

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A TROIS-RIVIÈRES

MÉMOIRE PRÉSENTÉ A
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR
MARC CHARLAND

MESURE DE L'ACTIVITÉ PHOTOSYNTÉTIQUE CHEZ LES PLANTES
SUPÉRIEURES PAR LA SPECTROSCOPIE PHOTOACOUSTIQUE

JUIN 1989

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.

A mes parents

"Dans les champs de l'observation,
le hasard ne favorise que les
esprits préparés"

Louis Pasteur

RÉSUMÉ

Les organismes photosynthétiques peuvent, suite à l'absorption d'énergie lumineuse, transformer de l'eau et du gaz carbonique en glucides et en oxygène. L'énergie solaire est drainée vers deux centres réactionnels où, dans des conditions optimales, une grande quantité est emmagasinée à des fins photosynthétiques.

La spectroscopie photoacoustique mesure le dégagement de chaleur d'un échantillon suite à l'absorption de lumière. Ceci permet l'établissement d'une carte chromophorique de l'échantillon appelée profil de profondeur. Dans le cas d'une feuille, il devient aussi possible, grâce à la spectroscopie photoacoustique, de déterminer le dégagement d'oxygène consécutif à l'activation de l'appareil photosynthétique. Nous utilisons cette technique afin de mesurer l'activité photosynthétique de l'érable à sucre, du haricot, de l'impatiens et du maïs.

Les profils de profondeur des plantes à l'étude sont présentés. Ils permettent de visualiser la présence des principaux pigments photosynthétiques ainsi que leur localisation à l'intérieur des différentes couches de la feuille. Outre cet aspect morphologique, des données d'ordre physiologique sont aussi obtenues. Dans un premier temps, nous définissons les paramètres photoacoustiques optimaux d'utilisation. C'est ainsi que les effets du temps, de la fréquence de modulation et de l'intensité des

faisceaux actinique et modulé sur le signal photoacoustique sont caractérisés. Par la suite, nous nous servons de ces conditions expérimentales afin d'évaluer l'activité photosynthétique des plantes à l'étude. L'impatiens présente la plus forte activité suivie dans l'ordre par le maïs, le haricot et l'érable à sucre.

L'érable à sucre possède une activité photosynthétique bien inférieure à celle des autres plantes. Nous émettons l'hypothèse que la photorespiration, un mécanisme régulateur de la photosynthèse pourrait expliquer cette faible activité. En utilisant différents mélanges gazeux et de l'acide glycidique, un inhibiteur de cette voie métabolique, nous suggérons que l'activité photosynthétique, telle que détectée en spectroscopie photoacoustique est modifiée par la photorespiration.

Ainsi, le présent travail caractérise les paramètres d'utilisation de la technique photoacoustique en vue de travaux ultérieurs portant sur le dépérissement des forêts. De plus, une analyse de la régulation de la photosynthèse est entreprise, ce qui permet d'apporter un éclairage nouveau sur les mesures photoacoustiques de l'activité photosynthétique.

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je me dois de remercier celui qui a dirigé mon travail au cours de ces derniers mois, le Dr Roger M. Leblanc. L'effort qu'il déploie au travail, sa volonté de réussir, sa gentillesse et sa grande patience ne peuvent que servir d'exemple lorsque vient le temps d'aborder des travaux de recherche.

Pas très loin derrière (à peine un paragraphe plus bas), se trouve mon superviseur, le Dr Christophe N. N'soukpoé-Kossi. Christophe, en conservant sa porte et son esprit toujours ouverts, m'a permis de mieux percevoir le cheminement scientifique lors de plusieurs discussions fort stimulantes et franches.

Je m'en voudrais d'oublier de remercier messieurs Paul Boivin et Alain Tessier pour leur constant support. Merci aussi à Paul pour son aide dans l'analyse des composantes vectorielles du signal photoacoustique. Par la même occasion, ma gratitude va à tous et toutes mes collègues du Centre pour leur gentillesse et leurs nombreux encouragements.

Finalement, je remercie avec une humilité profonde mon amie Marie-Hélène pour sa confiance et sa grande patience. Je me permet de dédier ce mémoire à mes parents en reconnaissance de leur inestimable support moral.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
CHAPITRES	
I. INTRODUCTION.....	1
A) La photosynthèse.....	1
1) Historique de la photosynthèse.....	1
2) Description de la photosynthèse.....	4
B) Le développement de la spectroscopie photoacoustique....	15
C) Les objectifs du travail.....	23
II. LA SPECTROSCOPIE PHOTOACOUSTIQUE.....	25
A) Théorie de l'effet photoacoustique dans les solides....	25
1) Équations du flux de chaleur.....	25
2) Distribution de la température dans la cellule.....	30
3) Production du signal acoustique.....	32
4) Cas spéciaux.....	36

	Page
B) Application à l'étude de la photosynthèse.....	42
1) Principe d'application.....	42
2) Profil de profondeur.....	45
3) Mesure de l'activité photosynthétique.....	45
III. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	53
A) Les produits utilisés.....	53
B) Les plantes.....	53
C) Le spectromètre photoacoustique.....	56
D) Les mesures photoacoustiques.....	60
IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	63
A) Les profils de profondeur.....	63
B) Les mesures de l'activité photosynthétique.....	68
1) Effet du temps.....	69
2) Effet de la fréquence de modulation.....	72
3) Effet de l'intensité du faisceau actinique.....	74
4) Effet de l'intensité du faisceau modulé.....	77
5) Mesure de l'activité photosynthétique.....	79
C) Détection d'une activité photorespiratoire.....	82

	Page
V. CONCLUSION.....	94
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	97

LISTE DES FIGURES

	Page
1 Niveaux organisationnels de la photosynthèse chez les végétaux. Schémas de coupes transversales d'une feuille (a), d'une cellule végétale (b) et d'un chloroplaste (c). Tirées de Alberts et al., 1983.....	5
2 Composition de la membrane thylacoïdienne. D'après Staehelin et Arntzen, 1983.....	7
3 Le cycle de Calvin. D'après Lehninger, 1981.....	9
4 La fixation du CO ₂ chez les végétaux en C ₄ . Tirée de Lehninger, 1981.....	11
5 La localisation de la photorespiration chez les végétaux. D'après Ting, 1981.....	13
6 Le spectrophone de A.G. Bell. Tirée de Bell, 1881.....	15
7 Schéma de l'intérieur d'une cellule photoacoustique cylindrique.....	26

LISTE DES FIGURES

	Page
1 Niveaux organisationnels de la photosynthèse chez les végétaux. Schémas de coupes transversales d'une feuille (a), d'une cellule végétale (b) et d'un chloroplaste (c). Tirées de Alberts et al., 1983.....	5
2 Composition de la membrane thylacoïdienne. D'après Staehelin et Arntzen, 1983.....	7
3 Le cycle de Calvin. D'après Lehninger, 1981.....	9
4 La fixation du CO ₂ chez les végétaux en C ₄ . Tirée de Lehninger, 1981.....	11
5 La localisation de la photorespiration chez les végétaux. D'après Ting, 1982.....	13
6 Le spectrophone de A.G. Bell. Tirée de Bell, 1881.....	15
7 Schéma de l'intérieur d'une cellule photoacoustique cylindrique.....	26

	Page
8 Répartition de la température dans la couche gazeuse adjacente à l'interface échantillon-gaz pour diffé- rentes valeurs de wt. Tirée de Rosencwaig, 1980.....	34
9 Représentation schématique de l'effet photoacoustique dans les solides (Cas spéciaux).....	37
10 Modes de désexcitation de la chlorophylle <u>in vivo</u>	43
11 Variation de la longueur de diffusion thermique dans les feuilles selon la fréquence de modulation.....	46
12 Représentation schématique des composantes vectorielles du signal photoacoustique dans les feuilles à faible fréquence de modulation ($f < 200$ Hz).....	49
13 Le spectromètre photoacoustique.....	58
14 Spectres photoacoustiques de feuilles matures (a) d'éra- ble à sucre, (b) de haricot, (c) d' <u>impatiens</u> et (d) de maïs. $f_{mod} = 35$ Hz, $I_{mod} = 4 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{act} = 350 \text{ W m}^{-2}$	64

	Page
15 Profils de profondeur de feuilles matures (a) d'érable à sucre, (b) de haricot, (c) <u>d'impatiens</u> et (d) de maïs. $I_{mod} = 4 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{act} = 350 \text{ W m}^{-2}$	66
16 A) Variation de l'effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique de feuilles d'érable à sucre (Θ), de haricot (\square), <u>d'impatiens</u> (\odot) et de maïs (Δ) en fonction du temps. $f_{mod} = 80 \text{ Hz}$, $I_{mod} = 4 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{act} = 350 \text{ W m}^{-2}$	70
B) Exemple de résultats: variation du signal photoacoustique d'une feuille de maïs en présence (\uparrow) et en absence (\downarrow) du faisceau actinique en fonction du temps. Conditions similaires à A.....	70
17 A) Variation de l'effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique de feuilles d'érable à sucre (Θ), de haricot (\square), <u>d'impatiens</u> (\odot) et de maïs (Δ) en fonction de la fréquence de modulation. $I_{mod} = 4 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{act} = 350 \text{ W m}^{-2}$	73
B) Exemple de résultats: effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique d'une feuille <u>d'impatiens</u> à basse (80 Hz) et haute (300 Hz) fréquences de modulation. Conditions similaires à A.....	73

	Page
18 A) Variation de l'effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique de feuilles d'étable à sucre (\ominus), de haricot (\square), <u>d'impatiens</u> (\oslash) et de maïs (Δ) en fonction de son intensité. $f_{mod} = 40$ Hz pour le haricot, 80 Hz pour les autres. $I_{mod} = 7 \text{ W m}^{-2}$	76
B) Exemple de résultats: effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique d'une feuille de haricot. Conditions similaires à A.....	76
19 A) Variation de l'effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique de feuilles d'étable à sucre (\ominus), de haricot (\square), <u>d'impatiens</u> (\oslash) et de maïs (Δ) en fonction de l'intensité du faisceau modulé. $f_{mod} = 40$ Hz pour le haricot, 80 Hz pour les autres; $I_{act} = 200 \text{ W m}^{-2}$ pour l'étable à sucre et le haricot, 250 W m^{-2} pour le maïs et 300 W m^{-2} pour <u>l'impatiens</u>	78
B) Exemple de résultats: effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique d'une feuille <u>d'impatiens</u> . Conditions similaires à A.....	78

	Page
20 Variation de l'effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique (O) et de la masse (Δ) d'une feuille d'éryable à sucre selon le temps. $f_{mod} = 80 \text{ Hz}$; $I_{mod} = 7 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{act} = 200 \text{ W m}^{-2}$. ↗ mise en sandwich entre papiers humides, ↘ mise à l'air libre.....	84
21 Variations des signaux en phase (C) et en quadrature (S) de feuilles d'éryable à sucre (a) et d' <u>impatiens</u> (b). $f_{mod} = 20 \text{ Hz}$, $I_{mod} = 7 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{act} = 300 \text{ W m}^{-2}$	85
22 Variation de l'effet du faisceau actinique sur des feuilles d'éryable à sucre selon le mélange gazeux. $f_{mod} = 80 \text{ Hz}$, $I_{mod} = 7 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{act} = 200 \text{ W m}^{-2}$	87
23 Effet de l'acide glycidique sur les paramètres photoacoustiques de mesure de l'activité photosynthétique de feuilles d'éryable à sucre. $f_{mod} = 20 \text{ Hz}$, $I_{mod} = 7 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{act} = 220 \text{ W m}^{-2}$	91

LISTE DES TABLEAUX

	Page
1 Quelques points de comparaison de la photosynthèse chez les plantes en C ₃ et en C ₄	14
2 Caractéristiques des produits utilisés.....	54
3 Mesure de l'activité photosynthétique de différentes plantes.....	80
4 Effet du faisceau actinique sur le signal photoacousti- que de feuilles d'érable à sucre enduites de silicium.....	89
5 Effet du faisceau actinique sur la variation du signal photoacoustique de feuilles traitées à l'acide glycidique....	92

CHAPITRE I

INTRODUCTION

A) LA PHOTOSYNTHÈSE

La photosynthèse est un processus métabolique fondamental pour tous les êtres vivants. En permettant la transformation de l'énergie solaire en énergie chimique, elle constitue la source immédiate d'énergie pour les plantes vertes et les autres autotrophes photosynthétiques. De plus, elle représente la source ultime d'énergie pour tous les organismes hétérotrophes par l'intermédiaire des chaînes alimentaires présentes dans la biosphère.

1) Historique de la photosynthèse

Les recherches sur cette mystérieuse boîte noire qui constitue la clef de la vie sur Terre ne datent pas d'hier. Déjà au IV^e siècle avant notre ère, Aristote constata que la lumière était nécessaire à la croissance des plantes. Beaucoup plus tard, S. Hales (1727) démontra la justesse de cette assertion, en plus de proposer que l'air avait un rôle à jouer dans la nutrition des végétaux. J. Priestley (1771) fut le premier à montrer que les plantes échangeaient des gaz

avec leur environnement, l'oxygène étant rejeté. J. Ingenhousz (1780) prouva que le dégagement d'oxygène nécessitait de la lumière.

N. de Saussure, au début du XIX^e siècle, établit que, dans l'obscurité, les plantes respiraient, inhalant de l'oxygène et rejetant du gaz carbonique. De plus, il fut le premier à relier l'eau au processus photosynthétique. Les travaux de J. Sachs, au milieu du XIX^e siècle, permirent de découvrir que la chlorophylle se trouvait uniquement dans les chloroplastes et que l'amidon constituait lui aussi un produit de la photosynthèse. Les pigments de chlorophylles a et b, responsables de l'absorption lumineuse, ne furent isolés et caractérisés qu'en 1918 par Wilstatter et Stoll.

C. Blackman (1920) mena des expériences qui sont à la base du concept des deux photosynthèses; une, lumineuse (photochimique) et l'autre sombre (enzymatique). C.B. van Niel mit en évidence la similitude des processus photosynthétiques des bactéries et des végétaux. Les travaux de R. Hill (1939) permirent de conclure que l'oxygène dégagé par des chloroplastes provenait de l'eau, lorsqu'on y ajoutait des accepteurs d'électrons appropriés.

Les années cinquante constituèrent une véritable plaque tournante dans les recherches au niveau de la photosynthèse. D. Arnon montra que le NADPH constituait un produit final des réactions lumineuses et qu'il était important dans la réduction ultérieure du CO₂. De

plus, il démontra que la phosphorylation, la formation d'ATP, était liée à la présence de lumière. Pendant ce temps, M. Calvin et ses collaborateurs, grâce à l'utilisation de marqueurs radioactifs éluciderent le côté biochimique de la photosynthèse en découvrant comment le CO₂ est métabolisé à l'intérieur d'un cycle qui porte maintenant son nom. De plus, les études sur la fixation du CO₂ permirent de scinder les plantes en deux grandes catégories.

R. Emerson, en examinant l'activité photosynthétique à l'intérieur du spectre visible, conclut que deux longueurs d'onde, une, inférieure à 680 nm et une seconde, supérieure à 700 nm, étaient nécessaires afin de maximiser cette activité. Cette découverte est à l'origine du concept des deux photosystèmes que nous connaissons aujourd'hui. Toujours à la même époque, Hill et Bendall décrivirent les réactions lumineuses comme une suite de réactions d'oxydo-réduction dont les deux photosystèmes, reliés en série, sont les agents moteurs.

Les articles qui ont servi à présenter ce bref historique sont les suivants: Bidwell, 1979; Clayton, 1980; Salisbury et Ross, 1978; Sheeler et Bianchi, 1987.

2) Description de la photosynthèse

L'étude de la photosynthèse requiert la collaboration de scientifiques oeuvrant dans plusieurs champs disciplinaires. Les trois composantes de ce processus, l'absorption de l'énergie lumineuse et sa transformation, la synthèse glucidique et le dégagement d'oxygène forment autant de grands axes de recherches.

L'énergie quantique capturée par l'organisme photosynthétique est transformée en énergie potentielle chimique présente dans les liens des glucides. Cette transformation démarre ainsi le cycle énergétique dans la nature. Quant à l'oxygène dégagé au cours de la photosynthèse, il devient l'ultime agent oxydant des réactions du métabolisme cellulaire des êtres vivants.

Dans la cellule végétale (figure 1b), l'organite responsable de l'activité photosynthétique est le chloroplaste (figure 1c). D'une taille pouvant varier de 1 à 10 μm , leur nombre peut passer de 1 dans certaines algues eucaryotes comme Chlorella jusqu'à 40 dans les cellules des végétaux supérieurs (Lehnninger, 1981). Les chloroplastes sont, avec les mitochondries, les seuls organites à posséder de l'ADN extra-nucléaire (Sheeler et Bianchi, 1987). Ils contiennent aussi de l'amidon présent sous forme de granules.

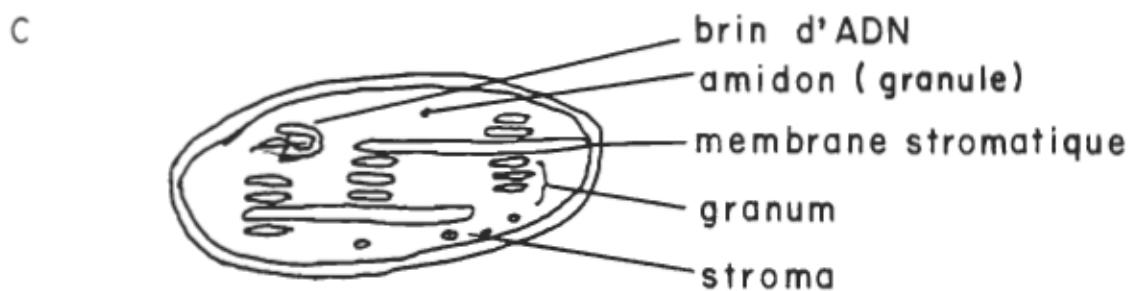
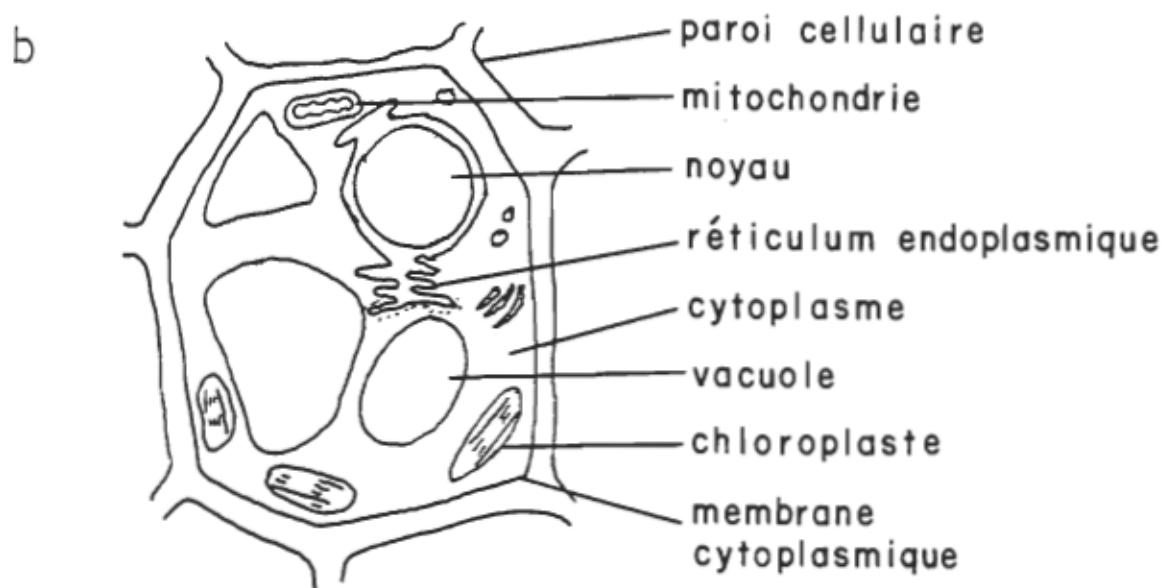
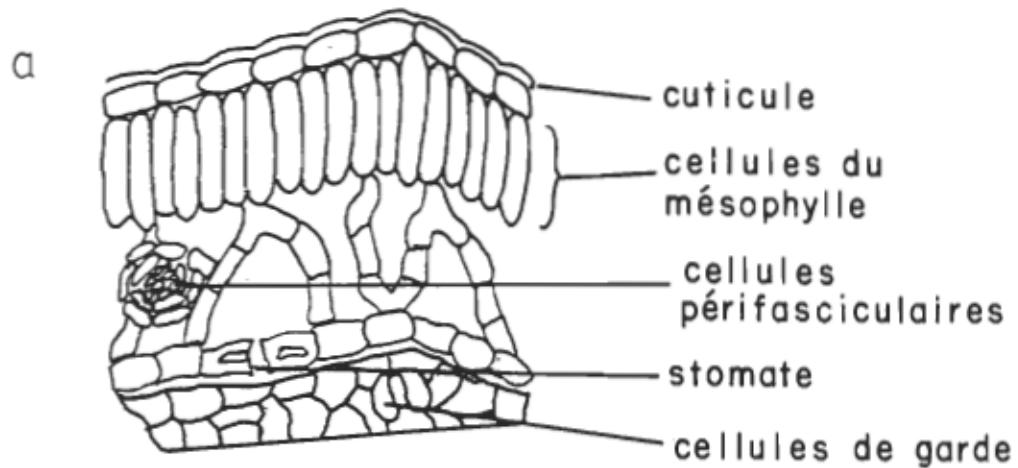


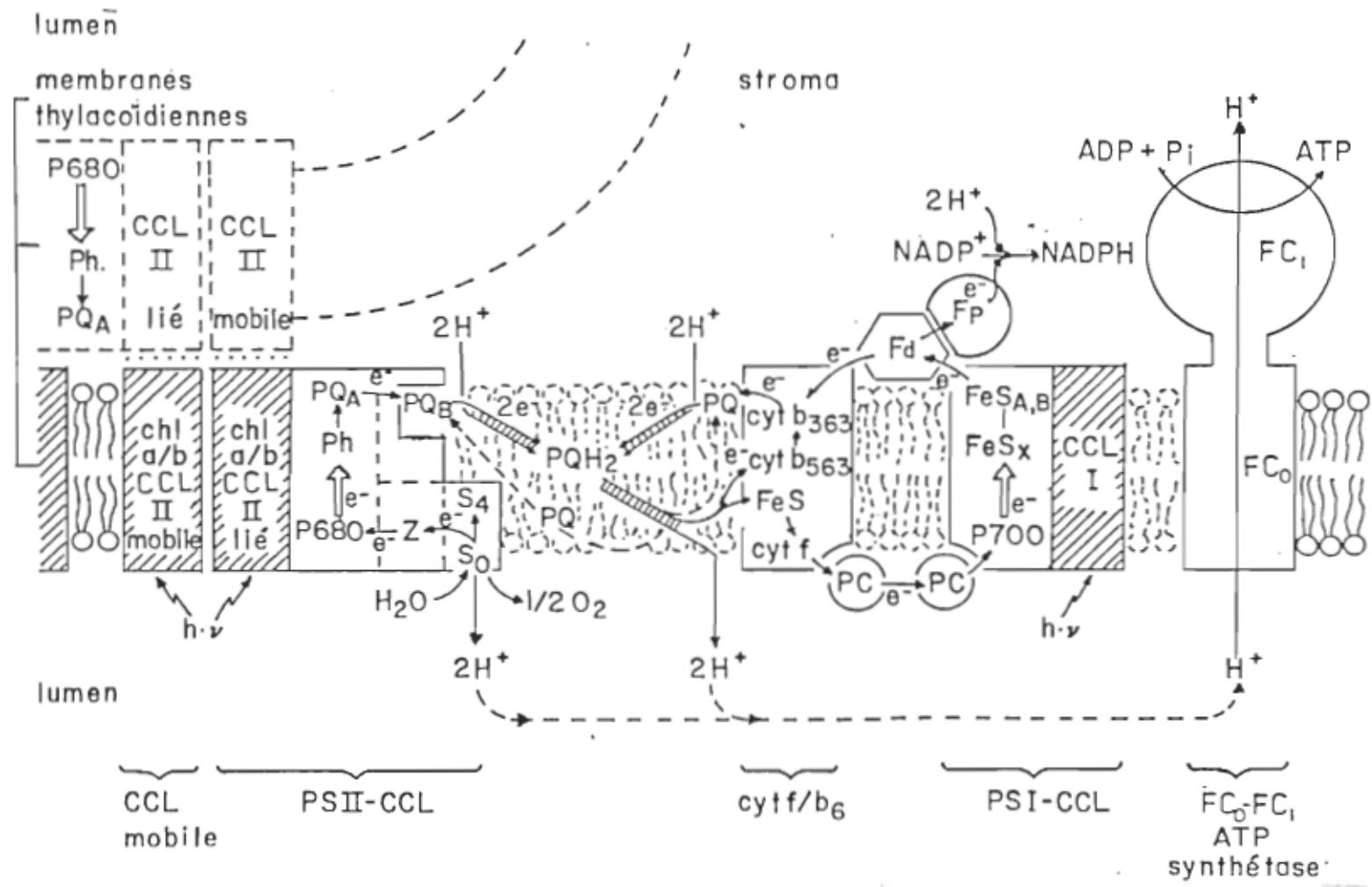
Figure 1: Niveaux organisationnels de la photosynthèse chez les végétaux. Schémas de coupes transversales d'une feuille (a), d'une cellule végétale (b) et d'un chloroplaste (c). Tirées de Alberts et al., 1983.

Les chloroplastes sont entourés d'une membrane externe unique et continue. De plus, une membrane interne forme, suite à des replisements, des disques dits thylacoïdes. Ces disques se retrouvent en empilements nommés grana (figure 1c). Le stroma, liquide dans lequel baigne les grana, contient la majeure partie des protéines utiles à la photosynthèse, en plus des acides nucléiques chloroplastiques et des granules d'amidon. Les membranes thylacoïdiennes possèdent tous les pigments photosynthétiques ainsi que les protéines nécessaires aux réactions primaires de la photosynthèse.

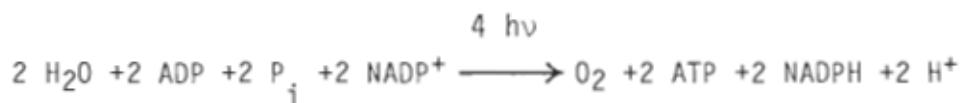
L'acte photosynthétique peut être scindé en deux parties: (i) la première, dite phase lumineuse, comprend les réactions photochimiques d'absorption et de transformation de l'énergie lumineuse. (ii) Quant à la seconde, la phase obscure, elle est constituée des réactions enzymatiques qui fixent le CO₂.

La figure 2 schématisé l'ensemble des réactions photochimiques et biochimiques à la surface et dans la membrane thylacoïdienne. Les photons de lumière sont absorbés par les complexes antennes qui drainent cette énergie jusqu'aux centres réactionnels des photosystèmes I et II. A cet endroit, la chlorophylle (probablement une paire spécifique) perd un électron qui est entraîné au travers de la chaîne transporteuse d'électrons jusqu'à l'accepteur final, le NADP⁺.

Figure 2: Composition de la membrane thylacoïdienne. D'après Staehelin et Arntzen, 1983.



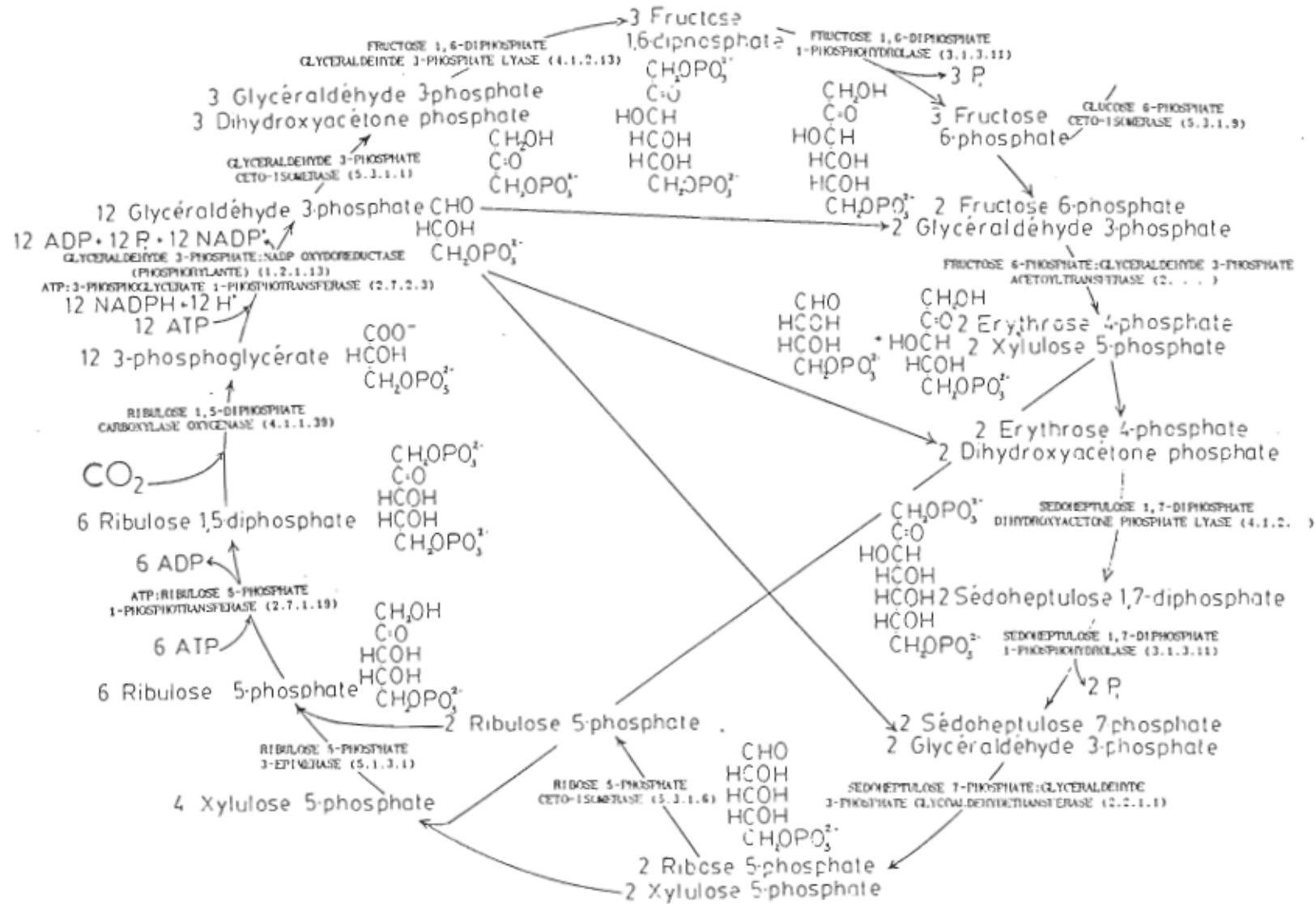
Le photosystème II constitue le site où l'eau se scinde, libérant les électrons nécessaires à la réoxydation de la chlorophylle, et de l'oxygène, produit de la photosynthèse. Les électrons, en passant au niveau de la plastoquinone, amènent des modifications de cette molécule. Ceci permet le passage de protons, ce qui conduit à l'établissement d'un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane thylacoïdienne. C'est ce gradient de protons qui est à l'origine de la synthèse de l'ATP, une molécule hautement énergétique. Cette synthèse se produit lors du passage des protons à l'intérieur de l'ATP-synthétase. Cette réaction se nomme la photophosphorylation. L'ATP et le NADPH formés au cours de ces réactions serviront au cours de la phase obscure. Ainsi, la phase lumineuse de la photosynthèse pourrait se résumer comme étant:



La fixation du gaz carbonique et sa réduction en glucose se produisent à l'intérieur des réactions enzymatiques du cycle de Calvin (figure 3).

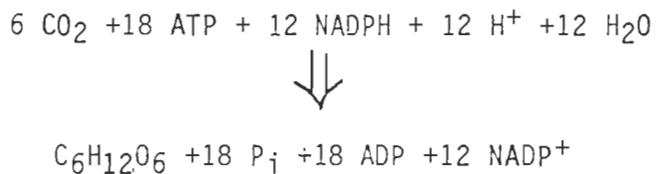
L'enzyme ribulose diphosphate carboxylase oxygénase (Rubisco) est responsable de la fixation du CO₂ atmosphérique. Elle transforme une molécule de ribulose 1,5-diphosphate (RuDP) et une de CO₂ en deux molécules de 3-phosphoglycérate (3-PGA). Cette enzyme représente jusqu'à 50% de toutes les protéines chloroplastiques d'où son

Figure 3: Le cycle de Calvin. D'après Lehnninger, 1981.



surnom de l'enzyme la plus abondante au monde (Ellis, 1979). Le NADPH et l'ATP utilisés à l'intérieur du cycle de Calvin proviennent des réactions lumineuses étudiées précédemment.

Le bilan de la production d'une molécule d'hexose peut s'écrire:



Le processus photosynthétique expliqué jusqu'ici est celui des plantes dites en C₃ car le premier composé formé comprenant le CO₂ est le 3-PGA, une molécule à 3 atomes de carbone. Ce processus est dominant dans le monde végétal. Certaines plantes, telles la canne à sucre et le maïs, métabolisent le CO₂ en produisant une molécule à quatre atomes de carbone, l'oxaloacétate. La phosphoénol-pyruvate (PEP) carboxylase agit ici comme l'enzyme fixatrice du CO₂ sur le PEP à l'intérieur des cellules du mésophylle. Par la suite, le CO₂ est transporté au niveau des cellules périfasciculaires où le cycle de Calvin se produit (figure 4).

La PEP carboxylase, à cause de son insensibilité à la concentration d'oxygène, permet d'augmenter la concentration de CO₂ à l'intérieur de la feuille, accroissant de ce fait l'activité carboxylante de la Rubisco. La photosynthèse de ce type de végétaux se révèle

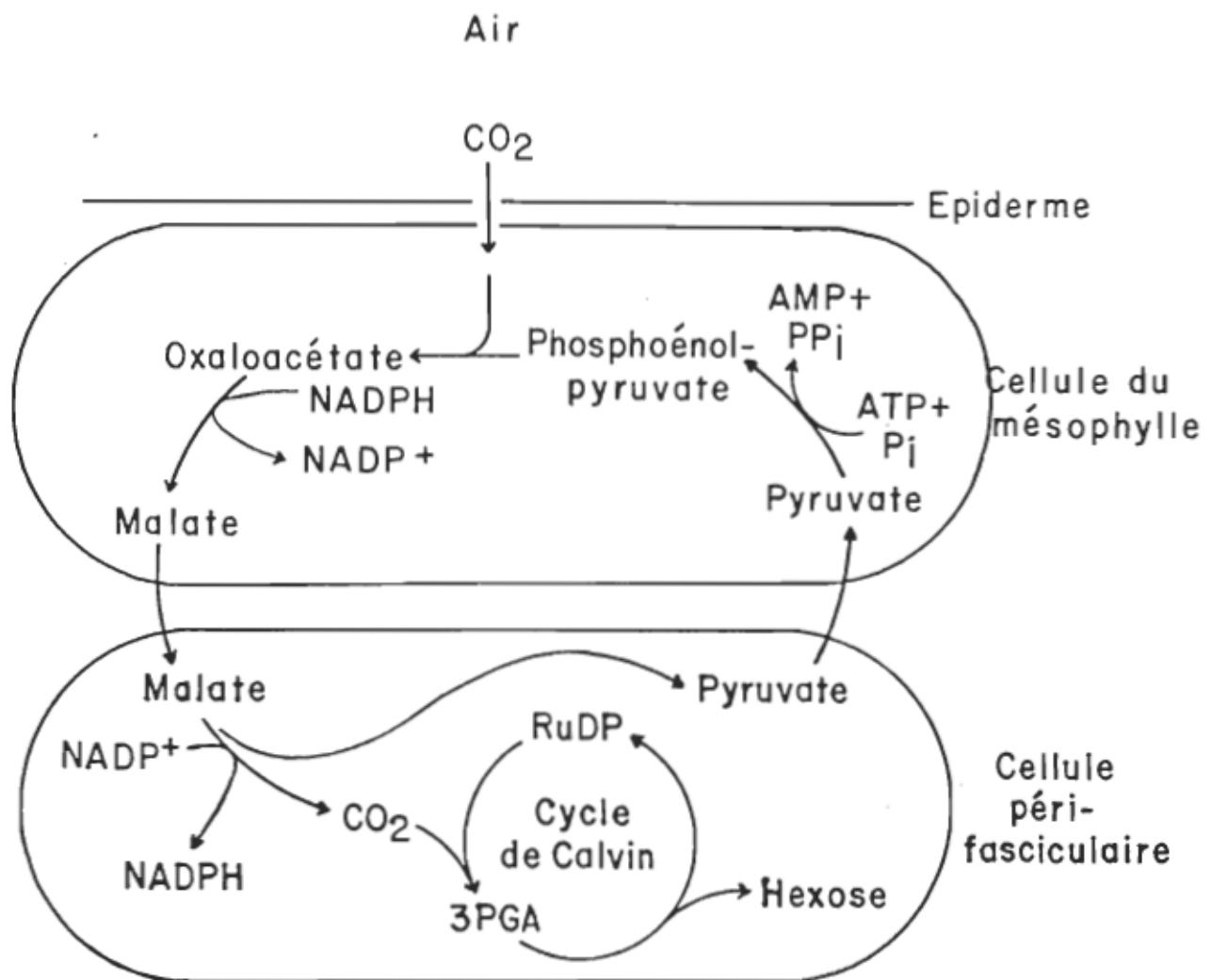


Figure 4: La fixation du CO_2 chez les végétaux en C₄. Tirée de Lehninger, 1981.

ainsi plus efficace que celle des plantes en C₃ (Somerville et Somerville, 1984).

La Rubisco, outre sa fonction de carboxylation, possède aussi un site de fixation de l'oxygène qui entre en compétition directe avec celui du CO₂. Le RuDP est encore ici le substrat de la réaction, produisant une molécule de 3-PGA et une autre de phosphoglycolate. Ainsi, on gaspille une partie des molécules utiles à la photosynthèse. La molécule de phosphoglycolate sera dégradée dans le processus de photorespiration (figure 5).

La photorespiration utilise comme substrats le phosphoglycolate et l'oxygène atmosphérique. La dégradation des molécules de phosphoglycolate requiert la coopération de plusieurs organites cellulaires (figure 5) et de multiples enzymes. Cet ensemble de réactions nécessitant une sur-utilisation de molécules de NADPH et d'ATP produites pendant les réactions lumineuses, il constitue en quelque sorte un gaspillage énergétique (Osmond, 1981). Certains chercheurs y attribuent aussi une fonction de protection (Somerville et Somerville, 1984; Husic et al., 1987). La photorespiration est plus élevée chez les plantes en C₃ puisqu'elles ne possèdent pas de mécanisme pour concentrer le CO₂.

Le Tableau 1 résume quelques caractéristiques différenciant les végétaux en C₃ et en C₄.

Figure 5: La localisation de la photorespiration chez les végétaux.
D'après Ting, 1982.

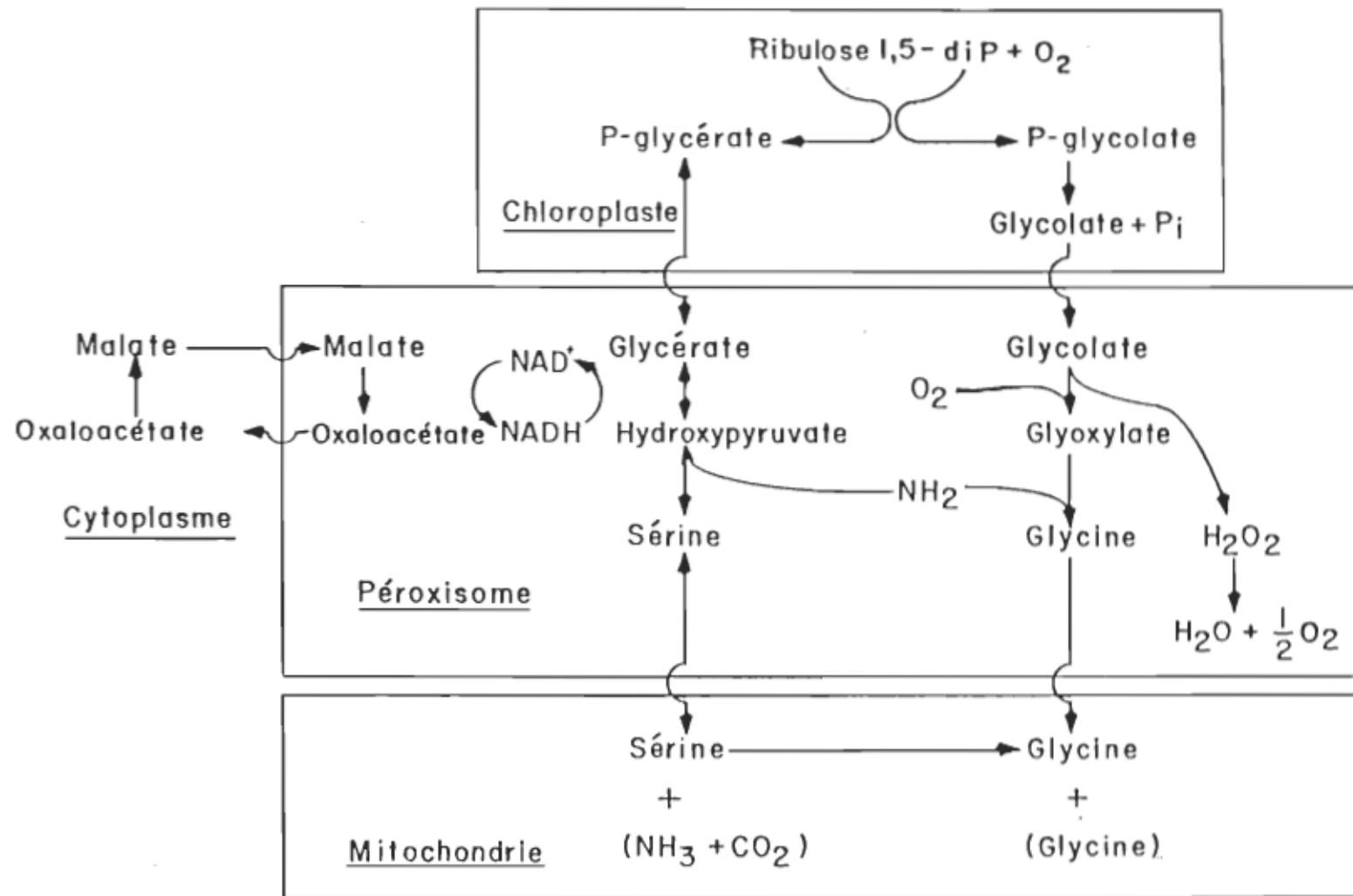


Tableau 1

Quelques points de comparaison de la photosynthèse
chez les plantes en C₃ et en C₄

Caractéristique	Photosynthèse en C ₃	Photosynthèse en C ₄
Anatomie de la feuille	Présence uniforme des cellules du mésophylle à l'intérieur de la feuille	Couche définie de cellules périfasciculaires entourée des cellules du mésophylle
Enzyme carboxylante	Rubisco	PEP carboxylase puis Rubisco
Demande énergétique théorique afin de fixer le CO ₂ (CO ₂ :ATP:NADPH)	1:3:2 (jusqu'à 1:10:6 en conditions de photorespiration)	1:5:2
Point de compensation en CO ₂ (ppm)	30 à 70	0 à 10
Taux maximal photosynthétique (mg CO ₂ /dm ² /h)	15 à 40	40 à 80
Taux maximal de croissance (g poids sec/dm ² /j)	19,5 ± 3,9	30,3 ± 13,8
Sensibilité de la photosynthèse à l'oxygène (1-21%)	Oui	Non
Température optimale de croissance (°C)	20 à 25	30 à 35
Réponse de la photosynthèse nette à une augmentation de l'intensité lumineuse	Saturation atteinte entre 1/4 et 1/3 de l'intensité solaire	Proportionnelle à l'intensité lumineuse jusqu'à une saturation à l'intensité solaire

B) LE DÉVELOPPEMENT DE LA SPECTROSCOPIE PHOTOACOUSTIQUE

Le concept sur lequel l'effet photoacoustique repose découle d'expérimentations effectuées par Alexander Graham Bell il y a un siècle (Bell, 1880). A ce moment, il découvrit qu'en illuminant de façon intermittante un solide placé dans un volume isolé, il se produisait un son audible (Bell, 1880). Il appela cet appareil le photophone, puisqu'à cette époque, ses travaux sur le téléphone progressaient. Le spectrophone, un dérivé du photophone original est présenté à la figure 6.

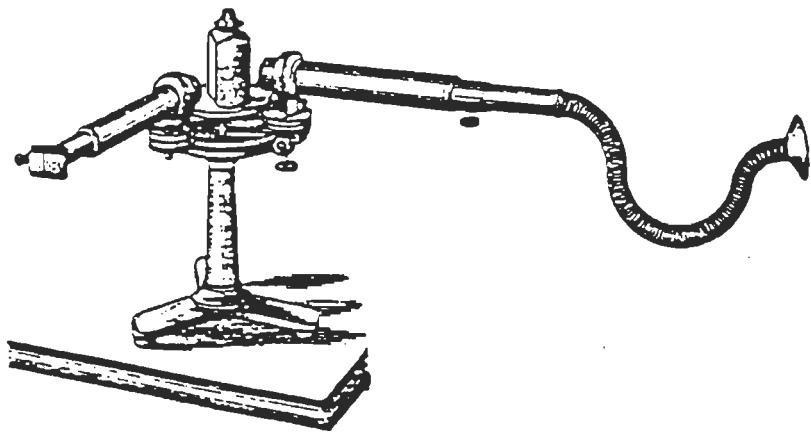


Figure 6. Le spectrophone d'Alexander Graham Bell (tirée de Bell, 1881).

Avec cet appareil, c'est le soleil qui constitue la source de rayonnement, la roue d'une machine à coudre fait office de modulateur alors que l'oreille humaine agit comme détecteur.

C'est à l'aide de cet instrument que Bell et son collaborateur, Sumner Tainter, étendirent leurs recherches aux liquides et aux gaz. Ils purent constater que les liquides généraient les signaux acoustiques les plus faibles, alors que les signaux étaient supérieurs avec des gaz absorbants. Il est intéressant de noter au passage que Bell tenta de modifier son spectrophone afin de le rendre utile aux militaires (Bell, 1881); comme quoi le dilemme du chercheur face à l'armement ne date pas d'hier...

Parallèlement à ces travaux, des chercheurs européens expérimentèrent l'effet photoacoustique. John Tyndall travailla sur les gaz (Tyndall, 1881), de même que Wilhelm Roentgen (1881) alors que Mercadier mena des manipulations sur les solides, les liquides et les gaz (Mercadier, 1881). Tous ces chercheurs tentèrent d'expliquer l'effet photoacoustique.

Dans le cas des gaz, la connaissance des principes de base de leur comportement permit une explication juste. En absorbant la lumière, le gaz se réchauffe, ce qui, dans une cellule fermée, se traduit par une élévation de la pression. C'est cette variation de pression qui est à l'origine du mouvement du diaphragme sis à la sortie et qui, éventuellement, produit le son.

En ce qui a trait aux liquides, aucune explication ne fut tentée par les chercheurs du XIX^e siècle. Par contre, plusieurs hypothèses furent formulées pour décrire l'origine de l'effet photoacoustique dans les solides.

Bell remarqua que les corps foncés et spongieux produisaient les signaux les plus intenses. Il émit l'explication selon laquelle les particules du solide, suite à l'illumination, sont réchauffées et, par conséquent, se dilatent. Ceci cause une contraction des espaces entre ces particules. Ainsi, comme une éponge que l'on presse, l'air est expulsé. En stoppant l'illumination, le processus inverse se produit (Bell, 1880).

Lord Rayleigh proposa que la génération de l'onde acoustique était due à un échauffement inégal des deux surfaces de l'échantillon, causant ainsi une dilatation supérieure d'un côté. C'est la vibration mécanique s'ensuivant qui provoquait le son audible (Rayleigh, 1881).

Mais ce sont les hypothèses de Mercadier (1881) et de Preece (1881) qui se rapprochèrent le plus de la théorie actuelle. Selon Mercadier, l'effet photoacoustique provenait d'un mouvement vibratoire de la couche gazeuse à la surface de l'échantillon. Il était créé par l'échauffement et le refroidissement alternatifs de l'échantillon, suite à l'absorption des radiations intermittentes. Preece lui aussi pensa à la couche de gaz superficielle, la chaleur originant de la "dégradation" de celle absorbée par l'échantillon.

Malgré l'engouement initial, l'intérêt porté à cette méthode décrut rapidement. La difficulté de quantifier l'effet photoacoustique s'avéra un facteur important. D'un point de vue technique, la faiblesse des sources lumineuses (Luscher, 1981) et le manque de sensibilité du

détecteur, l'oreille, (Rosencwaig, 1980) constituèrent les principales pierres d'achoppement.

L'avènement du microphone provoqua une renaissance de la spectroscopie photoacoustique. Viengerov commença à utiliser la méthode afin d'évaluer les concentrations des divers composants de mélanges gazeux (Viengerov, 1938). Pfund (1939) et Luft (1943) développèrent la technique et atteignirent une sensibilité de l'ordre de la ppm. Par la suite, ce type de mesures constitua la principale application de la spectroscopie photoacoustique.

Les travaux en phase gazeuse eurent aussi pour but d'étudier les processus de désexcitation et de transfert d'énergie. Gorelik (1946) fut le premier à proposer que la mesure de la phase du signal photoacoustique pouvait servir à observer le taux de transfert d'énergie entre les niveaux vibrationnels et translationnels des molécules.

L'étude de l'effet photoacoustique dans les solides ne recommença qu'au début des années soixante-dix sous l'impulsion de Harshbarger et Robin (1973) des Laboratoires Bell. Allan Rosencwaig poursuivit leur travail. Avec son collaborateur Allen Gersho, ils élaborèrent une théorie de l'effet photoacoustique dans les solides, théorie encore en usage aujourd'hui (Rosencwaig et Gersho, 1976; Rosencwaig, 1980). Nous discuterons cette théorie un peu plus loin.

Les applications de la spectroscopie photoacoustique au domaine biologique ne datent que d'une dizaine d'années. L'avantage de la spectroscopie photoacoustique réside dans le fait qu'on mesure la chaleur dégagée, contrairement aux méthodes spectroscopiques usuelles où l'on détermine l'intensité de la lumière réfléchie ou transmise. Ainsi, on évite les aléas d'échantillons opaques ou hautement diffusants, problème courant avec le matériel biologique (Braslavsky, 1986). De plus, une variation de la fréquence de modulation permet de sonder différentes épaisseurs du spécimen étudié, caractéristique unique chez ce type de méthodes (Adams et Kirkbright, 1977).

Plusieurs articles ont été écrits sur des chromophores photosynthétiques placés sur des supports artificiels afin d'étudier l'effet de l'environnement. Dans un premier temps, les études ont porté sur des systèmes modèles afin de vérifier l'état d'agrégation de la chlorophylle en monocouches et en multicouches (Désormeaux et Leblanc, 1985). Upadhyaya a analysé les transferts d'énergie de la chlorophylle dans l'acétone (Upadhyaya, 1985; Upadhyaya et al., 1985). De plus, Frackowiak et ses collaborateurs (Frackowiak et al., 1985a et b) ont étudié les biliprotéines dans des films d'alcool de polyvinyle avant de déterminer l'effet de l'orientation des thylacoïdes et des chloroplastes dans ce même milieu (Frackowiak et al., 1985c). Des matrices d'albumine ont aussi été utilisées afin d'analyser l'effet des cations (Thomasset et al., 1982) et de la photoinhibition (Carpentier et al., 1987) sur les membranes thylacoïdiennes.

La technique du profil de profondeur permet de sonder différentes épaisseurs de l'échantillon, et ce, de façon non destructive. La localisation de divers chromophores à l'intérieur de spécimens complexes peut être réalisée (Adams et Kirkbright, 1977). Ainsi, Mackenthum et al., (1979) ont pu étudier les caroténoprotéines de la carapace de homard. O'Hara et al. (1983) ont démontré la position différente de divers pigments d'un lichen tandis que Buschmann et Prehn (1983) ont fait de même avec des feuilles de radis. La localisation de la β -carotène dans la peau a été effectuée par Anjo et Moore (1984) alors que Giese et ses collaborateurs (Giese et al., 1986) ont observé la pénétration d'écrans solaires dans l'épiderme. La distribution chromophorique à l'intérieur de la rétine a aussi été réalisée (Boucher et al., 1986). Afin d'améliorer le rapport signal sur bruit, Pessoa et al., (1985) ont développé une technique de résolution de phase et l'ont utilisée lors de l'étude de l'action d'herbicides sur le maïs (Néry et al., 1987).

Outre cet aspect morphologique, une seconde application de la spectroscopie photoacoustique, plus physiologique, a été développée en grande partie par les équipes du Centre de recherche en photobiophysique de l'Université du Québec à Trois-Rivières et de l'Institut Weismann de Rehovot, en Israël. L'activité photosynthétique peut être mesurée par la biais de l'emmagasinage d'énergie ainsi que par le dégagement d'oxygène (Bults et al., 1982; Poulet et al., 1983). Ici encore, l'aspect non destructif de la méthode permet la réutilisation de l'échantillon à d'autres fins. Nous discuterons plus en détail cette méthode ultérieurement.

Appliquée à la cyanobactéries Anacystis nidulans, par Carpentier et ses collaborateurs (Carpentier et al., 1983a et b, 1984) la technique a permis l'étude de la distribution de l'énergie suite à son absorption ainsi que celle de l'activité photosynthétique proprement dite. Les travaux effectués sur la cyanobactéries Anabaema 7120 ont analysé la conversion d'énergie autour du photosystème I (Carpentier et al., 1986). Fragata et al., (1987), en mesurant la dissipation d'énergie de particules de photosystèmes II d'orge ont pu montrer le rôle de la phéophytine dans l'emmagasinage d'énergie photosynthétique. Finalement, des études sur les cellules périfasciculaires de feuilles de maïs ont permis de conclure que le photosystème II ne participait que partiellement à la réduction du photosystème I ayant plutôt un rôle de protection (Popovic et al., 1987a et b).

Quant à l'équipe israélienne, ses travaux ont majoritairement porté sur des feuilles entières. Bults et al., (1981, 1982) ont d'abord expliqué les différentes composantes du signal photoacoustique de la feuille. Poulet et al., (1983) ont ensuite élaboré une théorie basée sur les différences d'angle de phase entre les signaux thermiques et d'oxygène afin de déterminer l'activité photosynthétique de la feuille.

Les travaux ultérieurs ont permis d'appliquer la méthode à l'étude des effets des stress environnementaux sur les plantes. Qu'il suffise ici de mentionner les travaux de Canaani et al., (1982a) sur le verdissement des plants de fèves, de Ronen et al., (1985) sur l'action de la pollution au SO₂ sur les lichens, de Yakir et al., (1985, 1986) sur l'effet du stress thermique sur des plants de tomates. Havaux et al., ont travaillé sur les stress hydrique (1986a et b) et thermique (1987) chez des plants de tabac et de haricot.

D'un point de vue plus fondamental, les travaux de Canaani et al., (1985a) sur des plants de tabac déficients en chlorophylle ont permis d'établir que les caroténoïdes présents possédaient un rôle protecteur. De plus, les recherches effectuées sur l'effet Emerson ont mené à la conclusion que, in vivo, la phosphorylation d'un enzyme était responsable de la régulation des transitions entre les états 1 et 2 (Canaani et al., 1982b, 1984a et b, 1985b).

Finalement, les dernières années ont vu poindre une variante de la spectroscopie photoacoustique. L'utilisation de l'émission d'un laser pulsé comme source lumineuse permet une résolution dans le temps d'événements de l'ordre de la ns à la μ s (Braslavsky, 1986). Les premiers travaux ont porté sur des molécules d'intérêt biologique telles la biliverdine (Braslavsky et al., 1983) et les phytochromes (Jabben et al., 1984). La première application de la technique, in vivo, sur des feuilles revient à Jabben et Schaffner (1985). L'avantage de cette méthode vient du fait que, étant plus sensible dans le domaine du temps, elle permet de séparer le signal thermique proprement dit du signal issu de la diffusion à l'intérieur du spécimen. Ce phénomène est particulièrement important dans les feuilles (LaRue et al., 1985). Plus récemment encore, les états S₀-S₄ du dégagement d'oxygène ont pu être mis en évidence par cette méthode (Mauzerall et al., 1988).

C) LES OBJECTIFS DU TRAVAIL

La spectroscopie photoacoustique, comme nous l'avons déjà écrit, permet l'étude de l'activité photosynthétique sur différents types de spécimens. Cette méthode sensible et non destructive est ici appliquée sur des disques de feuilles.

Les deux aspects de la méthodologie, le profil de profondeur et la mesure de l'activité photosynthétique sont utilisés afin de caractériser la photosynthèse au niveau foliaire. Comme nous envisageons d'étudier à court terme les effets des polluants atmosphériques sur les végétaux, la détermination de paramètres morphologiques et physiologiques de plantes saines constitue la base de travaux ultérieurs.

Au niveau du profil de profondeur, nous nous attarderons particulièrement à l'analyse des principales bandes observées dans nos échantillons. De plus, nous étudierons leur variation à l'intérieur de l'échantillon. Quant aux mesures de l'activité photosynthétique, nous déterminerons dans un premier temps les différents paramètres optimaux d'étude. Nous vérifierons les effets du temps, de la fréquence de modulation et de l'intensité des faisceaux actinique et modulé sur le signal photoacoustique. Par la suite, nous utiliserons ces paramètres afin de mesurer l'activité photosynthétique de végétaux sains.

Au cours de nos expériences, nous avons observé un phénomène nouveau lors de ce type de mesures. Pour la première fois, il nous est apparu possible de détecter une activité photorespiratoire avec la méthodologie photoacoustique. La seconde partie de ce travail relate les diverses manipulations effectuées nous menant à cette conclusion.

CHAPITRE II

LA SPECTROSCOPIE PHOTOACOUSTIQUE

A) THÉORIE DE L'EFFET PHOTOACOUSTIQUE DANS LES SOLIDES

La théorie concernant l'effet photoacoustique dans les solides ne date que d'une quinzaine d'années et a été formulée par Allan Rosencwaig et Allen Gersho (Rosencwaig et Gersho, 1976; Rosencwaig, 1980). Selon cette théorie, la source primaire du signal photoacoustique provient du flux périodique de chaleur du solide vers la couche de gaz adjacente, suite à l'absorption modulée de la lumière excitatrice.

1) Équations du flux de chaleur

La lumière absorbée par le solide est convertie, en tout ou en partie, en chaleur suite à des processus de désexcitation non radiatifs. Le modèle développé par Rosencwaig et Gersho présente un flux de chaleur unidimensionnel résultant de l'absorption de l'énergie lumineuse.

Partons d'une cellule photoacoustique cylindrique (figure 7) d'un diamètre D et d'une longueur L . Assumons que L est petite en comparaison avec la longueur de l'onde acoustique. Quant à l'échantillon,

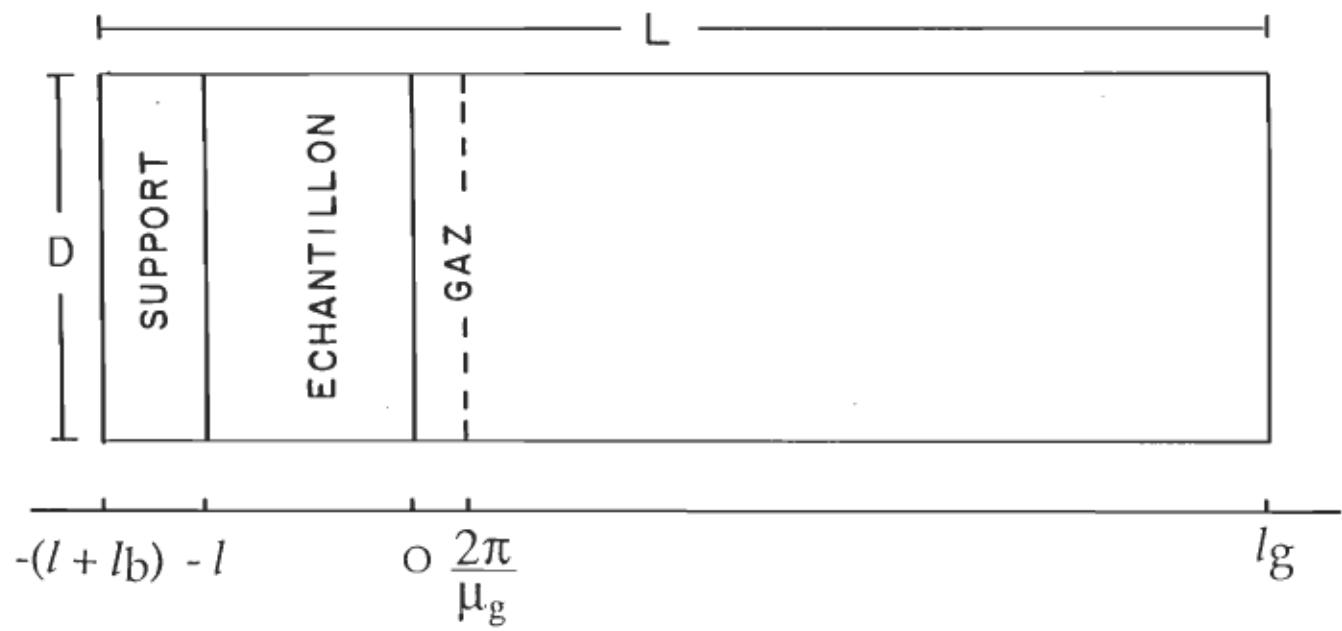


Figure 7: Schéma de l'intérieur d'une cellule photoacoustique cylindrique.

il a la forme d'un disque de diamètre D et d'épaisseur ℓ . L'échantillon repose sur un matériel de support d'épaisseur ℓ_b , matériel de faible conductivité thermique, exposant son autre surface au gaz. Ainsi, l'épaisseur de la colonne de gaz (ℓ_g) est donnée par l'équation:

$$\ell_g = L - \ell - \ell_b \quad (1)$$

Avant d'aller plus loin, définissons les paramètres suivants:

k_i est la conductivité thermique ($\text{cal cm}^{-1} \text{s}^{-1} \text{°C}^{-1}$).

ρ_i est la masse volumique (g cm^{-3}).

C_i est la chaleur spécifique ($\text{cal g}^{-1} \text{°C}^{-1}$).

ω est la fréquence angulaire de modulation (rad s^{-1}) ($\omega = 2\pi f$).

$\alpha_i = k_i / \rho_i C_i$ est la diffusivité thermique ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$).

$a_i = (\omega/2\alpha_i)^{1/2}$ est le coefficient de diffusion thermique (cm^{-1}).

$\mu_i = 1/a_i$ est la longueur de diffusion thermique (cm).

Le symbole i , représentant le matériel étudié, peut être remplacé par s , g ou b selon que nous analysions l'échantillon solide, le gaz ou le matériel de support.

Considérons une source lumineuse monochromatique, modulée sinusoïdalement, de longueur d'onde λ illuminant le solide avec une intensité (I):

$$I = \frac{I_0}{2} \cdot (1 + \cos \omega t) \quad (2)$$

où I_0 correspond au flux lumineux incident en W m^{-2} . Soit β , le coefficient d'absorption optique (cm^{-1}) de l'échantillon à la longueur d'onde λ . La densité de chaleur produite à n'importe quel point x suite à l'absorption lumineuse à ce point, est exprimée par la relation:

$$\frac{\beta \cdot I_0}{2} \cdot \exp(\beta \cdot x) \cdot (1 + \cos \omega t) \quad (3)$$

Par la suite, établissons les équations de diffusion thermique. Ainsi, par une distribution uniforme de la source de chaleur dans le solide, nous obtenons l'équation:

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = \frac{1}{\alpha_s} \frac{d\phi}{dt} - A \exp(\beta \cdot x) \cdot (1 + \exp(j\omega t)) \quad -l < x < 0 \quad (4)$$

où ϕ correspond à la température, j à $\sqrt{-1}$ et $A = \frac{\beta \cdot I_0 \cdot \eta}{2 \cdot k_s}$

η étant l'efficacité à laquelle la lumière absorbée est transformée en chaleur via un processus non radiatif.

Pour le gaz et le matériel de support, supposons qu'ils soient optiquement transparents. Nous obtenons ainsi les équations de diffusion de chaleur:

Pour le matériel de support

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = \frac{1}{\alpha_b} \frac{d\phi}{dt} \quad -(\ell + \ell_b) < x < -\ell \quad (5)$$

Pour le gaz

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = \frac{1}{\alpha_g} \frac{d\phi}{dt} \quad 0 < x < \ell_g \quad (6)$$

La partie réelle de la solution complexe de $\phi(x,t)$ des trois dernières équations représente la température dans la cellule relativement à la température ambiante, en fonction de la position et du temps. Ainsi, les gradients de température dans la cellule photo-acoustique sont donnés par l'expression:

$$T(x,t) = \text{Re } (\phi(x,t)) + \phi \quad (7)$$

où Re représente "la partie réelle de" et ϕ est la température ambiante.

La solution des équations 4 à 6 est obtenue en appliquant les conditions limites satisfaisant aux exigences de température et de continuité du flux de chaleur aux frontières de l'échantillon ($x = 0$ et $x = -\ell$). De plus, la température aux parois de la cellule ($x = \ell_g$ et $x = -\ell - \ell_b$) doit être égale à celle prévalant dans la pièce.

2) Distribution de la température dans la cellule

La solution de $\phi(x, t)$ nous permet de connaître la variation de la température dans la cellule en fonction de la position et du temps. La solution générale est exprimée par les relations suivantes:

$$\phi(x, t) = (1/\lambda_b).(\chi + \ell + \ell_b).W_0 + W.\exp[\sigma_b.(x + \ell) + j\omega.t] \quad (8a)$$

$$\begin{aligned} \phi(x, t) = & e_1 + e_2.x + d.\exp(\beta.x) + [U.\exp(\sigma_s.x) + V.\exp(-\sigma_s.x) \\ & - E.\exp(\beta.x)].\exp(j\omega.t) \end{aligned} \quad (8b)$$

$$\phi(x, t) = ((1-x)\ell_g).\theta_0 + \theta.\exp(-\sigma_g.x + j\omega.t) \quad (8c)$$

où W , U , V , E et θ sont des constantes complexes; e_1 , e_2 , d , W_0 et θ_0 sont des constantes réelles et $\sigma_i = (1+j)a_i$. Remarquons aussi que θ et W représentent les amplitudes complexes des températures cycliques aux frontières échantillon-gaz ($x = 0$) et échantillon-matériel de support ($x = -\ell$) respectivement. Quant à W_0 et θ_0 , ces valeurs comprennent la composante dc de la température aux surfaces de l'échantillon ($x = 0$ et $-\ell$). Les valeurs de E et de d sont données par les fonctions:

$$E = \frac{A}{(\beta^2 - \sigma^2)} = \frac{\beta \cdot I_0}{2 \cdot k_s \cdot (\beta^2 - \sigma^2)} \quad (9a)$$

$$d = \frac{-A}{\beta^2} \quad (9b)$$

Remarquons que la distribution de la température dépendante du temps comporte des composantes ac et dc, de même qu'une autre, une exponentielle croissante. Toutefois, les auteurs omettent cette dernière dans la solution générale (équation 8) concernant le gaz et le matériel de support. En effet, pour toutes les fréquences ω d'intérêt, la longueur de diffusion thermique, μ_j , est petite comparativement aux épaisseurs du gaz (ℓ_g) et du matériel de support (ℓ_b). Ainsi, les composantes sinusoïdales sont fortement atténueres jusqu'à atteindre 0 près des parois de la cellule.

Par la suite, il est possible de dériver les conditions de température et de continuité du flux de chaleur aux frontières échantillon-gaz et échantillon-matériel de support. En appliquant ces contraintes aux composantes dc et sinusoïdale de la solution, on peut déterminer les valeurs de e_1 , e_2 , d , ω_0 et θ_0 . De la même façon, on peut calculer U , V , W et θ à l'aide des équations 9a et 9b et en les appliquant sur la composante ac de la solution.

Ces solutions permettent d'évaluer la distribution de la température en fonction des paramètres optiques, thermiques et géométriques du système. Comme solution explicite de θ , l'amplitude complexe de la température cyclique à l'interface solide-gaz ($x = 0$) prend dès lors la forme de l'équation:

$$\theta = \frac{\beta \cdot I_0}{2k_s(\beta^2 - \sigma_s^2)} \cdot \left(\frac{(r-1)(b+1)\exp(\sigma_s \ell) - (r+1)(b-1)\exp(-\sigma_s \ell) + 2(b-r)\exp(-\beta \ell)}{(g+1)(b+1)\exp(\sigma_s \ell) - (g-1)(b-1)\exp(-\sigma_s \ell)} \right) \quad (10)$$

où

$$b = \frac{k_b \cdot a_b}{k_s \cdot a_s} \quad (11)$$

$$g = \frac{k_g \cdot a_g}{k_s \cdot a_s} \quad (12)$$

$$r = (1 - j) \frac{\beta}{2 + a_s} \quad (13)$$

L'équation 10 est évaluée pour des valeurs spécifiques de paramètres comportant un nombre complexe, comprenant des parties réelles (θ_1) et imaginaires (θ_2). Ces parties déterminent respectivement les composantes en phase et en quadrature de la variation cyclique de la température à la surface de l'échantillon.

3) Production du signal acoustique

Comme nous l'avons vu, la variation cyclique de température dans l'échantillon produit un effet similaire dans le gaz, lequel est relié à la composante sinusoïdale (ac) de l'équation 8:

$$\phi_{ac}(x,t) = \theta \cdot \exp(-\sigma_g \cdot x + j \cdot \omega \cdot t) \quad (14)$$

En prenant la partie réelle de l'équation 14, nous obtenons la variation de température actuelle dans le gaz.

$$T_{ac}(x,t) = \exp(-a_g \cdot x) \cdot [\theta_1 \cdot \cos(\omega \cdot t - a_g \cdot x) - \theta_2 \cdot \sin(\omega \cdot t - a_g \cdot x)] \quad (15)$$

La figure 8 montre que la composante de la température de la phase gazeuse dépendante du temps décroît rapidement en fonction de la distance de la surface de l'échantillon. A une distance de $2\pi\mu_g$, nous n'observons plus de variation de la température. Ceci nous permet de définir une couche gazeuse, égale à $2\pi\mu_g$, susceptible de répondre aux variations thermiques à la surface de l'échantillon.

Nous pouvons calculer en fonction du temps la température moyenne du gaz à l'intérieur de cette couche limite en utilisant l'expression:

$$\bar{\phi}(t) = (1/2\pi\mu_g) \cdot \int_0^{2\pi\mu_g} \phi_{ac}(x,t) dx \quad (16)$$

En y appliquant l'équation 14, nous obtenons la fonction:

$$\bar{\phi}(t) = (1/2) \sqrt{2\pi} \cdot \theta \cdot \exp[j(\omega t - \frac{\pi}{4})] \quad (17)$$

Ainsi, l'expansion et la contraction périodique de la couche limite lui permettent d'agir comme un piston sur la colonne gazeuse de la cellule photoacoustique. En utilisant la loi des gaz parfaits, nous pouvons exprimer le déplacement de ce piston par la relation:

$$\delta x(t) = 2\pi\mu_g \cdot \frac{\bar{\phi}(t)}{T_0} = \frac{\theta \cdot \mu_g}{\sqrt{2} \cdot T_0} \exp[j(\omega t - \frac{\pi}{4})] \quad (18)$$

où

$$T_0 = \phi + \theta_0$$

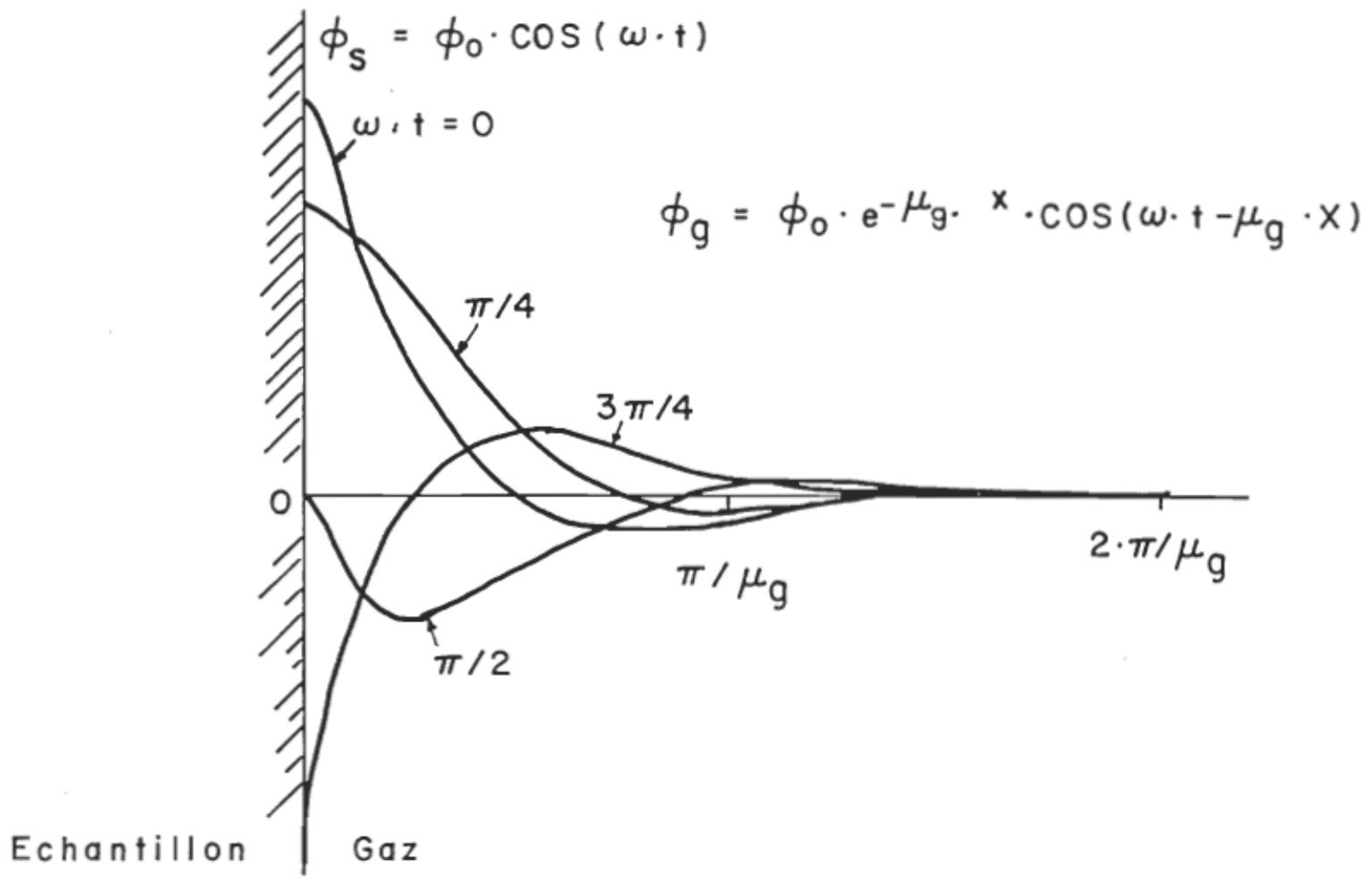


Figure 8: Répartition de la température dans la couche gazeuse adjacente à l'interface échantillon-gaz pour différentes valeurs de $\omega \cdot t$.

Tirée de Rosencwaig, 1980.

Ceci se traduit, en assumant que le reste de la colonne se comporte adiabatiquement vis-à-vis l'action du piston, par la possibilité d'évaluer la pression acoustique dans la colonne en utilisant la loi des gaz adiabatiques.

$$P \cdot V^\gamma = \text{Constante} \quad (19)$$

où P représente la pression, V , le volume gazeux de la cellule et γ , le rapport des chaleurs spécifiques.

Ainsi, la variation de pression est donnée par l'expression:

$$\delta P(t) = \frac{\gamma \cdot P_0}{V_0} \cdot \delta V = \frac{\gamma \cdot P_0}{\ell_g} \cdot \delta x(t) \quad (20)$$

Ce qui, en y introduisant l'équation 18 nous donne les équations:

$$\delta P(t) = Q \cdot \exp[j(\omega t - \frac{\pi}{4})] \quad (21)$$

où

$$Q = \frac{\gamma \cdot P_0 \cdot \theta}{\sqrt{2} \cdot \ell_g \cdot a_g \cdot T_0} \quad (22)$$

En combinant les équations 10 et 22 nous obtenons la relation:

$$Q = \frac{\beta \cdot I_0 \cdot \gamma \cdot P_0}{2\sqrt{2} \cdot k_s \cdot \ell_g \cdot a_g \cdot T_0 \cdot (\beta^2 - \sigma^2)} \cdot \frac{(r-1)(b+1)\exp(\sigma_s \cdot \ell) - (r+1)(b-1)\exp(-\sigma_s \cdot \ell) + 2(b-r)\exp(-\beta \cdot \ell)}{(g+1)(b+1)\exp(\sigma_s \cdot \ell) - (g-1)(b-1)\exp(-\sigma_s \cdot \ell)} \quad (23)$$

Aux températures les plus courantes, $T \approx 0$, ce qui implique que les composantes dc de la distribution de température n'ont pas à être évaluées. Ainsi, ce développement permet de déterminer l'amplitude et la phase de l'onde acoustique produite dans la cellule par l'effet photoacoustique.

4) Cas spéciaux

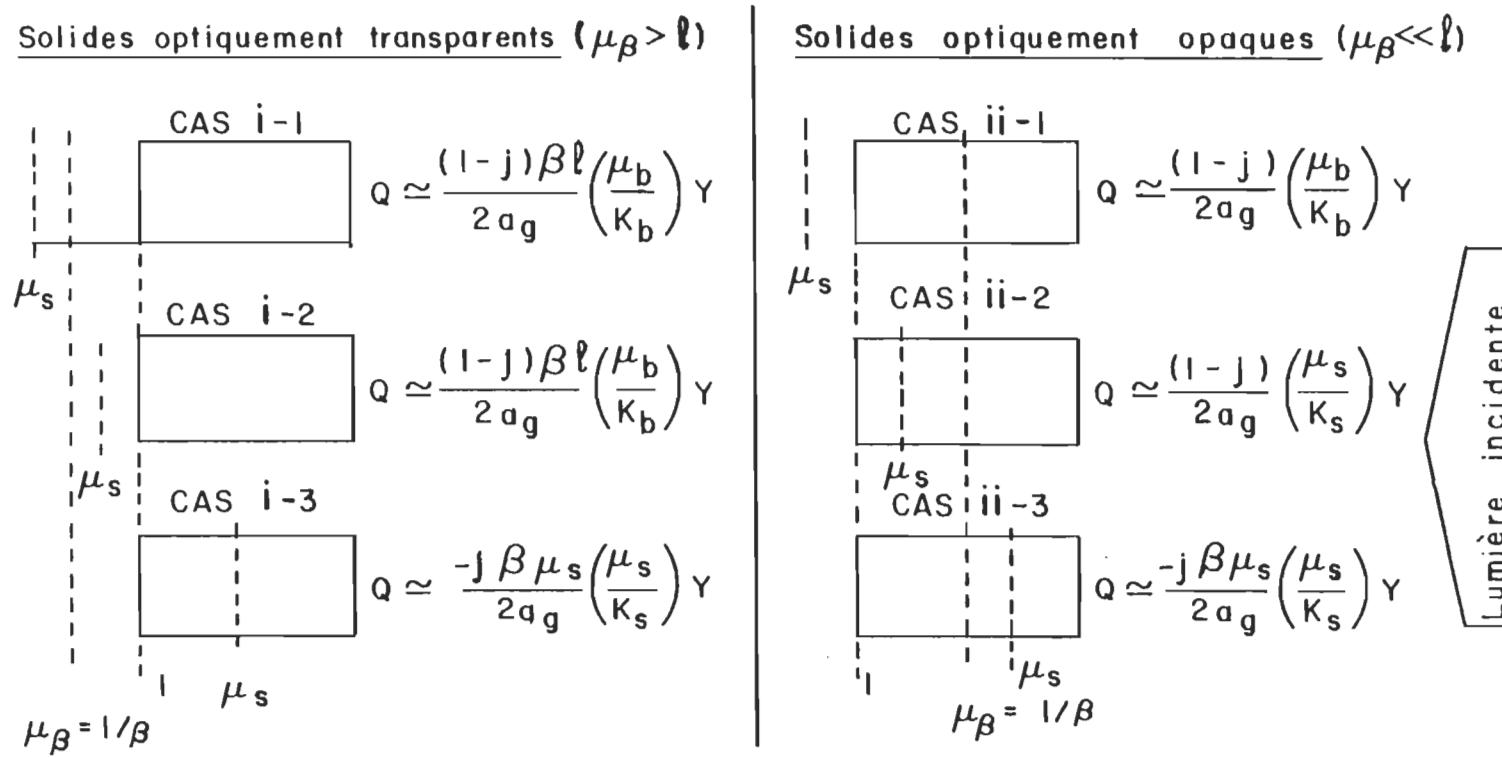
L'interprétation de la formule 21 représentant la pression acoustique se révèle difficile, compte tenu de la complexité même de l'équation 23. Rosencwaig et Gersho ont simplifié cette relation dans certains cas bien précis. L'analyse de l'effet photoacoustique dans les solides s'en trouve ainsi facilitée. L'opacité optique a permis de regrouper les diverses situations. Trois catégories ont été instaurées, tenant compte de la longueur de diffusion thermique, μ_s , de la longueur de l'échantillon, l , et de la longueur d'absorption optique, μ_β (où $\mu_\beta = 1/\beta$, β représentant le coefficient d'absorption optique). Dans tous les cas considérés, on suppose que $g < b$ et que $b = 1$, ce qui implique que $k_g \cdot a_g < k_b \cdot a_b$ et que $k_b \cdot a_b = k_s \cdot a_s$.

La figure 9 illustre les six cas particuliers. Définissons Υ

$$\Upsilon = \frac{\gamma \cdot P_0 \cdot I_0}{2 \cdot \sqrt{2} \cdot \frac{l}{g} \cdot T_0} \quad (24)$$

comme étant un terme constant apparaissant dans l'expression de Q .

Figure 9: Représentation schématique de l'effet photoacoustique dans les solides (Cas spéciaux).



a) Les solides optiquement transparents ($\mu_B > \ell$)

Ici, les cas décrivent des situations où la lumière est absorbée sur toute la longueur de l'échantillon, une partie étant transmise.

i) Solides thermiquement minces ($\mu_s \gg \ell ; \mu_s > \mu_B$)

En posant que $\exp(-\beta \cdot \ell) \approx 1 - \beta \cdot \ell$, $\exp(+\sigma_s \cdot \ell) \approx 1$ et $r > 1$ dans l'équation 23, nous obtenons la relation:

$$\begin{aligned} Q &= \frac{\ell \cdot \gamma}{2 \cdot a_g \cdot a_b \cdot k_b} \cdot (\beta - 2 \cdot a_s \cdot b - j \cdot \beta) \\ &= \frac{(1-j) \cdot \beta \cdot \ell}{2 \cdot a_g} \cdot \frac{\mu_b}{k_b} \cdot \gamma \end{aligned} \quad (25)$$

Le signal acoustique est donc proportionnel à $\beta \cdot \ell$ et, puisque μ_b/a_g est proportionnel à $1/\omega$, il varie aussi selon ω^{-1} . Les propriétés thermiques du matériel de support sont à considérer.

ii) Solides thermiquement épais ($\mu_s > \ell ; \mu_s < \mu_B$)

En assumant que $\exp(-\beta \cdot \ell) \approx 1 - \beta \cdot \ell$, $\exp(\pm \sigma_s \cdot \ell) \approx 1 \pm \sigma_s \cdot \ell$ et $r < 1$, nous exprimons Q par l'équation:

$$Q = \frac{\beta \cdot \ell \cdot \gamma}{4 \cdot k_s \cdot a_g \cdot a_s^3 \cdot b} [(\beta^2 + 2 \cdot a_s^2) + j (\beta^2 - 2 \cdot a_s^2)] \quad (26)$$

$$= \frac{(1-j) \cdot \beta \cdot \ell}{2 \cdot a_g} \cdot \frac{\mu_b}{k_b} \cdot \gamma$$

L'expression de Q étant similaire à celle de l'exemple précédent, le signal acoustique est donc proportionnel à $\beta \cdot l$ et à ω^{-1} .

iii) Solides thermiquement épais ($\mu_s < l$; $\mu_s \ll \mu_B$)

Dans ce cas, en plaçant $\exp(-\beta \cdot l) \approx 1 - \beta \cdot l$, $\exp(-\sigma_s \cdot l) \approx 0$ et $r \ll 1$, Q est donné par l'expression

$$Q = \frac{-j \cdot \beta \cdot \mu_s}{2 \cdot a_g} \cdot \frac{\mu_s}{k_s} \cdot \gamma \quad (27)$$

Remarquons que le signal acoustique est proportionnel à $\beta \cdot \mu_s$. Ainsi, seule la lumière absorbée dans la première longueur de diffusion thermique contribue au signal; c'est un cas de saturation thermique. Nous pouvons conclure que seules les propriétés thermiques de l'échantillon se révèlent importantes. Ici, le signal est proportionnel à $\omega^{-3/2}$.

b) Les solides optiquement opaques ($\mu_B \leq l$)

Ici, la majeure partie de la lumière est absorbée à une distance bien inférieure à la longueur de l'échantillon et ne permet virtuellement pas de transmission. C'est la situation que nous retrouverons lors de l'étude de feuilles.

i) Solides thermiquement minces ($\mu_s \gg \ell; \mu_s \gg \mu_\beta$)

En appliquant les approximation $\exp(-\beta \cdot \ell) \approx 0$, $\exp(\pm \sigma_s \cdot \ell) \approx 1$ et $r \gg 1$, nous dérivons la fonction:

$$Q = \frac{(1 - j)}{2 \cdot a_g} \cdot \frac{\mu_b}{k_b} \quad (28)$$

Dans ce cas, nous retrouvons une saturation optique et photoacoustique car le signal photoacoustique est indépendant de β . Il est néanmoins proportionnel à ω^{-1} et dépend des propriétés thermiques du matériel de support.

ii) Solides thermiquement épais ($\mu_s < \ell; \mu_s \gg \mu_\beta$)

En supposant que $\exp(-\beta \cdot \ell) \approx 0$; $\exp(-\sigma_s \cdot \ell) \approx 0$ et $r > 1$, Q est représenté par la relation:

$$Q = \frac{\gamma}{2 \cdot a_g \cdot a_s \cdot k_s \cdot \beta} (\beta - 2 a_s - j \cdot \beta) = \frac{(1-j)}{2 \cdot a_g} \frac{\mu_s}{k_s} \gamma \quad (29)$$

L'équation 29 est semblable à l'équation 28 sauf que les paramètres thermiques de l'échantillon remplacent ceux du matériel de support. Ici aussi, le signal acoustique est indépendant de β et est proportionnal à ω^{-1} .

iii) Solides thermiquement épais ($\mu_s \ll \ell$; $\mu_s > \mu_\beta$)

En admettant que $\exp(-\beta \cdot \ell) \approx 0$, $\exp(-\sigma_s \cdot \ell) \approx 0$ et $r < 1$, Q est déterminé par l'équation

$$Q = \frac{-j \cdot \beta \cdot Y}{4 \cdot a_g \cdot a_s^3 \cdot k_s} (2 \cdot a_g - \beta - j \cdot \beta) = \frac{-j \cdot \beta \cdot \mu_s}{2 \cdot a_g} \frac{\mu_s}{k_s} Y \quad (30)$$

Dans ce cas, nous sommes en présence d'un solide très opaque ($\beta \cdot \ell \gg 1$). Cependant, tant que $\beta \cdot \mu_s < 1$, i.e. $\mu_s < \mu_\beta$, ce solide n'est pas saturé photoacoustiquement mais l'est au niveau optique. Le signal acoustique est donc dépendant des propriétés thermiques de l'échantillon et fluctue selon $\omega^{-3/2}$.

Ainsi, selon la théorie de Rosencwaig et Gersho, l'effet photoacoustique dans les solides est fonction de trois paramètres de l'échantillon: son épaisseur physique, sa longueur d'absorption optique et sa longueur de diffusion thermique. Ce dernier paramètre régit ultimement le signal photoacoustique. L'aspect intéressant de la technique photoacoustique réside dans le fait qu'il est possible de modifier l'épaisseur de l'échantillon (lors de la préparation) et la longueur de diffusion thermique (puisque celle-ci est inversement proportionnelle à la fréquence de modulation). Ainsi, nous pouvons ramener toutes nos situations expérimentales aux cas ci-haut étudiés.

B) APPLICATION À L'ÉTUDE DE LA PHOTOSYNTHÈSE

Au cours des prochaines lignes, nous nous attarderons sur les applications de la spectroscopie photoacoustique à l'étude de la photosynthèse. Dans ce domaine, cette technique possède des avantages uniques: elle permet d'analyser in vivo et de façon non destructive des pigments contenus dans des matériaux hautement diffusants, voire opaques. L'étude des propriétés thermiques et optiques des échantillons est également rendue possible. Des renseignements sur les différents modes de désexcitation des molécules impliquées peuvent aussi être obtenus. De plus, l'activité photosynthétique peut être mesurée comme nous le verrons un peu plus loin.

1) Principe d'application

La chlorophylle constitue la molécule-clé de la photosynthèse puisqu'elle est responsable de l'absorption de l'énergie quantique et de sa première transformation. Les différents modes d'excitation et de désexcitation in vivo de cette molécule sont présentés à la figure 10.

La désexcitation par des voies non radiatives libère de la chaleur qui, lorsque modulée, génère le signal photoacoustique. La fluorescence émise par la molécule de chlorophylle peut servir d'indicateur de l'activité photosynthétique via l'effet Kausky (Krause et

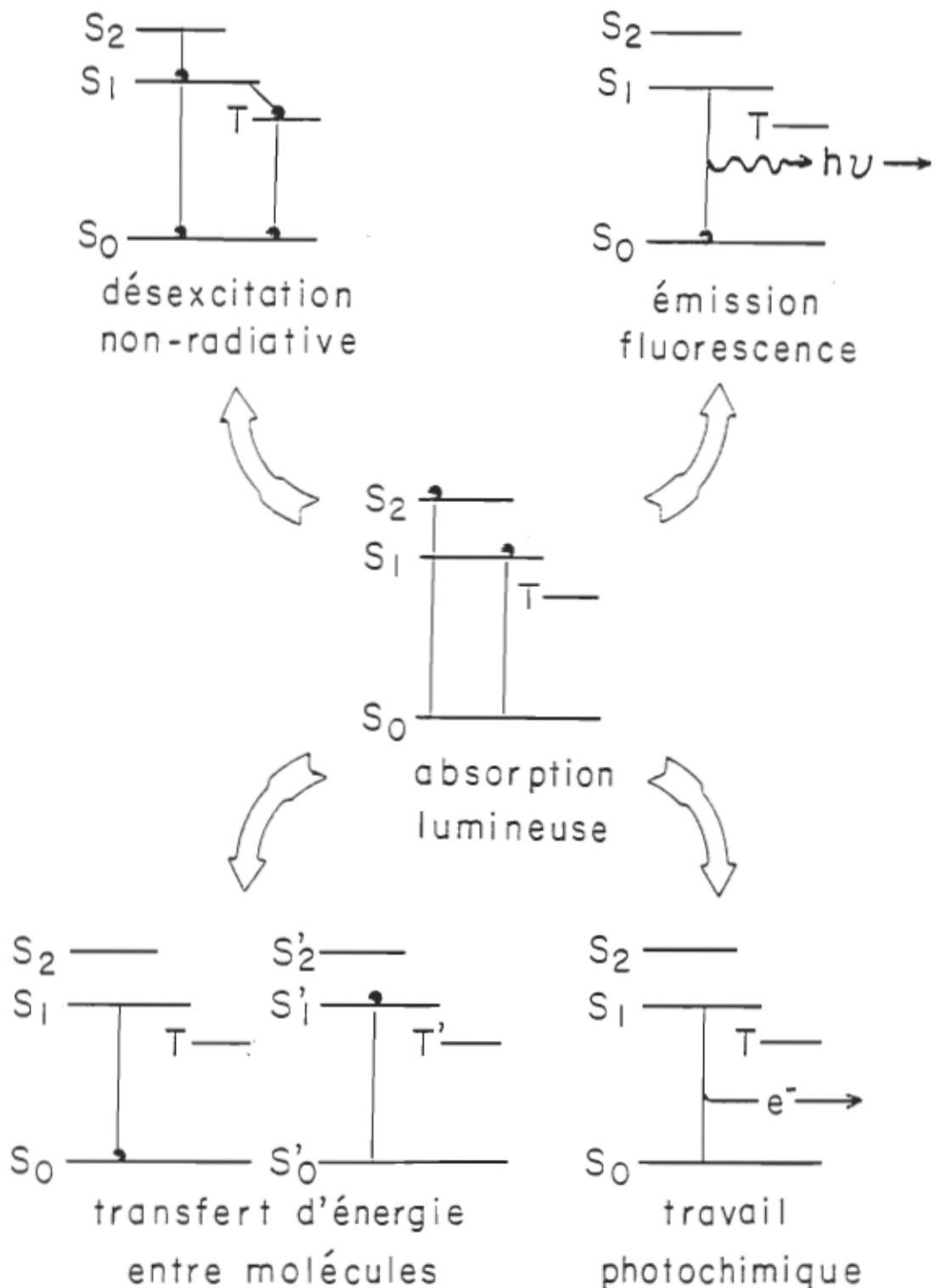


Figure 10: Modes de désexcitation de la chlorophylle in vivo.

Weis, 1984). Le transfert d'énergie se situe principalement dans les complexes collecteurs de lumière lors de la migration de l'exciton vers le centre réactionnel. Le travail photochimique se place au cœur même de la photosynthèse puisque la séparation de charges permet à l'électron d'entrer dans la chaîne transporteuse. Comme nous pouvons le constater, tous ces processus entrent en compétition et, dans une feuille, se produisent en même temps.

La spectroscopie photoacoustique mesurant de la chaleur, le travail avec des systèmes photosynthétiques nécessite l'élaboration d'un système de référence où la compétition entre les différents modes de désexcitation serait éliminée au profit de l'émission de chaleur. L'inhibition de la photosynthèse permet à la feuille de devenir sa propre référence en bloquant le transfert d'énergie et le travail photochimique. On considère que la fluorescence est négligeable comparativement à l'émission de chaleur (Bults et al., 1982).

Deux méthodes sont utilisées pour inhiber la photosynthèse. 1) Le dichlorophényl diméthylurée (DCMU) bloque la chaîne transporteuse d'électrons au niveau de la plastoquinone (Satoh et Fork, 1983), d'où inhibition de l'acte photosynthétique (Buschmann et Prehn, 1981 et 1983). 2) Un résultat similaire peut être obtenu en appliquant un puissant faisceau lumineux, empêchant ainsi la séparation de charges entre le centre réactionnel et la phéophytine du photosystème II (Demeter et al., 1987). Ce type d'inhibition est facilement levé

dans les feuilles en éteignant le faisceau lumineux (Bults et al., 1982).

2) Profil de profondeur

Comme nous l'avons vu précédemment lors de l'explication de l'effet photoacoustique dans les solides, il existe une relation entre la longueur de diffusion thermique et la fréquence de modulation. La figure 11 illustre la relation $\mu = (2\alpha/\omega)^{1/2}$ où α vaut 0,001 44 cm²/s soit la diffusivité thermique moyenne de tissus végétaux (Touloukian, 1973).

Ainsi, il est possible d'observer la position de divers chromophores dans l'échantillon en variant la fréquence de modulation. Plus la fréquence de modulation est élevée, plus superficielle sera la couche sondée. Dans le cas de feuilles, le dégagement d'oxygène et l'emmagasinage d'énergie viennent s'additionner à la composante thermique usuelle. Dans ce cas, on se doit d'éliminer ces deux composantes afin de ne pas fausser l'intensité des pics. L'emploi du DCMU ou d'un fort faisceau lumineux, en inhibant la photosynthèse, enlève ces deux paramètres.

3) Mesure de l'activité photosynthétique

Le signal photoacoustique d'une feuille est constitué de deux composantes originant des chloroplastes: i) la composante thermique

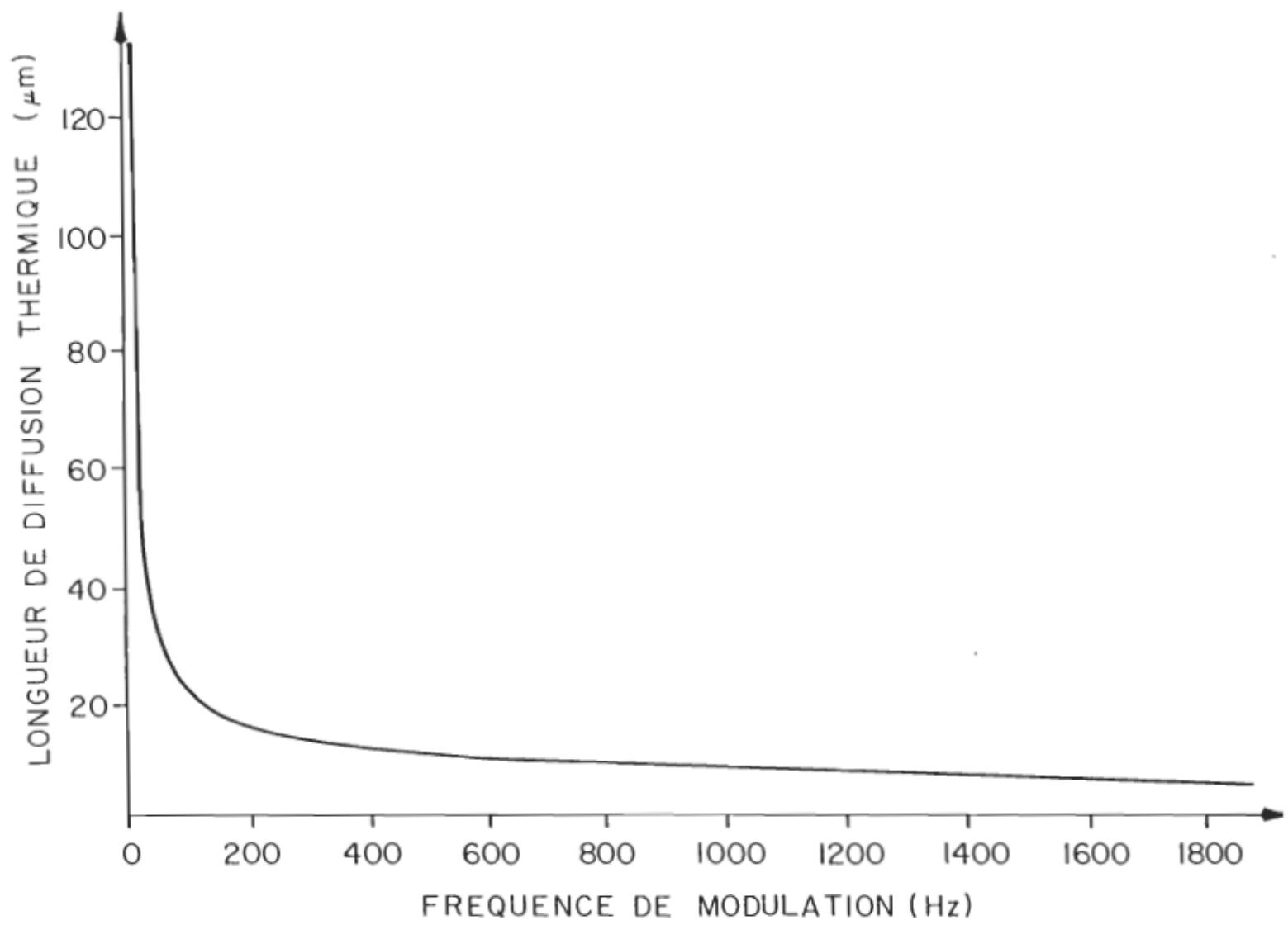


Figure 11: Variation de la longueur de diffusion thermique dans les feuilles selon la fréquence de modulation.

habituelle résulte de la conversion totale ou partielle de l'énergie quantique en chaleur. L'emmagasinage d'énergie photosynthétique (EEP) diminue cette quantité, puisque les deux paramètres constituent des modes compétitifs de désactivation énergétique; ii) le dégagement d'oxygène provient de l'activation de l'appareil photosynthétique. Ce paramètre augmente le signal photoacoustique. L'équation 31 caractérise le signal photoacoustique d'une feuille

$$P = P_{th}^{\max} - EEP + P_0 \quad (31)$$

où P est la pression du signal photoacoustique, P_{th}^{\max} , la composante thermique maximale et P_0 est la composante d'oxygène.

La méthode consiste à mesurer la variation du signal photoacoustique induite par la saturation de la photosynthèse chez un spécimen actif. La saturation est rendue possible en appliquant un faisceau lumineux continu de forte intensité. La saturation de la photosynthèse enlève les composantes relatives à l'emmagasinage d'énergie et au dégagement d'oxygène, nous révélant un signal thermique pur. La valeur de EEP est déterminée en travaillant à des fréquences de modulation supérieures à 200 Hz. Dans ces conditions, la composante reliée au dégagement d'oxygène disparaît, l'oxygène n'ayant pas le temps de diffuser jusqu'à la surface (Bults et al., 1982). La valeur de EEP est similaire à faible fréquence de modulation comme en font foi les travaux de Kanstad et al., (1983) en utilisant un radiomètre. Il est par la suite possible de calculer les

proportions des composantes thermique et oxygénique du signal photoacoustique, ce qui nous donne une idée générale de l'activité photosynthétique de l'échantillon.

A première vue, l'addition des deux composantes du signal photoacoustique semble scalaire (Bults et al., 1981 et 1982). Poulet et ses collaborateurs (Poulet et al., 1983) ont développé un modèle du signal photoacoustique dans la feuille où les deux composantes sont des vecteurs originant du même endroit, le chloroplaste. Par contre, les vecteurs présentent une différence de phase car l'oxygène diffuse plus lentement que la chaleur au travers des tissus végétaux. C'est ce modèle que nous étudierons dans les prochaines lignes et que nous appliquerons à l'étude de l'activité photosynthétique.

La figure 12 représente les composantes vectorielles du signal photoacoustique généré à des fréquences de modulation inférieures à 200 Hz. Il est à noter que dans les calculs subséquents, nous assurons que l'angle de phase du vecteur thermique ne varie pas lorsqu'on illumine la feuille.

Le signal photoacoustique résultant (\vec{R}) est la somme vectorielle des composantes thermique (\vec{T}) et de dégagement d'oxygène (\vec{O}). Il est possible de scinder chacun de ces vecteurs en ses constituantes en phase (cosinus(c)) et en quadrature (sinus(s)).

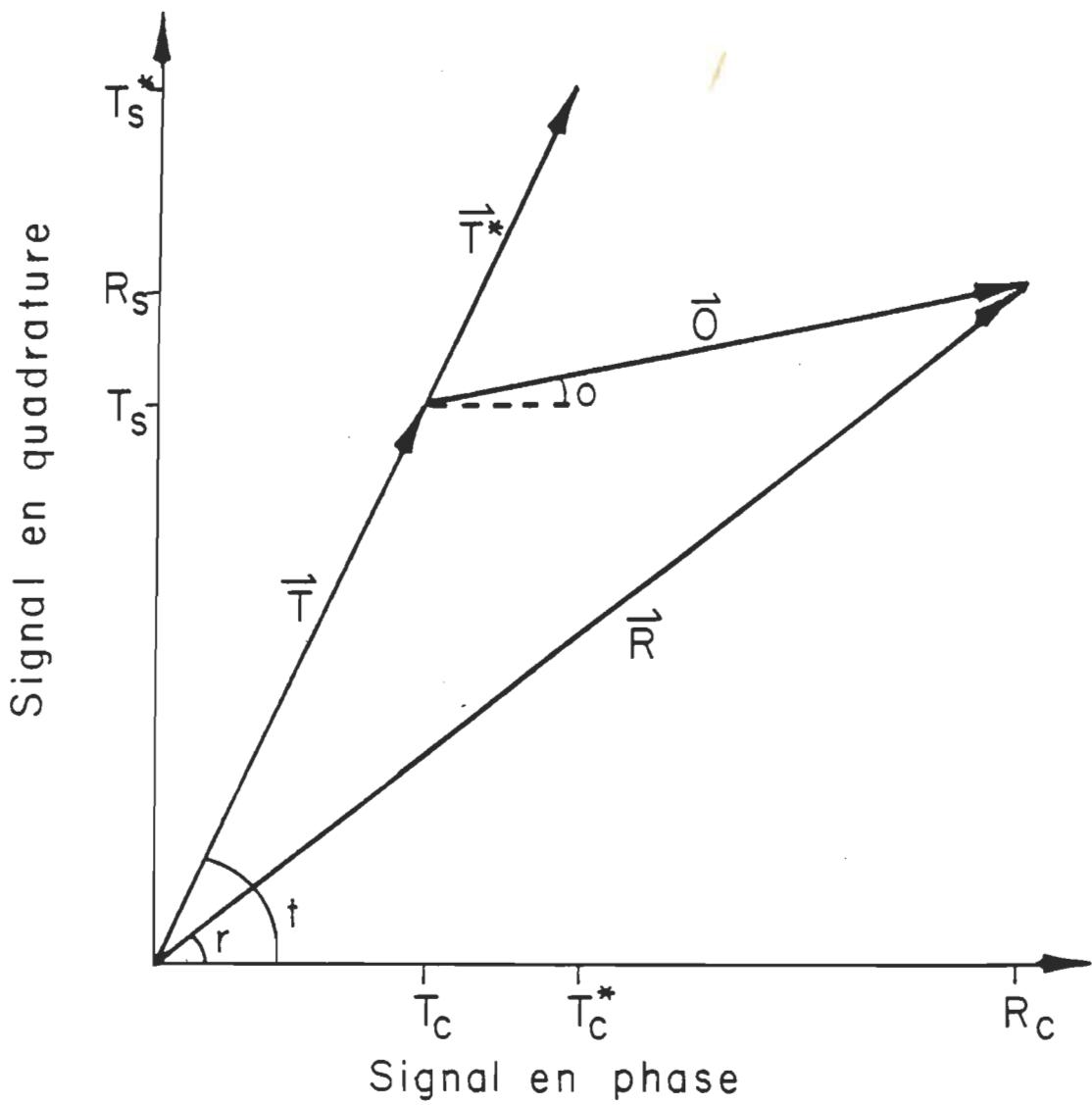


Figure 12: Représentation schématique des composantes vectorielles du signal photoacoustique dans les feuilles à faible fréquence de modulation ($f < 200$ Hz).

L'inhibition de la photosynthèse engendre des variations des deux composantes du signal photoacoustique. Le dégagement d'oxygène est bloqué, de même que l'emmagasinage d'énergie (EEP). Le vecteur \vec{O} disparaît alors que le vecteur thermique augmente de \vec{T} jusqu'à une valeur \vec{T}^* .

Lors d'une mesure photoacoustique à une fréquence de modulation inférieure à 200 Hz, nous détectons les constituantes en phase et en quadrature du vecteur résultant R . La dimension et l'orientation de ce vecteur sont établies par les équations:

$$| \vec{R} | = \sqrt{R_s^2 + R_c^2} \quad (32)$$

$$\theta = \arctan (R_s/R_c) \quad (33)$$

L'illumination par le faisceau actinique permet d'obtenir les constituantes en phase et en quadrature du vecteur thermique maximal \vec{T}^* . De façon similaire, sa grandeur et sa direction sont calculées par les relations:

$$| \vec{T}^* | = \sqrt{T_s^{*2} + T_c^{*2}} \quad (34)$$

$$\phi = \arctan (T_s^*/T_c^*) \quad (35)$$

La relation entre les vecteurs thermique \vec{T} et thermique maximal \vec{T}^* est établie à une fréquence de modulation supérieure à 200 Hz afin d'éliminer le dégagement d'oxygène. Les résultats de Kanstad et al., (1983) ont montré que cette relation est semblable à faible fréquence de modulation. Les constituantes en phase et en quadrature montrent le même rapport qu'entre les grandeurs des signaux totaux nous permettant d'obtenir les fonctions:

$$k = \frac{|\vec{T}|}{|\vec{T}^*|} = \frac{T_s}{T_s^*} = \frac{T_c}{T_c^*} \quad (36)$$

où k est une constante équivalente à $(1 - EEP)$. L'angle du vecteur \vec{T} est similaire à celui calculé pour \vec{T}^* .

La dernière étape de la détermination des composantes vectorielles du signal photoacoustique ne demande que du calcul. Les constituantes en phase et en quadrature du vecteur de dégagement d'oxygène sont déterminées en soustrayant les constituantes du vecteur T de celles du vecteur R . L'amplitude et l'angle de phase du vecteur O sont données par les expressions:

$$|\vec{O}| = \sqrt{(R_s - T_s)^2 + (R_c - T_c)^2} \quad (37)$$

$$\phi = \arctan((R_s - T_s)/(R_c - T_c)) \quad (38)$$

En résumé, la mesure de l'activité photosynthétique en spectroscopie photoacoustique requiert les paramètres suivants: i) les valeurs des constituantes en phase et en quadrature de la feuille active et inhibée à une fréquence de modulation inférieure à 200 Hz; ii) les valeurs du signal photoacoustique de la feuille active et inhibée à une fréquence de modulation supérieure à 200 Hz. Les renseignements obtenus, l'emmagasinage d'énergie photosynthétique ainsi que le dégagement d'oxygène de la feuille sont des paramètres fort révélateurs de l'état de santé de l'échantillon étudié.

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A) LES PRODUITS UTILISÉS

Le Tableau 2 présente la liste ainsi que les caractéristiques des différentes produits employés au cours des manipulations.

B) LES PLANTES

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons utilisé l'impatiens (Impatiens petersiana), le maïs (Zea mays var. Golden Bantam), l'érable à sucre (Acer saccharum Marsh.) et le haricot (Phaseolus vulgaris var. Saint-Sacrement).

L'impatiens a été employée afin de mettre au point la méthodologie expérimentale. Utilisée antérieurement par d'autres chercheurs du Centre (LaRue et al., 1985; Désormeaux, 1986), cette plante domestique possède comme avantages d'être disponible à l'année longue et de posséder de larges feuilles plates non pubescentes, ce qui facilite les mesures photo-acoustiques (Carpentier, 1983).

Tableau 2

Caractéristiques des produits utilisés

Produit	Provenance	Pureté
Engrais		
10-52-10	Plant Prod. Co. Ltée	
20-20-20	Plant Prod. Co. Ltée	
30-10-10	Plant Prod. Co. Ltée	
Glycidylméthacrylate (acide glycidique)	Fluka AG	95%
Mélanges gazeux CO ₂	Air Liquide Canada Ltée	100%
CO ₂ 0,05% dans O ₂		
N ₂		100%
O ₂		100%

Le maïs, à cause de son importance dans l'agriculture québécoise, a été choisi comme plant expérimental afin de vérifier ultérieurement l'effet des polluants atmosphériques sur les végétaux.

Le phénomène du dépérissement des érablières, un mal forestier dont l'étendue augmente d'année en année en sol québécois en inquiète plus d'un (Dessureault, 1985; Bernier et Brazeau, 1986). L'acériculture constitue un important secteur économique des régions du sud du Québec. C'est pourquoi une étude du comportement de l'érable en présence de polluants s'avère justifiée.

Finalement, le haricot, à cause de son type physiologique similaire à celui de l'érable (plantes en C₃) est devenu un plant expérimental. Sa croissance rapide et ses larges feuilles expliquent son choix de sujet d'expériences.

Le plant de départ d'impatiens nous a été gracieusement fourni par soeur Estelle Lacoursière, professeure au Département de chimie-biologie de l'Université du Québec à Trois-Rivières, qui nous l'a ainsi identifié. Par la suite, nous avons bouturé les tiges afin d'obtenir plusieurs plants.

Les plantules d'érables à sucre proviennent de l'érablière expérimentale du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du

Québec sise à Tingwick, Québec. Quelques semis nous ont été offerts par madame Nicole Brassard de l'Institut Armand-Frappier de Laval.

Les plants de maïs et de haricot croissent à partir de graines (Semences Laval, Laval). Les graines sont semées dans de la vermiculite et, lorsque les semis atteignent de dix à quinze centimètres de hauteur, ils sont transplantés dans de la terre noire.

Tous les plants expérimentaux croissent dans une salle aménagée en chambre de croissance. L'éclairage est fourni par une lampe au quartz de 400 W (Luminor Inc., Québec). La photopériode est réglée à quatorze heures de lumière et dix heures d'obscurité. La température de la chambre se maintient à $23 \pm 3^\circ\text{C}$ et l'humidité se situe à $40 \pm 10\%$. Les plantes sont arrosées à l'eau du robinet trois fois par semaine, ce qui se révèle suffisant pour conserver la terre humide.

C) LE SPECTROMÈTRE PHOTOACOUSTIQUE

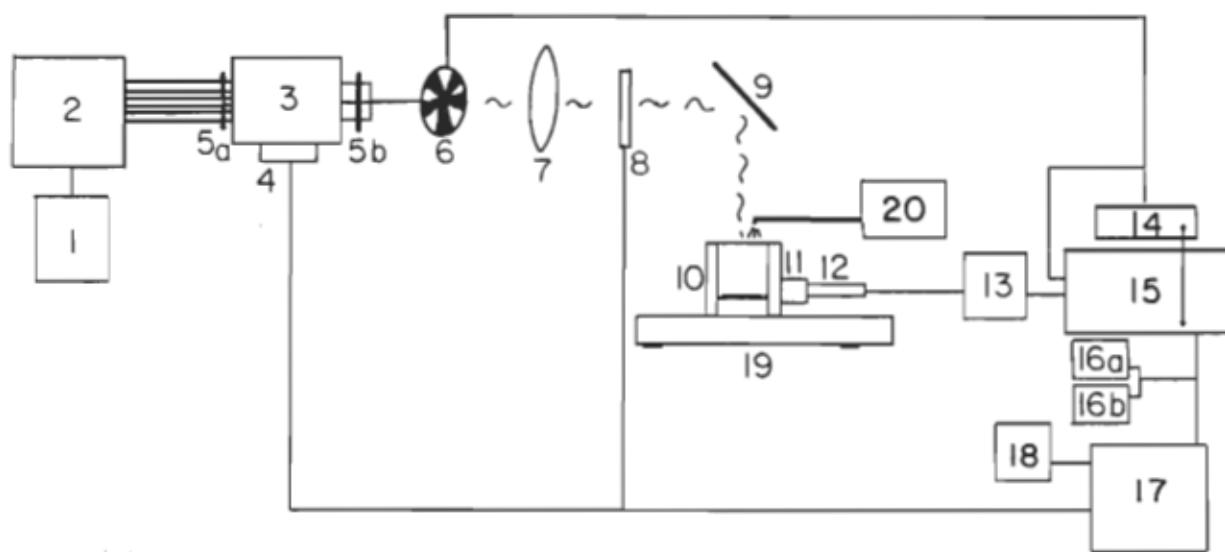
Comme nous l'avons déjà indiqué dans l'Introduction, le principe de la spectroscopie photoacoustique réside dans la production d'un son consécutive à l'absorption d'un faisceau lumineux intermittent par un échantillon placé dans une enceinte isolée. L'onde acoustique ainsi créée est captée, analysée et enregistrée. Au cours des prochaines lignes, nous

étudierons l'appareil, puis nous verrons son utilisation dans le cadre de notre étude.

Le spectromètre photoacoustique à simple faisceau dont nous nous sommes servis est schématisé à la fig. 13. Une description plus détaillée des diverses composantes est présentée dans le mémoire de Ducharme (1979).

Le faisceau lumineux produit par une lampe à arc au xénon de 1 000 W (Schoeffel Instruments Corporation) est modifié à la suite de son passage à l'intérieur d'un monochromateur à réseau (modèle GMA-251-2; Schoeffel Instruments Corporation). La distance focale du monochromateur est de 25 cm alors que la dispersion linéaire est de $3,3 \text{ nm mm}^{-1}$. L'intensité lumineuse est réglée par deux fentes sises aux deux extrémités de l'appareil. Elle peut ainsi prendre une valeur comprise entre 1 et 40 W m^{-2} . Il est possible de balayer automatiquement un domaine de longueurs d'onde situé entre 230 et 900 nm grâce à un moteur relié à l'ordinateur.

Par la suite, le faisceau monochromatique devient modulé à la suite de son passage au travers d'un disque métallique. Le disque possède des secteurs évidés en alternance avec d'autres secteurs pleins, tous d'égale dimension. Ainsi, l'intensité lumineuse suit une courbe quasi-sinusoidale dans le temps puisque les secteurs pleins obstruent complètement le passage de la radiation. Le disque est mû par un moteur relié à un



- | | |
|---|--|
| 1 Source d'alimentation | 11 Microphone |
| 2 Lampe à arc au xénon | 12 Préamplificateur |
| 3 Monochromateur | 13 Amplificateur |
| 4 Sélecteur de longueur d'onde | 14 Régulateur de fréquences |
| 5 Fentes a - émission
b - excitation | 15 Amplificateur à verrouillage
de phase |
| 6 Disque modulateur | 16 Enregistreurs a - en phase
b - en quadrature |
| 7 Lentille convergente | 17 Micro-ordinateur |
| 8 Filtre optique | 18 Table traçante |
| 9 Miroir | 19 Table anti-vibrations |
| 10 Cellule photoacoustique | 20 Lampe actinique |

Figure 13: Le spectromètre photoacoustique.

régulateur de fréquences (modèle 218F; Bentham). Des disques dotés de deux, cinq ou dix ouvertures permettent d'obtenir une plage de fréquences comprises entre 10 et 1 000 Hz. Une photodiode est fixée au modulateur afin de générer une onde de référence pour l'amplificateur.

Une lentille convergente permet de focaliser le faisceau. Au besoin, un filtre (modèle GG455; Schott), dont le mécanisme de positionnement est lui aussi relié à l'ordinateur, élimine les harmoniques des longueurs d'onde supérieures à 500 nm. Finalement, un miroir concave, dont la distance focale est de 15 cm dirige le faisceau lumineux vers la cellule photoacoustique.

Alors que la majorité des composantes du spectromètre est disponible chez des compagnies spécialisées, la cellule photoacoustique a été construite dans notre laboratoire (Ducharme et al., 1979; Goulet, 1983). La cellule est protégée des vibrations extérieures par une table anti-vibrations (modèle TLI-386; Technilab Instruments Inc.).

Le signal acoustique produit par l'échantillon est décelé par un microphone du type condensateur-électret (modèle 1972-9600; General Radio Co.). Il est ensuite préamplifié, puis transmis à un amplificateur à verrouillage de phase (modèle 393; Ithaco-Dynatrac). Les données ainsi recueillies peuvent être directement tracées sur papier par un enregistreur (modèle 5 000; Fischer-Recordall ou modèle 555-0000; Linear) ou sont emmagasinées sur un disque mou grâce à un micro-ordinateur (modèle Apple IIe; Apple Co.) en vue d'un traitement ultérieur.

Lorsque requis, la photosynthèse est saturée par un faisceau de lumière blanche continue de forte intensité. Ce faisceau actinique est produit par une lampe de type tungstène-quartz-halogène (modèle SV-181; General Electric). Une fibre optique conduit la lumière jusqu'au-dessus de la cellule photoacoustique. L'intensité de la lampe est de 420 W m^{-2} et son spectre comprend une gamme de longueurs d'onde située dans toute la région du spectre visible. Un filtre infrarouge élimine les longueurs d'onde supérieures à 850 nm. L'adjonction de divers filtres neutres permet d'obtenir une plage d'intensités lumineuses comprise entre 40 et 420 W m^{-2} .

Les intensités lumineuses ont été mesurées à l'aide d'un radiomètre (modèle UDT-21A; United Detector Technology).

D) LES MESURES PHOTOACOUSTIQUES

Lors des mesures photoacoustiques, un disque de 1,8 cm de diamètre est prélevé sur une feuille. Suite à une adaptation à l'obscurité d'une dizaine de minutes, le disque est transféré à la cellule photoacoustique.

Deux types de mesures sont effectuées: i) des spectres de l'échantillon sont réalisés en balayant le spectre visible. Dans ce cas, le spectre doit être divisé par celui du noir de charbon obtenu dans les mêmes conditions. Cette substance, en absorbant toute la radiation

incidente, nous permet d'obtenir le profil de la lampe, ce qui se révèle être un moyen de normaliser le spectre.

ii) Lorsque les mesures visent à mesurer l'activité photosynthétique de l'échantillon, par le biais du dégagement d'oxygène et de la perte photochimique, on fixe la longueur d'onde à 680 nm et on applique le faisceau actinique de façon répétée. La détermination des signaux photo-acoustiques de l'échantillon actif et inhibé est effectuée. L'enregistrement des signaux en phase et en quadrature (hors-phase) est fait simultanément grâce à l'emploi de deux branchements correspondant aux signaux en cosinus et en sinus de l'amplificateur. Les signaux sont alors relayés vers les deux enregistreurs.

Une cellule photoacoustique munie de clapets de vidange est utilisée lors de la mesure des effets des mélanges gazeux sur l'activité photosynthétique. Un faible courant du mélange gazeux ($0,5 \text{ l min}^{-1}$) est entraîné dans la cellule photoacoustique afin de modifier l'atmosphère.

La présence de la photorespiration est aussi déterminée à l'aide de l'acide glycidique. Ce composé est reconnu pour inhiber la glycine:sérine aminotransférase, une enzyme de la voie métabolique photorespiratoire (Zelitch, 1974). Le disque de feuille est incubé dans une solution 1 mM légèrement agitée pendant 30 minutes avant la mesure.

Une série de mesures, telle que l'effet de la fréquence de modulation entre 20 et 200 Hz, comprend deux ou trois répétitions du même paramètre (p.ex. la fréquence de modulation de 100 Hz). La même série de mesures est répétée de huit à douze fois.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION

A) LES PROFILS DE PROFONDEUR

Comme nous l'avons déjà mentionné dans l'Introduction, la méthodologie du profil de profondeur nous permet d'obtenir des données d'ordre morphologique au sujet du spécimen étudié. Dans cette section, nous étudierons d'abord les différentes bandes d'absorption présentes avant d'analyser les profils de profondeur proprement dits.

La figure 14 présente les spectres photoacoustiques des feuilles à l'étude. La fréquence de modulation utilisée (35 Hz) permet de sonder les différents pigments de la feuille.

Les larges bandes visibles entre 250 et 300 nm sont dues à la présence des acides nucléiques (260 nm (Inagaki, 1986)) et des protéines (les acides aminés tryptophane et tyrosine absorbant à 275 et 280 nm respectivement (Creed, 1984a et b)). Les caroténoïdes, les pigments accessoires de la photosynthèse, absorbent à l'intérieur de la région s'étendant entre 450 et 550 nm (Clayton, 1980). Quant à la chlorophylle, le principal pigment photosynthétique, elle possède des bandes d'absorption aux environs de 450 nm (bande de Soret) et de 680 nm (Clayton, 1980).

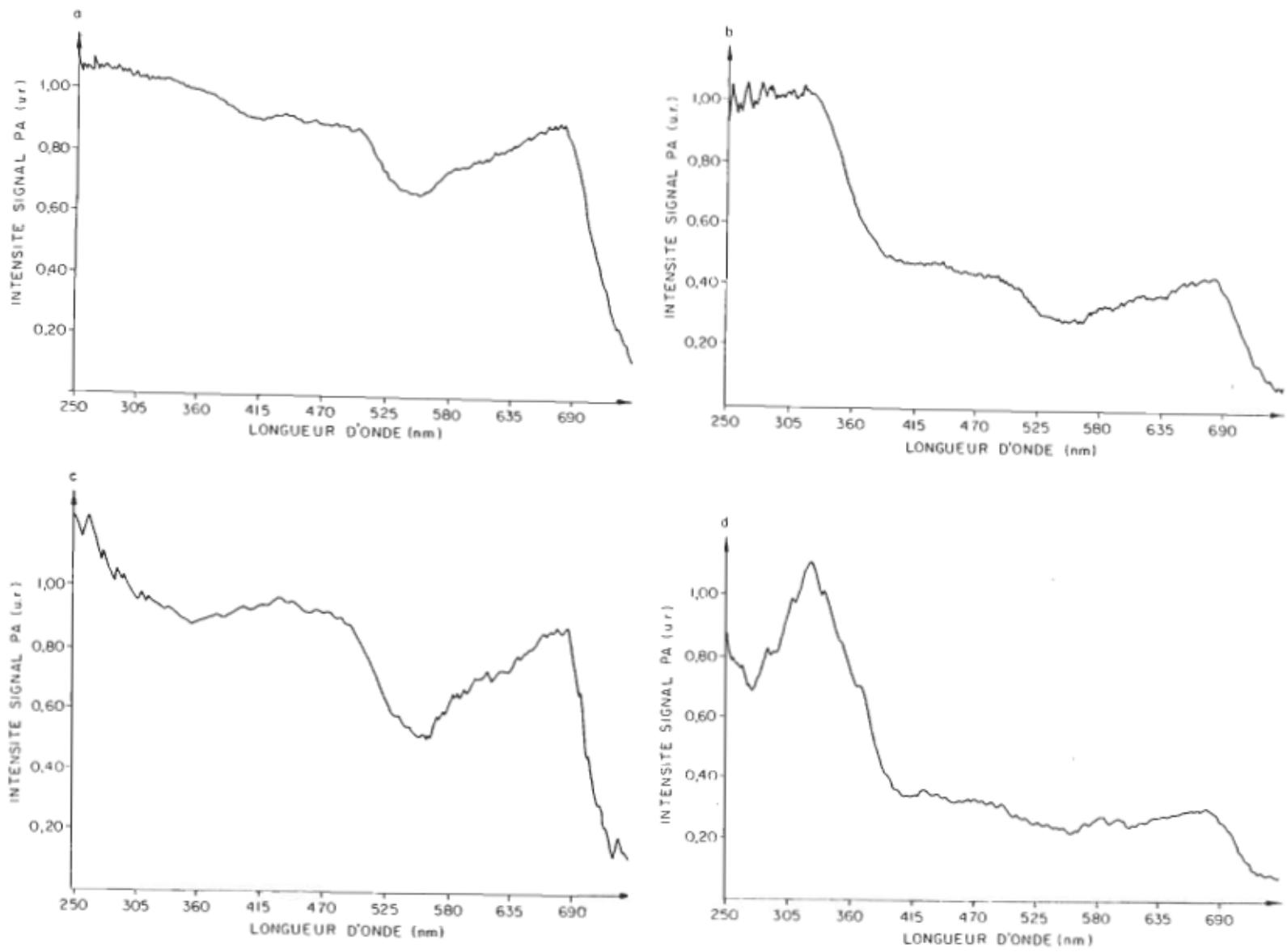


Figure 14: Spectres photoacoustiques de feuilles matures a) d'érable à sucre, b) de haricot, c) d'impatiens et d) de maïs.
 $f_{\text{mod}} = 35 \text{ Hz}$, $I_{\text{mod}} = 4 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{\text{act}} = 350 \text{ W m}^{-2}$.

Toutes ces bandes sont présentes dans les différentes feuilles, mais en des proportions différentes. Les rapports entre les différentes bandes pourraient être des indicateurs de l'état de la feuille. A ce stade-ci des travaux, nous devons demeurer prudents car de grandes variations sont observées dans les bandes reliées aux acides nucléiques et aux protéines d'un échantillon à l'autre (Charlebois, résultats non publiés).

Avant de discuter des profils de profondeur, nous devons définir l'axe de profondeur utilisé. Selon la théorie de Rosencwaig et Gershoff (1976), la couche thermiquement sondée (L) équivaut à $2\pi\mu$. Cependant, Malkin et Cahen (1981) considèrent cette valeur de L trop amplifiée et l'évaluent plutôt à $\mu/\sqrt{2\pi}$. Nous avons décidé d'utiliser une valeur moyenne de L valant μ , comme Boucher et al., (1986).

Les profils de profondeur des différentes plantes étudiées sont présentés à la fig. 15.

Les premiers 12 μm ne laissent apparaître que les bandes d'absorption associées aux acides nucléiques, aux protéines et aux cires. Ces composés se retrouvent en grande majorité dans l'épiderme de la feuille, dont l'épaisseur correspond à cette zone (fig. 1a). Bien que la couche épidermique comprenne les cellules de garde stomatiques, leur faible contenu de chlorophylle (Ziegler, 1986) explique l'absence de cette bande. Chez l'érable, la décroissance de ces pics avec la profondeur nous porte à croire que la densité protéique est plus grande dans les premières

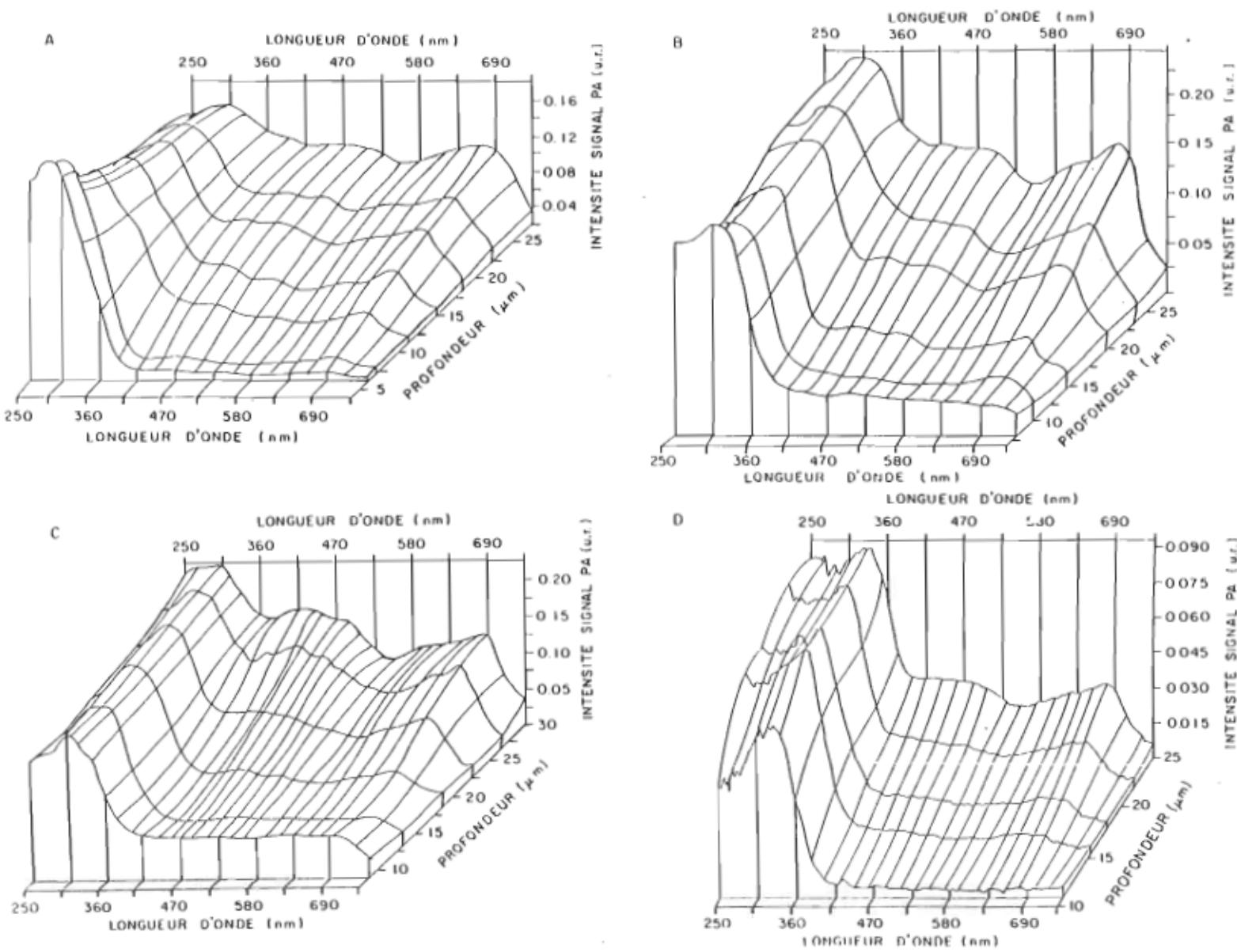


Figure 15: profils de profondeur de feuilles matures a) d'érable à sucre, b) de haricot, c) d'impatiens et d) de maïs.
 $I_{\text{mod}} = 4 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{\text{act}} = 350 \text{ W m}^{-2}$.

couches de la feuille ou qu'il existe une très grande réflexion interne de ces longueurs d'onde dans l'épiderme, ce qui provoquerait une augmentation de leur absorption. Étant donné l'importance biologique de ces molécules, l'épiderme aurait alors un rôle de filtre solaire.

La présence des pigments photosynthétiques, la chlorophylle et les caroténoïdes, est détectée à une profondeur de 12 µm. Cette profondeur correspond à celle des cellules du mésophylle, sises sous la cuticule de la feuille (fig. 1a). L'intensité des bandes de ces composés augmente proportionnellement à la profondeur sondée. Le rapport entre les bandes de la chlorophylle (à 680 nm) et des caroténoïdes (à 500 nm) ne varie que très peu à l'intérieur d'une feuille et d'une espèce à l'autre. Ce rapport est de un chez les espèces étudiées.

Dans le cadre de nos études ultérieures sur le dépérissement des forêts, cette méthodologie peut se révéler efficace dans la détection des dommages morphologiques. La région de la cuticule, comprise entre 0 et 15 µm devient un premier repère en cas de dommages. Percy et Baker (1987) et Caporn et Hutchinson (1986) ont démontré que les cires de l'épiderme de feuilles soumises à l'action de pluies acides étaient affectées en qualité et en quantité. Nagel et al., (1987), en travaillant sur des aiguilles de sapin, ont déjà montré l'efficacité de la méthodologie photoacoustique dans ce domaine.

Quant à la région supérieure à 15 µm, son intérêt réside dans la présence des pigments photosynthétiques. Des variations du rapport des bandes d'absorption de la chlorophylle et des caroténoïdes pourraient être visibles dans des cas de dommages importants à la feuille. Nous pensons ici à un déplacement de l'équilibre acido-basique du cytoplasme, suite à la perte de son pouvoir-tampon ou à des dommages directs à un des deux pigments.

B) LES MESURES DE L'ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE

Les résultats présentés dans cette section ne tiennent pas compte de l'aspect vectoriel des composantes thermique et de dégagement d'oxygène du signal photoacoustique. Nous considérons que le calcul scalaire des composantes nous donne une idée suffisamment juste afin de déterminer les paramètres optimaux. Par contre, lors de mesures de l'activité photosynthétique, avec les paramètres optimaux, nous utiliserons l'aspect vectoriel.

L'effet du faisceau actinique est enregistré selon la relation:

$$\text{Effet} = \frac{Q_{m+a} - Q_m}{Q_{m+a}} \times 100 \quad (39)$$

où Q_{m+a} représente l'intensité du signal photoacoustique lorsque les faisceaux modulé et actinique sont allumés. Q_m symbolise l'intensité du signal photoacoustique lorsque seul le faisceau modulé est allumé.

L'application du faisceau actinique supprime l'activité photosynthétique. En même temps, les paramètres observables de dégagement d'oxygène et d'emmagasinage d'énergie photosynthétique se retrouvent annulés. C'est ainsi que le signal photoacoustique variera selon les intensités de ces deux paramètres. Si l'intensité du dégagement d'oxygène est la plus grande, l'effet du faisceau actinique résulte en une diminution du signal photoacoustique (effet négatif). Dans le cas inverse où la contribution de l'emmagasinage d'énergie est supérieure, il y aura augmentation du signal photoacoustique (effet positif) lors de l'application du faisceau actinique.

1) Effet du temps

Suite à l'introduction du disque de feuille dans la cellule photoacoustique, il s'ensuit généralement une période de transition (Fig. 16b). Pendant ce laps de temps, le signal photoacoustique varie jusqu'à l'atteinte d'un plateau. En travaillant à des fréquences de modulation inférieures à 200 Hz, nous avons constaté que l'effet du faisceau actinique passait de positif à négatif. Par contre, en opérant à des fréquences de modulation supérieures, l'effet

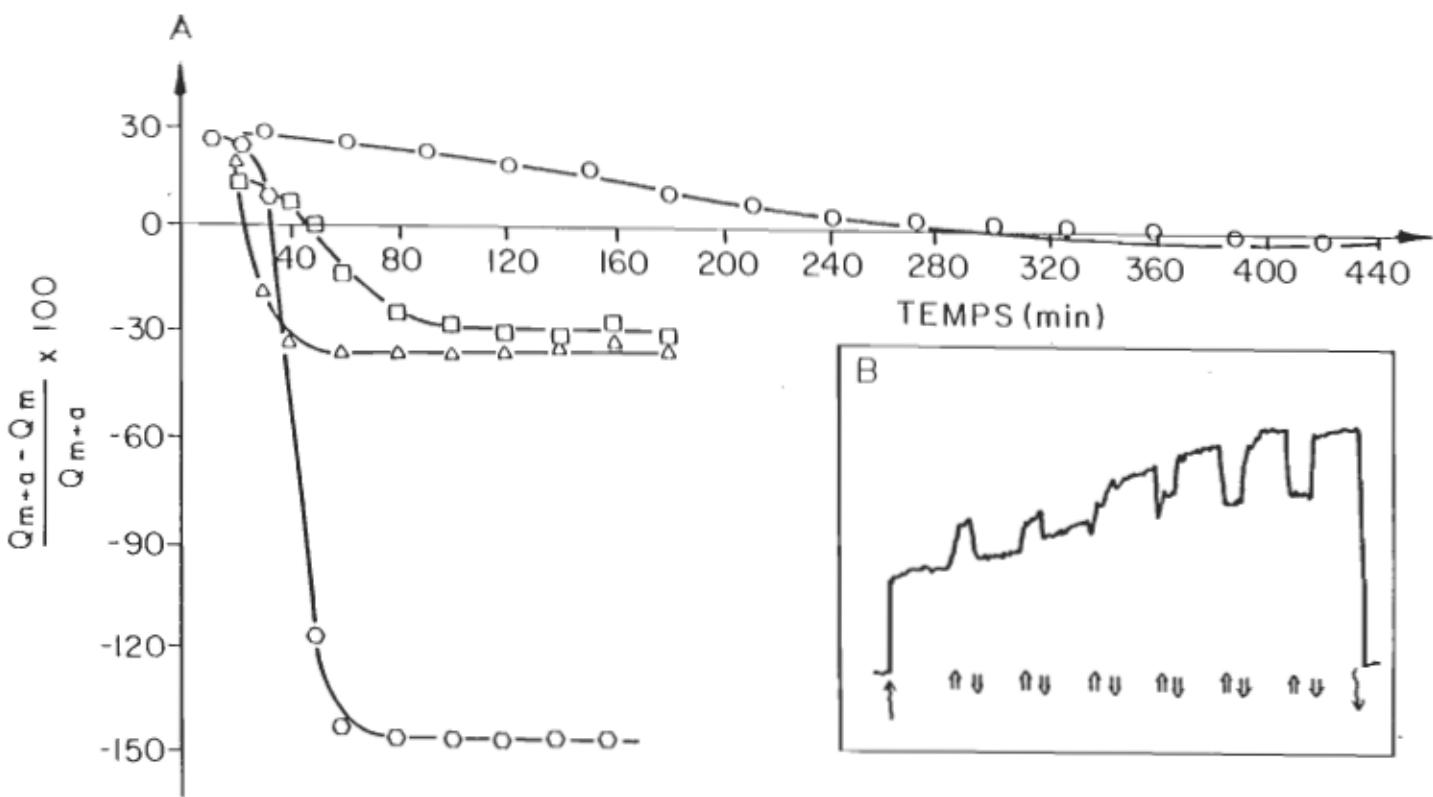


Figure 16: A. Variation de l'effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique de feuilles d'érable à sucre (\ominus), de haricot (\square), d'impatiens (\odot) et de maïs (Δ) en fonction du temps. $f_{mod} = 80\text{ Hz}$; $I_{mod} = 4\text{ W m}^{-2}$ et $I_{ea} = 350\text{ W m}^{-2}$.
 B. Exemple de résultats: variation du signal photoacoustique d'une feuille de maïs en présence (\Uparrow) et en absence (\Downarrow) du faisceau actinique en fonction du temps. Conditions similaires à A.

positif initial augmente légèrement. La figure 16 montre la période de transition observée pour chacune des plantes à l'étude.

Cette période de transition, présente aussi chez des plants de tabac, est expliquée comme étant une phase d'induction de la photosynthèse (Bults et al., 1982). C'est pourquoi nous pouvons apercevoir cette transition autant au niveau du dégagement d'oxygène que de l'emmagasinage d'énergie photosynthétique (résultats non présentés).

Par contre, la période de transition varie d'une espèce à l'autre. Sa valeur passe de 30 minutes chez le maïs à plus de 6 heures chez l'érable à sucre, en passant par 40 et 80 minutes chez l'impatiens et le haricot respectivement. L'érable représente un cas spécial: cette transition s'accompagne d'une perte de près de 75% de sa masse fraîche. Dans le cas des autres plantes, la perte de masse ne représente que 20 à 25% de la masse fraîche pendant la période de transition. Ceci nous porte à croire qu'un autre phénomène entre en ligne de compte. Nous en reparlerons plus loin.

L'établissement d'un plateau par le signal photoacoustique indique que la photosynthèse a atteint un état stationnaire. C'est à partir de ce moment que les mesures de l'activité photosynthétique peuvent être effectuées. L'activité photosynthétique est stable pendant plus de 3 heures chez les végétaux étudiés. De plus, le dépôt du disque sur un linge humide permet d'augmenter cette période jus-

qu'à 8 heures. Ces résultats montrent que nous disposons de suffisamment de temps afin d'analyser des échantillons récoltés hors du campus dans le cadre du projet sur le dépérissement des forêts.

2) Effet de la fréquence de modulation

Des résultats similaires à ceux présentés par Bults et al. (1982) ont été obtenus avec trois des plantes étudiées. La figure 17 montre l'influence de la fréquence de modulation sur l'effet du faisceau actinique.

L'effet du faisceau actinique est dépendant de la fréquence de modulation chez le haricot, l'impatiens et le maïs. Nous observons des effets négatifs à des fréquences de modulation inférieures à 200 Hz. Les mesures effectuées à des fréquences supérieures à 200 Hz montrent des effets positifs. Comme nous l'avons déjà indiqué, l'effet négatif est dû à la contribution supérieure du dégagement d'oxygène par rapport à l'emmagasinage d'énergie. La disparition de la composante de dégagement d'oxygène aux environs de 200 Hz est reliée à la faible vitesse de diffusion de l'oxygène dans les tissus végétaux (10^{-2} cm s⁻¹ (Windrem et Plechy (1980))). Ainsi à haute fréquence de modulation, l'oxygène n'a pas le temps de se rendre à la surface de la feuille afin de générer le signal photoacoustique.

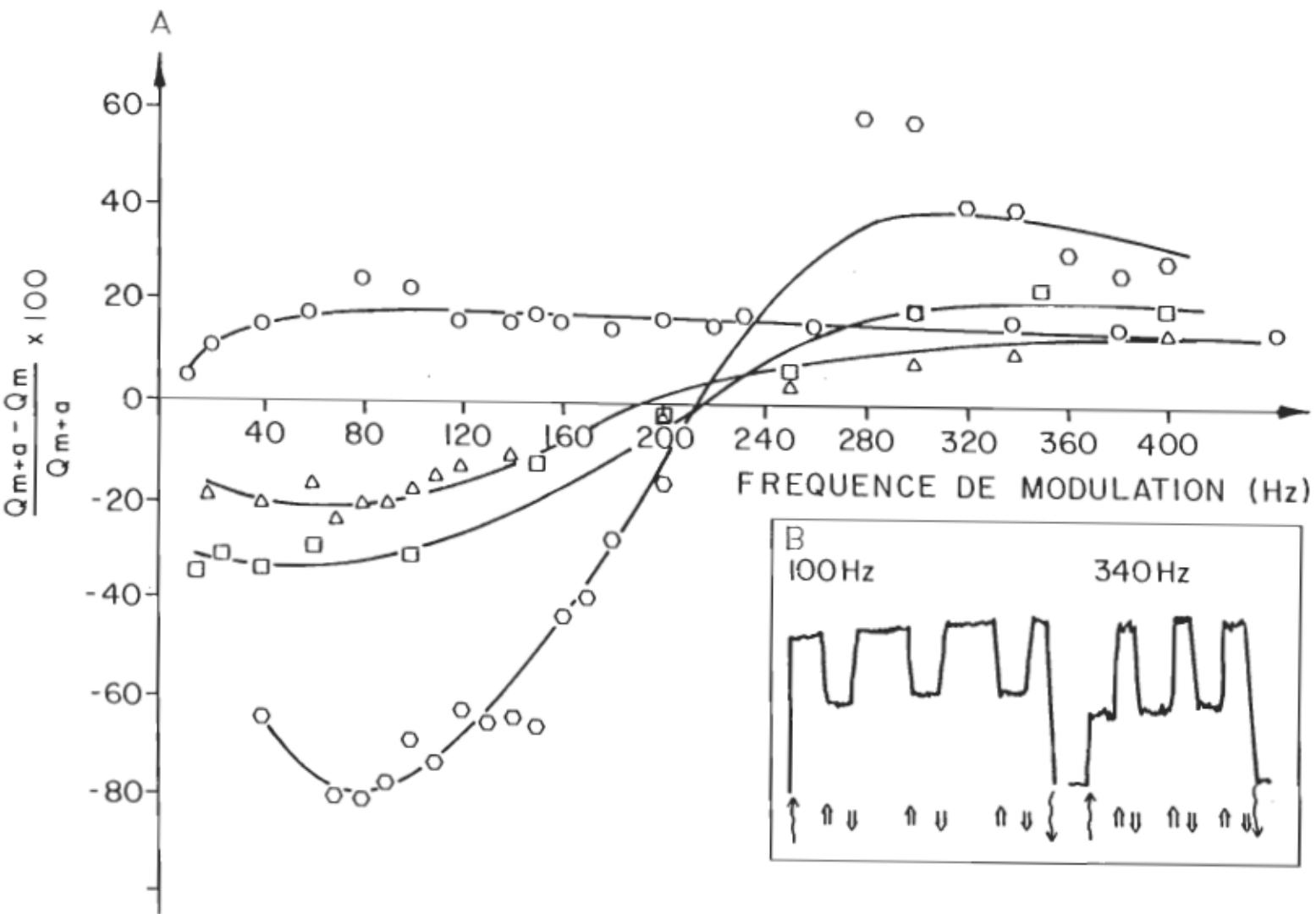


Figure 17: Variation de l'effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique de feuilles d'érable à sucre, (O), de haricot (\square), d'impatiens (\circ) et de maïs (Δ) en fonction de la fréquence de modulation. $I_{\text{mod}} = 4 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{\text{act}} = 350 \text{ W m}^{-2}$.
 B. Exemple de résultats: effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique d'une feuille d'impatiens à basse (80 Hz) et haute (300 Hz) fréquences de modulation. Conditions similaires à A.

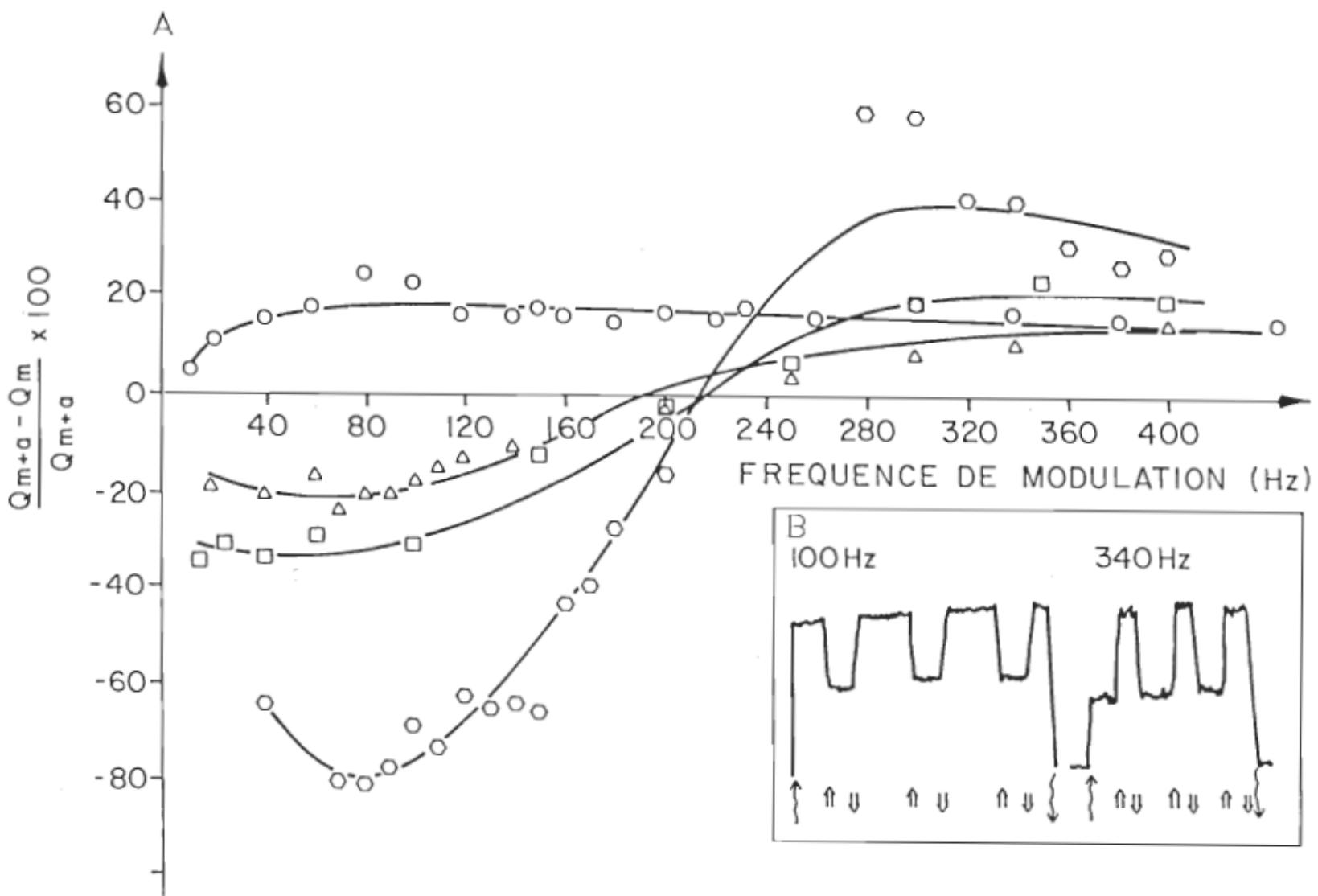


Figure 17: A. Variation de l'effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique de feuilles d'érable à sucre, (○), de haricot (□), d'impatiens (△) et de maïs (▲) en fonction de la fréquence de modulation. $I_{\text{mod}} = 4 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{\text{lact}} = 350 \text{ W m}^{-2}$.

B. Exemple de résultats: effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique d'une feuille d'impatiens à basse (80 Hz) et haute (300 Hz) fréquences de modulation. Conditions similaires à A.

L'indépendance de l'effet du faisceau actinique en regard de la fréquence de modulation constitue un phénomène jamais relaté jusqu'à présent. Notons toutefois que l'érable à sucre représente le premier arbre dont l'activité photosynthétique est mesurée selon cette méthodologie. En effet, les mesures antérieures ont porté sur des plants de tabac (Bults et al., 1982), de fèves (Canaani et al., 1982), de tomates (Yakir et al., 1985) et de haricots (Havaux et al., 1986).

Ces résultats nous permettent d'établir les premiers paramètres de mesure de l'activité photosynthétique. Le dégagement maximal d'oxygène (effet négatif) est observé à 40 Hz pour le haricot et 80 Hz pour l'impatiens et le maïs. Quant à l'emmagasinage d'énergie photosynthétique, son taux optimal se rencontre à 300 Hz pour l'impatiens et à 350 Hz pour le haricot et le maïs. En ce qui a trait aux paramètres maximaux de l'érable à sucre, nous utiliserons 80 et 350 Hz, résultats les plus fréquemment rencontrées. Ces données se retrouvent dans le Tableau 3.

3) Effet de l'intensité du faisceau actinique

Le faisceau actinique agit en saturant la photosynthèse, ce qui permet ainsi d'éliminer les composantes de dégagement d'oxygène et d'emmagasinage d'énergie photosynthétique du signal photoacoustique. Il se révèle donc important de travailler à une intensité actinique sous laquelle la photosynthèse est complètement saturée.

La figure 18 présente l'effet de l'intensité du faisceau actinique sur la saturation de l'activité photosynthétique des plantes à l'étude.

Nous discernons deux tendances de ces résultats. L'activité photosynthétique des deux plantes en C₃, l'éryable à sucre et le haricot est saturée à des intensités actiniques avoisinant 150 W m⁻². Quant au maïs, une plante en C₄, la saturation de la photosynthèse se produit aux environs de 250 W m⁻². En ce qui a trait à l'impatiens, aucune étude, à notre connaissance, n'a déterminé son appartenance à l'un des deux types physiologiques. Ces données montrent les comportements différents des plantes appartenant aux deux types physiologiques. L'activité photosynthétique des plantes en C₃ est saturée à des intensités lumineuses inférieures à celle des plantes en C₄ (Black, 1973 voir le Tableau 1).

Nous utiliserons donc des intensités actiniques de 200 W m⁻² pour saturer la photosynthèse chez l'éryable à sucre et le haricot, de 250 W m⁻² chez le maïs et de 350 W m⁻² chez l'impatiens. Ces valeurs constituent des intensités suffisantes pour saturer l'activité photosynthétique mais inférieures à celles qui risqueraient d'endommager irréversiblement l'appareil photosynthétique des feuilles. En effet, à ce niveau d'organisation, la feuille est capable de synthétiser suffisamment de nouveaux composés afin de remplacer ceux dégradés par la lumière.

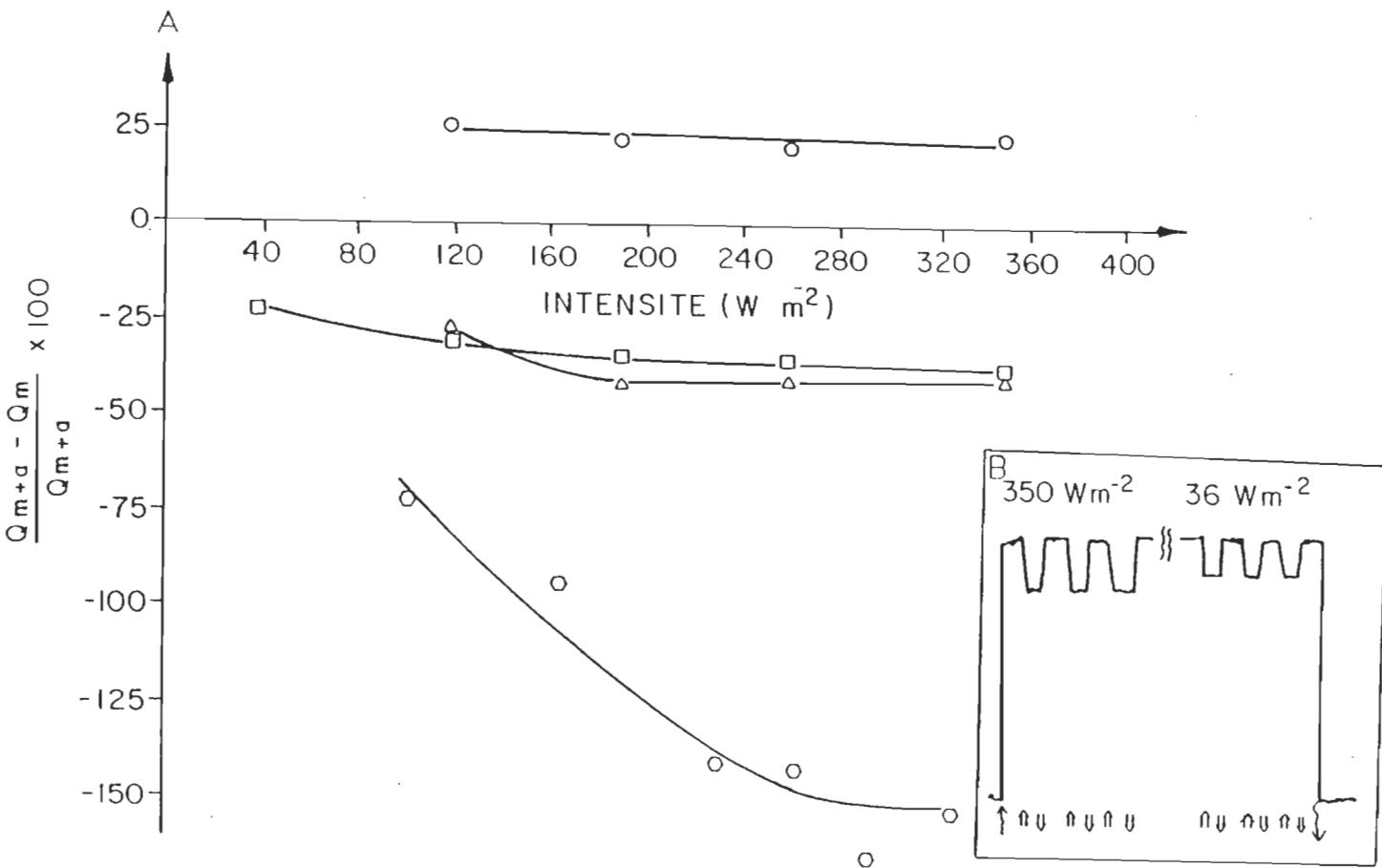


Figure 18: A. Variation de l'effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique de feuilles d'érable à sucre (○), de haricot (□), d'impatiens (○) et de maïs (△) en fonction de son intensité. $f_{mod} = 40$ Hz pour le haricot, 80 Hz pour les autres; $I_{mod} = 7$ W m⁻².
 B. Exemple de résultats. Effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique d'une feuille de haricot. Conditions similaires à A.

4) Effet de l'intensité du faisceau modulé

L'intensité du faisceau modulé peut elle aussi entraîner une saturation partielle de l'activité photosynthétique. La réduction du dégagement d'oxygène qui s'ensuit est observable à la fig. 19.

Il est à noter que l'allure générale de la courbe des résultats à haute fréquence de modulation est similaire à celle obtenue à basse fréquence de modulation. Cependant, en raison de l'intensité moindre du signal photoacoustique aux environs de 300 Hz, les points expérimentaux présentent une plus grande dispersion (résultats non présentés).

L'amplitude des effets négatifs est supérieure aux faibles intensités lumineuses du faisceau d'analyse comparativement à celle observée aux intensités plus élevées. Ceci s'explique par la saturation partielle de l'activité photosynthétique aux fortes intensités. Ces données devraient nous inciter à choisir une intensité du faisceau modulé la plus faible possible. Cependant, comme nous utilisons la même intensité lumineuse à des fréquences de modulation de 300 Hz, nous devons opter pour une intensité de faisceau d'analyse supérieure afin d'obtenir un signal photoacoustique et un rapport signal/bruit acceptables. C'est pourquoi nous travaillerons avec un faisceau modulé de 7 W m^{-2} , ce qui correspond à des ouvertures des fentes du monochromateur de 2 et 2 mm.

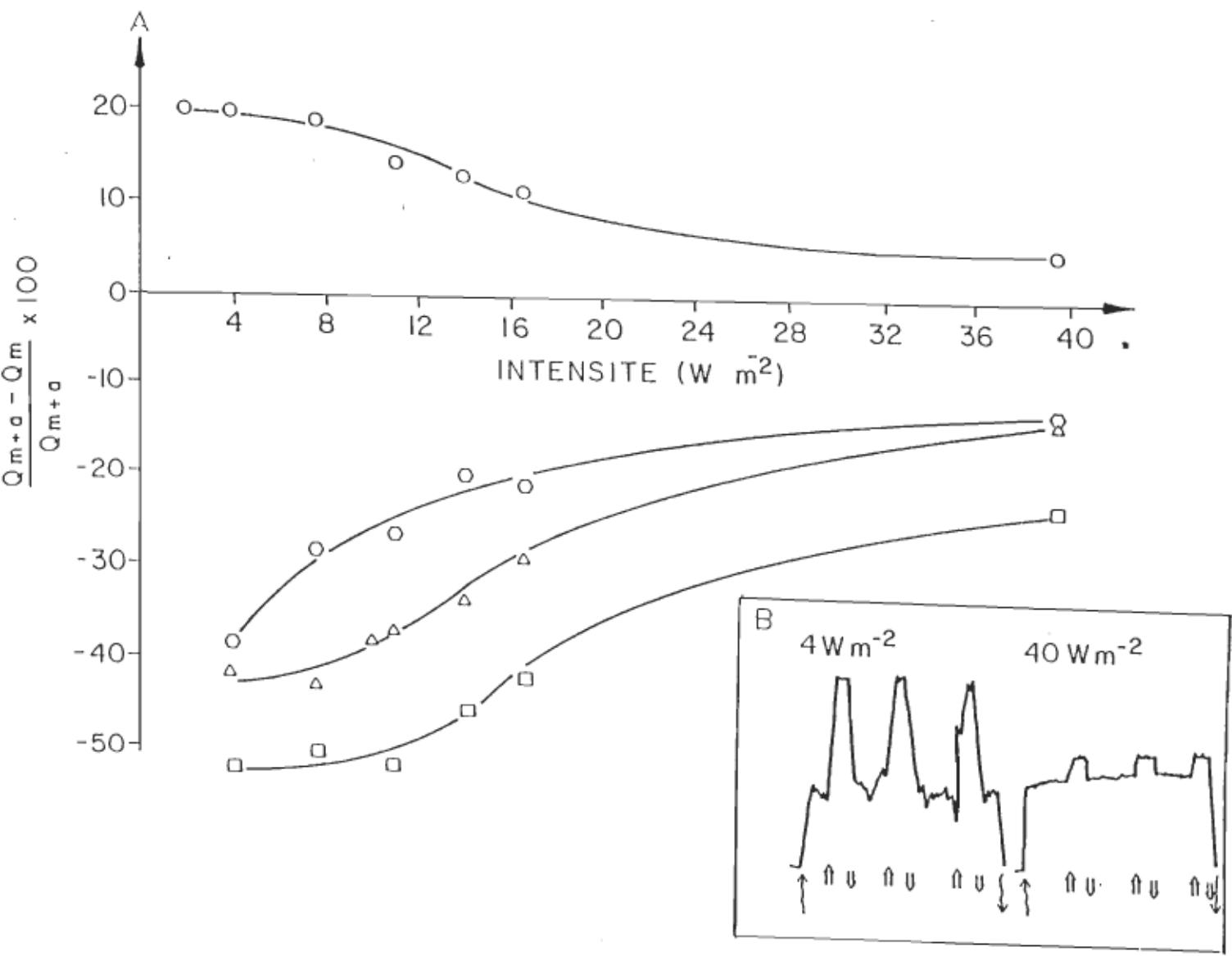


Figure 19:
 A. Variation de l'effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique de feuilles d'érable à sucre (○), de haricot (□), d'impatiens (△) et de maïs (▲) en fonction de l'intensité du faisceau modulé. $f_{mod} = 40$ Hz pour le haricot, 80 Hz pour les autres; $I_{act} = 200$ W m⁻² pour l'érable à sucre et le haricot, 250 W m⁻² pour le maïs et 350 W m⁻² pour l'impatiens.
 B. Exemple de résultats: effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique d'une feuille d'impatiens. Conditions similaires à A.

5) Mesure de l'activité photosynthétique

Nous présentons au Tableau 3 une synthèse des parties précédentes ainsi que les résultats obtenus à l'aide de ces paramètres.

L'activité photosynthétique est déterminée par le rapport des amplitudes des vecteurs de dégagement d'oxygène et thermique maximal. Le vecteur de dégagement d'oxygène représente l'activité photosynthétique proprement dite. La division par le vecteur thermique maximal permet en quelque sorte d'obtenir une référence puisque son amplitude est directement reliée à la quantité de chlorophylle présente dans la feuille. L'impatiens possède l'activité photosynthétique la plus élevée comme en témoigne le rapport des composantes oxygène/thermique maximale de 1,7. Le maïs, le haricot et l'érable à sucre suivent dans l'ordre avec des valeurs de 0,7, 0,6 et 0,1 respectivement. Cette tendance se retrouve autant au niveau de l'analyse scalaire que vectorielle du signal photoacoustique. Hesketh et Moss (1963) et Hesketh (1963) ont mesuré des taux de fixation de CO₂ de 31, 12 et 5 mg de CO₂ dm⁻² h⁻¹ pour le maïs, le haricot et l'érable à sucre respectivement. A notre connaissance, aucune étude sur l'activité photosynthétique de l'impatiens n'a été effectuée.

Les résultats observés par la méthodologie photoacoustique se révèlent donc comparables à ceux enregistrés avec une autre méthode. Cette correspondance entre les diverses techniques avait aussi été

Tableau 3

Mesure de l'activité photosynthétique de différentes plantes

Paramètre	Érable à sucre	Plante Haricot	<u>impatiens</u>	Maïs
Période de transition (min)	360	30	40	40
Intensité actinique saturante (W m^{-2})	200	200	350	250
Intensité du faisceau modulé (W m^{-2})	7	7	7	7
Basse fréquence de modulation (Hz)	80	40	80	80
Haute fréquence de modulation (Hz)	300	350	300	300
<hr/>				
Approche scalaire				
Effet négatif (%)	-4	-36	-82	-22
Effet positif (%)	25	24	66	50
$\rho_{\text{oxygène}} / \rho_{\text{thermique}}$	0,3	0,8	4,5	2,9
<hr/>				
Approche vectorielle				
Thermique Max.				
Amplitude (10^{-5}V)	43,5	25,1	16,7	10,5
Angle (°)	13,3	34,5	12,4	-4,0
Thermique				
Amplitude (10^{-5}V)	30,1	17,4	8,2	8,1
Angle (°)	13,3	34,5	12,4	-4,0
Oxygène				
Amplitude (10^{-5}V)	6,1	14,7	27,9	7,4
Angle (°)	-56,7	22,8	-34,5	-31,4
Résultant				
Amplitude (10^{-5}V)	32,3	32,3	34,5	15,1
Angle (°)	1,0	29,3	-24,0	-15,4
$ \vec{O}_1 / \vec{T}^* $	0,14	0,59	1,67	0,70

obtenue par Carpentier et al., (1984) avec des mesures de dégagement d'oxygène et par Yakir et al., (1985) en fluorescence.

Dans un autre ordre d'idées, la variation de l'angle observée entre les vecteurs résultant et thermique de l'impatiens est similaire à celle présentée par Carpentier et al., (1985) soit environ 40°. De façon générale, la différence entre les angles des vecteurs thermiques et résultants est d'une dizaine de degrés. Ces vecteurs, obtenus en absence et en présence du faisceau actinique, expriment bien le modèle de Poulet et al., (1983) de superposition de deux composantes, de phases différentes, formant le signal acoustique. Dans tous les cas, le vecteur résultant, qui contient la composante oxygène, est le premier à être détecté (d'un point de vue angulaire). Ceci s'explique par la courte distance que parcourt l'oxygène pour générer un signal photoacoustique. En effet, l'oxygène libéré par les chloroplastes diffuse rapidement au travers les cellules avant d'atteindre les espaces aérifères de la feuille. A cet endroit, il engendre des variations de pression sur les parois cellulaires converties en vibrations mécaniques de la feuille, produisant ainsi un signal acoustique (Bults et al., 1982). La majeure partie de la composante thermique voyage jusqu'à la surface de la feuille, subissant ainsi une forte atténuation. Ce parcours plus long explique le "retard" du vecteur thermique (LaRue et al., 1985).

A ce stade des travaux, nous considérons que seul le rapport entre les vecteurs oxygène et thermique maximal constitue un point de comparaison entre les différentes plantes. Nous avons tenté de tenir compte de la masse fraîche des spécimens mais sans parvenir à des comparaisons valables (résultats non présentés). Dans le futur, des contrôles pourront être effectués sur la base de la masse sèche ou de la concentration de chlorophylle. Par contre, dans le cadre d'une étude sur le dépérissement des forêts, ce dernier point peut fausser les résultats si les dommages foliaires s'étendent jusqu'à atteindre la chlorophylle. Des comparaisons avec des méthodes biochimiques pourraient aussi être envisagées; nous pensons ici aux mesures de dégagement d'oxygène par électrodes par exemple.

C) DÉTECTION D'UNE ACTIVITÉ PHOTORESPIRATOIRE

L'indépendance de l'effet du faisceau actinique sur les feuilles d'érable selon la fréquence de modulation (figure 17) constitue un phénomène unique parmi toutes les plantes étudiées jusqu'ici. Deux causes pourraient expliquer cette particularité: i) une composante de dégagement d'oxygène inexiste ou fortement atténuée par une feuille gorgée d'eau, comme dans les solutions de chloroplastes (Carpentier et al., 1985); ii) une composante d'emmagasinage d'énergie photosynthétique supérieure, ce qui aurait comme effet de dissimuler les variations du signal photoacoustique induites par la suppression du dégagement d'oxygène.

Nous avons déjà vu à la fig. 12 que l'effet positif initial devenait négatif après 6 heures. A ce moment, la feuille avait perdu environ 50% de sa masse. La réhydratation de la feuille permet de redonner cet effet positif avec une amplitude comparable (Fig. 20). Le taux d'humidité de la feuille se révèle important puisqu'une autre feuille, conservée humide, ne montre pas cet effet. Ceci nous montre l'importance de l'effet de l'eau sur la structure de la feuille et de par le fait même, sur les composantes de diffusion thermique et d'oxygène. Cette donnée nous permet de croire que nous pourrions être aussi vis-à-vis un phénomène nécessitant de l'eau, probablement d'ordre biochimique.

Dans un second temps, vérifions l'amplitude du vecteur \vec{O} . La présence du vecteur de dégagement d'oxygène est établie en réglant la phase de mesure. Lorsque le faisceau actinique est allumé, seule la composante thermique est détectable. L'angle de la phase de mesure est alors réglé afin d'obtenir seulement un signal en phase. L'extinction du faisceau actinique restaure la composante de dégagement d'oxygène, qui peut ainsi être observée en quadrature (signal hors-phase). Ce sont les variations de ces deux signaux que nous présentons à la fig. 21.

Le signal en quadrature de la feuille d'éryable à sucre varie de façon similaire à celui de la feuille d'impatiens. L'augmentation de ce signal lors de la fermeture du faisceau actinique indique la présence d'une composante de dégagement d'oxygène. Ceci corrobore nos résultats précédents sur la présence de ce vecteur chez l'éryable à sucre (Tableau 3). Le vecteur relié au dégagement d'oxygène est donc caché par une composante d'emmagasinage d'énergie photosynthétique supérieure à celle observée chez les autres plantes étudiées jusqu'ici.

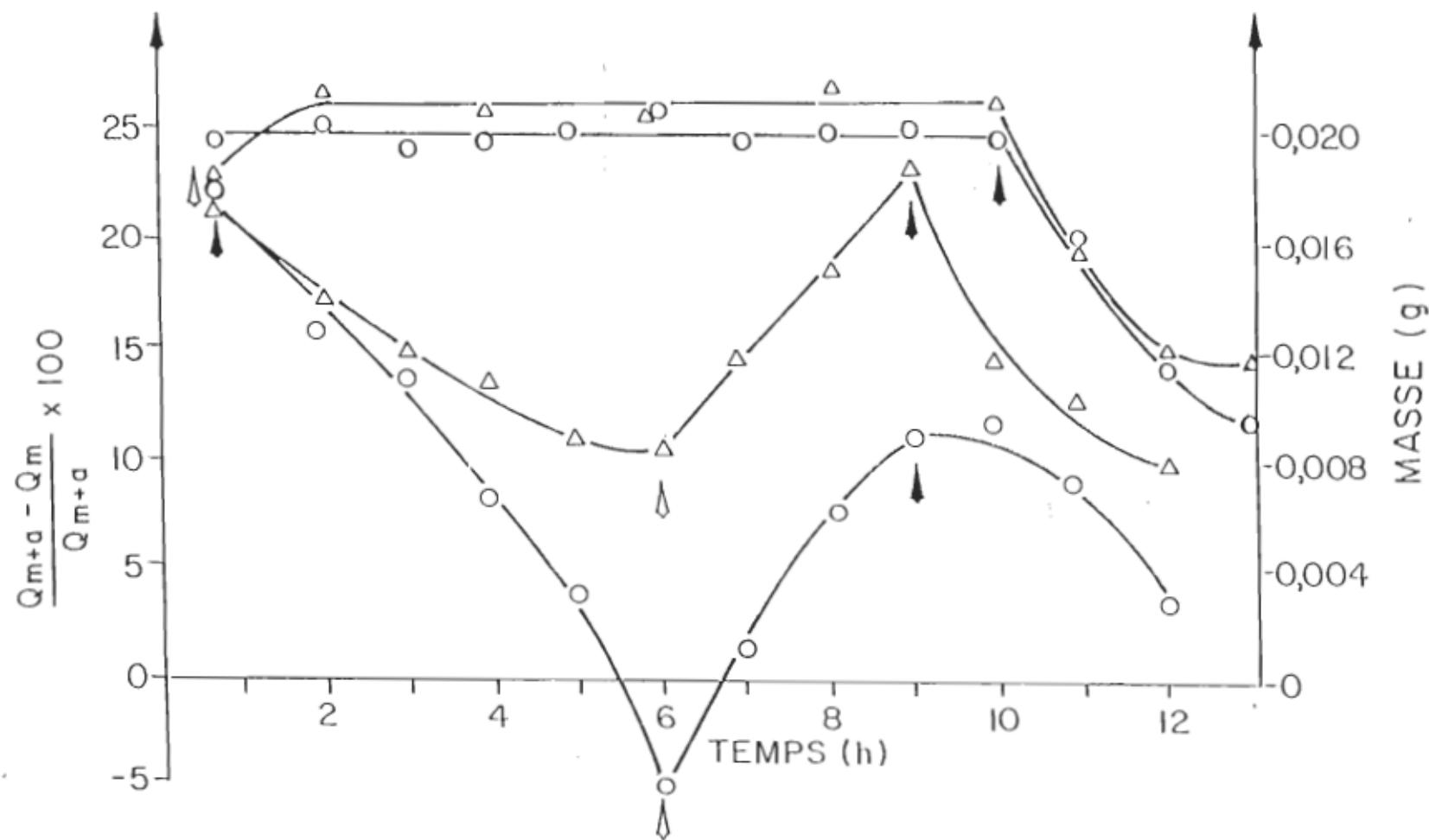


Figure 20: Variation de l'effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique (θ) et de la masse (Δ) d'une feuille d'érable à sucre selon le temps. $f_{\text{mod}} = 80 \text{ Hz}$; $I_{\text{mod}} = 7 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{\text{act}} = 200 \text{ W m}^{-2}$. \uparrow mise en sandwich entre papiers humides, \downarrow mise à l'air libre.

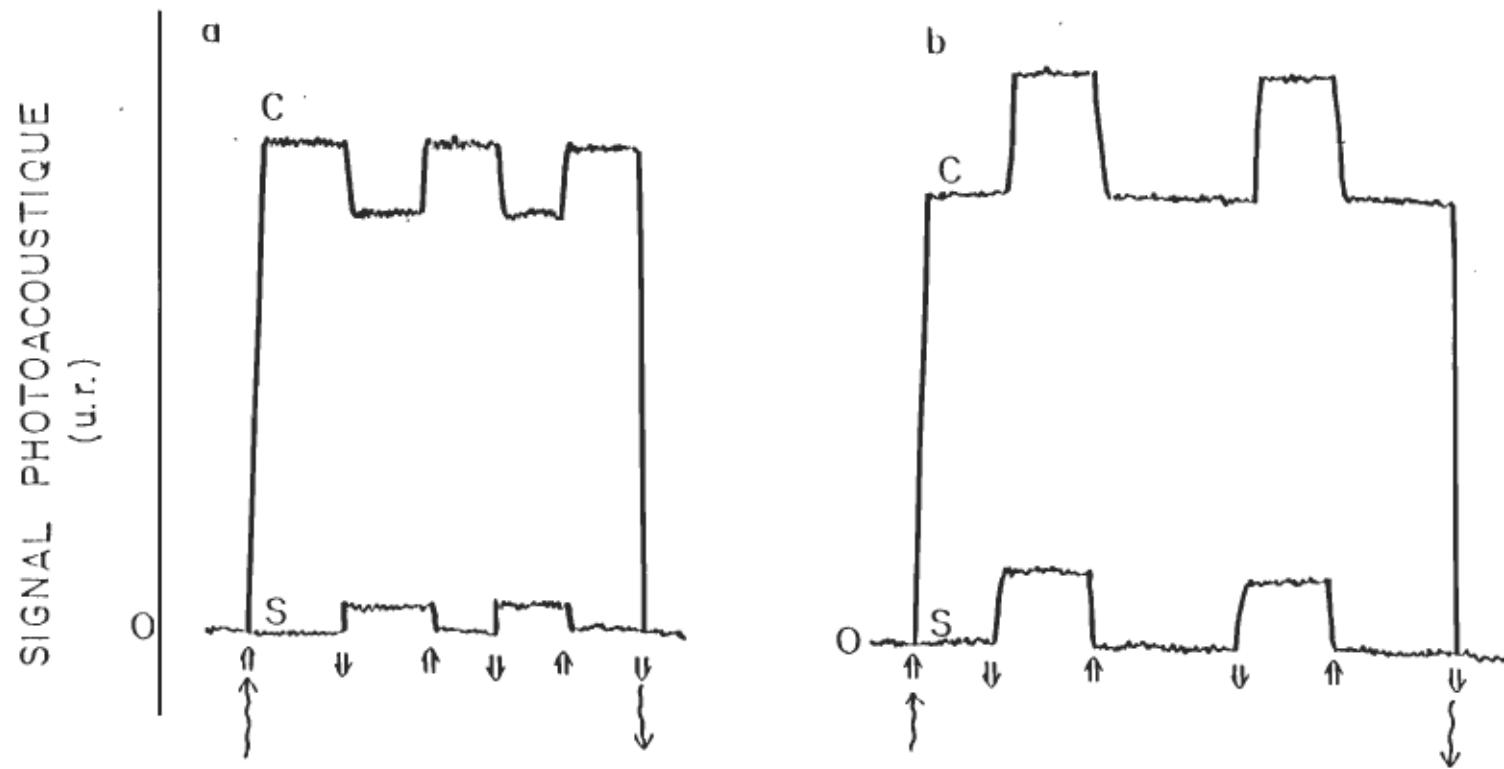


Figure 21: Variations des signaux en phase (C) et en quadrature (S) de feuilles d'éryable à sucre (a) et d'impatiens (b). $f_{\text{mod}} = 20 \text{ Hz}$; $I_{\text{mod}} = 7 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{\text{act}} = 300 \text{ W m}^{-2}$.

Voici la question qui se pose à ce stade: Quel est le phénomène, probablement biochimique, qui augmenterait l'emmagasinage d'énergie dans la feuille? Nos lectures nous ont mené vers la photorespiration. Osmond (1981) indique qu'une plante chez laquelle la photorespiration est active consomme jusqu'à 10 molécules d'ATP et 6 de NADPH pour assimiler une molécule de CO_2 . Ce rapport est de 3 molécules d'ATP et 2 de NADPH dans des conditions où la photorespiration est inhibée. Ces deux molécules énergétiques constituent les sites ultimes d'emmagasinage d'énergie dans les réactions lumineuses. Elles peuvent donc être reliées à la composante d'emmagasinage d'énergie mesurée en spectroscopie photoacoustique.

La photorespiration est affectée par la composition gazeuse de l'atmosphère (Fock, 1979). Nous avons donc soumis des feuilles d'érable à sucre à différents mélanges gazeux. Le résultat en est présenté à la fig. 22.

Seuls des mélanges de CO_2 produisent le passage d'un effet positif à un effet négatif. Ceci s'explique en analysant l'activité de l'enzyme ribulose-1,5 diphosphate carboxylase oxygénase (Rubisco). Cette enzyme possède une double fonction: de carboxylation lors de la photosynthèse, et d'oxygénéation lors de la photorespiration. Il est à noter que ces deux fonctions sont compétitives (Zelitch, 1976). Ainsi, en augmentant la concentration de CO_2 de 0.03% (air normal) jusqu'à 2 ou 100%, on privilégie la photosynthèse. Ceci se traduit par une augmentation du

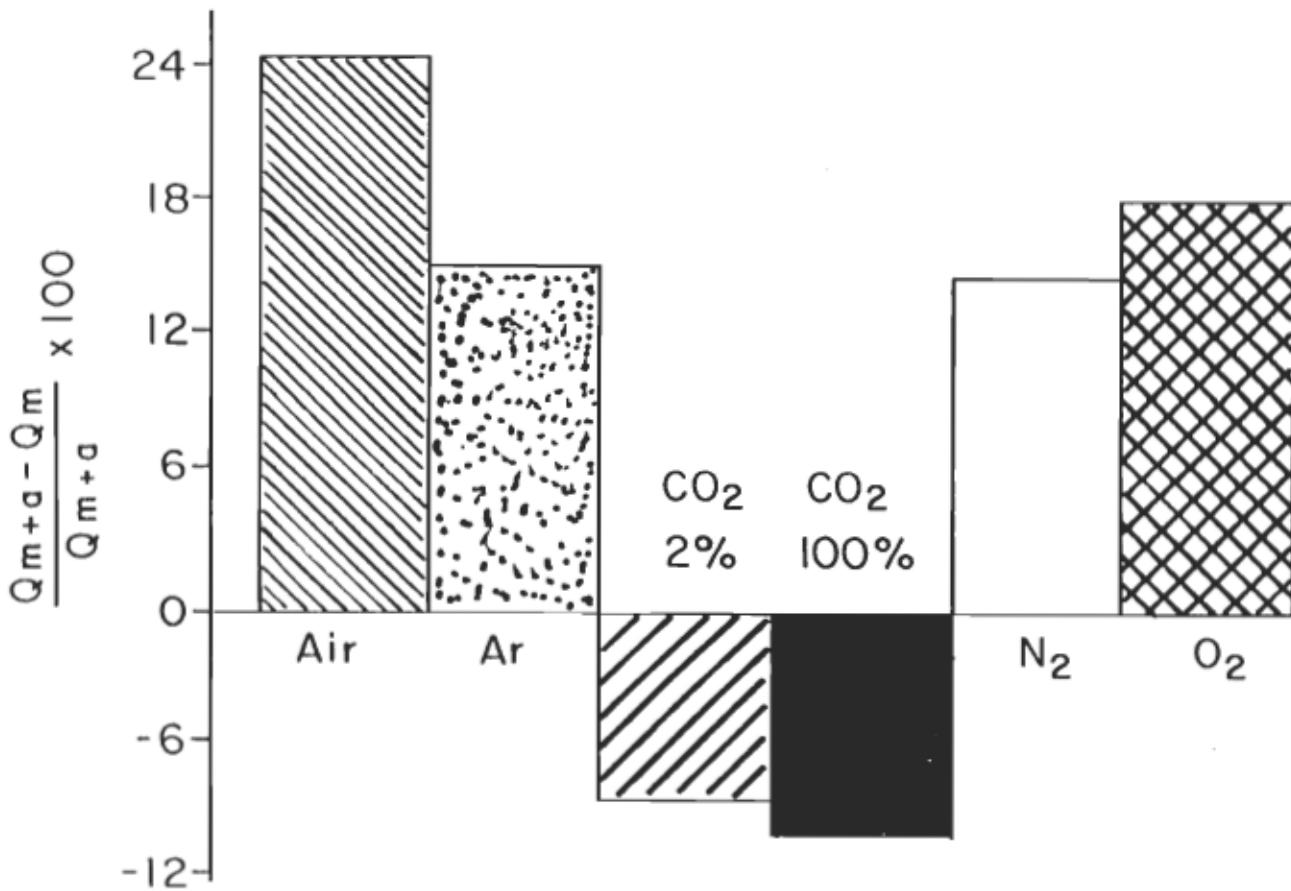


Figure 22: Variation de l'effet du faisceau actinique sur des feuilles d'érable à sucre selon le mélange gazeux. $f_{mod} = 80 \text{ Hz}$, $I_{mod} = 7 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{act} = 200 \text{ W m}^{-2}$.

dégagement d'oxygène et, suite à une diminution de la photorespiration, à une régression de l'emmagasinage d'énergie. La conjugaison de ces deux phénomènes permet l'établissement d'un effet négatif.

Pour vérifier l'effet du CO₂, nous avons enduit de silicium les disques de feuilles. Lorsque le disque est sous une atmosphère normale, aucune variation de l'effet du faisceau actinique n'est observée (Tableau 4). Par contre, sous atmosphère de CO₂, la feuille enduite de silicium présente l'effet positif antérieurement noté, contrairement à l'effet négatif engendré par la présence de CO₂. Le silicium, en empêchant le passage du CO₂ jusqu'à la feuille enlève son effet sur l'activité photosynthétique.

Notons au passage que l'effet du faisceau actinique sur la feuille en présence de CO₂ est indépendant de la fréquence de modulation. En effet, nous observons un effet négatif à des fréquences de modulation supérieures à 200 Hz. Ce résultat nous laisse perplexes. Il faudra vérifier à l'aide d'une autre méthode si le dégagement d'oxygène peut encore être détectable aux fréquences de modulation supérieures à 300 Hz, ce qui contredirait les hypothèses de Bults et al., (1982).

Toujours en vue de déterminer la présence d'une activité photorespiratoire, les feuilles ont été mises à tremper dans une solution d'acide glycidique. Ce composé est un inhibiteur de la voie métabolique de la photorespiration au niveau de l'enzyme glycine:sérine aminotransférase

Tableau 4

Effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique
de feuilles d'érable à sucre enduites de silicone.

$\frac{Q_{m+a} - Q_m}{Q_{m+a}} \times 100$			
Dans l'air sans silicone	Dans l'air avec silicone	Dans le CO ₂ sans silicone	Dans le CO ₂ avec silicone
25	25	-5	17

(Zelitch, 1974). La figure 23 compare les résultats obtenus sur des feuilles traitées à l'acide glycidique ou mises à tremper dans l'eau distillée.

Nous avons étendu nos mesures à nos plants expérimentaux afin de vérifier la présence de la photorespiration (Tableau 5).

Nous constatons que chez les trois plantes en C₃, l'acide glycidique produit plusieurs résultats: soit le passage d'un effet positif à un effet négatif dans le cas des arbres (érable à sucre et pin), soit une augmentation de l'effet négatif chez le haricot. L'acide glycidique, en inhibant la photorespiration, produit une augmentation de l'activité photosynthétique. Ceci se traduit par un plus grand dégagement d'oxygène et une diminution de l'emmagasinage d'énergie. Quant au maïs, une plante en C₄, il n'est pas affecté par l'acide glycidique, ce qui correspond au schème général selon lequel ce type de plantes ne possède qu'une très faible activité photorespiratoire (Canvin, 1982).

A la lumière de ces résultats, l'impatiens semble être une plante en C₄. Son activité photosynthétique est très élevée et n'est saturée qu'à de hautes intensités lumineuses. De plus, elle ne semble pas affectée par l'acide glycidique, comme le maïs. Toutes ces données sont caractéristiques des plantes du type physiologique C₄ (Black, 1973). Des mesures en vue de déterminer son appartenance à un type physiologique nous permettraient de juger de la pertinence de la méthodologie

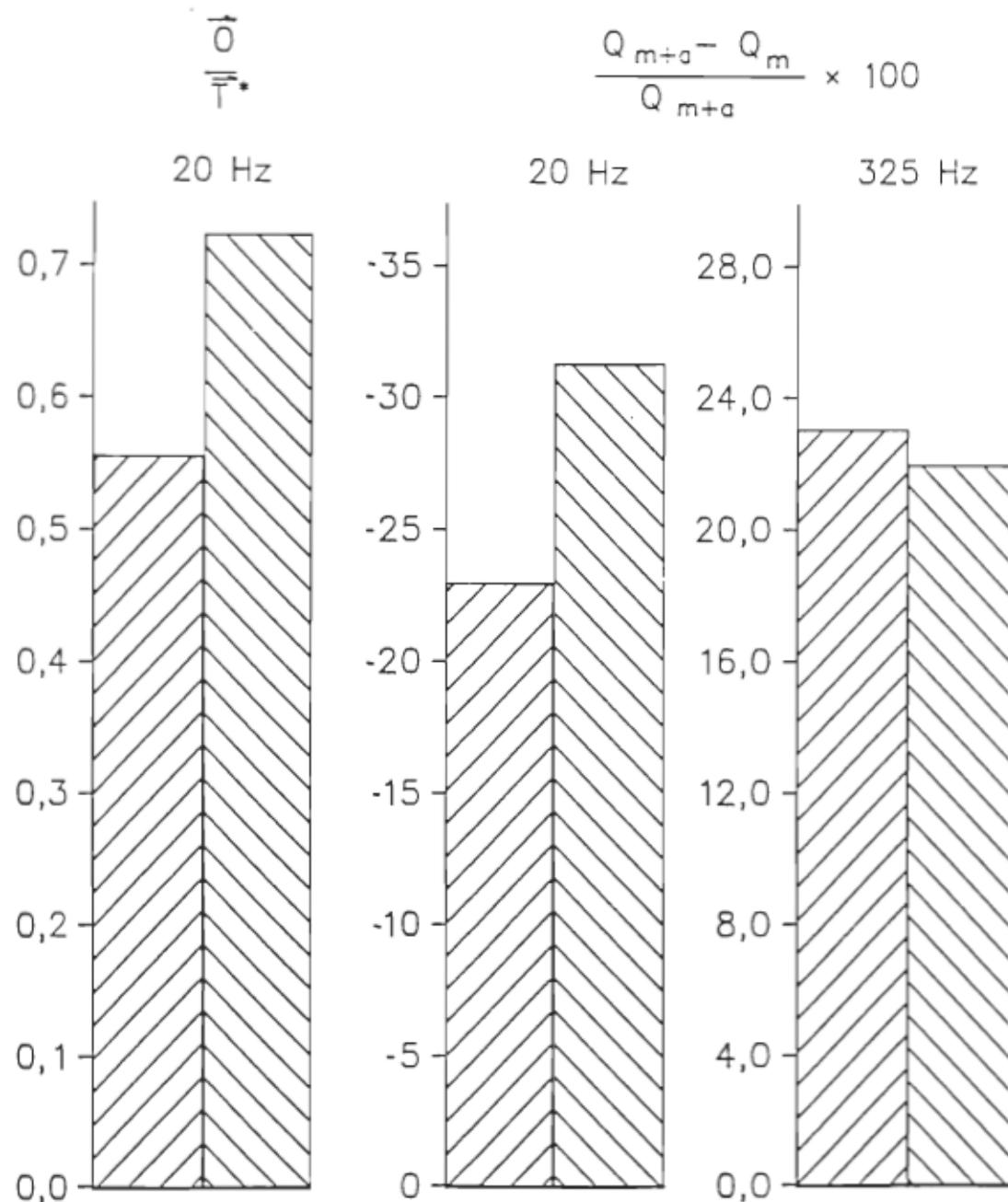


Figure 23: Effet de l'acide glycidique sur les paramètres photo-acoustiques de mesure de l'activité photosynthétique de feuilles d'éryable à sucre. $f_{mod} = 20$ Hz; $I_{mod} = 7 \text{ W m}^{-2}$ et $I_{act} = 220 \text{ W m}^{-2}$. \blacksquare à l'air libre, \blacksquare dans une solution d'acide glycidique.

Tableau 5

Effet du faisceau actinique sur la variation du signal
photoacoustique de feuilles traitées à l'acide glycidique

Plante	$\frac{Q_{m+a} - Q_m}{Q_{m+a}} \times 100$	
	Dans l'eau	Dans l'acide glycidique
Érable à sucre	19	-12
Haricot	-12	-21
<u>Impatiens</u>	-39	-39
Maïs	-57	-57
Pin	10	- 5

photoacoustique dans ce domaine. La facilité de la prise de mesures et d'interprétation se révéleraient des avantages indéniables comparativement aux méthodes d'analyse par marquage radioactif ou d'analyse spectroscopie des échanges de CO₂ (Zelitch, 1976).

Toutes ces données convergent vers une même conclusion: la photorespiration serait à l'origine de l'indépendance de l'effet du faisceau actinique sur les feuilles d'érable à sucre selon la fréquence de modulation. La photorespiration diminue la composante de dégagement d'oxygène et augmente celle d'emmagasinage d'énergie photosynthétique. La conjugaison de ces deux résultats est à l'origine de l'effet positif observé à des fréquences de modulation inférieures à 200 Hz chez l'érable à sucre.

La possibilité de détecter la photorespiration par la méthodologie photoacoustique ouvre des voies d'étude fort intéressantes. L'analyse des interactions bioénergétiques entre la photosynthèse et la photorespiration sera ainsi permise. Ceci nous permettra de mieux saisir les modes de régulation entre ces deux phénomènes. La facilité et la rapidité d'utilisation de la méthodologie photoacoustique sont deux avantages indéniables vis-à-vis les autres techniques.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons utilisé la spectroscopie photoacoustique afin d'obtenir des données morphologiques et physiologiques sur des feuilles. L'emploi de la spectroscopie photoacoustique se révèle fort avantageux pour l'étude des propriétés spectroscopiques de matériaux biologiques. Souvent, les méthodes conventionnelles ne permettent pas l'étude de tels matériaux, les limitations provenant de l'opacité de l'échantillon, des phénomènes de diffusion lumineuse, de l'hétérogénéité de la surface, etc. La technique photoacoustique constitue donc une méthode d'investigation privilégiée des propriétés optiques et thermiques des systèmes in vivo. De plus, dans le cas de feuilles intactes, des informations peuvent être obtenues sur l'emmagasinage d'énergie photosynthétique et du dégagement d'oxygène, deux indicateurs de l'état de santé de la feuille.

Dans un premier temps, nous avons dressé des cartes chromophoriques des feuilles par la technique de profil de profondeur. Ceci nous a permis d'établir la présence et de localiser les différents pigments foliaires. Dans le cadre d'études ultérieures sur les effets des polluants sur la flore, il nous apparaît important de corrélérer ces résultats avec ceux obtenus à l'aide des techniques microscopiques usuelles afin de bien situer les différentes assises cellulaires.

Par la suite, nous avons mesuré l'activité photosynthétique de différentes plantes par le biais de l'emmagasinage d'énergie photosynthétique et du dégagement d'oxygène. Nous avons pu vérifier les effets du temps, de la fréquence de modulation et de l'intensité des faisceaux actinique et modulé sur le signal photoacoustique. Ceci nous a permis de déterminer nos paramètres de mesure. Plus particulièrement, nous avons observé une indépendance de la fréquence de modulation sur l'effet du faisceau actinique dans le cas de l'érable à sucre.

Ce nouveau phénomène, rapporté pour la première fois, a été relié à la photorespiration, un mécanisme régulateur de la photosynthèse. L'utilisation de mélanges gazeux affectant l'une ou l'autre de ces voies métaboliques, ainsi que l'emploi d'un inhibiteur de la photorespiration nous ont permis d'exprimer cette hypothèse.

En ce qui a trait à la détermination de l'activité photosynthétique de plantes soumises à des stress environnementaux (pluies acides, polluants gazeux) par la spectroscopie photoacoustique, nous nous permettons quelques remarques. Une des étapes cruciales dans le calcul de l'activité photosynthétique (\hat{O}/\hat{T}^*) consiste en la détermination de l'emmagasinage d'énergie photosynthétique. Comme celle-ci se déroule à des fréquences de modulation supérieures à 350 Hz, le rapport signal/bruit est faible, ce qui entraîne une erreur sur la mesure. Une seconde méthode, telle l'effet Mirage, permettrait de mieux définir l'emmagasinage d'énergie photosynthétique, et ce, à des fréquences de modulation inférieures à

100 Hz. De plus, nous avons présenté dans ce travail, des valeurs d'activité photosynthétique calculées à une fréquence de modulation donnée. Il serait préférable, dans le cadre d'études basées sur des comparaisons entre différents sujets, d'utiliser plusieurs fréquences de modulation afin de déterminer le rapport \bar{O}/\bar{T}^* à une fréquence de modulation de 0 Hz. Ceci correspond en quelque sorte à un rendement quantique puisque l'on divise une activité photochimique (le dégagement d'oxygène) par une valeur (T^*) reliée à la quantité de lumière absorbée. De plus, il est possible à partir de ces données de vérifier la capacité de diffusion de l'oxygène à travers les tissus. Finalement, des mesures de l'effet Emerson sur des échantillons nous permettraient de cerner le ou les sites d'action des stress.

La spectroscopie photoacoustique demeure un outil important qui permet d'élargir la puissance des analyses spectroscopiques. Avec l'adjonction d'autres techniques d'investigation physiologiques (fluorescence, transmittance...) elle devient utile dans une recherche de la compréhension des processus de base régissant la photosynthèse.

CHAPITRE VI

BIBLIOGRAPHIE

Adams, M.J. et G.F. Kirkbright. Analytical optoacoustic spectroscopy III. The optoacoustic effect and thermal diffusivity. *Analyst*, 1977, 102, 281-292.

Alberts, G., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et J.D. Watson. Molecular biology of the cell. New York: Garland Publishing Inc., 1983.

Anjo, D.M. et T.A. Moore. A photoacoustic depth-profile of β -carotene in skin. *Photochem. Photobiol.*, 1984, 39, 635-640.

Bell, A.G. Upon the production of sound by radiant energy. *Am. J. Sci.*, 1880, 20, 305-311.

Bernier, G. et M. Brazeau. Maple decline in Quebec: role of atmospheric pollution. Dans Maple decline, maple producers information session (Québec, 8 mai 1986), pp. 97-109. Conseil des productions végétales du Québec, AGDEX 300/637.

Bidwell, R.G.S. Photosynthesis dans Plant Physiology (2nd ed). New York: MacMillan Publishing Co., Inc., 1979, pp. 146-191.

Black, C.C. Jr. Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO₂ uptake. Ann. Rev. Plant. Physiol., 1973, 24, 253-286.

Boucher, F., R.M. Leblanc, S. Savage et B. Beaulieu. Depth-resolved chromophore analysis of bovine retina and pigment epithelium by photo-acoustic spectroscopy. Appl. Opt., 1986, 25, 515-523.

Braslavsky, S.E. Photoacoustic and photothermal methods applied to the study of radiationless deactivation processes in biological systems and in substances of biological interest. Photochem. Photobiol., 1986, 43, 667-675.

Braslavsky, S.E., R.M. Ellul, R.G. Weiss, H. Al-Erabi et K. Schaffner. Phytochrome models 7. Photoprocesses in biliverdin dimethyl ester in ethanol studied by laser-induced opto-acoustic spectroscopy. Tetrahedron, 1983, 39, 1909-1913.

Bults, G., B.A., Horwitz, S. Malkin et D. Cahen. Frequency-dependent photoacoustic signals from leaves and their relation to photosynthesis. FEBS Lett., 1981, 129, 44-46.

Bults, G., B.A. Horwitz, S. Malkin et D. Cahen. Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in whole leaves. Photochemistry and gas exchange. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 679, 452-465.

Buschmann, C. et H. Prehn. In vivo studies of radiative and non-radiative de-excitation processes of pigments in Raphanus seedlings by photoacoustic spectroscopy. *Photobiochem. Photobiophys.*, 1981, 2, 209-215.

Buschmann, C. et H. Prehn. In vivo photoacoustic spectra of Raphanus and Tradescantia leaves taken at different chopping frequencies of the excitation light. *Photobiochem. Photobiophys.*, 1983, 5, 63-69.

Canaani, O. The effect of chloroplast pH on the distribution of excitation energy between PSI and II suggests the involvement of two kinases in state 1- state 2 transitions. *FEBS Lett.*, 1985b, 188, 281-285.

Canaani, O., D. Cahen et S. Malkin. Photosynthetic chromatic transitions and Emerson enhancement effects in intact leaves studies by photoacoustics. *FEBS Lett.*, 1982b, 150, 142-145.

Canaani, O. et S. Malkin. Physiological adaptation to a newly observed low light intensity state in intact leaves, resulting in extreme imbalance in excitation energy distribution between the two photosystems. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984a, 766, 525-532.

Canaani, O., J. Barber et S. Malkin. Evidence that phosphorylation and dephosphorylation regulate the distribution of excitation energy between the two photosystems of photosynthesis *in vivo*: Photoacoustic and fluorimetric study of an intact leaf. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984b, 81, 1614-1618.

Canaani, O., Z. Motzan et S. Malkin. Comparison of photosynthetic parameters of an aurea mutant (Su/su) of tobacco and the wild type by the photoacoustic method. Planta, 1985a, 164, 480-486.

Canvin, D.T. Photorespiration: Comparison between C₃ and C₄ plants dans (M. Gibbs et E. Latzko, eds) Encyclopedia of Plant Physiology, V6, New York: Springer-Verlag, 1982, 368-396.

Caporn, S.M. et T.C. Hutchinson. The contrasting response to simulated acid rain of leaves and cotyledons of cabbage. New Phytol., 1986, 103, 311-324.

Carpentier, R. Organisation et rendement photosynthétique de pigments thylacoïdiens. Thèse de doctorat. Université Laval, 1983. 154 pages.

Carpentier, R., B. LaRue et R.M. Leblanc. Photoacoustic spectroscopy of Anacystis nidulans. I. Effect of the sample thickness on the photoacoustic signal. Arch. Biochem. Biophys., 1983a, 222, 403-410.

Carpentier, R., B. LaRue et R.M. Leblanc. Photoacoustic spectroscopy of Anacystis nidulans. II. Characterization of pigment holochroms and thermal deactivation spectrum. Arch. Biochem. Biophys., 1983b, 222, 411-415.

Carpentier, R., B. LaRue et R.M. Leblanc. Photoacoustic spectroscopy of Anacystis nidulans. III. Detection of photosynthetic activities. Arch. Biochem. Biophys., 1984, 228, 534-543.

Carpentier, R., H.C.P. Matthijs, R.M. Leblanc et G. Hind. Monitoring energy conversions in photosystem I of cyanobacterial heterocysts by photoacoustic spectroscopy. Can. J. Phys., 1986, 64, 1136-1138.

Carpentier, R., R.M. Leblanc et M. Mimeault. Photoinhibition and chlorophyll photobleaching in immobilized thylakoid membranes. Enzyme Microbiol. Technol., 1987, 9, 489-493.

Clayton, R.D. Photosynthesis: Physical mechanisms and chemical patterns. New York: Cambridge University Press, 1980, 281 pages.

Creed, D. The photophysics and photochemistry of the near-UV absorbing amino acids-I. Tryptophane and its simple derivatives. Photochem. Photophys., 1984a, 39, 537-562.

Creed, D. The photophysics and photochemistry of the near-UV absorbing amino acids-II. Tyrosine and its simple derivatives. Photochem. Photophys., 1984b, 39, 563-575.

Demeter, S., P.J. Neale et A. Melis. Photoinhibition: impairment of the primary charge separation between P-680 and pheophytin in photosystem II of chloroplasts. FEBS Lett., 1987, 214, 370-374.

Désormeaux, A. Mémoire de maîtrise. Université du Québec à Trois-Rivières, 1986.

Désormeaux, A. et R.M. Leblanc. Electronic and photoacoustic spectroscopies of chlorophyll a in monolayer and multilayer arrays. Thin Solid Films, 1985 132, 91-99.

Dessureault, M. Le déprérissement des arbres: nature, causes et mécanismes. Phytoprotection, 1985, 66, 71-81.

Ducharme, D. Mise au point d'un spectromètre photoacoustique à simple faisceau. Mémoire de maîtrise. Université Laval, 1979, 89 pages.

Ducharme, D., A. Tessier et R.M. Leblanc. Design and characteristics of a cell for photoacoustic spectroscopy of condensed matter. Rev. Sci. Instrum., 1979, 50, 1461-1462.

Ellis, R.J. The most abundant protein in the world. Trends Biochem. Sci., 1979, 4, 241-244.

Fock, H., K. Klug et D.T. Canvin. Effect of carbon dioxide and temperature on photosynthetic CO₂ uptake and photorespiratory CO₂ evolution in sunflower leaves. Planta, 1979, 145, 219-223.

Frackowiak, D., S. Hotchandani et R.M. Leblanc. Photoacoustic spectra of phycobiliproteins and chlorophyllin in isotropic and anisotropic polyvinyl alcohol films. Photochem. Photobiol., 1985a, 42, 559-565.

Frackowiak, D., S. Hotchandani, G. Bialek-Bylka et R.M. Leblanc. Polarized photoacoustic spectra of phycoerythrin and phycocyanin in anisotropic polymer films. Photochem. Photobiol., 1985b, 42, 567-572.

Frackowiak, D., L. Lorrain, D. Wrobel et R.M. Leblanc. Polarized photoacoustic, absorption and fluorescence spectra of chloroplasts and thylakoids oriented in polyvinyl alcohol films. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1985c, 126, 254-261.

Fragata, M., R. Popovic, E.L. Camm et R.M. Leblanc. Pheophytin-mediated energy storage of photosystem II particles detected by photoacoustic spectroscopy. Photosynth. Res., 1987, 14, 71-80.

Giese, K., A. Nicolaus, B. Sennhenn et K. Kölmel. Photoacoustic in vivo study of the penetration of sunscreen into human skin. Can. J. Phys., 1986, 64, 1139-1141.

Gorelik, G. Method for studying the time of energy exchange between the various degrees of freedom of gaseous molecules. Dokl. Akad. Nauk. S.S.R., 1946, 54, 779-783.

Goulet, D. Spectroscopie photoacoustique de différents types d'hémoglobine et quelques applications médicales. Mémoire de maîtrise. Université du Québec à Trois-Rivières, 1983, 154 pages.

Harshbarger, W.R. et M.G. Robin. The opto-acoustic effect: Revival of an old technique for molecular spectroscopy. Acc. Chem. Res., 1973, 6, 329-334.

Havaux, M., O. Canaani et S. Malkin. Photosynthetic responses of leaves to water stress, expressed by photoacoustic and related methods. I. Probing the photoacoustic method as an indicator of water stress in vivo. Plant Physiol., 1986a, 82, 827-833.

Havaux, M., O. Canaani et S. Malkin. Photosynthetic responses of leaves to water stress, expressed by photoacoustic and related methods. II. The effect of rapid drought on the electron transport and the relative activities of the two photosystems. Plant Physiol., 1986b, 82, 834-839.

- Havaux, M., O. Canaani et S. Malkin. Rapid screening for heat tolerance in Phaseolus species using the photoacoustic technique. Plant Sci., 1987, 48, 143-149.
- Hesketh, J.D. Limitations to photosynthesis responsible for differences among species. Crop Sci., 1963, 3, 493-496.
- Hesketh, J.D. et D.N. Moss. Variation in the response of photosynthesis to light. Crop Sci., 1963, 3, 107-110.
- Husic, D.W., H.D. Husic et N.E. Tolbert. The oxidative photosynthetic carbon cycle or C₂ cycle. CRC Crit. Rev. Plant. Sci., 1987, 5, 45-100.
- Inagaki, T., A. Ito, K. Hieda et T. Ito. Photoacoustic spectra of some biological molecules between 300 and 130 nm. Photochem. Photobiol., 1986, 44, 303-306.
- Jabben, M., K. Heihoff, S.E. Braslavsky et K. Schaffner. Studies on phytochrome photoconversions in vitro with laser-induced opto-acoustic spectroscopy. Photochem. Photobiol., 1984, 40, 361-367.
- Jabben, M. et K. Schaffner. Pulsed-laser-opto-acoustic spectroscopy of intact leaves. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 809, 445-451.
- Kanstad, S.O., D. Cahen et S. Malkin. Simultaneous detection of photosynthetic energy storage and oxygen evolution in leaves by photothermal radiometry and photoacoustics. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 722, 182-189.
- Krause, G.H. et E. Weis. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology II. Interpretation of fluorescence signals. Photosynth. Res., 1984, 5, 139-157.

LaRue, B., R.M. Leblanc et A. Désormeaux. The origin of the photacoustic effect in leaves of Impatiens petersiana. Dans Proc. 4th Int. Meet. photoacoustic, photothermal and related methods, 1985, Ville d'Estérel, ThA.8.

Lehninger, A.L. Biochimie (2^e éd.). Paris: Flammarion, 1981.

Luft, K.F. Z. Tech. Phys., 1943, 24, 97-105.

Luscher, E. Photoacoustic effect in condensed matter: Historical development. Dans E. Luscher, P. Korpiun, H.J. Coufal et R. Tilgner (Eds). Photoacoustic effect. Principles and applications. Wiesbaden: Friedr. Vieweg and Sohn, 1981, 1-18.

Mackenthun, M.L., R.D. Tom et T.A. Moore. Lobster shell carotenoproteins organization in situ studied by photoacoustic spectroscopy. Nature, 1979, 279, 265-266.

Malkin, S. et D. Cahen. Dependance of photoacoustic signal on optical absorption coefficient in optically dense liquids. Anal. Chem., 1981, 53, 1426-1432.

Mauzerall, D., O. Canaani et S. Malkin. Observation of the cyclical states of oxygen formation in intact leaves by pulsed photoacoustics. Biophys. J., 1988, 53, 268a.

Mercadier, M.E. C.R. Hebd. Séan. Acad. Sci., 1881, 92, 409-417.

Nagel, E.M., C. Buschmann et H.K. Lichtenthaler. Photoacoustic spectra of needles as an indicator of the activity of the photosynthetic apparatus of healthy and damaged conifers. Physiol. Plant., 1987, 70, 427-437.

Nery, J.W., O. Pessoa Jr, H. Vargas, F.A.M. Reis, A.C. Gabrielli, A.C.M. Miranda et C.A. Vinha. Photoacoustic spectroscopy for depth-profile analysis and herbicide monitoring in leaves. Analysis, 1987, 112, 1487-1490.

O'Hara, E.P., R.D. Tom et T.A. Moore. Determination of the in vivo absorption and photosynthetic properties of the lichen Acarospora schleicheri using photoacoustic spectroscopy. Photochem. Photobiol., 1983, 38, 709-715.

Osmond, C.B. Photorespiration and photoinhibition. Some implications for the energetics of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 639, 77-98.

Pearcy, K.E. et E.A. Baker. Effects of simulated acid rain on production, morphology and composition of epicuticular wax and on cuticular membrane development. New Phytol., 1987, 107, 577-589.

Pessoa, Jr O., C.L. Cesar, C.A.S. Lima, H. Vargas et L.C.M. Miranda. Phase-resolved photoacoustic microscopy: application to biological layered samples. Proc. 4th Int. Top Meet. Photoacoustic, photothermal and related sciences, 1985, Ville d'Estérel, Québec, Ec. Polytech. Mtl. Th.A5.

Pfund, A.H. Discussion - Atmospheric contamination. Science, 1939, 90, 326-333.

Popovic, R., M. Beauregard et R.M. Leblanc. Photosynthetic action spectra of the energy storage in bundle sheath cells of Zea mays. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987a, 144, 198-202.

Popovic, R., M. Beauregard et R.M. Leblanc. Study of energy-storage processes in bundle sheath cells of Zea mays. Plant Physiol., 1987b, 84, 1437-1441.

Poulet, P., O. Canaani et S. Malkin. Photoacoustic detection of photosynthetic oxygen evolution from leaves. Quantitative analysis by phase and amplitude measurements. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 724, 433-446.

Preece, W.H. On the conversion of radiant energy into sonorous vibrations. Proc. R. Soc. London, 1881, 31, 505-520.

Rayleigh, (Lord). The photophone. Nature (Lond.), 1881, 23, 274-279.

Roentgen, W.C. Philos. Mag., 1881, 11, 308-315.

Ronen, R., O. Canaani, J. Garty, D. Cahen, S. Malkin et M. Galun. Photosynthetic parameters in Ramalina duriaeae, in vivo, studied by photoacoustics. Dans Lichen physiology and cell biology (D.H. Brown, éd.). New York: Plenum Publishing Co., 1985, 9-21.

Rosencwaig, A. et A. Gersho. Theory of the photoacoustic effect with solids. J. Appl. Phys., 1976, 47, 64-69.

Rosencwaig, A. Photoacoustics and photoacoustic spectroscopy. New York: John Wiley and Sons, 1980.

Salisbury, F.B. et C.W. Ross. Plant physiology (2^e éd.). Belmont: Wadsworth Publishing Company, Inc., 1978.

Satoh, K. et D.C. Fork. Chlorophyll fluorescence transients as indicators of changes in the redox state of plastoquinone in intact Bryopsis chloroplasts. Plant Sci. Lett., 1983, 29, 133-144.

Sheeler, P. et D.E. Bianchi. The chloroplast dans Cell and molecular biology. Toronto: John Wiley and Sons, Inc., 1987, 417-443.

Somerville, C.R. et S. Somerville. Les photosynthèses des plantes. La Recherche, 1984, 15, 490-501.

Staehelin, W. et C. Arntzen. Regulation of chloroplast membrane function: Protein phosphorylation changes the spatial organization of membrane components. *J. Cell Biol.*, 1983, 97, 1327-1337.

Ting, I.P. Plant Physiology. Don Mills: Addison Wesley, 1982.

Thomasset, B., T. Thomasset, A. Vejux, J. Jeanfils, J.N. Barbotin et D. Thomas. Immobilized thylakoids in a cross-linked albumin matrix. Effects of cations studied by electron microscopy, fluorescence emission, photoacoustic spectroscopy and kinetic measurements. *Plant Physiol.*, 1982, 70, 714-722.

Touloukian, Y.S. Thermal diffusivity (thermophysical properties of matter) (no 10). New York: IFI/Plenum, 1973.

Tyndall, J. Action of an intermittent beam of radiant heat upon gaseous matter. *Proc. R. Soc. London*, 1881, 31, 307-311.

Upadhyaya, V., L.B. Tiwari et S.P. Mishra. A study of the fluorescence quenching of chlorophyll by photoacoustic spectrometry. *Spectrochim. Acta*, 1985, 41A, 833-836.

Upadhyaya, V. Photoacoustic study of charge transfer interactions. Proc. 4th Int. Meet. photoacoustics, photothermal and related sciences, 1985, Ville d'Estérel, Québec. École Polytechnique: Montréal, Th.B3.

Viengerov, M.L. Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 1938, 19, 687-694.

Windrem, K. et D. Plechy. The diffusion solubility of oxygen in lipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 600, 655-665.

Yakir, D., J. Rudish et B.A. Bravdo. Photoacoustic and fluorescence measurements of the chilling response and their relationship to carbon dioxide uptake in tomato plants. Planta, 1985, 164, 345-353.

Yakir, D., J. Rudish, B.A. Bravdo et S. Malkin. Prolonged chilling under moderate light: effect on photosynthetic activity measured with the photoacoustic method. Plant Cell Environ., 1986, 9, 581-588.

Zelitch, I. The effect of glycinate, an inhibitor of glycolate synthesis, on photorespiration and net photosynthesis. Arch. Biochem. Biophys., 1974, 163, 367-377.

Zelitch, I. Photorespiration: Studies with whole tissues (Trebst, A. et M. Avron, Eds.), Encyclopedia of plant physiology, Vol. 5. New York: Springer-Verlag, 1976, 353-396.