 / ABS (PM))
1000 Y = ABS (Y)
1010 IF Y < 0 THEN Y = 0
1020 IF Y > 190 THEN GOTO 1040
1025 X = J * 1.08984375
1030 HPLOT X,Y
1040 NEXT J
1050 GET A$
1060 IF SU = 0 AND I < > N4 THEN GOTO 1110
1070 IF IM = 1 THEN GOTO 1110
1080 PR# 1
1085 IF II = 1 THEN PRINT CHR$(9);"G2E"
1090 IF II = 2 THEN PRINT CHR$(9);"G2D"
1100 PR# 0
1110 US = SU
1120 RETURN
1130 REM
1140 REM   ENTREE DES DONNEES
1150 REM
1170 INPUT "BETA MAX. EN Y (0-(-K)) ? ";BM
1172 IF BM > 0 THEN BM = - BM
1175 BM = EXP (BM)
1180 INPUT "PENTE BETA ? ";PB
1185 PB = ABS (PB)
1187 INPUT "ORDONNEE Y (0-(-Y)) ? ";PM
1189 IF PM > 0 THEN PM = - PM
1190 RETURN
1200 END

```

JLOAD DELTA A DCMU  
JLIST

```

10 HOME
20 PRINT "*****"
30 PRINT "*"
40 PRINT "* SURFACE A VS Fvm DCMU *"
50 PRINT "*"
60 PRINT "*****"
70 IF DC$ < > "DC" THEN GOTO 260
80 IF S1$ < > "S1" THEN GOTO 260
81 PRINT : PRINT "CHOISIR UNE OPTION"
82 PRINT : PRINT " <1> CALCUL A VS F"
83 PRINT " <2> MENU"
84 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";CX
85 IF CX < 1 OR CX > 2 THEN GOTO 10
86 IF CX = 2 THEN GOTO 260
90 PRINT : INPUT "IMPRESSION, <0> OUI, <1> NON ? ";IM
100 IF IM = 1 THEN GOTO 140
105 PRINT : PRINT "ECHELLE": PRINT
110 PRINT " <1> 1X"
120 PRINT " <2> 2X"
130 PRINT : INPUT "CHOIX ? ";II
140 INPUT "SUPERPOSITION, 0 OUI, 1 NON ? ";SU
150 PRINT
160 PRINT " *** ATTENDRE S.V.P. ***"
170 GOSUB 290
180 US = 1
190 FOR I = 1 TO N4
200 GOSUB 410
210 GOSUB 530
220 GOSUB 610
230 NEXT I
240 HOME : TEXT
250 PRINT : PRINT "*** ATTENDRE S.V.P. ***"
260 PRINT CHR$(4);"BLOAD CHAIN,A520,D1"
270 CALL 520"MENU,D1"
280 END
290 REM
300 REM RECHERCHE DU DEPART
310 REM
320 FOR I = 1 TO N4:PT(I) = 0: NEXT I
330 FOR I = 1 TO N4
340 FOR J = 1 TO 255
360 IF MS%(J,I) > 1 THEN GOTO 380
370 NEXT J
380 PT(I) = J - 1
390 NEXT I
400 RETURN
410 REM
420 REM INTEGRATION
430 REM
440 SC(I) = 0:ADD = 0
450 IF PT(I) = 0 THEN PT(I) = 1
460 FOR J = PT(I) + 1 TO 255
470 ADD = (VM(I) - MS%(J - 1,I)) + (VM(I) - MS%(J,I))
475 IF ADD < 0 THEN ADD = 0
480 ADD = ADD / 2
490 SC(I) = ADD + SC(I)
500 T(J) = SC(I)
510 NEXT J
520 RETURN
530 REM

```

```
530 REM
540 REM  CALCUL DE LOG(SC-U%)/SC)
550 REM
560 FOR J = PT(I) TO 255
570 T(J) = T(J) / SC(I)
580 IF T(J) < = 0 THEN GOTO 590
590 NEXT J
600 RETURN
610 REM
620 REM  GRAPHIQUE
630 REM
640 IF US = 0 THEN GOTO 690
650 HCOLOR= 3
660 HGR2
670 HPLOT 0,0 TO 250,0 TO 250,190 TO 0,190 TO 0,0
680 GOSUB 860
690 FOR J = PT(I) TO 255
700 X = (MS%(J,I) / VM(I)) * 250
710 Y = T(J) * 190
720 IF Y < 0 THEN Y = 0
730 IF Y > 190 THEN Y = 190
740 Y = 190 - Y
750 HPLOT X,Y
760 NEXT J
770 IF SU = 0 AND I < > N4 THEN GOTO 830
780 IF IM = 1 THEN GOTO 830
790 PR# 1
800 IF II = 1 THEN PRINT CHR$(9);"G2E"
810 IF II = 2 THEN PRINT CHR$(9);"G2D"
820 PR# 0
830 US = SU
840 GET A$
850 RETURN
860 REM
870 REM  SCALE
880 REM
890 FOR K = 0 TO 190 STEP 19
900 HPLOT 0,K TO 4,K
910 NEXT K
920 FOR K = 0 TO 250 STEP 25
930 HPLOT K,187 TO K,190
940 NEXT K
950 RETURN
960 END
```