

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE POUR L'OBTENTION

DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR

PASCAL MEUNIER

BACCALAUREAT ES SCIENCES (PHYSIQUE, UNIVERSITE LAVAL)

LE MECANISME DU DEGAGEMENT D'OXYGENE PAR LA PHOTOSYNTHESE.

NOVEMBRE 1990

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

## RESUME

Le but de la recherche présentée est d'éclaircir quelques-uns des principaux problèmes actuels dans la compréhension du mécanisme du dégagement d'oxygène sous éclairs. Afin de pouvoir différentier les meilleurs modèles du dégagement d'oxygène, j'ai développé un nouveau système qui permet de nouvelles approches expérimentales grâce à sa flexibilité, et qui augmente la précision et la fiabilité des mesures. Ce faisant, j'ai clarifié la méthodologie de la mesure du dégagement d'oxygène, et établi des critères de fonctionnement fiables. Ces critères m'ont permis de constater que la controverse d'importance fondamentale au sujet du temps du dégagement d'oxygène a été produite par de mauvaises pratiques expérimentales.

Au niveau du mécanisme de dégagement d'oxygène lui-même, les résultats obtenus indiquent de façon claire que les modèles ne peuvent s'accorder avec une grande précision aux résultats. J'ai démontré que cette limitation est causée par la variation dans le temps des propriétés de ce mécanisme, alors que les modèles considèrent ces propriétés comme constantes. L'étude de ces variations a mis en évidence la grande dépendance des ratés envers l'état rédox de la plastoquinone. Ceci est une découverte importante, car on pensait auparavant que les propriétés du dégagement d'oxygène ne dépendaient que du côté oxidant du photosystème II. Comme

l'état rédox de la plastoquinone varie constamment dans le temps, il s'ensuit que la quantité de ratés varie aussi.

J'ai ensuite réussi à expliquer la variation des ratés selon un modèle de désactivation des états-S. La plastoquinone réduite peut réduire l'accepteur Qa, ce qui ferme les centres réactionnels à la photochimie et augmente les ratés de façon homogène. Elle cause en plus des désactivations des états-S, qui apparaissent comme des ratés.

La façon dont les désactivations contribuent aux ratés a été caractérisée par une nouvelle approche expérimentale de l'état stationnaire du dégagement d'oxygène. J'ai montré qu'en connaissant la distribution des CDO dans les états-S à l'état stationnaire, on peut connaître la distribution des ratés. Ainsi, la distribution des ratés due aux désactivations a montré que les désactivations de l'état  $S_0$  à  $S_2$  sont les plus importantes, suivies des désactivations jusqu'à l'état  $S_1$ . Ceci indique que les ratés à basse fréquence d'éclairs ne se produisent pas principalement sur un seul état-S (modèle de Delrieu), mais sur deux. De plus, parce que toutes les données peuvent être expliquées sans le transporteur "C" (modèle de Lavorel), j'ai conclu que ce transporteur est inexistant. J'ai donc résolu le problème de la nature des ratés, à savoir si les charges étaient perdues lors d'un raté, ou si les ratés représentaient simplement la redistribution au hasard des charges par un "transporteur de

charges C" (modèle conservatif). La nature des ratés est non-conservatrice.

En conclusion, le mécanisme de production d'oxygène a un comportement très variable, qui dépend de façon cruciale de la chaîne de transport d'électrons.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Radovan Popovic, de sa compréhension, de sa patience et de son support. J'ai grandement apprécié les nombreuses occasions qu'il m'a données pendant ces quatres années d'en apprendre plus qu'il n'était obligé de m'en enseigner. Merci aussi à mes collègues pour leur amitié et les échanges qu'ils ont permis: Marc Beauregard, Guy Samson, Jean-Claude Morissette, Jean Pascal, Luc Morin, Alexandre Cvetovic, Guy Arsenault, Sonya Grenier et Michel Grandbois. Je suis reconnaissant pour l'aide bibliothécaire professionnelle de Frances Christman (licenciée en bibliothéconomie de Concordia, et étudiante à la maîtrise en bibliothéconomie à l'université de Montréal) pour la vérification des références de cette thèse. Je me dois aussi de remercier le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie pour son support financier tout au long de mes études graduées et sous-graduées.

## TABLE DES MATIERES

RESUME. . . . .	ii
REMERCIEMENTS. . . . .	v
TABLE DES MATIERES. . . . .	vi
LISTE DES FIGURES. . . . .	ix
LISTE DES ABBREVIATIONS. . . . .	xiii
CHAPITRE 1: <u>INTRODUCTION</u> . . . . .	1
1.1. La photosynthèse. . . . .	1
1.1.1. Le chloroplaste: fonction et organisation. . . . .	2
1.1.2. Les réactions lumineuses. . . . .	6
1.1.2.1. La capture de la lumière. . . . .	7
1.1.2.2. La séparation de charges. . . . .	12
1.1.2.3. Le transport d'électrons linéaire. . . . .	13
1.1.2.4. La photophosphorylation. . . . .	15
1.1.2.5. Le transport cyclique et pseudo-cyclique. . . . .	19
1.1.2.6. Régulation:les transitions d'état. . . . .	20
1.1.3. Les réactions à l'obscurité. . . . .	22
1.1.3.1. La fixation du CO <sub>2</sub> . . . . .	22
1.1.3.2. La chlororespiration. . . . .	25
1.2. La composition du photosystème II. . . . .	27
1.2.1. L'environnement membranaire. . . . .	27
1.2.2. Les antennes du PSII. . . . .	28
1.2.3. Le centre réactionnel. . . . .	29
1.2.4. Le cytochrome b-559. . . . .	30

1.2.5. Les protéines régulatrices du dégagement d'oxygène. . . . .	32
1.3. Le mécanisme du dégagement d'oxygène. . . . .	34
1.3.1. Le temps requis pour le dégagement d' $O_2$ . . . . .	34
1.3.2. Les états-S du modèle de Kok. . . . .	37
1.3.3. Les états-S négatifs. . . . .	41
1.3.4. Le modèle de Delrieu. . . . .	42
1.3.5. Le modèle de Lavorel. . . . .	43
1.3.6. Représentation matricielle du dégagement d' $O_2$ . .	43
1.3.7. L'équation de récurrence du dégagement d' $O_2$ . .	46
1.3.8. Les désactivations des états-S. . . . .	48
1.3.8.1. Recombinaisons de charges. . . . .	48
1.3.8.2. Les agents ADRY. . . . .	49
1.4. Objectifs de la recherche présentée. . . . .	50
CHAPITRE 2: MATERIELS ET METHODES. . . . .	53
2.1. Choix des algues <i>Dunaliella tertiolecta</i> . . . . .	53
2.2. La mesure de la production d'oxygène. . . . .	54
2.2.1. Les électrodes. . . . .	55
2.2.2. Etude des conditions optimales de mesure. . . .	58
2.2.3. Développement du polarographe. . . . .	67
2.3. La mesure de la fluorescence. . . . .	81
CHAPITRE 3: RESULTATS ET INTERPRETATIONS. . . . .	83
3.1. Le temps de production de l'oxygène. . . . .	83
3.2. Etude des modèles de dégagement d'oxygène. . . . .	96

3.3. La dépendance des ratés envers l'état redox de la plastoquinone. . . . .	106
3.4. Détermination des probabilités de ratés dus aux désactivations pour chaque état-S. . . . .	124
CHAPITRE 4: CONCLUSIONS. . . . .	139
ANNEXE 1: Acquisition en continu par le programme "GRAPHITI". . . . .	144
ANNEXE 2: Acquisition aux temps sélectionnés, par le programme Menu02. . . . .	178
ANNEXE 3: Modèle de l'électrode de platine. . . . .	236
ANNEXE 4: Ajustement de courbe par le programme Reffit3. .	242
REFERENCES. . . . .	253

## LISTE DES FIGURES

Figure 2.2.2.1. Amplitudes normalisées du courant après un éclair en fonction du temps, résultant de la réduction de l'oxygène produit par l'algue <u>D. tertiolecta</u> . . . . .	59
Figure 2.2.2.2. Séquence de production d'oxygène sous éclairs par des algues <u>D. tertiolecta</u> laissées à l'obscurité pendant 120 s. . . . .	63
Figure 2.2.2.3. Amplitudes normalisées de production d'oxygène par l'algue <u>D. tertiolecta</u> en fonction du numéro de l'éclair. . . . .	66
Figure 2.2.3.1. Circuit de la lampe à éclairs. . . . .	69
Figure 2.2.3.2. Schéma de l'électrode construite pour mesurer le dégagement d'oxygène sous éclairs. . . . .	71
Figure 2.2.3.3. Schéma complet du circuit de polarisation .	73
Figure 2.2.3.4. Courant détecté en fonction du temps. L'oxygène est produit par un échantillon de <u>D. tertiolecta</u> , placé sur l'électrode à une concentration de 80 fg Chl/ml.	76
Figure 2.2.3.5. Agrandissement du signal après le troisième éclair de la Fig.2.2.3.4. . . . .	80
Figure 3.1.1. Réponse des électrodes à un éclair, mesuré en A avec une électrode fraîchement polie et en B avec une électrode salie volontairement. . . . .	85
Figure 3.1.2. Mesure de la production d'oxygène avec des électrodes malpropres, à une fréquence d'éclairs de 5 Hz. .	87
Figure 3.1.3. Réponse d'électrodes fraîchement polies à la production d'oxygène au troisième éclair, pour des polarisations de 400, 500, 600 et 700 mV. . . . .	88

Figure 3.1.4. Polarogramme, montrant le logarithme naturel du courant maximum de détection en fonction du voltage de polarisation (pour des électrodes polies). . . . .	90
Figure 3.1.5. Courbes expérimentale et théorique de la réponse de l'électrode à la production d'oxygène sous éclairs. . . . .	94
Figure 3.2.1. Production d'oxygène en fonction du numéro de l'éclair, pour un échantillon d'algues <u>D. tertiolecta</u> , normalisée relativement au troisième éclair. . . . .	97
Figure 3.2.2. Probabilités de transition des états-S, mesurées en utilisant des groupes de neuf éclairs consécutifs, indiquées en fonction du premier éclair dans le groupe. . . . .	103
Figure 3.3.1. Courbes d'induction de fluorescence mesurées après N éclairs. . . . .	108
Figure 3.3.2. La probabilité moyenne de ratés (en pourcentage) en fonction du retard du niveau D. . . . .	110
Figure 3.3.3. La probabilité moyenne de ratés (en pourcentage) en fonction de l'intervalle entre les éclairs. . . .	111
Figure 3.3.4. Courbes d'induction de fluorescence mesurées après 20 éclairs donnés à la fréquence indiquée. . . . .	113
Figure 3.3.5. Le retard du niveau D, mesuré en Fig.3.3.4, en fonction de l'intervalle entre les éclairs. . . . .	114
Figure 3.3.6. Courbe d'induction de fluorescence de <u>D. tertiolecta</u> incubé pendant 5 min avec 0.25 mM de benzoquinone. . . . .	119

Figure 3.3.7. Production d'oxygène en fonction du numéro de l'éclair, à une fréquence de 0.5 Hz (triangles), et avec 0.25 mM benzoquinone (cercles) . . . . .	120
Figure 3.4.1. Oscillation de la production d'oxygène d'algues adaptées au noir, en fonction du numéro de l'éclair (fréquence de 5Hz) . . . . .	130
Figure 3.4.2. Oscillation du dégagement d'oxygène en fonction du numéro de l'éclair, qui résulte d'un changement de fréquence, de 0.2 Hz (carrés noirs) et de 0.5 Hz (triangles blancs) à 5 Hz. . . . .	132
Figure 3.4.3. Pourcentage de CDOs dans chaque état-S, en fonction de l'intervalle entre les éclairs. . . . .	133
Figure 3.4.4. Probabilité de ratés (en pourcentage) en fonction de l'intervalle entre les éclairs, calculée à partir de la Fig. 3.4.3. . . . .	135
Figure A3.1. Schéma représentant le système de mesure. .	237

## LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique  
ADP: Adénosine diphosphate  
ADRY: "Acceleration of the Deactivation Reactions of the water-oxidizing enzyme system Y"  
ATP: Adénosine triphosphate  
CCL: Complexe collecteur de lumière  
Cyt: cytochrome  
CDO: Complexe de dégagement d'oxygène  
Chl: Chlorophylle  
DGDG: Digalactosyldiglycéride  
FPM: Force proto-motrice  
MGDG: Monogalactosyldiglycéride  
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
PG: phosphatidylglycérol  
PSI: Photosystème I  
PSII: Photosystème II  
P680: Centre réactionnel du PSII  
P700: Centre réactionnel du PSI  
Qa: Plastoquinone, accepteur primaire du PSII  
Qb: Plastoquinone, accepteur secondaire du PSII  
SQDG: Sulphoquinovosyldiacylglycéride  
TMPD: N, N, N', N'-Tétraméthyléthylenediamine

## CHAPITRE 1

INTRODUCTION

## 1.1. LA PHOTOSYNTHESE

Les plantes vertes et les algues convertissent l'énergie de la lumière en énergie chimique stable sous la forme de glucides et d'oxygène moléculaire. Les hydrates de carbone sont synthétisés à partir de l'hydrogène contenu dans l'eau et de bioxyde de carbone; il y a donc production d'oxygène par photolyse de l'eau. Ainsi, la synthèse d'hydrates de carbone par la photosynthèse s'écrit (pour le glucose):



où le changement d'énergie libre de Gibbs est  $G=2868 \text{ kJ}$  par mole de glucose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ). Tous les organismes de la chaîne alimentaire dépendent de cette énergie chimique emmagasinée.

Dans les organismes eukaryotes, les réactions conduisant à la synthèse des hydrates de carbone sont toutes effectuées dans une organelle spécialisée (chromoplaste); le chloroplaste en est l'exemple le plus commun (Kirk et Tilney-Basset 1978). L'étude de la photosynthèse procède donc de deux aspects principaux: de l'organisation fonctionnelle et de la composition du chloroplaste, et des transformations de l'énergie s'y produisant. Puisque les travaux présentés ici portent sur la photolyse de l'eau, une attention particulière

sera donnée à la composition et au fonctionnement du mécanisme de dégagement d'oxygène.

#### 1.1.1. Le chloroplaste: fonction et organisation.

Le chloroplaste est délimité par une double membrane qui isole son intérieur, le stroma, du cytoplasme de la cellule; le chloroplaste forme donc une organelle distincte (Fig.1.1.1). De plus, les chloroplastes possèdent leurs propres acides nucléiques (ADN) et ribosomes; ceci leur confère un certain degré d'autogestion pour la production des protéines et enzymes nécessaires au fonctionnement de la machinerie photosynthétique. Cette autogestion s'étend jusqu'à l'entreposage des produits de la photosynthèse, qui est organisé dans les plastoglobuli (réservoirs de lipides) et les grains d'amidon (hydrates de carbone). Il est probable que cette autogestion découle de l'origine du chloroplaste dans la cellule, i.e. la symbiose de bactéries photosynthétiques prokaryotes ou d'algues bleues-vertes avec des eukaryotes non-photosynthétiques (Schopf 1978) ou encore avec d'autres bactéries ou protozoaires (Possingham 1980, Margulis 1981).

La plupart des plantes supérieures possèdent une grande quantité de chloroplastes en forme de lentilles (de l'ordre de la centaine), qui ont des dimensions variant entre 3-10 micromètres de diamètre et 1-5 micromètres d'épaisseur. Cependant, beaucoup d'algues ne possèdent qu'un seul

chloroplaste par cellule (ex.: Chlorella, Spirogyra, Ulva), de forme variant selon l'espèce. On croit que le plus grand nombre de chloroplastes des plantes supérieures est un avantage évolutionnel, car ainsi chaque chloroplaste présente une plus grande surface à la lumière par unité de volume (Foyer 1984).

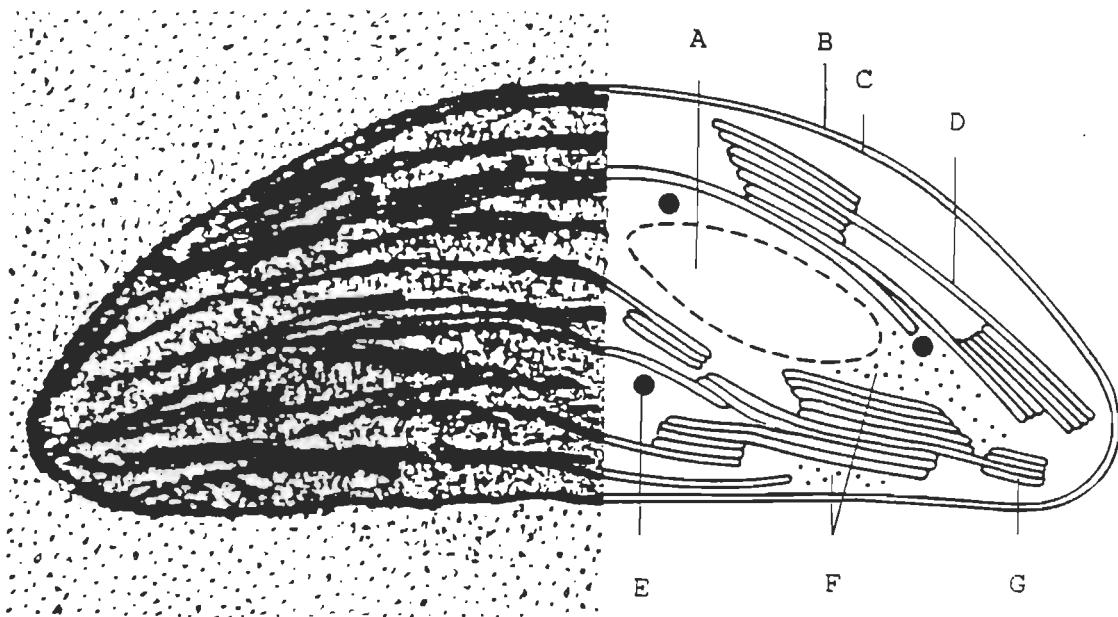
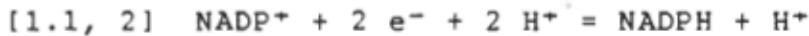


Figure 1.1.1. Chloroplaste de plante supérieure. La partie gauche est une photographie par microscopie électronique; la partie droite est un dessin identifiant les différentes parties du chloroplaste: a) grain d'amidon; b) membrane externe; c) membrane interne; d) thylakoides; e) plastoglobule; f) stroma, qui contient des ribosomes; g) grana.

Dans le stroma, on distingue des structures membranaires fermées qui ont l'aspect de disques, appelées thylakoïdes (Menke 1962). Les empilements de thylakoïdes constituent des grana, qui sont reliés entre eux par un réseau tridimensionnel complexe de thylakoïdes simples et non-empilés, les thylakoïdes stromatiques. Les thylakoïdes captent la lumière et la convertissent en énergie électrochimique (sous forme de NADPH) et chimique (sous forme d'ATP). Le NADPH est produit selon la réaction suivante:



où les électrons proviennent de l'oxydation de l'eau.

Quant à l'ATP, il transporte de l'énergie sous forme de deux liens phosphate anhydres:



Les tâches de réduire le  $\text{NADP}^+$ , d'oxyder l'eau et de produire de l'ATP, sont réparties entre différentes composantes des thylakoïdes. L'oxydation de l'eau est effectuée par le photosystème II (PSII), présent principalement dans les thylakoïdes des grana. La réduction du  $\text{NADP}^+$  est effectuée par le photosystème I (PSI), présent principalement dans les parties des thylakoïdes exposées au stroma. Le PSII fournit des électrons au PSI, par le biais de transporteurs d'électrons. Finalement, la synthèse de l'ATP (photophosphorylation) est effectuée par un enzyme

complexe formé de plusieurs sous-unités, le "facteur de couplage" ou ATPase. Ces processus (réduction du NADP<sup>+</sup>, oxydation de l'eau et production d'ATP) sont les seuls qui dépendent de réactions photochimiques; ils sont donc appelés les processus primaires de la photosynthèse (Hoover 1984, Ort 1986).

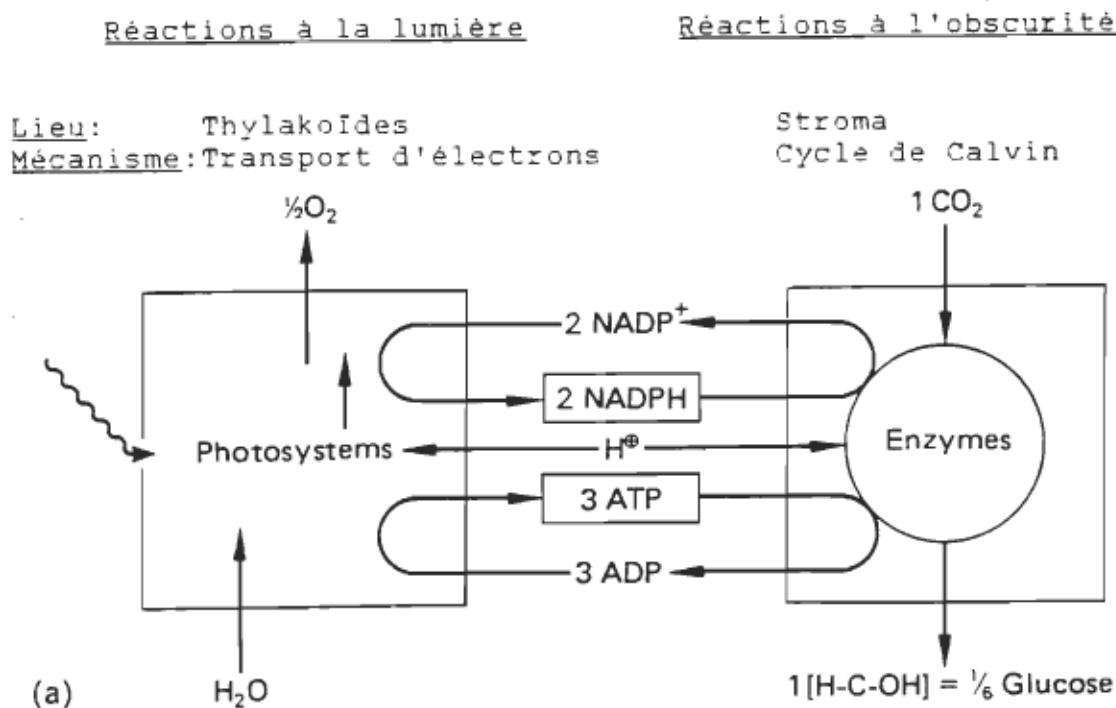


Figure 1.1.1.2. Les réactions lumineuses et les réactions obscures en photosynthèse. La stoichiométrie de l'ATP et du NADPH correspond au mécanisme C3.

Les molécules d'ATP et de NADPH sont ensuite utilisées pour la fixation du CO<sub>2</sub> qui peut se faire selon deux mécanismes, "C3" et "C4". Pour fixer une molécule de CO<sub>2</sub> et la réduire, les mécanismes en C<sub>3</sub> et en C<sub>4</sub> demandent

respectivement 3 ATP par 2 NADPH et 5 ATP par 2 NADPH. La fixation du CO<sub>2</sub> est effectuée dans le stroma, qui contient tous les enzymes nécessaires (Benson et Calvin 1950, Calvin et Bassham 1962). Puisque les processus impliqués dans la fixation du CO<sub>2</sub> se produisent à la suite de la formation de NADPH et d'ATP, ils sont dénommés "processus secondaires". La photosynthèse s'effectue donc en deux étapes, dans deux parties distinctes du chloroplaste: la transformation de l'énergie de la lumière en énergie chimique et électrochimique qui est effectuée par les thylakoides, et la préservation de cette énergie par la fixation du CO<sub>2</sub> qui se fait dans le stroma sans apport supplémentaire d'énergie en provenance de la lumière. Cette distinction est aussi exprimée respectivement sous le nom de réactions "lumineuses" et de réactions "à l'obscurité" (Fig.1.1.1.2).

### 1.1.2. Les réactions lumineuses

Les réactions lumineuses nécessitent plusieurs étapes communes à la plupart les organismes photosynthétiques. Ces étapes sont: la collection de la lumière, la transformation de l'énergie de la lumière en énergie électrochimique par séparation de charges (Sauer 1979), et le transport d'électrons jusqu'au NADP<sup>+</sup>, qui est couplé à la formation d'ATP (photophosphorylation) (Avron 1981). De plus, ces étapes doivent être régularisées afin de fournir les bons

ratios d'ATP par NADPH requis pour la fixation du CO<sub>2</sub> (Robinson et Walker 1981).

#### 1.1.2.1. La capture de la lumière

Les réactions lumineuses des organismes photosynthétiques nécessitent la présence de pigments pour absorber la lumière. Chez les plantes et les algues, la lumière est captée par des pigments spécialisés: les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobilines (Levine 1969). Chez les plantes supérieures, les principaux pigments sont les chlorophylles a et b tandis que les algues peuvent posséder les chlorophylles c, d, et e en plus de la chlorophylle a. Les chlorophylles (Fig. 1.1.2.1) sont caractérisées par un noyau tétrapyrolé contenant un atome de magnésium chélaté, et une queue phytol estérifiée à l'atome C7 du noyau tétrapyrolé (Hill 1963). Les autres pigments présents de façon universelle sont les caroténoïdes, qui sont caractérisés par une longue chaîne d'hydrocarbones polyinsaturés contenant des groupements méthyle (Fig.1.1.2.2), (Britton 1976).

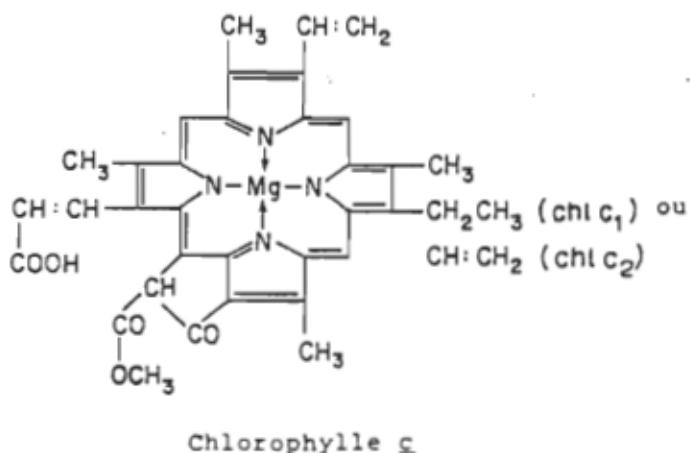
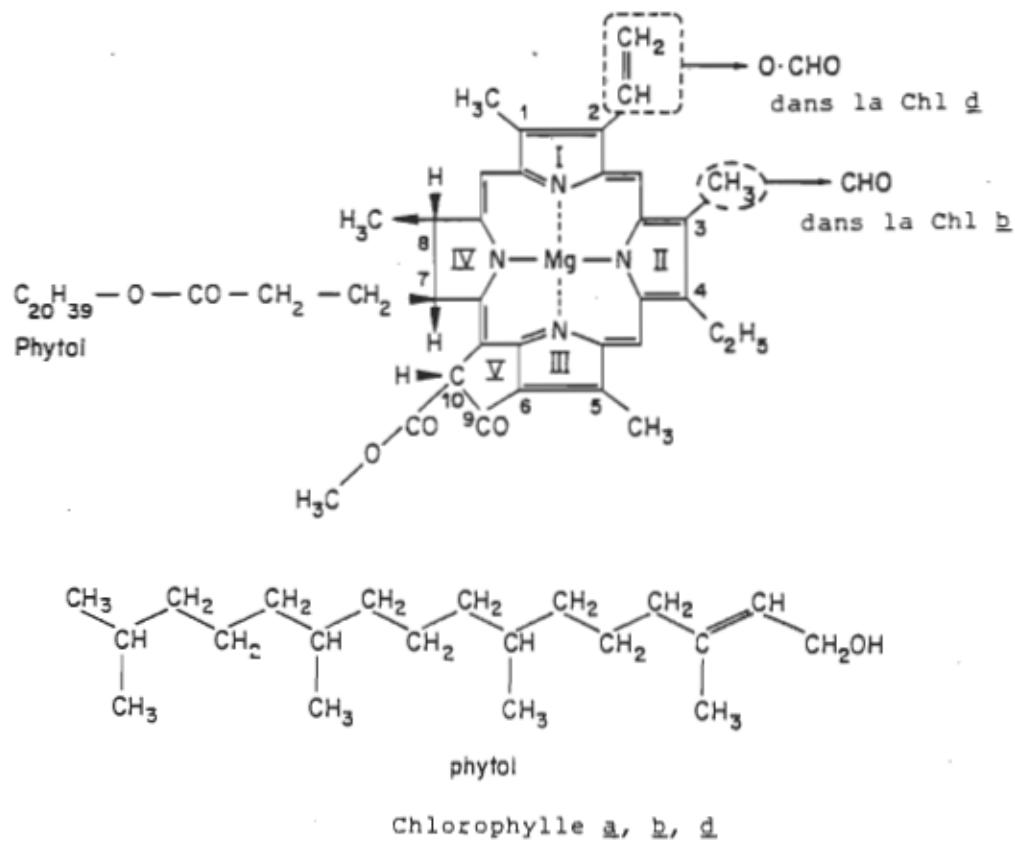
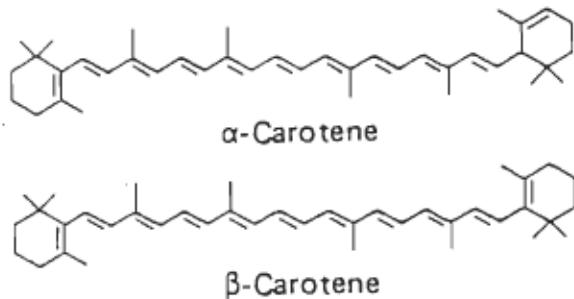


Figure 1.1.2.1. Représentation de la structure des chlorophylles a, b, c et d.



au pigment dont le premier état excité contient le moins d'énergie. Par exemple, les carotènes, les phycobilines et les chlorophylles b, c, d et e transmettent toutes leur énergie à la chlorophylle a plutôt que d'émettre de la fluorescence. Quand l'énergie d'un photon (exciton) est transmise à la chlorophylle a à partir des autres pigments, une partie de l'énergie est perdue sous forme de chaleur. La perte d'énergie fait en sorte que l'exciton ne peut retourner de la chlorophylle a aux autres pigments; donc, seule la fluorescence de la chlorophylle a est observée dans les algues vertes et les plantes supérieures (Levine 1969).

Ce principe est illustré dans le modèle des antennes du PSII (Fig. 1.1.2.3), dans lesquelles les pigments sont organisés à l'aide de protéines en complexes collecteurs de lumière (CCL). Dans les CCL, l'énergie de la lumière absorbée par les caroténoides est successivement transmise à la chlorophylle b (maximum d'absorption à 650 nm), puis à des chlorophylles a absorbant à 660, 670, 678 et 680 nm. La multiplicité des pigments permet donc d'absorber la lumière dans une largeur de bande spectrale plus vaste, tout en canalisant cette énergie vers un seul type de pigment, la chlorophylle a (680 nm). Ceci est important car le centre réactionnel du PSII, P680, est composé à partir de chlorophylle a (680 nm); l'énergie des photons est donc canalisée vers les centres réactionnels où s'effectuent les

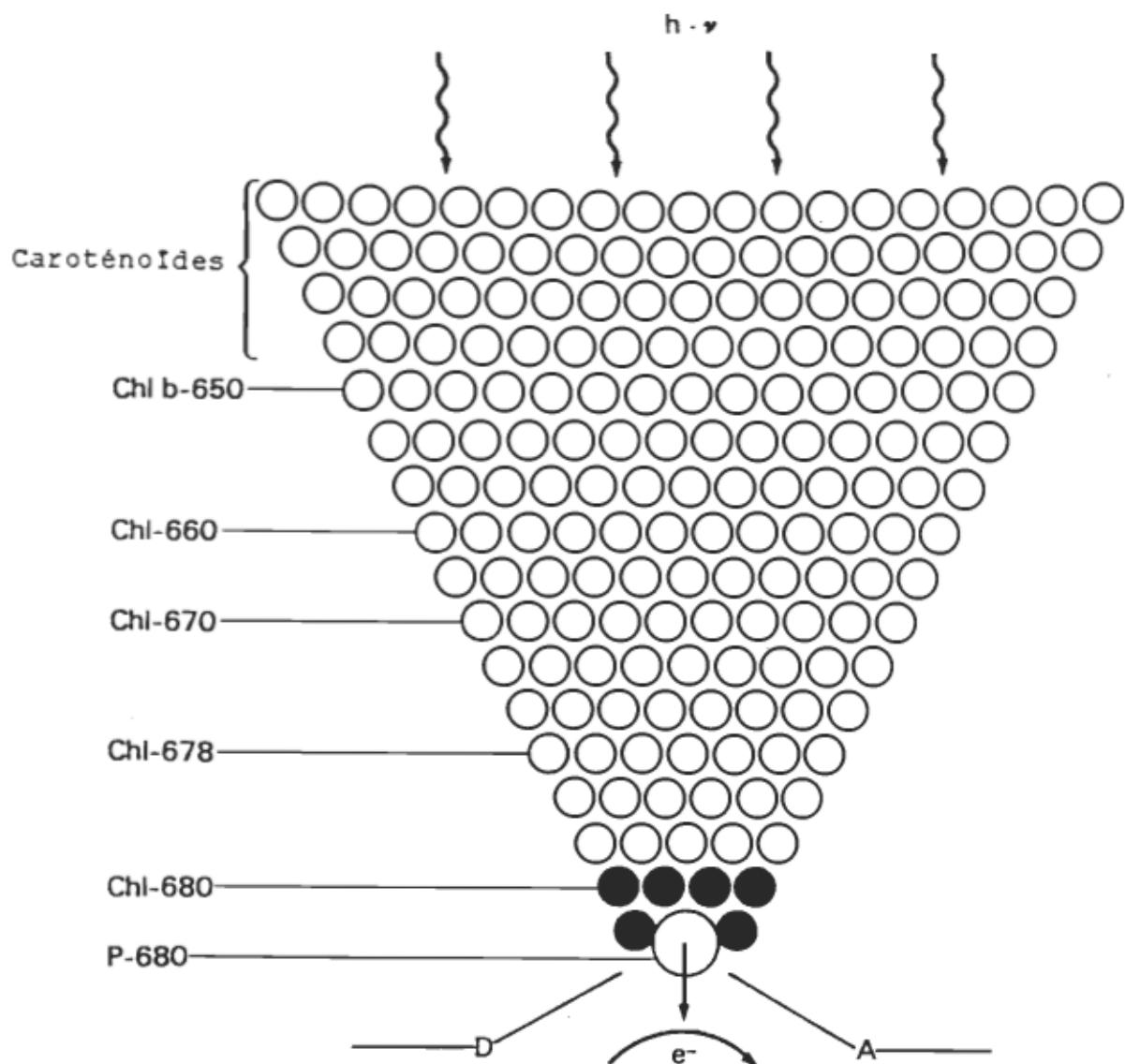


Figure 1.1.2.3. Migration de l'énergie dans les pigments jusqu'au centre réactionnel P680.

séparations de charges (Govindjee et Govindjee 1974, Richter 1982).

#### 1.1.2.2. La séparation de charges

La séparation de charges est effectuée dans les centres réactionnels du photosystème I, P700, et du photosystème II, P680 (l'indice dénote leur maximum d'absorption). Dans les deux cas, l'énergie d'un photon est utilisée pour réduire un accepteur primaire, alors que le centre réactionnel adopte une charge positive. L'énergie se trouve donc à être transformée sous la forme d'un couple rédox qui ne peut contenir qu'une quantité d'énergie bien définie. Ainsi, bien qu'un photon de longueur d'ondes courte (e.g. bleu) peut contenir plus d'énergie que le couple rédox, le surplus d'énergie est inutilisable pour la photosynthèse. Donc, indépendamment de l'énergie d'un photon capté par les pigments, il ne peut y avoir qu'une seule séparation de charges par photon (Govindjee et Govindjee 1974, Gregory 1989).

Les séparations de charges, en l'absence de transport d'électrons, ne sont pas stables. En effet, les charges séparées par les centres réactionnels peuvent se recombiner. L'énergie de la recombinaison de charges peut alors se dissiper en chaleur ou produire un exciton dans le centre réactionnel; l'exciton se comportera alors dans les pigments comme décrit précédemment (c.f. section 1.1.2.1., la capture de la lumière). Afin d'éviter la perte d'énergie par recombinaison de charges, les séparations de charges doivent

être stabilisées. Pour ce faire, les charges sont éloignées des centres réactionnels par transport d'électrons avec une certaine perte de l'énergie originale de la séparation de charges. La recombinaison de charges nécessite alors le renversement du transport d'électrons qui est défavorable énergétiquement. Donc, un premier effet du transport d'électrons est la stabilisation des séparations de charges (Sauer 1975, Pearlstein 1982, Parson et Ke 1982).

#### 1.1.2.3. Le transport d'électrons linéaire

Le transport linéaire d'électrons se distingue des autres transports d'électrons en ce que les charges positives du centre réactionnel du photosystème II (P680) fournissent le pouvoir oxidant pour la séparation de l'eau, et les charges négatives du centre réactionnel du photosystème I (P700) fournissent le pouvoir réducteur pour former du NADPH. Ces pouvoirs sont transmis par des transporteurs d'électrons, qui éloignent les charges des centres réactionnels.

En Fig.1.1.2.4 se trouve un schéma montrant les principales composantes du transfert d'électrons. Dans le PSII, l'accepteur primaire est une molécule de phéophytine (la phéophytine est une chlorophylle sans magnésium chélaté). Une charge négative (électron) est donnée à la molécule de phéophytine (Ph) en environ 3 ps (picosecondes) alors que le centre réactionnel P680 adopte une charge positive

(Wasielewski et al. 1989). La charge positive, ou "trou", est transférée à Z, sur une tyrosine qui est la composante essentielle de Z (Gerken et al. 1988). Le trou est ensuite transmis au complexe de dégagement d'oxygène (Y), où se produit l'oxidation de l'eau. L'électron de la phéophytine est transféré à l'accepteur Qa, en 120-240 ps (Rockley et al. 1975). L'accepteur "Qb", lui, prend successivement deux électrons de Qa, le premier en 100-200  $\mu$ s et le deuxième en 400-500  $\mu$ s avant d'être échangé dans le bassin de plastoquinone (PQ) (Mathis et Rutherford 1987).

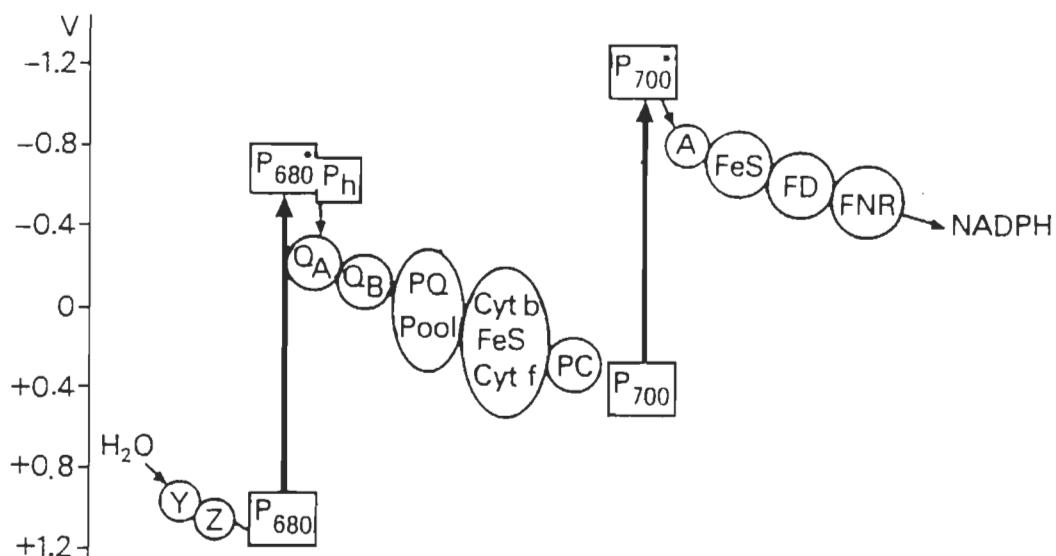


Figure 1.1.2.4. Schéma en Z du transport d'électrons linéaire de l'eau jusqu'au  $NADP^+$ , montrant le potentiel rédox approximatif des composantes impliquées.

La plastoquinone est oxidée par le complexe du cytochrome b6/f, qui transmet l'électron au bassin de plastocyanine (PC). Le centre réactionnel du photosystème I oxide la plastocyanine à la suite d'une séparation de charges entre P700 et l'accepteur primaire du photosystème I, A0. Cette séparation de charges est stabilisée par transfert d'électron aux accepteurs A1 et complexes fer-soufre (FeS), dénommés FX, FA et FB. Le complexe A donne un électron à la ferredoxine (FD), qui réduit ensuite le NADP<sup>+</sup> avec l'aide d'un catalyseur, la ferredoxine-NADP<sup>+</sup> réductase (FNR) (Mathis 1986, Malkin 1987).

#### 1.1.2.4. La photophosphorylation

Il a été observé que le taux de transport d'électrons est limité par le taux de synthèse d'ATP; ceci constitue le "couplage" du transport d'électrons à la synthèse d'ATP (Arnon et al. 1954, Frenkel 1954). Le couplage est réalisé par l'intermédiaire d'une force proto-motrice (F.P.M., par analogie avec la force électro-motrice, F.E.M.), qui est formée par le pompage de protons à travers la membrane du thylakoïde lors du transport d'électrons (Fig. 1.1.2.5). Ceci nécessite l'imperméabilité de la membrane au passage des protons (Mitchell 1961, 1966); les substances créant des "fuites" de protons sont appelées par ce fait même "découpleurs". La FPM (force proto-motrice) est composée de deux facteurs: la différence de concentration de protons

de part et d'autre de la membrane, et le potentiel membranaire généré par le mouvement des charges. Ainsi, La FPM est augmentée lors des séparations de charges, car celles-ci sont vectorielles: les centres réactionnels (charge positive) sont orientés du côté intérieur de la membrane, et les accepteurs primaires (charge négative) sont du côté extérieur de la membrane (Junge et Witt 1968, Witt 1979).

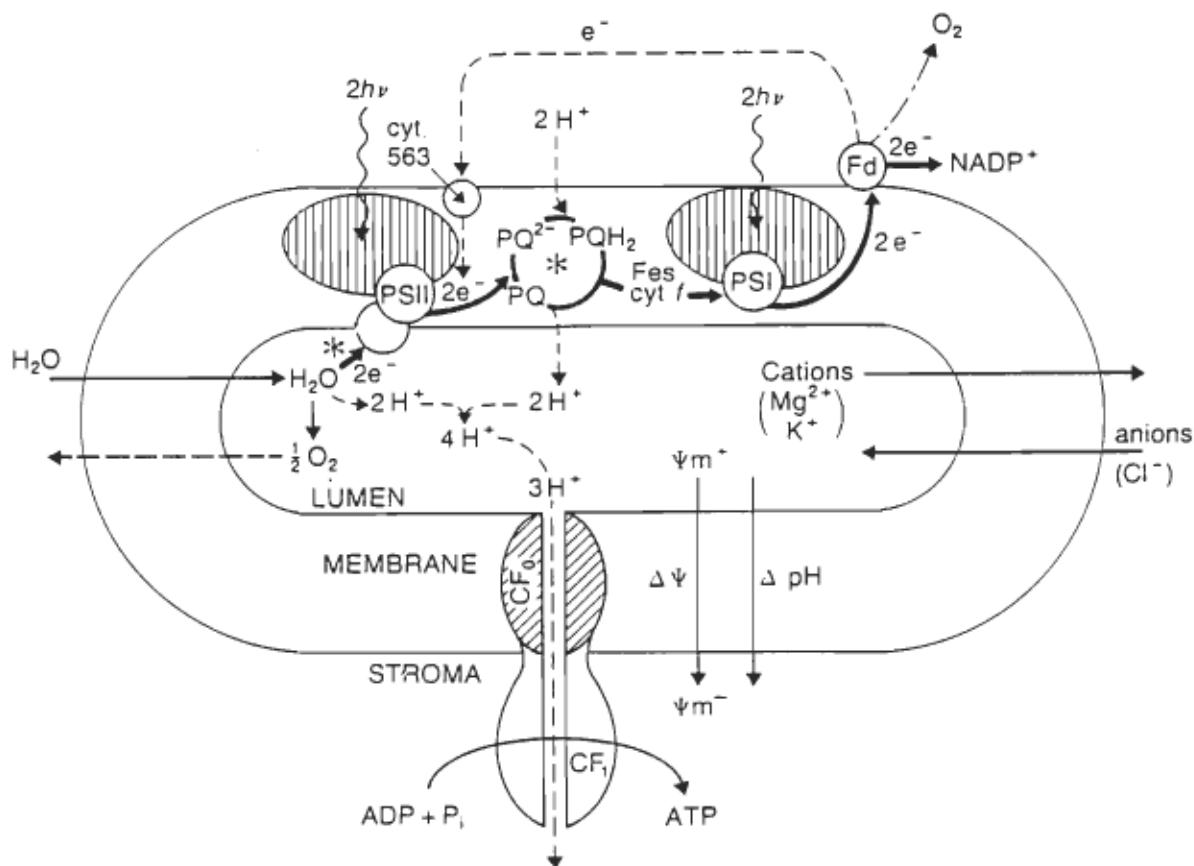


Figure 1.1.2.5. Représentation de la formation de l'ATP par la force proto-motrice (FPM) dans les thylakoides. La lettre grecque "psi" symbolise le gradient de potentiel électrique.

L'ATPase du chloroplaste est composée en deux parties distinctes; une partie, CF1, est hydrophyllique et une autre, CF0, est hydrophobique. La partie CF0 est incluse dans la membrane; son rôle consiste à contrôler le passage des protons et permet d'ancrer CF1 au thylakoïde. La partie CF1 est à l'extérieur du thylakoïde, dans le stroma, et est le site de la synthèse de l'ATP (McCarty, 1979).

Le pompage des protons est réalisé de différentes manières lors du transport d'électrons. Dans le photosystème II, l'oxidation de l'eau en oxygène libère quatre protons à l'intérieur du thylakoïde par molécule d'oxygène. De plus, quand la plastoquinone associée au site "Qb" accepte deux électrons de Qa, elle prend aussi deux protons de l'extérieur du thylakoïde avant de migrer dans la membrane vers le cytochrome b6/f. Lors de son oxidation, elle relâche alors ces deux protons à l'intérieur du thylakoïde, contribuant ainsi au gradient de pH transmembranaire. Le cytochrome b6 (aussi appelé cytochrome 563), quant à lui, peut utiliser l'électron le plus énergétique libéré lors de l'oxidation de la plastoquinone pour effectuer la première réduction, moins énergétique, d'une autre molécule de plastoquinone (Fig. 1.1.2.6.). Cette plastoquinone transporte alors un autre proton à travers la membrane, et est ré-oxidée par le cytochrome b/f du côté intérieur de la membrane. Ce cycle ("Q cycle") confère un maximum d'efficacité de deux protons

par électron transporté entre PSII et PSI; il est cependant lent et n'est pas toujours utilisé. Donc en incluant le dégagement d'oxygène, chaque électron réduisant le  $\text{NADP}^+$  aura augmenté le nombre de protons à l'intérieur de la membrane de 2 ou 3 protons (Crowther et Hind 1981).

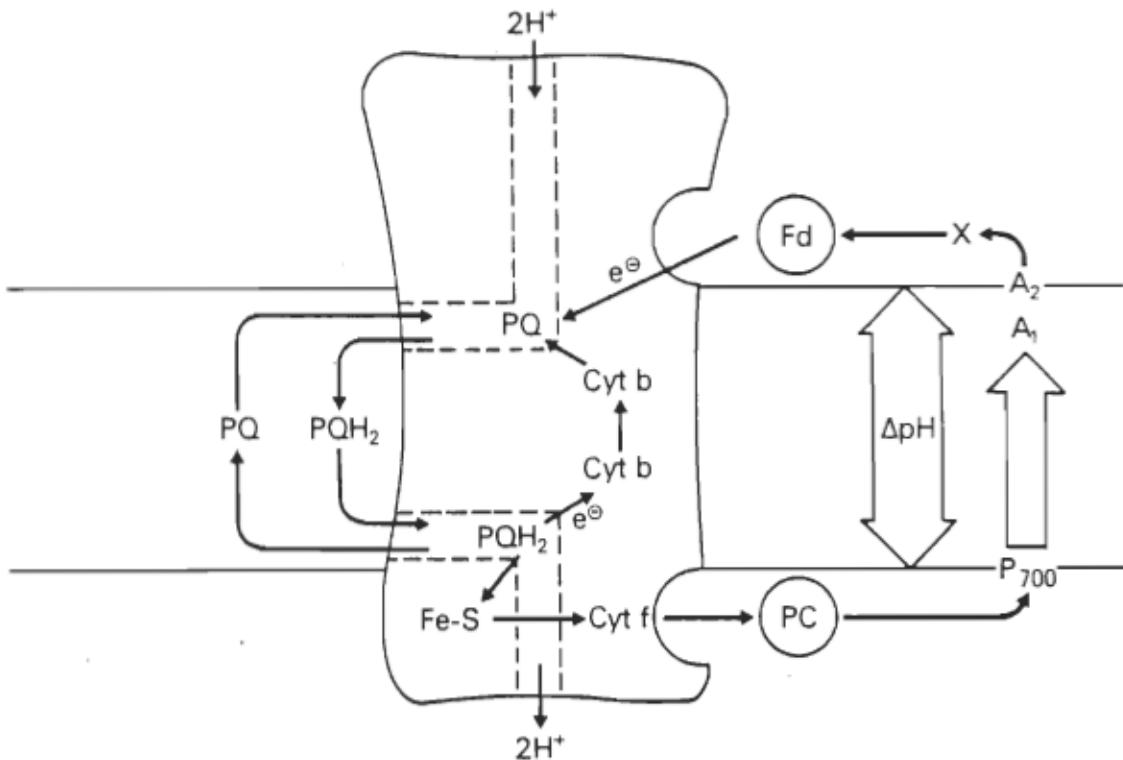


Figure 1.1.2.6. Le pompage des protons par le cycle Q et le transport cyclique d'électrons autour du PSI.

L'ATPase requiert 3 protons pour synthétiser une molécule d'ATP; pour chaque paire de molécules de NADPH produites, il peut donc y avoir moins de trois molécules d'ATP synthétisées, ce qui est insuffisant pour la fixation

du CO<sub>2</sub>. De plus, lors d'une transition du noir à la lumière, le gradient de pH demande un certain temps avant d'être formé, ce qui induit un retard dans la production d'ATP. La fixation du CO<sub>2</sub> demande la phosphorylation initiale de certains intermédiaires, ce qui augmente aussi la demande en ATP. Le transport d'électrons linéaire est donc insuffisant pour produire tout l'ATP nécessaire (Foyer 1984, Lawlor 1987).

#### 1.1.2.5. Le transport d'électrons cyclique et pseudo-cyclique

Afin de produire plus d'ATP, le photosystème I peut effectuer un transport d'électrons cyclique qui augmentera le transport des protons à travers la membrane (Fig. 1.1.2.6). Pour ce faire, les électrons de la ferredoxine ou du NADPH sont utilisés pour réduire la plastoquinone. La plastoquinone lie alors deux protons à l'extérieur de la membrane, qu'elle relâche lors de son oxidation par le cytochrome b/f. Ces électrons retournent alors par la plastocyanine au PSI, qui peut réduire à nouveau la ferredoxine et/ou le NADP<sup>+</sup>. Chaque électron peut alors transporter entre 1 et 2 protons, dépendamment de l'efficacité du cycle Q discuté précédemment (Arnon et Chain 1977, Foyer 1984).

Afin de produire de l'ATP, le photosystème I peut aussi réduire lentement l'oxygène en absence d'autres accepteurs d'électrons (Mehler 1951). Les électrons provenant du

dégagement d'oxygène du PSII sont donc utilisés pour réduire à nouveau l'oxygène au PSI, d'où l'appellation de ce phénomène "transport d'électrons pseudo-cyclique". Puisque les électrons passent par la plastoquinone, et que les électrons du dégagement d'oxygène sont libérés à l'intérieur du thylakosome, le transport d'électrons pseudo-cyclique résulte en un transport de protons qui permet la production d'ATP. Chaque électron permet donc de transporter entre 2 et 3 protons, selon l'efficacité du cycle Q discuté précédemment (Foyer 1984).

#### 1.1.2.6. Régulation: les transitions d'état

La demande variable en ATP exposée précédemment nécessite une adaptation de la quantité d'énergie donnée au PSI relativement à celle du PSII. De plus, les deux photosystèmes réagissent à des longueurs d'ondes différentes, comme l'exprime leur dénotation P700 et P680 (l'indice exprime leur maximum d'absorption). Donc, dépendamment de la composition de la lumière excitante, un réajustement de la distribution de l'énergie entre le PSII et le PSI peut être nécessaire afin d'équilibrer le nombre de séparations de charges selon les besoins (Williams WP et Salamon 1976).

Dans le transport linéaire d'électrons, quand le photosystème II effectue plus de séparations de charges que le photosystème I, il en résulte une réduction des transporteurs d'électrons entre le PSII et le PSI. Dans la

situation contraire, quand le PSI effectue plus de séparations de charges que le photosystème II, il en résulte une oxidation des transporteurs d'électrons entre le PSII et le PSI. L'état rédox de ces transporteurs d'électrons est donc un indicateur de l'équilibre entre le nombre de séparations de charges par le PSII et le PSI qui sont utilisées pour le transport d'électrons linéaire.

L'état rédox du bassin de plastoquinone est utilisé par le chloroplaste dans un mécanisme de rétro-action afin de régulariser la distribution de l'énergie (Allen et al. 1981). Cette régulation est effectuée en déplaçant les complexes capteurs de lumière (CCL) qui sont mobiles du PSII au PSI ou vice-versa. Afin de les déplacer du PSII au PSI, les CCL sont phosphorylés par un enzyme (kinase) qui est activé par la plastoquinone réduite. Le déplacement des CCL du PSII au PSI se produit en présence de lumière excitant principalement le PSII; cet état est donc appelé l'état II (state II). Afin de les retourner au PSII, ils sont déphosphorylés par une phosphatase qui est toujours active indépendamment de l'état rédox de la plastoquinone. Le retour des CCL du PSI au PSII se produit en présence de lumière excitant principalement le PSI; cet état est donc appelé l'état I (state I) (Williams et al. 1980, Williams et Allen 1987).

### 1.1.3. Les réactions à l'obscurité

#### 1.1.3.1. La fixation du CO<sub>2</sub>

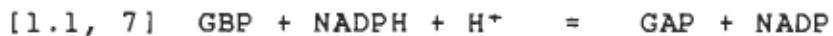
La fixation du CO<sub>2</sub> peut se faire selon deux mécanismes, "C3" et "C4". D'après le mécanisme C3 (aussi appelé cycle de Benson-Calvin: c.f. Benson et Calvin 1950, Calvin et Bassham 1962) le CO<sub>2</sub> est fixé par réaction avec le ribulose-1,5-biphosphate (RuBP), pour former deux molécules de phosphoglycerate (PGA):



où le Mg<sup>2+</sup> est un cofacteur. Par la suite, le PGA est converti en glycératate-1,3-biphosphate (GBP) en utilisant de l'ATP:



Par la suite, le GBP est réduit par le NADPH pour donner du glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP):

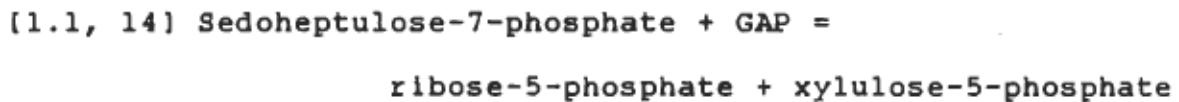
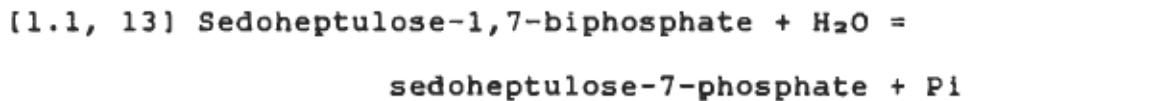
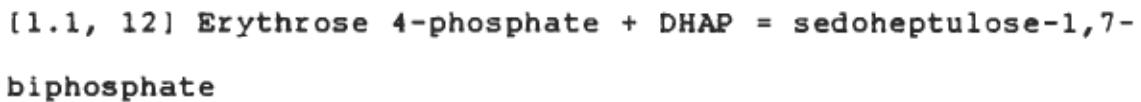
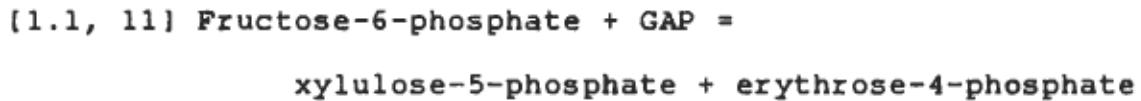
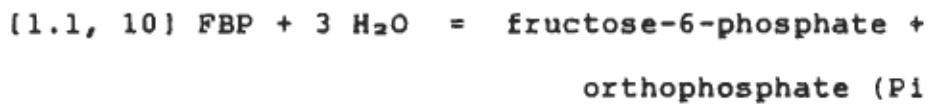


Le GAP est converti grâce à une isomérase en dihydroxyacetone phosphate (DHAP):



où l'équilibre dynamique est d'environ 22 molécules de DHAP pour une molécule de GAP. Les trioses phosphates DHAP et GAP peuvent alors être exportées hors du chloroplaste en échange d'un orthophosphate (P<sub>i</sub>), de sorte que la quantité de phosphate à l'intérieur du chloroplaste demeure constante. Si aucun phosphate n'est disponible, les trioses phosphates

peuvent alors être transformées sous forme d'amidon, ce qui libère les phosphates pour continuer la fixation du CO<sub>2</sub>. Cependant, l'exportation de trioses phosphates doit être contrôlée car la RuBP demande pour être régénérée les 5/6 de la production de DHAP:



La régénération de la RuBP fait que la fixation du CO<sub>2</sub> est auto-catalytique: plus il y a de CO<sub>2</sub> fixé, plus il est possible d'en fixer davantage. Ceci a pour conséquence, cependant, que le rythme maximal de fixation du CO<sub>2</sub> n'est atteint que lorsque la concentration de RuBP a atteint son maximum; il en résulte un délai, aussi appelé période

d'induction. Cette période d'induction est aussi augmentée par le temps d'activation des enzymes impliqués, mais elle demeure due en majorité au délai d'accumulation de la RuBP et des composants intermédiaires (Foyer 1984).

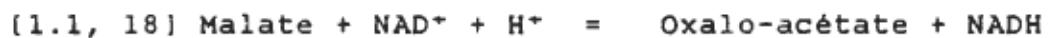
L'incorporation du  $\text{CO}_2$  dans la RuBP est effectuée par l'enzyme ribulose-bi-phosphate carboxylase (Yeoh et al. 1981). Cette enzyme est aussi une oxygénase, c'est-à-dire que au lieu d'incorporer une molécule de  $\text{CO}_2$ , elle peut oxyder la RuBP avec de l'oxygène moléculaire. Ceci cause une consommation d'oxygène et une perte d'énergie considérable, la photorespiration. La compétition entre l'oxygène et le  $\text{CO}_2$  pour le site actif de la RuBP carboxylase/oxygénase fait que l'importance des pertes dues à la photorespiration dépend des concentrations respectives d' $\text{O}_2$  et de  $\text{CO}_2$  (Tolbert 1980). Afin de diminuer la photorespiration, certaines plantes ont ajouté un autre mécanisme pour concentrer le  $\text{CO}_2$  avant la réaction avec la RuBP. Dans les cellules extérieures de la feuille (mésophylles), le  $\text{CO}_2$  est fixé à du phosphoénolpyruvate, pour donner de l'oxaloacétate. Ce produit est ensuite réduit par le NADPH pour donner du malate. Le malate est ensuite exporté aux cellules intérieures de la feuille, où il est décomposé en pyruvate et  $\text{CO}_2$ , avec la synthèse d'une molécule de NADPH. Après la libération du  $\text{CO}_2$ , le pyruvate est alors retourné aux cellules mésophylles pour être retransformé en

phosphoénolpyruvate au coût de 2 ATP. Ce mécanisme pompe donc du CO<sub>2</sub> dans les cellules intérieures (périvasculaires) afin de réduire la photorespiration. Afin d'augmenter encore l'efficacité de la fixation du CO<sub>2</sub>, les cellules périvasculaires sont déficientes en PSII; ceci résulte en une diminution de la concentration d'O<sub>2</sub>, et donc moins de photorespiration. Parce que le mécanisme de pompage du CO<sub>2</sub> produit des molécules à quatre carbones, les plantes possédant ce mécanisme sont appelées "C4"; comme les plantes sans ce mécanisme produisent des molécules à 3 carbones, elles sont appelées "C3" (Hatch et Slack 1970, Hatch 1978, Campbell et Black 1982).

#### 1.1.3.2. La chlororespiration

La chlororespiration consiste en l'oxidation aérobie ou anaérobie de molécules organiques en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> et composés à trois carbones (ex.: dihydroxyacétone-P, glycératate 3-P); elle est distincte et exclut les réactions photorespiratoires du chloroplaste (Gibbs et al. 1990). Il ne s'agit donc pas à proprement parler d'un mécanisme photosynthétique; mais comme la chaîne respiratoire du chloroplaste intercepte le transport d'électrons photosynthétique, son existence influence profondément les réactions photosynthétiques.

Dans le chloroplaste, le malate est utilisé pour réduire le NAD (Gibbs et al. 1990):



Le NADH réduit ensuite la plastoquinone par l'intermédiaire d'une NADH-plastoquinone oxido-réductase présente dans la membrane du thylakoïde (Godde and Trebst 1980, Godde 1982). La plastoquinone est donc le lien commun entre la chaîne chloro-respiratoire et la chaîne photosynthétique. Par la suite, la plastoquinone peut être oxidée soit par le PSI (Peltier et al. 1987), soit par une cytochrome oxidase jusqu'à l'oxygène (Williams and Allen 1987). Ce phénomène explique la dépendance de l'état rédox de la plastoquinone sur la concentration d'oxygène, qui avait été observée avant la découverte de la chlororespiration (Diner 1977). Ainsi, la chlororespiration dans le noir détermine l'état rédox de la plastoquinone; ceci a pour conséquence que la distribution de l'énergie entre le PSII et le PSI par les transitions d'état est fixée au départ par la chlororespiration (Dominy and Williams 1987). Comme autre conséquence de cette interaction, on distingue l'effet Kok, soit la suppression de la respiration lors de l'activation de la chaîne de transport d'électrons photosynthétique. Cette inhibition avait autrefois été interprétée comme étant due à la respiration mitochondriale (Kok 1949), mais est due en fait à la suppression de la chlororespiration (Peltier et al. 1987, Peltier et Sarry 1988).

## 1.2. La composition du photosystème II

### 1.2.1. L'environnement membranaire

Les lipides de la membrane du thylakoïde sont très importants pour la fonction du PSII. Ils constituent 25-30% de la masse totale des thylakoides. La majeure partie (75%) consiste en galactolipides neutres comme le monogalacto-syldiglycéride (MGDG) et le digalactosyldiglycéride (DGDG). Le reste est constitué de lipides chargés négativement, 10% de phosphatidylglycérol (PG) et 10% de sulfoquinovosyl-diacylglycéride (SQDG), et 5% d'autres phospholipides. Transversalement dans la membrane, les lipides du côté stromatique ne sont pas identiques aux lipides du côté lumineux: environ 60% des galactolipides neutres se trouvent du côté stromatal. Il y a donc assymétrie (Sundby et Larsson 1985).

Les lipides sont différents aussi selon la position de la membrane, dans les grana ou dans le stroma (Hansson and Wydrzynski 1990). Les régions membranaires riches en PSII, les grana, comprennent plus de MGDG relativement au DGDG que les thylakoides stromataux. De plus, la masse des lipides est moins importante: dans les grana, les lipides représentent 14% de la masse de la membrane contre 40% dans le stroma. Les propriétés des PSII dépendent des lipides environnants: l'addition de DGDG ou de phosphatidylcholine (PC) augmente la capacité de dégagement d'oxygène de

fractions membranaires riches en PSII. A l'opposé, les lipides anioniques SQDG et PG inhibent l'activité du PSII (Gounaris et al. 1983). Le degré de saturation des lipides influence aussi l'activité des PSII (Horvath et al. 1987). En fait, les lipides sont même essentiels pour obtenir une séparation de charges stable entre P680<sup>+</sup> et Qa<sup>-</sup> (Jordan et al. 1983, Eckert et al. 1987, Akabori et al. 1988). On croit donc que l'existence de PSII dans l'environnement lipidique différent du stroma serait à l'origine de l'observation d'un deuxième type de PSII (bêta), qui possède des propriétés différentes (Black et al. 1986, Hansson et Wydrzynski 1990).

#### 1.2.2. Les antennes du PSII

La collection de la lumière dans le PSII est organisée en deux antennes, proximale et distale. L'antenne proximale comprend de 40 à 70 molécules de chlorophylle et une dizaine de B-carotène dans deux complexes protéiniques, CP-47 (ou CPa-1) et CP-43 (ou CPa-2). Elle est en association étroite avec le centre réactionnel P680 et possède un spectre d'absorption identique. Son rôle, en plus d'absorber la lumière, est de coupler le centre réactionnel à l'antenne distale (Green 1988, Bricker 1990).

L'antenne distale du PSII comprend environ 200 chlorophylles et de la xanthophylle, et est composée de deux parties: un complexe collecteur de lumière mobile (CCL-II),

et un complexe chlorophylle-protéine fixe qui sert de point d'ancre au CCL-II. Environ 30% du CCL-II peut être phosphorylé par une kinase qui est activée par la plastoquinone réduite; cette partie du CCL-II se détache alors du PSII pour migrer dans les thylakoides du stroma, afin d'équilibrer la distribution de l'énergie entre PSII et PSI (voir les transitions d'état) (Briantais et al. 1986, Deng et Melis 1986).

#### 1.2.3. Le centre réactionnel

Le centre réactionnel du PSII est inclus dans des particules isolées composées de deux protéines, D1 et D2, et du cytochrome b-559 (Nanba et Satoh 1987, Seibert et al. 1988). Les protéines D1 et D2 ont des masses respectivement de 32 et 34 kDa, et traversent toutes deux la membrane. Le donneur d'électrons Z a été identifié comme étant constitué de la tyrosine en position 161 de la protéine D1; conséquemment, un nouveau symbole, Yz, a été proposé car Y est le symbole de la tyrosine (Debus et al. 1988). L'accepteur d'électron Qa semble être une plastoquinone liée à la protéine D2 (Diner 1988), alors que l'accepteur Qb est une plastoquinone liée à la protéine D1. La conformation de la protéine D1 dépend de la présence de la plastoquinone à Qb (Trebst et al. 1988), bien que les conséquences fonctionnelles de ce changement de conformation n'ont pas été encore découvertes. Le centre réactionnel P680 semble être composé de chlorophylle, bien

qu'il ne soit pas certain encore si cette chlorophylle est un dimère ou un monomère (Hansson et Wydrzynski 1990).

Il existe un donneur d'électrons relié à Yz, et qui n'a pas été mentionné précédemment car il ne semble pas être impliqué dans le transport linéaire d'électrons. Ce donneur d'électrons était autrefois nommé D, et a maintenant été identifié comme une tyrosine de la protéine D2; par conséquent, il est maintenant nommé YD. Il est spéculé que le donneur YD est l'analogue de Yz sur une partie dédoublée et non-fonctionnelle du centre réactionnel, qui contiendrait aussi une deuxième molécule de phéophytine (Nanba et Satoh 1987, Hansson et Wydrzynski 1990).

#### 1.2.4. Le cytochrome b-559

Le cytochrome b-559 est composé de deux sous-unités de 4 et 9 kDa; les deux sous-unités sont reliées entre elles par un hème utilisant le résidu histidine présent dans chacune des deux protéines. La protéine de 9 kDa traverse une seule fois la membrane, avec l'hème orienté du côté stromal (Cramer et al. 1986, Tae et al. 1988).

Le cytochrome b-559 présente un changement d'absorbance quand il est réduit par le PSII; le site de cette réduction semble être près de Qb (Tsujimoto et Arnon 1985). Le cytochrome b-559 peut aussi être oxidé par le PSII, selon les conditions expérimentales; ainsi il a été proposé que le cyt b-559 pouvait jouer un rôle dans le transport d'électrons

cyclique autour du PSII (Heber et al. 1979). Cependant, l'oxidation et la réduction du cytochrome b-559 sont compliquées du fait qu'il existe sous deux formes de potentiel redox différentes, qui sont identifiées HP and LP (d'après les initiales de "High-Potential" et "Low-Potential") (Bendall 1982). Ces deux formes sont composées des mêmes protéines, et sont toutes deux associées fortement avec le PSII (Ortega 1989). De plus, les centres réactionnels isolés qui sont fonctionnels contiennent tous le cytochrome b-559 (Nanba et Satoh 1987, Barber et al. 1987). Cependant, le nombre de cytochromes b-559 par centre réactionnel est controversé, et est soit de 1 (Miyazaki et al. 1989), soit de deux (Tae et al. 1988). Le cytochrome b-559 peut effectuer un cycle de la forme HP à la forme LP, et vice-versa; ce cycle nécessite la liaison et la libération successives de protons (Ortega et al. 1988). Contrairement à ce qui était cru auparavant, la conversion entre les formes HP et LP ne montre pas de corrélation nécessaire avec les changements de capacité (d'activité) du PSII, bien qu'il est possible qu'une inhibition du PSII puisse en causer la conversion (Briantais et al. 1985, Ghanotakis et al. 1986, Bergstrom et Franzen 1987). Pour ces raisons, on croit présentement que le rôle du cytochrome b-559 est d'effectuer un transport d'électron cyclique autour du PSII, qui permet le transport de protons à travers la membrane du thylakoïde.

(McCauley et al. 1987, Ortega et al. 1988, Arnon et Tang 1988). Une deuxième hypothèse propose que le rôle du cyt b-559 est photoprotecteur (Thompson and Brudvig 1988); le rôle physiologique exact du cyt b-559 n'est pas encore clair (Hansson et Wydrzynski 1990).

#### 1.2.5. Les protéines régulatrices du dégagement d'oxygène

Le dégagement d'oxygène dans le PSII est effectuée par un complexe qui contient quatre atomes de manganèse (Fig.1.2.5.1). Certains atomes de manganèse semblent être liés directement aux protéines D1 (Diner et al. 1988, Babcock et al. 1989) et D2 (Vermaas et al. 1990) du centre réactionnel. Ce complexe est logé du côté lumineux du thylakoïde, dans un environnement protégé par un ensemble de protéines extrinsèques à la membrane. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la régulation et la préservation du complexe de manganèse; si les protéines sont perturbées, le dégagement d'oxygène peut être inhibé de 40-95%, avec ou sans relâche du manganèse en solution (Kuwabara et al. 1985, Tang et Satoh 1986, Ono et Inoue 1986).

Les protéines protectrices ont des masses moléculaires de 33, 23 et 16 kDa, présentes en quantités égales. L'enlèvement des protéines de 16 et 23 kDa inhibe le dégagement d'oxygène jusqu'à 50%; cependant cette inhibition est enlevée par l'ajout de calcium et de chlorure, qui sont considérés comme co-facteurs. Il semble donc que ces

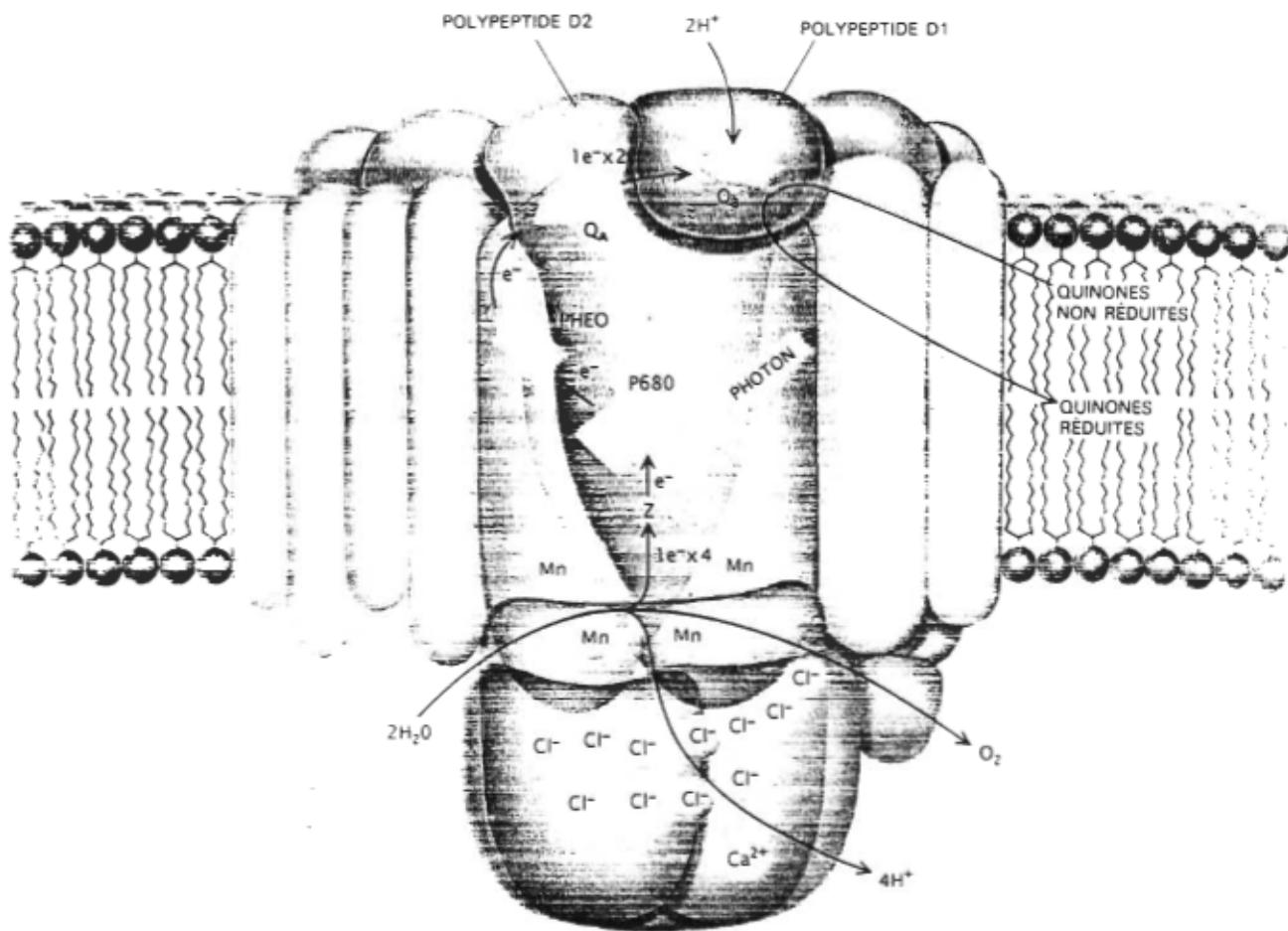


Figure 1.2.5.1. Schéma simplifié du photosystème II dans la membrane, en montrant les principales composantes (voir le texte).

protéines soient impliquées dans la liaison des co-facteurs au complexe de dégagement d'oxygène. La protéine de 33 kDa est liée directement aux protéines intrinsèques du centre réactionnel et de l'antenne proximale; son enlèvement résulte en un ralentissement marqué des cinétiques de relâche

de l'oxygène en solution (Miyao et al. 1987). Son rôle est aussi considéré comme étant de stabiliser le manganèse (Kuwabara et al. 1987).

### 1.3. Le mécanisme du dégagement d'oxygène

Le complexe de dégagement d'oxygène (CDO) utilise l'énergie des trous positifs qui lui parviennent du centre réactionnel P680 pour séparer l'oxygène de l'eau. L'accumulation de l'énergie de quatre trous par le complexe de manganèse dans le CDO est nécessaire pour la séparation de deux molécules d'eau en oxygène et 4 protons. A chacun des trous qui sont accumulés, correspond un état du CDO; ces états sont dénotés par le symbole  $S_n$ , où  $n$  représente le nombre de trous (de 0 à 4) qui ont été accumulés (Fig.1.3.1). Lors des passages de  $S_0$  à  $S_1$ , de  $S_1$  à  $S_2$ , de  $S_2$  à  $S_3$ , et de  $S_3$  à  $S_4$  les protons sont libérés de façon inégale; il y a respectivement 1, 0, 1, et 2 protons de libérés lors de ces transitions. Une fois l'état  $S_4$  atteint, les CDO retournent spontanément à l'état  $S_0$  avec dégagement d'oxygène (Joliot et Kok 1975).

#### 1.3.1. Le temps requis pour le dégagement d'oxygène

Le temps nécessaire pour la relâche de l'oxygène par le CDO a été mesuré premièrement en modulant l'intensité d'une source de lumière (Joliot 1965, Joliot et al. 1966). Le

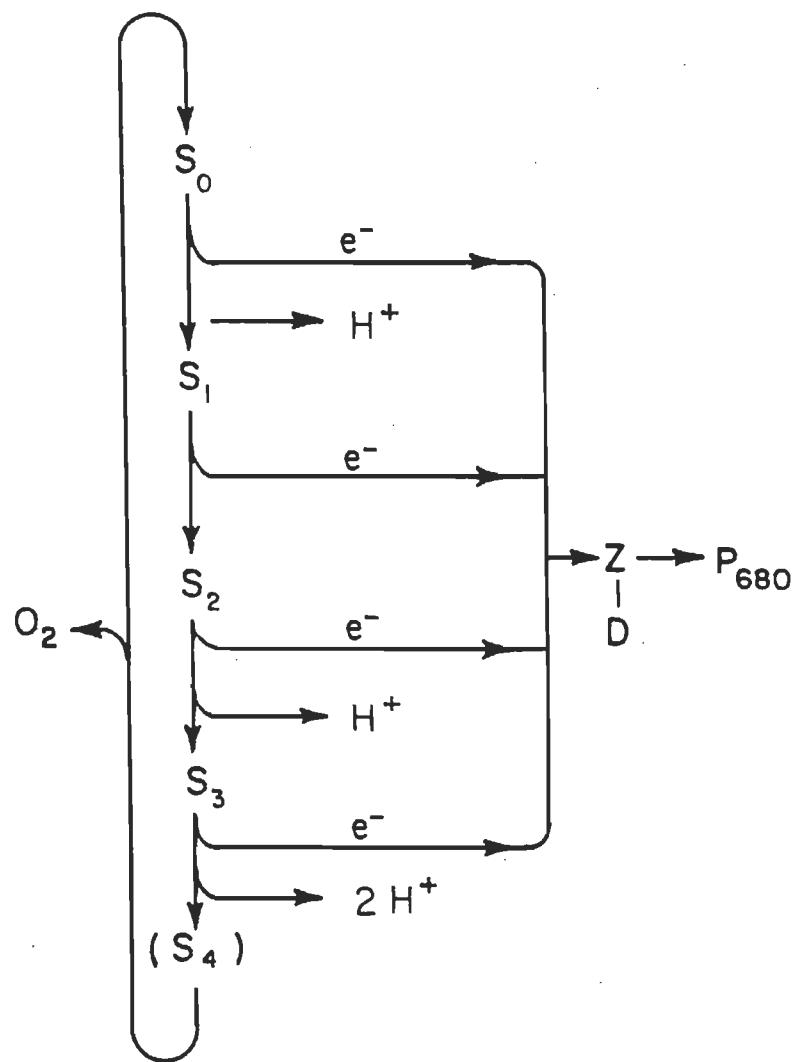


Figure 1.3.0.1. Représentation du cycle des états-S du CDO (voir le texte).

déagement d'oxygène était donc lui aussi modulé, jusqu'au point où la période de modulation devenait plus courte que le temps du déagement d'oxygène (multiplié par 2 "pi", pour raisons de vitesse angulaire). A ce point l'amplitude

modulée du dégagement d'oxygène chutait. Par cette technique, la formation de l'oxygène à la température de la pièce (constante de temps) a été mesurée en 1.2 ms (Joliot et al. 1966). Cependant, le temps de formation de l'oxygène devait être déconvolué des cinétiques de diffusion jusqu'à l'électrode détectrice; en utilisant un échantillon circulant à grande vitesse, il n'était plus nécessaire de déconvoluer les cinétiques de diffusion. Le dégagement d'oxygène a alors été mesuré comme étant près de 1 ms (Etienne 1968).

En utilisant des éclairs brefs, les transitions des états-S peuvent être contrôlées. On a alors trouvé que la transition de l'état S3 à S4, et de retour à S0, prenait un demi-temps de 0.36 ms (correspondant à une constante de temps de 0.52 ms) à 30°C et 2.5 ms (correspondant à une constante de temps de 3.6 ms) à 2°C (Bouges-Bocquet 1973). Le dégagement d'oxygène lors de la transition S3-(S4)-S0 dépend aussi du type d'organisme photosynthétique; dans l'algue *Chlorella* et dans les chloroplastes d'épinards, il faut respectivement 3.3 ms (Sinclair et Arnason 1974) et 4.7 ms (Arnason et Sinclair 1976). Un temps d'environ 2 ms a aussi été mesuré par une technique photoacoustique de détection de la production d'oxygène (Canaani et al. 1988). Cependant, en contradiction avec ces résultats, il a récemment été proposé, sur la base de mesures polarographiques de dégagement

d'oxygène, que des demi-temps variables de 30 à 130 ms (à 5°C) étaient nécessaires pour le dégagement d'oxygène dans les PSII (Plijter et al. 1988). Le temps requis pour le dégagement d'oxygène est donc encore incertain.

La controverse sur le temps requis pour le dégagement d'oxygène crée une ambiguïté au niveau de l'interaction entre le transport d'électrons linéaire et le dégagement d'oxygène. En effet, on a cru jusqu'à maintenant que la transition S3-(S4)-S0 produisait immédiatement de l'oxygène en environ 1 ms (Bouges-Bocquet 1973, Govindjee et al. 1985, Dekker and Gorkom 1987), et donc que le transport d'électrons du CDO à YZ était simultané avec le dégagement d'O<sub>2</sub>. Or il a été récemment proposé que l'émission d'oxygène se produisait de 30-130 ms après la transition S3-(S4)-S0 (Plijter et al. 1988), ce qui signifie que le transport d'électrons se produirait avant le dégagement d'oxygène. De plus, selon les auteurs, une deuxième transition S3-(S4)-S0 (après un cycle complet) ne pourrait se produire que si l'oxygène de la première transition a été libéré. Si ces propositions s'avèrent véridiques, alors il est possible que le transport d'électrons linéaire soit limité par le temps de libération de l'oxygène (Plijter et al. 1988).

### 1.3.2. Les états-S du modèle de Kok

L'étude du dégagement d'oxygène sous éclairs a conduit à la découverte d'oscillations de période quatre quand les

échantillons étaient auparavant adaptés au noir.

L'oscillation présente un maximum au troisième éclair et s'amortit progressivement, jusqu'à un niveau stationnaire (Fig.1.3.2, tirée de Joliot et al. 1969).

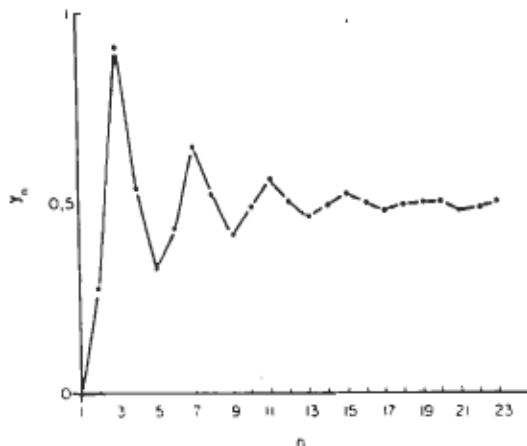


Figure 1.3.2.1. Quantités d'oxygène émises par des chloroplastes d'épinards isolés, illuminés par une série d'éclairs. L'intervalle entre les éclairs est de 300 ms, et "n" indique le numéro de l'éclair.

Afin d'expliquer la production d'oxygène obtenue sous éclairs, Kok et collègues (1970) ont proposé le modèle suivant. Un éclair suffisamment bref et intense, en moyenne, doit résulter en une séparation de charges par le centre réactionnel P680 et en l'accumulation d'une charge dans le CDO. On suppose que le complexe de dégagement d'oxygène se trouve dans un état déterminé uniquement par la quantité de charges y étant accumulée. Ils ont proposé que ces états soient dénotés par la lettre "S" suivie du nombre de charges

accumulées dans cet état. A chaque fois qu'une charge est ajoutée, ce nombre augmente de un, jusqu'à ce que suffisamment de charges soient accumulées pour qu'il y ait dégagement d'oxygène. Puisque quatre électrons sont libérés lors de l'oxidation de l'eau, quatre charges positives doivent être accumulées, et le dégagement d'oxygène s'effectue donc à partir de l'état S4. Après le dégagement d'oxygène, le CDO se retrouve dans l'état S0. Si dans un échantillon tous les CDOs étaient distribués au hasard dans tous les états possibles, le dégagement d'oxygène mesuré serait constant à chaque éclair. Pour expliquer le maximum de dégagement d'oxygène au troisième éclair dans des algues adaptées au noir, on suppose que la majorité des complexes de dégagement d'oxygène sont dans l'état S1 au début de la série d'éclairs. Trois éclairs font donc passer les CDOs de l'état S1 jusqu'à l'état S4 où le dégagement d'oxygène s'effectue. Dans le noir, les CDOs dans les états S3 et S2 retournent à l'état S1 (désactivation). Le temps nécessaire pour la perte des charges positives est appelé le temps de désactivation, et dépend de l'état S de départ, S3 ou S2 (Kok et al. 1970).

L'oscillation de période quatre de la production d'oxygène observée sous éclairs montre un amortissement progressif. Pour que cet amortissement se produise, les CDOs doivent être progressivement redistribués au hasard dans tous

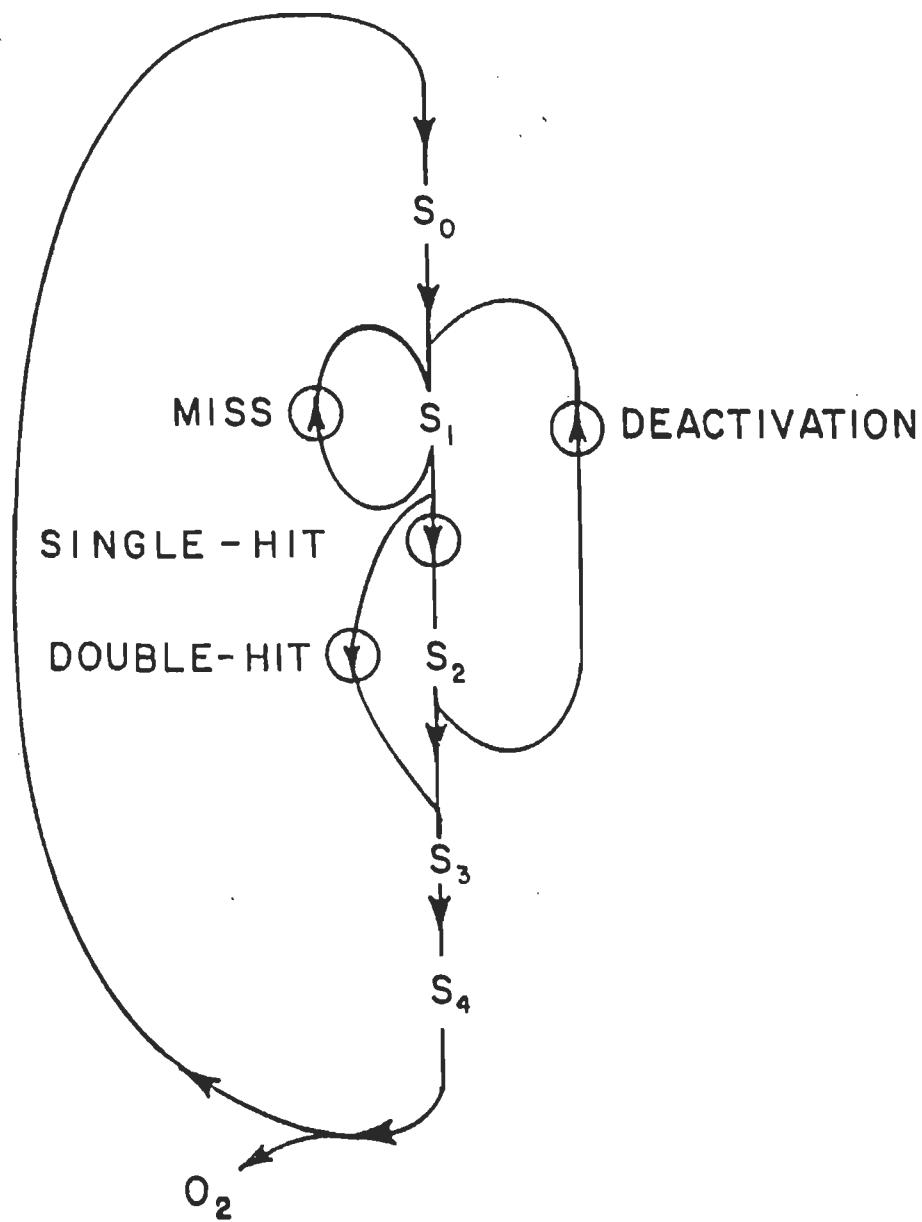


Figure 1.3.2.2. Représentation de l'effet d'un raté (miss), d'une transition simple (single-hit) et d'une double transition (double-hit) lors d'un éclair pour un CDO, à partir de l'état  $S_1$ . Dans le noir, des désactivations de  $S_3$  à  $S_2$  (non-montrées), et de  $S_2$  à  $S_1$  se produisent.

les états S possibles. On suppose que cette redistribution est causée par les phénomènes suivants (Fig.1.3.2.2):

a) La possibilité que, pendant un éclair, il n'y ait pas de séparation de charges, ou encore, qu'il y ait recombinaison de charges avant l'éclair suivant. En ces cas, on parle d'un raté ("miss"), parce que l'état du CDO n'a pas été changé par l'éclair. On peut supposer que l'origine des ratés est biologique plutôt que technique, puisque que la proportion de ratés demeure constante même quand l'intensité des éclairs est augmentée (Radmer et Kok 1975).

Effectivement, la probabilité de ratés est supérieure chez les algues entières que chez les chloroplastes (Lavorel 1976) ou les thylakoïdes isolés (Vermaas et al. 1984).

b) La possibilité, si l'éclair est assez long pour que deux photons soient convertis, que le centre réactionnel P680 effectue deux séparations de charges, et que deux charges soient accumulées dans le CDO. Dans ce dernier cas, il s'agit d'une double transition ("double-hit") (Forbush et al. 1971).

On assume que ces possibilités sont indépendantes de l'état S dans lequel se trouve le complexe de dégagement d'oxygène, i.e., qu'elles sont homogènes (Kok et al. 1970).

### 1.3.3. Les états-S négatifs

L'interprétation selon le modèle de Kok de la production d'oxygène a mis en évidence une anomalie sous le premier

éclair (Thibault 1978a, Thibault 1978b). En effet, la simulation numérique du modèle de Kok conduit à des résultats différents si le premier éclair est exclu de l'analyse. Dans ces conditions, la simulation numérique prédit une quantité relativement grande d'OEC dans l'état S3 dans le noir, alors qu'aucune production d'oxygène n'est observée au premier éclair. Cette incohérence disparaît si on suppose l'existence dans le noir d'un état plus réduit que S0, c'est-à-dire S-1 (Bader et al. 1983). Cependant l'état S-1 hypothétique est difficilement relié aux états du manganèse, contrairement aux autres états-S (Christou et Vincent 1988, Pecoraro 1988, Guiles et al. 1990); son existence demeure à être démontrée.

#### 1.3.4. Le modèle de Delrieu

Le modèle de Kok suppose que les probabilités de ratés (misses) et de doubles transitions (double-hits) sont indépendantes de l'état S dans lequel se trouve le complexe de dégagement d'oxygène (CDO) (Forbush et al. 1971). Cependant, quand des simulations numériques sont faites, les modèles attribuant les ratés de façon inégale aux états-S sont plus près des résultats expérimentaux (Delrieu 1974). Il a même été proposé que tous les ratés se produisaient dans l'état S2 (Delrieu 1983). De plus, l'existence de double-hits lors d'éclairs très courts (moins de 1 micro-seconde) est mise en doute par les faits suivants. Quand l'intensité

des éclairs est diminuée, on devrait s'attendre à une diminution de la proportion de doubles-transitions. Hors, les simulations numériques donnent le résultat contraire (Delrieu 1983). Ainsi, le modèle proposé par Delrieu comprend une probabilité de ratés importante sur un état-S, et pas de probabilité de double transition (à moins que l'éclair dure excessivement longtemps).

#### 1.3.5. Le modèle de Lavorel

L'introduction du concept des ratés a pour but d'expliquer l'amortissement progressif de la production d'oxygène. Cependant il a été remarqué que d'autres processus de redistribution au hasard des CDO dans les états-S sont possibles, par des mécanismes dits conservatifs (Lavorel 1978). Selon ce concept, les charges positives peuvent être emmagasinées de façon aléatoire dans les CDO. Ainsi, l'amortissement du dégagement d'oxygène s'explique sans perte de charges positives au contraire du mécanisme des ratés. Le plus récent modèle de ce type postule l'existence d'un transporteur de charges C. Son rôle serait de prendre deux charges positives aux CDO dans l'état S3 et les donner aux CDO dans l'état S0 (Lavorel et Maison-Peteri 1983).

#### 1.3.6. Représentation matricielle du dégagement d' $O_2$

Les propriétés du dégagement d'oxygène selon le modèle des états-S peuvent être mises en évidence par sa mise en

équations matricielles. La quantité de CDO dans chaque état-S est exprimée à l'aide d'un vecteur "S" de quatre nombres, pour les quatre états-S stables. Une matrice carrée de quatre rangées et quatre colonnes "K" décrit les probabilités de transition de chaque état-S à tous les autres. A chaque éclair, le nouveau vecteur décrivant la proportion de CDO dans chaque état-S est trouvé en multipliant l'ancien vecteur par la matrice de transition K:

$$[1.3, 1] \quad S_{n+1} = K S_n$$

où la matrice de transition K dépend du modèle de la production d'oxygène, et  $S^n$  est le vecteur décrivant la quantité de CDO dans chaque état-S au  $n^{\text{ème}}$  éclair. On remarquera que la distribution des états-S à l'éclair  $n+1$  ne dépend que de la distribution à l'éclair  $n$ , puisque la matrice K est supposée constante. Le dégagement d'oxygène est donc un processus de Markov, i.e. un processus où l'état suivant un événement ne dépend que de l'état présent du système (Delrieu 1974).

Le dégagement d'oxygène est une fonction de la quantité de CDO dans les états S3 et S2, et des probabilités de ratés et de double transition:

$$[1.3, 2] \quad Y = S_3 (1 - P(\text{raté})) + S_2 P(\text{double transition})$$

où Y est le dégagement d'oxygène, P() dénote la probabilité de l'événement entre parenthèses et  $Sx$  dénote la quantité de

CDO dans l'état-S numéro x. Soit D un vecteur horizontal de 4 éléments (N.B.: le vecteur D n'est jamais explicitement mentionné dans les références qui traitent du sujet; son existence est cependant nécessaire au traitement matriciel du dégagement d'oxygène. Le développement qui suit est donc une reconstitution par l'auteur):

$$[1.3, 3] \quad D = [0, 0, P(\text{double transition}), 1-P(\text{raté})]$$

et S un vecteur vertical de quatre éléments:

$$[1.3, 4] \quad S = [S_0, S_1, S_2, S_3]$$

En multipliant le vecteur des états-S par un vecteur de dégagement d'oxygène D, on obtient un nombre scalaire qui est la quantité d'oxygène produite à l'éclair n:

$$[1.3, 5] \quad Y_{n+1} = D \cdot S_n$$

où  $Y_{n+1}$  est la quantité d'oxygène produite à l'éclair  $n+1$ , et où  $S_n$  est le vecteur des états-S après l'éclair n. On remarquera que l'équation [1.3, 1] peut s'écrire aussi:

$$[1.3, 6] \quad S_n = K^n \cdot S_0$$

où la matrice K a été élevée à la puissance n. En combinant les équations 5 et 6, on obtient:

$$[1.3, 7] \quad Y_{n+1} = D \cdot K^n \cdot S_0$$

ce qui exprime le dégagement d'oxygène à n'importe quel éclair à partir de la distribution des états-S de départ. Donc, exprimé au moyen de matrices, le dégagement d'oxygène

peut être prédit à n'importe quel éclair en connaissant la matrice  $K$  (le vecteur  $D$  est un sous-ensemble de la matrice  $K$ ) et le vecteur  $S$  de départ.

La représentation matricielle du dégagement d'oxygène possède à première vue 20 inconnues, dont 16 dans la matrice  $K$  et quatre dans le vecteur des états- $S$ . Cependant plusieurs de ces variables sont liées: la somme des probabilités de transition pour chaque état- $S$  doit donner 100%, et la somme des proportions de CDO dans chaque état- $S$  doit aussi donner 100%. Il reste donc 15 variables à connaître.

#### 1.3.7. L'équation de récurrence du dégagement d' $O_2$

Puisque le dégagement d'oxygène peut être mis sous forme matricielle, les théorèmes mathématiques qui s'appliquent aux matrices s'appliquent au dégagement d'oxygène. Le théorème de Cayley-Hamilton (Gille et Clique 1984) permet d'écrire (N.B.: le développement qui suit n'est pas exposé dans aucune des références qui traite du sujet, et est donc une reconstitution par l'auteur):

$$[1.3, 8] \quad K^4 + a_3 K^3 + a_2 K^2 + a_1 K^1 + a_0 K^0 = 0$$

où les coefficients  $aX$  sont les traces de la matrice  $K$ . En multipliant le vecteur des états- $S$  par l'équation [1.3, 8], on obtient:

$$[1.3, 9] \quad K^4 S_n + a_3 K^3 S_n + a_2 K^2 S_n + a_1 K^1 S_n + a_0 K^0 S_n = 0$$

et en multipliant par le vecteur D en tenant compte de l'équation [1.3, 7], on obtient l'équation de récurrence du dégagement d'oxygène (Lavorel 1976, Thibault 1978b):

$$[1.3, 10] \quad Y_{n+4} + a_3 Y_{n+3} + a_2 Y_{n+2} + a_1 Y_{n+1} + a_0 Y_n = 0$$

où  $Y_n$  représente le dégagement d'oxygène au  $n^{\text{ème}}$  éclair, et les  $a_X$  sont alors appellés coefficients sigma. Cette équation récurrente permet de calculer le dégagement d'oxygène à n'importe quel éclair, une fois que le dégagement d' $O_2$  est connu sur les quatre premiers éclairs. Comme les coefficients sigma sont aussi inconnus a priori, au total huit éclairs sont nécessaires pour définir toutes les inconnues. La loi de récurrence du dégagement d'oxygène a donc huit degrés de liberté; il s'ensuit que seulement 8 variables peuvent être déduites des données de dégagement d'oxygène. Cependant la représentation matricielle possède 15 variables à déterminer; il est donc impossible à partir de données de dégagement d'oxygène de déduire toutes les inconnues (Delrieu 1974). Conséquemment, les modèles de dégagement d'oxygène ont sept degrés de liberté qui sont indéterminés. Cela implique qu'il n'y a pas de solution unique, i.e. plusieurs modèles différents de dégagement d'oxygène pourraient prédire de façon exacte le dégagement d'oxygène (Lavorel 1978).

L'équation de récurrence a aussi une application pratique très importante. Il peut être démontré que le coefficient  $a_0$ , parce qu'il est la première trace de la

matrice de transitions  $K$ , est égal à la somme des probabilités de ratés sur les quatre états- $S$ . Elle permet donc de déterminer la moyenne des probabilités de ratés indépendamment du modèle choisi pour expliquer les états- $S$ . Donc, elle donne une méthode objective (parce qu'indépendante du choix d'un modèle) pour l'évaluation de l'amortissement de la production d'oxygène (Lavorel 1976, Thibault 1978).

#### 1.3.8. Les désactivations des états- $S$

Pour expliquer le maximum de dégagement d'oxygène au troisième éclair dans des algues adaptées au noir, on suppose que la majorité des complexes de dégagement d'oxygène sont dans l'état  $S1$  au début de la série d'éclairs. Ceci implique que dans le noir, les CDOs dans les états  $S3$  et  $S2$  retournent à l'état  $S1$  par désactivation. Jusqu'à maintenant, deux mécanismes ont été identifiés pour les désactivations: par recombinaisons de charges (Robinson et Crofts 1983), et par l'intermédiaire d'agents catalyseurs nommés agents ADRY (Renger 1971).

##### 1.3.8.1. Désactivations par recombinaisons de charges

Le temps nécessaire pour la perte des charges positives est appelé le temps de désactivation, et dépend non seulement de l'état  $S$  de départ,  $S3$  ou  $S2$ , mais aussi de l'état rédox des accepteurs d'électrons du PSII (Diner 1977). La raison en est que les charges positives doivent être neutralisées

par un même nombre d'électrons. Ces électrons peuvent provenir des accepteurs d'électrons du PSII, qui par transport renversé d'électrons, reviennent à l'accepteur primaire I (phéophytine). Le trou du CDO revient au centre réactionnel, et effectue une recombinaison de charges avec l'électron (Robinson et Crofts 1983). Une autre possibilité est que le donneur d'électrons YD, quand il est sous forme réduite, donne un électron pour réduire les états-S (Vermaas et al. 1984).

#### 1.3.8.2. Les agents ADRY

Les désactivations des états  $S_1$  et  $S_2$  peuvent être accélérées par l'addition de produits chimiques, les agents ADRY (où ADRY est l'abréviation de "Acceleration of the Deactivation Reactions of the water-oxidizing enzyme system Y") (Renger 1971). L'incubation de chloroplastes avec des agents ADRY inhibe le dégagement d'oxygène et la réduction du DCPIP (Renger 1971, Packham et Barber 1983).

Il a été proposé que les agents ADRY pouvaient induire un transport cyclique d'électrons autour du PSII, et que les désactivations des états-S étaient induites par une donation d'électrons du côté oxidant du PSII (Renger 1973). Il a été démontré que la source des électrons n'était pas les agents ADRY eux-mêmes; les agents ADRY ne sont que des catalytes de la réaction (Hanssum et al. 1985). Dans la recherche de la source d'électrons, il a été trouvé que la réduction des

états-S par l'effet ADRY n'était pas due à Qa- (Homann 1971, Hanssum et al. 1985). Les agents ADRY provoquent l'oxidation des caroténoïdes; cependant il a été démontré que ce n'était qu'un effet secondaire, et que les caroténoïdes n'étaient pas la source des électrons de l'effet ADRY (Packham et Ford 1986). On croit que le cytochrome b-559 est incapable de donner suffisamment d'électrons, et l'hypothèse d'un transport cyclique d'électrons a été délaissée (Hanssum et al. 1985) (Note de l'auteur: sans preuve expérimentale rapportée). Donc, la source d'électrons pour l'effet ADRY demeure inconnue (Hanssum et al. 1985).

#### 1.4. Objectifs de la recherche présentée

Il apparaît au cours de l'examen du mécanisme de dégagement d'oxygène que l'information disponible lors des mesures est limitée. En effet, les mesures ne permettent pas la détermination de plus de huit variables sur quinze (c.f. équation de récurrence). On doit alors recourir à des modèles afin d'exprimer l'information disponible sous une forme utile, qui doit posséder un sens physique comme les probabilités de transition. Puisque seulement huit variables peuvent être déterminées, les modèles doivent donc effectuer des hypothèses pour réduire le nombre d'inconnues de 15 à un maximum de 8. Présentement, le modèle utilisé couramment est le modèle de Kok qui effectue les hypothèses que les probabilités de transition sont égales pour tous les états-S

(homogènes), et qu'il n'y a pas de probabilité de triple transition; ces hypothèses réduisent donc le nombre d'inconnues à 5. Cependant la façon de réduire les 15 inconnues, si elle est inadéquate, produira un modèle qui ne pourra pas être parfaitement adapté aux données. Ainsi, les différents modèles de dégagement d'oxygène peuvent différer des données, par des hypothèses inadéquates, même si en théorie il y a indétermination. Mais de par le grand nombre de variables qui sont réduites, les dégagements d'oxygène prédits par les modèles diffèrent relativement peu. De plus, l'information contenue dans les oscillations du dégagement d'oxygène disparaît rapidement de par leur amortissement, et la précision des mesures est souvent limitante. Donc, afin de distinguer le modèle effectuant les meilleures hypothèses, une grande précision dans les mesures m'apparaît nécessaire. De plus, il faudrait aussi modifier l'approche expérimentale classique afin de pouvoir retrouver des informations supplémentaires. Ceci demande le développement d'un nouveau système de mesure, qui démontre un haut niveau de flexibilité et de précision.

On remarquera que la modélisation du dégagement d'oxygène se heurte présentement à un obstacle de taille: la nature même du mécanisme d'amortissement de l'oscillation de la production d'oxygène est inconnue. Présentement, deux hypothèses s'affrontent: l'amortissement peut être dû à une

perte au hasard des trous accumulés, ou au contraire à leur redistribution au hasard (conservatrice) par un transporteur d'électrons mobile. Je me suis donc fixé comme objectif primordial d'éclaircir la nature des ratés.

La probabilité de ratés (i.e. l'amortissement de la production d' $O_2$ ) contient une contribution due aux désactivations (Radmer et Kok 1975), dont l'impact est présentement inconnu et qui est par conséquent négligé. Je propose donc comme autre objectif d'étudier l'étendue et le comportement des ratés causés par les désactivations.

Les désactivations étant dues à un transport d'électrons renversé, il est intéressant de noter l'ambiguïté dans l'interaction entre le transport d'électrons et le CDO. En effet, le transport d'électrons linéaire et le dégagement d'oxygène pourraient ne pas être simultanés, mais le temps du dégagement d'oxygène pourrait limiter le transport d'électrons linéaire (c.f. 1.3.1, le temps du dégagement d'oxygène). Ainsi, il est fondamental pour la compréhension du mécanisme de dégagement d'oxygène de vérifier la correspondance du temps de dégagement d'oxygène avec le temps du transport d'électrons.

## CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES2.1. Choix des algues *Dunaliella tertiolecta*

Les algues du genre *Dunaliella* font partie de l'ordre des Volvocales, division Chlorophyta. Ce sont des eukaryotes unicellulaires possédant un seul chloroplaste, qui occupe près de 50% du volume cellulaire. Elles sont adaptées au milieu marin, duquel elles sont séparées seulement par une membrane plasmique. Leur adaptation au milieu marin permet d'utiliser une grande concentration de NaCl (330 mM) dans les expériences de dégagement d'oxygène; ceci est essentiel pour une bonne conductivité et un bon signal (voir section 2.2.2.). De plus, l'absence de paroi cellulaire cellulosique permet l'ajout plus aisément d'effecteurs biochimiques, et représente une barrière de moins pouvant ralentir la diffusion de l'oxygène jusqu'aux électrodes. Cette espèce est déjà largement utilisée pour les expériences de photosynthèse, et est bien caractérisée (Ben-Amotz 1980, Aoki et al. 1986, Sukenic et al. 1987). La portée des résultats n'est pas limitée par l'utilisation d'algues, car le photosystème II est commun aux plantes vertes et aux algues vertes (Foyer 1984).

Les algues ont été obtenues de la North East Pacific Culture Collection, et ont été cultivées dans un milieu marin

artificiel (Harrison et al. 1980). Afin de maintenir le pH constant à 7.5 dans le milieu, 10 mM de tampon HEPES était ajouté au milieu de culture. Les produits chimiques pour la composition du milieu étaient achetés de la compagnie Sigma. Les conditions de la culture étaient maintenues à 18°C par un bain thermostaté, sous une illumination d'environ 10 mW/cm<sup>2</sup> (composée de tubes fluorescents "Grolux" de Sylvania et lampes incandescentes). Pour les expériences, les algues étaient récoltées après quatre jours, en accord avec le protocole élaboré précédemment (Samson 1988). Les algues étaient centrifugées à l'aide d'une micro-centrifuge Fisher (modèle 235B), et amenées à une concentration de 80 µg Chl/ml. La concentration des algues était mesurée dans l'acétone à 80% selon la méthode décrite par Strain et al. (1972). Les algues ainsi concentrées étaient alors immédiatement déposées sur les électrodes (une centrifugation par mesure).

## 2.2. La mesure de la production d'oxygène

Pour mesurer la production d'oxygène sous éclairs, il est nécessaire d'utiliser la méthode la plus rapide, car le temps de réponse de l'appareillage dicte l'intervalle minimum entre les éclairs. Si l'intervalle est trop long, les états-s auront le temps de se désactiver et les oscillations du dégagement d'oxygène seront faibles. La méthode de détection la plus rapide de la production d'oxygène des organismes

photosynthétiques est la réduction électrochimique de l'oxygène par une électrode de platine nue (sans membrane de dialyse, en opposition avec l'électrode dite "de Clark"). Le développement et l'utilisation de cette électrode remonte à un certain temps (Haxo et Blinks 1950, Myers et Graham 1963, Joliot et al. 1968), et elle constitue depuis une méthode standard en photosynthèse (Joliot et al. 1971, Fork 1972, Chow et al. 1989).

#### 2.2.1. Les électrodes

Afin de catalyser la réduction de l'oxygène, le métal le plus efficace est le platine (Hoare 1968). Le platine adsorbe l'hydrogène (Frumkin 1963) et l'oxygène (Hoare 1985), et forme donc un milieu idéal pour leur combinaison en eau. Il est reconnu que l'électrode de platine réduit l'oxygène en deux étapes, dont la première est la production de peroxyde d'hydrogène, et la deuxième est la décomposition catalytique du peroxyde en oxygène et en eau (revue par Hoare 1968). Le peroxyde d'hydrogène qui est produit lors de la réduction de l'oxygène est décomposé de façon très efficace par le platine. En effet, la décomposition est plus rapide que la production jusqu'à des densités de courant de l'ordre de  $10^{-4}$  A/cm<sup>2</sup> (Hoare 1968). Or, la densité de courant moyenne dans l'électrode utilisée est de l'ordre de  $10^{-5}$  à  $10^{-6}$  A/cm<sup>2</sup>. La décomposition du peroxyde procède donc à un taux au moins 10

fois plus rapide que sa production. L'équation globale qui en résulte s'écrit ainsi (Appleby et Savy 1978):



et le courant mesuré est donc proportionnel à la quantité d'oxygène étant réduite par unité de temps.

Les fractions membranaires enrichies en PSII (inside-out thylakoids) qui sont utilisées pour des analyses de dégagement d'oxygène sous éclairs (Delrieu 1983, 1987), laissent le CDO exposé directement à la solution. S'il arrivait que quelques molécules de peroxyde échappent à l'action de l'électrode, ceci affecterait le CDO; or aucun effet de la sorte dû à l'électrode n'a jamais été rapporté dans ces fractions membranaires (Delrieu 1983, 1987). Les algues utilisées opposent des barrières supplémentaires: pour atteindre le CDO, le peroxyde devrait traverser la membrane externe de la cellule, le cytoplasme, la double membrane du chloroplaste, le stroma, et la membrane du thylakosome. De plus, durant ce trajet, le peroxyde est détruit par les mécanismes de défense très forts des algues, spécifiques au peroxyde d'hydrogène (Foyer 1984, Lawlor 1987). La très faible quantité de peroxyde d'hydrogène pouvant peut-être échapper à l'électrode n'est donc pas à considérer ici.

Afin de compléter le circuit électrique, il est nécessaire d'ajouter une contre-électrode. L'électrode la plus stable qui est compatible avec un milieu biologique est

l'électrode de chlorure d'argent (Ag/AgCl) (Feder 1968). Son fonctionnement est selon l'équation suivante (Janz et Ives 1968):



et en maintenant l'électrode de platine entre -0.6 et -0.9 volts par rapport à l'électrode de chlorure d'argent, tout l'oxygène entrant en contact avec l'électrode sera réduit (Joliot et al. 1968). En présence d'un électrolyte (NaCl, KCl) en concentrations suffisantes, le courant est alors limité par la diffusion de l'oxygène; on dit que l'électrode de platine est polarisée, alors que l'électrode d'argent est dite impolarisable. De façon équivalente, on dit aussi que l'électrode de platine est l'électrode de travail tandis que l'électrode d'argent est la contre-électrode (Crow 1988). En conséquence, l'électrode qui a été utilisée pour les expériences suivantes est constituée d'un disque de platine, sur lequel l'échantillon est déposé. Le disque de platine est entouré d'un disque d'argent qui réalise la contre-électrode (la configuration de l'électrode est décrite en section 2.2.3).

Afin de compléter le circuit électrique entre les électrodes, j'ai utilisé un gel de polyacrylamide (à 30%) de 2 mm d'épaisseur, posé sur les électrodes. Le gel était fabriqué en utilisant 30% d'acrylamide (poids/volume), 0.8% de bisacrylamide, 0.333 ml de persulfate d'ammonium en

solution (à 10%) et 10  $\mu$ L de TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine) par 100 ml de solution (ces produits étaient obtenus de la compagnie Sigma). La solution était dégazifiée avant l'ajout du TEMED par une pompe à pression d'eau, puis polymérisée entre deux plaques de verre maintenues parallèles à une distance de 1.6 mm. Le gel était ensuite enlevé du moule et rincé dans de l'eau distillée; il atteignait alors une épaisseur de 2 mm. Le gel était ensuite trempé dans l'électrolyte (le milieu de culture des algues). Avant la mesure, le bain d'électrolyte était changé cinq fois à intervalles d'au moins deux heures.

#### 2.2.2. Etude des conditions optimales de mesure (Meunier et Popovic 1988a):

En photosynthèse, les circuits utilisés pour appliquer une tension de polarisation entre 0.6 et 0.9 V aux électrodes sont de simples diviseurs de tension constitués de résistances. Le courant est alors mesuré avec une résistance (Delieu et Walker 1972, Swenson et al. 1987), ou encore avec une bobine de transformateur (Joliot et Joliot 1968, Delrieu 1983, Boussac et al. 1985) en série avec le diviseur de tension. Cependant, les circuits de polarisation ainsi faits ne maintiennent pas la tension de polarisation constante, parce que la résistance (ou la bobine) cause une chute de tension dépendant du courant de détection. Au contraire, un

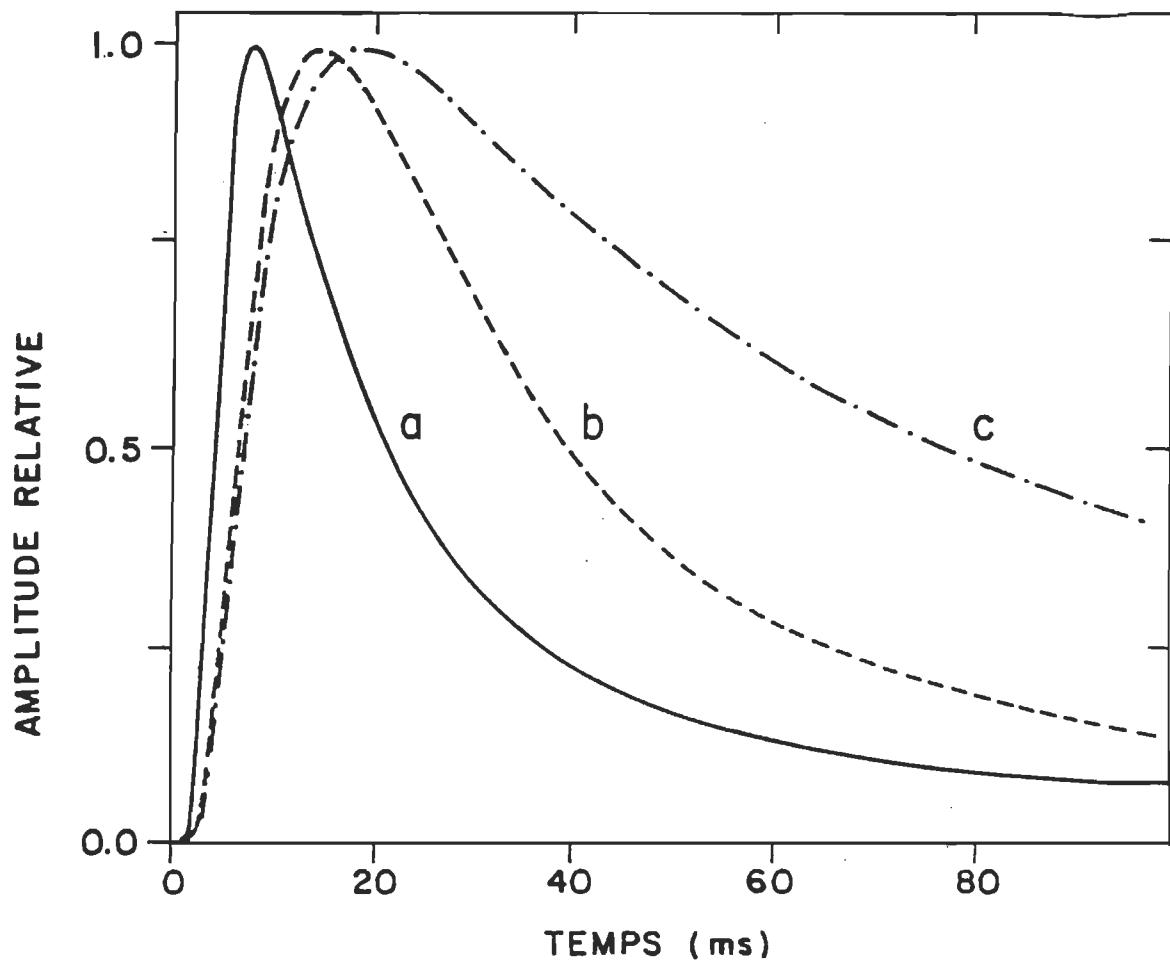


Figure 2.2.2.1. Amplitudes normalisées du courant après un éclair en fonction du temps, résultant de la réduction de l'oxygène produit par l'algue D. tertiolecta. La courbe a a été obtenue avec un potentiostat et le gel de polyacrylamide. La courbe b a été obtenue avec une résistance de 1000 ohms en série avec le potentiostat. Pour la courbe c, le gel a été remplacé par une membrane de dialyse équivalente à une résistance de 2600 ohms.

potentiostat maintient le même voltage de polarisation indépendemment du courant (von Fraunhoffer et Banks 1972).

J'ai donc étudié l'effet sur les mesures de l'utilisation d'un circuit résistif ou d'un potentiostat (Fig.2.2.2.1.). Après la déposition d'un échantillon d'algues sur l'électrode de platine, les algues étaient adaptées au noir pendant cinq minutes. Cette figure montre le courant résultant de la réduction de l'oxygène suivant le troisième éclair (d'une lampe au xénon). Les cinétiques obtenues avec un potentiostat sont représentées par la courbe a, et sont caractérisées par une constante de temps de 23 ms pour le retour à la ligne de base. La courbe b a été obtenue en mesurant la production d'oxygène avec un circuit résistif possédant une résistance équivalente de 1000 ohms. La constante de temps pour le retour à la ligne de base est alors de 42 ms. Ceci montre qu'une résistance de seulement 1000 ohms est suffisante pour ralentir considérablement le temps de récupération du système.

Que la résistance soit contenue dans le circuit de polarisation ou ailleurs a le même effet (courbe c). Ceci peut être démontré en diminuant l'épaisseur de l'électrolyte afin d'augmenter la résistance entre les électrodes. Précédemment, l'électrolyte était contenu dans un gel de polyacrylamide (à 30%) de 2 mm d'épaisseur, posé sur les électrodes. Ce gel contient  $1,6 \text{ kg m}^{-2}$  d'eau, ce qui est

équivalent à une couche de 1,6 mm d'épaisseur d'eau de mer entre les électrodes. Les électrodes sont sous forme d'anneaux concentriques (c.f. section 2.2.3.); la résistance d'un gel, entre deux rayons, se calcule comme étant:

$$[2.2, 1] \quad R = \ln(r_2/r_1)/(2\pi\sigma E)$$

où R est la résistance,  $r_2$  est le rayon extérieur (6.5 mm),  $r_1$  est le rayon intérieur (3.3 mm),  $\sigma$  est la conductivité de l'eau de mer (environ  $3.2 \Omega^{-1}m^{-1}$ ) et E est l'épaisseur du gel. La résistance entre les électrodes est donc d'environ 21 ohms.

Auparavant, une membrane de dialyse a été utilisée pour contenir l'électrolyte (Chandler and Vidaver 1971, Swenson et al. 1987). En utilisant une membrane de dialyse (Spectra/Por 4, de la compagnie Spectrum) qui peut contenir approximativement  $0.013 \text{ kg m}^{-2}$  d'eau de mer, l'épaisseur équivalente d'eau de mer entre les électrodes est de  $13 \mu\text{m}$ . Ceci correspond à une résistance équivalente de 2600 ohms. Puisque avec une résistance de 1021 ohms (gel + circuit) la constante de temps est de 42 ms, avec 2600 ohms la constante de temps devrait être de 107 ms. En remplaçant le gel de polyacrylamide par la membrane de dialyse, les cinétiques obtenues suivent la courbe C. La constante de temps vaut alors 104 ms, ce qui correspond à ce qui a été calculé. Ceci démontre clairement que la constante de temps est

proportionnelle à la somme de toutes les résistances dans le circuit.

Une constante de temps (s) est le produit de la résistance (ohms) et de la capacité (Farads). Il y a donc une capacité dans le système; une constante de temps de 42 ms avec une résistance de 1021 ohms demande une capacité de 41  $\mu$ F. La source de capacité la plus importante dans ce système est la capacité due à l'adsorption de l'hydrogène sur les électrodes de platine (Frumkin 1963, Gilman 1969). L'adsorption de l'hydrogène se produit selon l'équation suivante:



où Hads dénote un atome d'hydrogène qui est adsorbé, le proton  $H^+$  provient de la solution, et l'électron provient de l'électrode. Lorsque le potentiel entre l'électrode et la solution change, le nombre d'atomes adsorbés change aussi, ce qui produit un courant. Les atomes d'hydrogène adsorbés se comportent donc comme une capacité (Frumkin 1963).

La combinaison d'une résistance et d'un capacité produit donc un filtre RC qui ralentit la réponse des électrodes. L'effet des fortes constantes de temps est plus évident quand les algues sont éclairées avec un plus grand nombre d'éclairs (Fig.2.2.2.2.). En A, le contact entre les électrodes est effectué avec une membrane de dialyse, alors qu'en B, le gel de polyacrylamide est utilisé. On reconnaît le profil normal

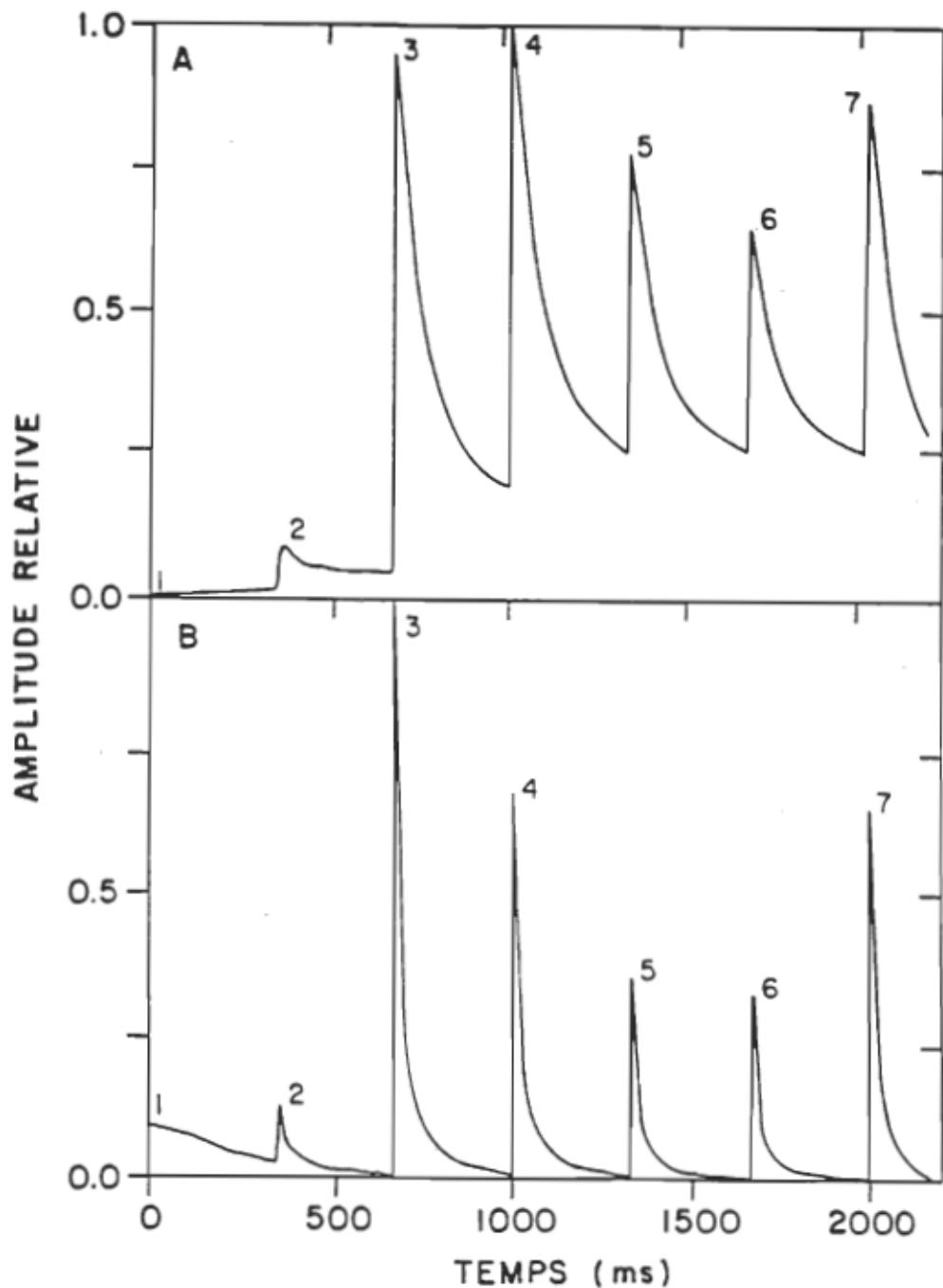


Figure 2.2.2.2. Séquence de production d'oxygène sous éclairs par des algues D. tertiolecta laissées à l'obscurité pendant 120 s (le courant est indiqué en unités relatives). Les mesures ont été faites en A avec une membrane de dialyse entre les électrodes, et en B avec un gel de polyacrylamide.

du dégagement d'oxygène sous éclairs d'échantillons adaptés à l'obscurité (Joliot et al. 1969, Delrieu 1980, Jursinic 1981). Les numéros des éclairs sont indiqués sur la figure à côté des impulsions de production d'oxygène y correspondant.

La lente descente du signal obtenue avec la membrane à dialyse cause un empilement des impulsions; le courant n'a pas eu le temps de retourner à la ligne de base quand l'éclair suivant est donné. Cet empilement rend difficile l'évaluation précise des amplitudes de production d'oxygène et requiert une technique de déconvolution des impulsions (Swenson et al. 1987). Ce phénomène est absent en B, avec le gel de polyacrylamide. Il est préférable de se passer de la déconvolution (Swenson et al. 1987), car elle introduit des erreurs supplémentaires.

Les effets précédents démontrent que la résistance totale entre les électrodes est un facteur important, et qu'elle doit être minimisée. La résistance maximum que l'électrolyte peut posséder est calculée aisément:  $23 \text{ ms}/41 \mu\text{F} = 560 \Omega$ . Puisque la capacité est dépendante de la surface de l'électrode, il est plus pratique d'exprimer cette condition sous forme de conductance minimale de l'électrolyte:  $1/560 \Omega/33 \text{ mm}^2 = 54 \Omega^{-1} \text{ m}^{-2}$ . Comme les conditions expérimentales peuvent varier, et que la capacité d'une autre électrode de platine peut être plus grande que celle de notre système (Frumkin 1963), une marge de sécurité

idéale serait d'augmenter la conductance d'un facteur de 10, à  $540 \Omega^{-1} m^{-2}$ . Ce critère est facilement atteignable, puisque la conductance dans notre système est de 1440  $\Omega^{-1} m^{-2}$ .

Les algues (et les plantes) doivent être adaptées au noir afin de montrer l'oscillation caractéristique du dégagement d'oxygène sous éclairs (Joliot et al. 1969). Cependant, le temps de polarisation de l'électrode avant les mesures peut influencer les résultats (Fig.2.2.2.3.). En a, les électrodes ont été polarisées durant toute la période d'adaptation au noir. En b, elle n'ont été polarisées que pendant 10 s avant l'expérience. Quand les électrodes ont été polarisées durant toute la période d'adaptation au noir (330 s), la quantité moyenne d'oxygène produit augmente avec le numéro de l'éclair. Au contraire, le dégagement d'oxygène oscille normalement autour d'une valeur moyenne (Joliot et al. 1969, Forbush et al. 1971). De plus, l'impulsion de production d'oxygène au troisième éclair est normalement celle de plus grande amplitude (courbe b); elle est cependant plus petite que la plupart des autres impulsions après un long temps de polarisation (courbe a).

Ceci peut être expliqué par ce que durant tout le temps d'adaptation au noir, l'électrode consomme de l'oxygène. Donc, après cinq minutes de polarisation, les algues sont stressées par une basse concentration en oxygène. Il est

connu que des conditions anaérobiques inhibent le dégagement d'oxygène (Diner 1977, Bruce et al. 1983, Popovic et al. 1984). Il est donc probable que l'effet des longs temps de polarisation soit dû aux basses concentrations en oxygène.

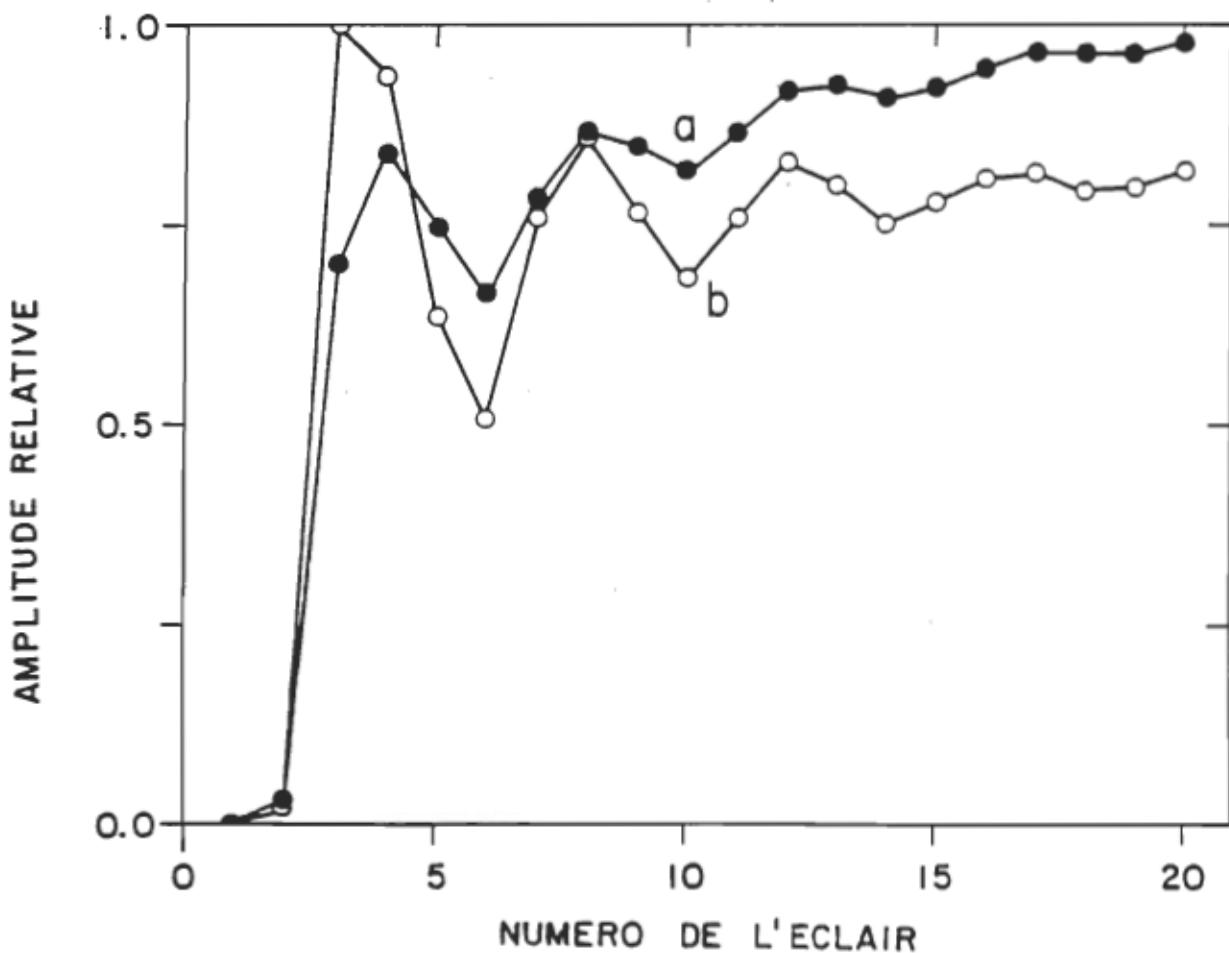


Figure 2.2.2.3. Amplitudes normalisées de production d'oxygène par l'algue D. tertiolecta en fonction du numéro de l'éclair. En a, les électrodes ont été polarisées durant toute la période d'adaptation au noir (330 s). En b, les électrodes ont été polarisées juste avant la mesure.

En conclusion, l'utilisation d'un potentiostat, négligée en photosynthèse, est nécessaire pour un bon temps de réponse des électrodes. De plus, je propose comme critère une épaisseur d'électrolyte possédant une conductance de  $540 \Omega^{-1}$  par  $m^2$  de surface de l'électrode de platine afin de garantir la réponse la plus rapide. Ceci rend les techniques de déconvolution inutiles. Les mesures sont aussi sensibles au temps de polarisation, qui devrait être minimisé afin d'obtenir des mesures fiables. La dépendance de l'oscillation du dégagement d'oxygène envers le temps de polarisation est probablement due à une inhibition causée par les basses concentrations d'oxygène.

2.2.3. Développement du polarographe (Meunier et Popovic 1988b):

D'après l'étude des conditions optimales de mesure, le polarographe idéal devrait posséder un circuit de polarisation avec une impédance aussi faible que possible (potentiostat). Le temps de polarisation des électrodes doit aussi être contrôlé précisément. Pour un maximum de flexibilité, de précision, de reproductibilité et de convenance, le système est basé sur un ordinateur.

L'ordinateur (IBM-PC) occupe une position centrale, d'où il peut assister l'expérimentateur avec un maximum d'efficacité. L'ordinateur peut envoyer un signal au potentiostat pour (dé)polariser les électrodes, ou à la lampe

au xénon pour déclencher des éclairs. Il contrôle le convertisseur analogue-digital (ADC), duquel il tire les valeurs digitalisées du courant. A la commande de l'utilisateur, il peut filtrer, traiter et analyser les données ou les sauvegarder sur disque. Les données peuvent aussi être envoyées à une table traçante, sous forme d'un graphique du courant en fonction du temps.

L'ordinateur est relié à la lampe à éclairs par la sortie parallèle LPT2 (pin 2; c.f. Fig.2.2.3.1.). Une transition de niveau logique bas à haut sur cette ligne est convertie en impulsion de 65 ns par un circuit différentiateur logique. J'ai choisi d'utiliser un différentiateur logique parce que le signal provenant de l'ordinateur peut être sujet à des impulsions parasites ("glitch"). Le différentiateur agit comme tampon et permet d'empêcher de faux déclenchements de la lampe à éclairs. L'impulsion du différentiateur est amplifiée en courant par le transistor MJE-170, et active le redresseur contrôlé au silicium (SCR) #ECG 5351. Le SCR permet alors la décharge d'un petit condensateur de 0.25 uF chargé à 140 V dans les bobinages du "Lite-Pac" FY-712 de EG&G, ce qui génère une étincelle. Cette étincelle produit un chemin de gaz ionisé, qui conduit l'électricité entre les deux électrodes principales de la lampe; ceci produit un éclair en

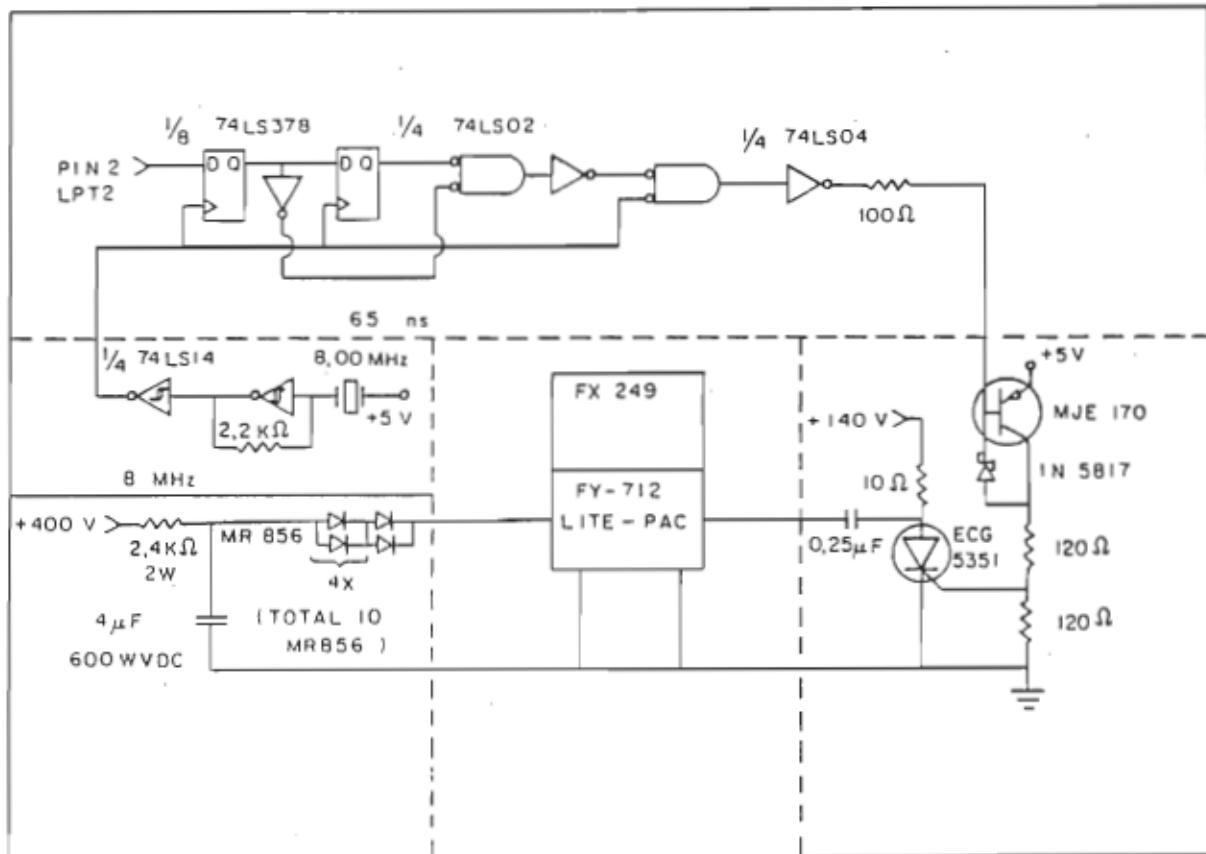


Figure 2.2.3.1. Circuit de la lampe à éclairs (voir le texte). Les éclairs très intenses (jusqu'à 25 J) ne produisent pas de photoinhibition, car ils sont très courts (Joliot et al. 1969, Fork 1972, Chow et al. 1989). L'énergie de chaque éclair produit par cette lampe est de 0.32 J; il ne peut donc pas y avoir de photoinhibition. Cette énergie est cependant saturante, car l'ajout d'un autre condensateur de 4  $\mu$ F (doublant l'énergie des éclairs) ne change pas les résultats.

déchargeant le condensateur de 4 uF chargé à 400 V. La lampe au xénon (FX-249 par EG&G) est reliée aux électrodes de mesure par une fibre optique de 90 cm, et produit des éclairs d'environ 100 uJ à la sortie de la fibre optique.

L'électrode qui a été construite pour la réduction d'oxygène (Fig.2.2.3.2) est constituée d'un disque de platine polycristallin (1) d'une surface de 33 mm<sup>2</sup>. Le disque est entouré de plastique (2), de sorte que seulement un côté de l'électrode est en contact avec la solution. Un anneau d'argent (3) entoure le plastique et l'électrode de platine. L'anneau d'argent a un diamètre intérieur de 13.0 mm et un diamètre extérieur de 20.3 mm, donnant une surface totale de 190 mm<sup>2</sup>. La surface de l'électrode d'argent est presque 6 fois plus grande que celle de l'électrode de platine, afin que l'électrode d'argent ne se polarise pas. Les électrodes (1,3) et le plastique (2) ont été ensuite polis pour donner une surface plane.

Afin de réaliser le contact électrique entre les électrodes, j'ai choisi d'utiliser un gel de polyacrylamide (4), parce qu'il permet une manipulation aisée de l'électrolyte. Le gel a une épaisseur de 2 mm, ce qui donne une résistance de moins de 25 ohms (dans l'eau de mer). Un disque de teflon de 75 µm d'épaisseur (5), placé sur le plastique entre le platine et l'argent, produit une cavité (6) entre l'électrode de platine et le gel. Le gel de

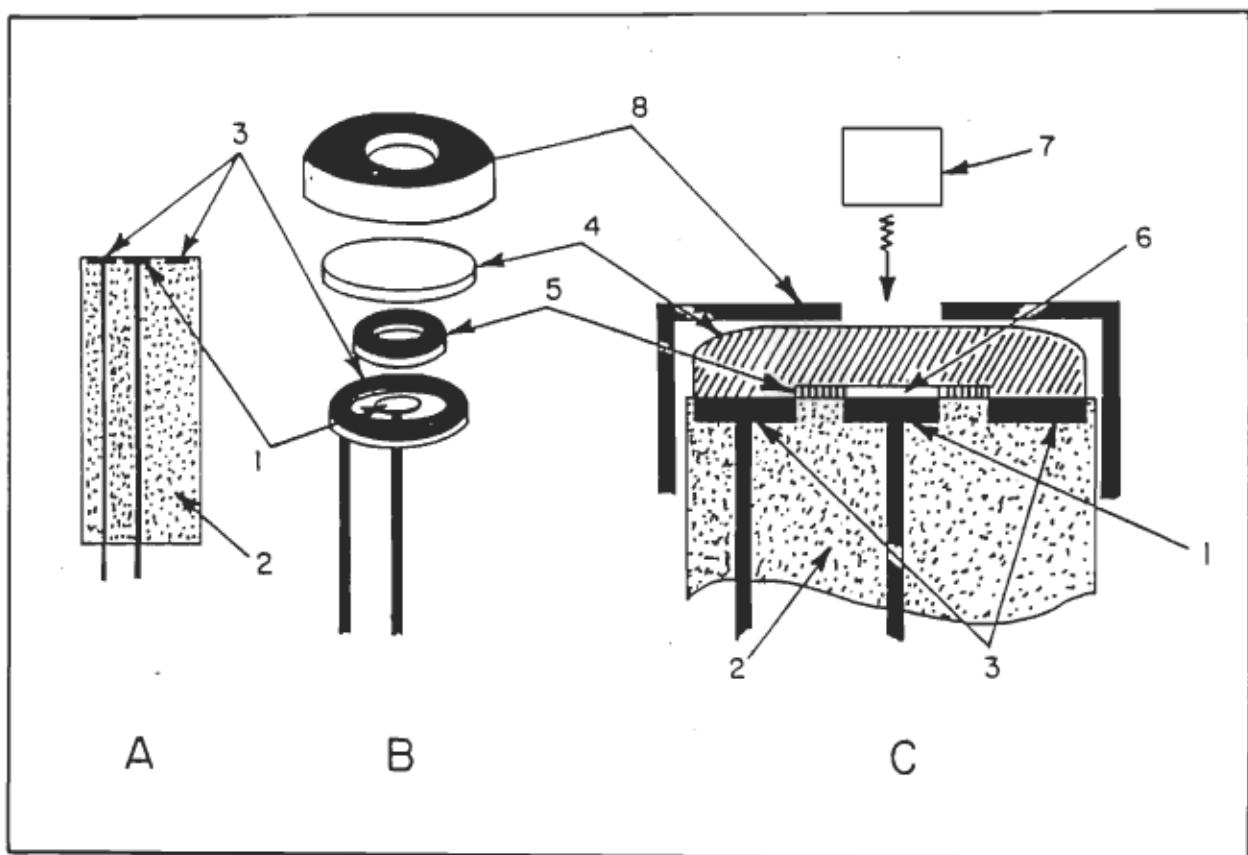


Figure 2.2.3.2. Schéma de l'électrode construite pour mesurer le dégagement d'oxygène sous éclairs. En partie A, une coupe verticale de l'électrode montre l'électrode de platine (1), le support de plastique (2) et l'électrode d'argent (3), avec leurs connections électriques. En B se trouve, par dessus les électrodes, un disque de teflon de 75  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (5), le gel de polyacrylamide (4) et le capuchon de plastique. En C, le système entier est assemblé; on voit l'espace pour l'échantillon (6), créé par le disque de teflon (5). Les éclairs entrent par la fenêtre (7).

polyacrylamide est d'une concentration de 30% (poids/volume) de polyacrylamide (densité maximum) pour que sa rigidité permette de définir l'épaisseur de l'échantillon (75  $\mu\text{m}$ ). Le capuchon de plastique limite la quantité de lumière atteignant l'électrode d'argent.

Afin de maintenir l'électrode de platine à un potentiel constant relativement à l'électrode d'argent, on utilise un potentiostat. L'ordinateur contrôle la polarisation des électrodes par le potentiostat à l'aide d'une "interface", qui permet de choisir entre un voltage nul (pas de polarisation) et de -0.739 V. Le potentiostat fixe le voltage appliqué aux électrodes, tout en mesurant le courant nécessaire. Le signal est amplifié, filtré puis appliqué à l'entrée du convertisseur analogue-digital.

Le potentiostat conçu est montré en Fig. 2.2.3.3. Le signal provenant de l'ordinateur (sortie LPT1) contient énormément de bruit; j'ai donc placé une interface entre le signal et le reste du potentiostat. Pour ce faire, le signal est appliqué à l'entrée d'un amplificateur opérationnel OP-07EZ configuré en comparateur; la sortie de l'amplificateur opérationnel est alors dénuée de bruit digital. Le signal de l'amplificateur opérationnel est utilisé pour alimenter une source de tension de référence de 5 V, le REF-02EZ. La tension de référence de 5V est ensuite inversée, puis

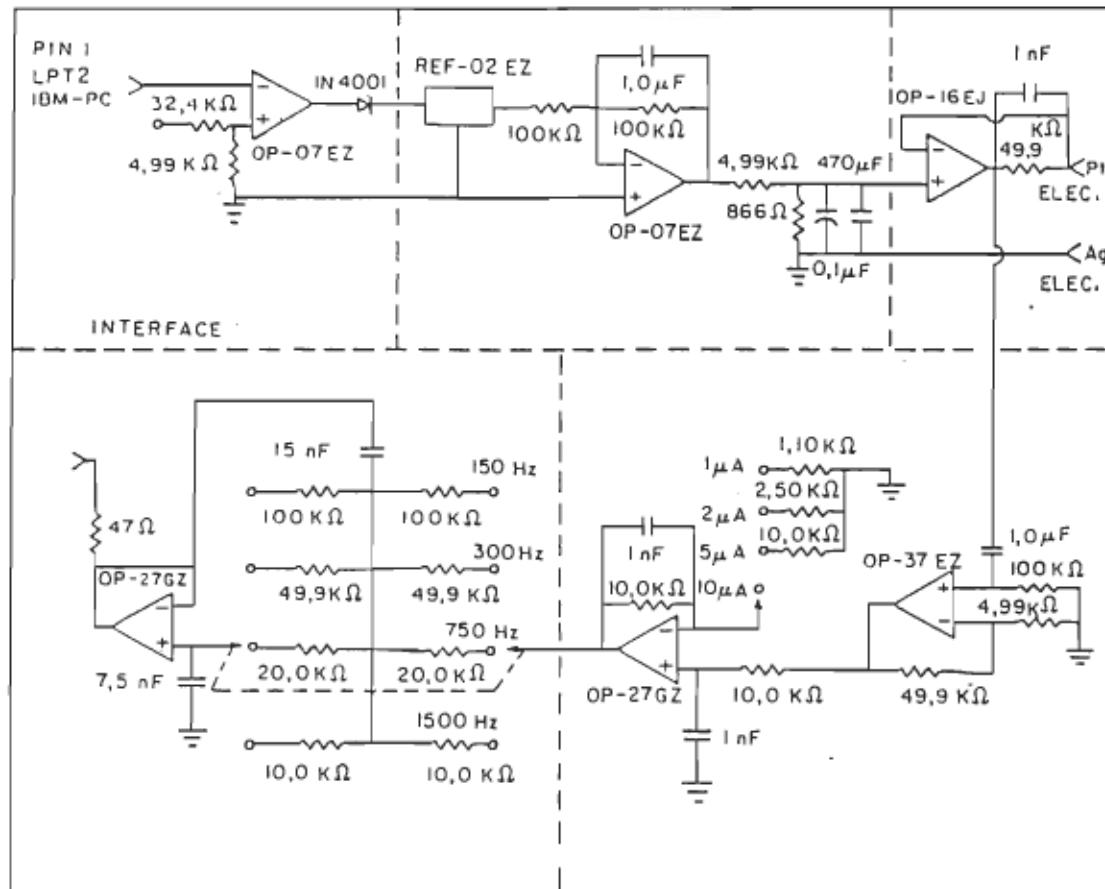


Figure 2.2.3.3. Schéma complet du circuit de polarisation (voir le texte).

diminuée à 0.739 V. Ceci fournit la tension de référence pour la polarisation de l'électrode de platine.

Le courant de réduction de l'oxygène est détecté par un amplificateur opérationnel configuré en potentiostat (von Fraunhoffer et Banks 1972). La tension de référence est appliquée à l'entrée positive de l'ampli-op (ampli-op), et le potentiel de l'électrode est "lu" à l'entrée négative de

l'ampli-op. Les déviations entre les deux entrées sont amplifiées afin de maintenir la tension appliquée constante, ce qui constitue une boucle de rétro-action négative. Comme le courant (I) de réduction d'oxygène doit passer à travers la résistance de gain (49.9 K $\Omega$ ), il y a une différence de potentiel RxI entre la sortie de l'ampli-op et l'électrode de travail. Cette différence sera donc proportionnelle au taux de réduction d'oxygène, et constitue la quantité mesurée.

Tableau 2.2.3.1.

Caractéristiques de l'OP-16EJ (spécifications de PMI Inc.).

---

Courant de polarisation à 20°C:	20 pA
Courant de polarisation à 70°C:	100 pA
Gain en courant continu:	200 000
Gain à 100 Hz:	100 000

---

Le choix de l'OP-16EJ pour détecter le courant est justifié par les raisons suivantes. Un ampli-op demande un certain courant de polarisation à ses entrées (bias current), qui s'ajoute au courant mesuré. Ce courant dépend de la température (Table 2.2.3.1.); les variations du courant de polarisation avec les fluctuations de la température apparaissent alors comme du bruit. Les caractéristiques de l'OP-16 montrent un très faible courant de polarisation

(négligeable). De plus, la résistance apparente du potentiostat est égale à la résistance de gain (49.9 k $\Omega$ ) divisée par le gain de l'ampli-op. Comme l'OP-16EJ présente un gain de 100 000 à une fréquence de 100 Hz, et donc si R=50 Kohms, la résistance équivalente du potentiostat est de 0,5 ohms. Cette résistance est négligeable comparé à la résistance entre les électrodes (21 ohms); donc l'OP-16EJ présente un gain excellent pour faire un potentiostat.

Dû à la présence de la capacité importante de l'électrode, il est possible que l'amplificateur opérationnel oscille. Afin d'éviter toute oscillation ou instabilité, j'ai limité la résistance de gain à 50 k $\Omega$ , et j'ai ajouté un condensateur de 1 nF en parallèle avec la résistance. Cette combinaison donne une bande passante (à la détection) de 3200 Hz.

Le signal à la sortie de l'OP-16EJ est surimposé au voltage de polarisation de l'électrode; de plus, les électrodes présentent un courant de polarisation qui varie lentement dans le temps. Ces voltages sont indésirables car ils limitent l'amplification du signal et diminuent la résolution utile des convertisseurs analogue-digital. Dans les expériences rapportées dans la littérature, un différentiateur est utilisé pour éliminer le courant de polarisation variant lentement (Joliot et Joliot 1968, Delrieu 1983, Boussac et al. 1985). Cependant, un

différentiateur amplifie de façon proportionnelle à la fréquence (par définition). Ainsi, le bruit à haute fréquence sera plus amplifié que le signal, et le rapport signal/bruit sera diminué. Si le signal RI est le signal de plus haute fréquence dans le système, alors le rapport signal/bruit ne sera pas détérioré. Mais pour cela il faut ajuster précisément la bande passante du différentiateur pour enlever les bruits de plus hautes fréquences que le signal, sans affecter le signal lui-même; cet ajustement est difficile, pour ne pas dire impossible. J'ai choisi d'utiliser plutôt un filtre passe-haut, parce qu'au contraire du différentiateur, un filtre passe-haut n'amplifie pas le bruit indésirable. Puisque les impulsions de production d'oxygène sont des signaux variant rapidement, un filtre RC passe-haut permet d'isoler efficacement le signal RI, en éliminant les signaux variant lentement. Le signal de sortie ne comprend donc que les signaux de production d'oxygène sous éclairs.

Le signal est ensuite amplifié 10 fois par un ampli-op OP-37EZ, qui est conçu spécialement pour les gains plus élevés que 5. Un étage de gain variable (OP-27GZ) permet d'ajuster l'amplitude des signaux pour la conversion analogue-digitale. Finalement, les signaux sont filtrés par un filtre passe-bas de type butterworth du deuxième ordre (OP-27GZ), de fréquence de coupure variable, puis appliqués à

l'entrée du convertisseur analogue-digital. Le signal est converti en chiffres binaires par la carte DT-2814 (Data Translation) de 12 bits de résolution, qui sont emmagasinés par l'ordinateur.

Des précautions spéciales ont été prises pour réduire le bruit du potentiostat. Le circuit est blindé par une boîte de fer doux de 4 mm d'épaisseur. Le circuit électronique n'entre en contact avec la boîte qu'en une seule place; les connections sont faites avec du câble blindé à trois conducteurs, de sorte que le blindage n'est pas utilisé pour conduire le signal, ainsi que recommandé (Morrison 1986). Afin d'éviter les inductions magnétiques dans le circuit, l'alimentation électrique du circuit est placée à l'extérieur du boîtier, avec un étage de régulation externe et un étage interne. De plus, chaque ampli-op est isolé des bruits de l'alimentation par des filtres RC. Ceci produit un bruit de 500 pA RMS sur l'échelle de 2  $\mu$ A, en l'absence d'électrolyte entre les électrodes.

Pour mesurer les désactivations des états-S (Bouges-Bocquet et al. 1973), ou bien pour mesurer les temps de transitions d'un état-S à un autre (Bouges-Bocquet 1973), les temps de déclenchement de la lampe à éclairs sont variables et peuvent être difficiles à reproduire. Mais parce que le système de mesure est organisé autour d'un ordinateur, n'importe quelle séquence d'opérations est possible et

reproductible. Par exemple, l'intervalle de temps entre les éclairs peut être contrôlé de façon indépendante pour chaque éclair. La polarisation des électrodes est précisément reproductible, et les données peuvent être acquises quand désiré, pour n'importe quel intervalle de temps (jusqu'à la limite de l'ordinateur). Les programmes que j'ai développés, Graphiti (annexe 1) et MenuOz (annexe 2) permettent toutes les variations possibles.

Les performances de l'appareil sont démontrées avec un échantillon d'algues D. tertiolecta à 80 µg Chl/ml (Fig.2.2.3.4.). La ligne de base négative est due au filtre passe-haut situé juste après l'OP-16EJ; c'est un effet normal des filtres passe-haut quand un signal décroît lentement. Cette ligne de base ne signifie pas que le courant réel était négatif. Le rapport signal/bruit est de 50 dB au troisième éclair, soit une erreur de 0.3%. Ce bruit provient principalement de l'électrode, puisque le rapport signal/bruit sans électrolyte est de 70 dB. La limite théorique à la réduction du bruit par moyennage est de 0.017% d'erreur (75 dB). L'utilisation d'un filtre RC passe-haut est avantageuse, car la dérivée du signal montré en Fig.2.2.3.4. diminue le rapport signal/bruit de 6 dB (44 dB au lieu de 50 dB).

Le signal au troisième éclair est montré en agrandissement en Fig.2.2.3.5. Cette figure montre que les

amplitudes mesurées ne sont pas affectées par le filtre passe-haut puisque le temps de montée du signal est de 4 ms, soit 25 fois plus court que la constante de temps du filtre (100 ms).

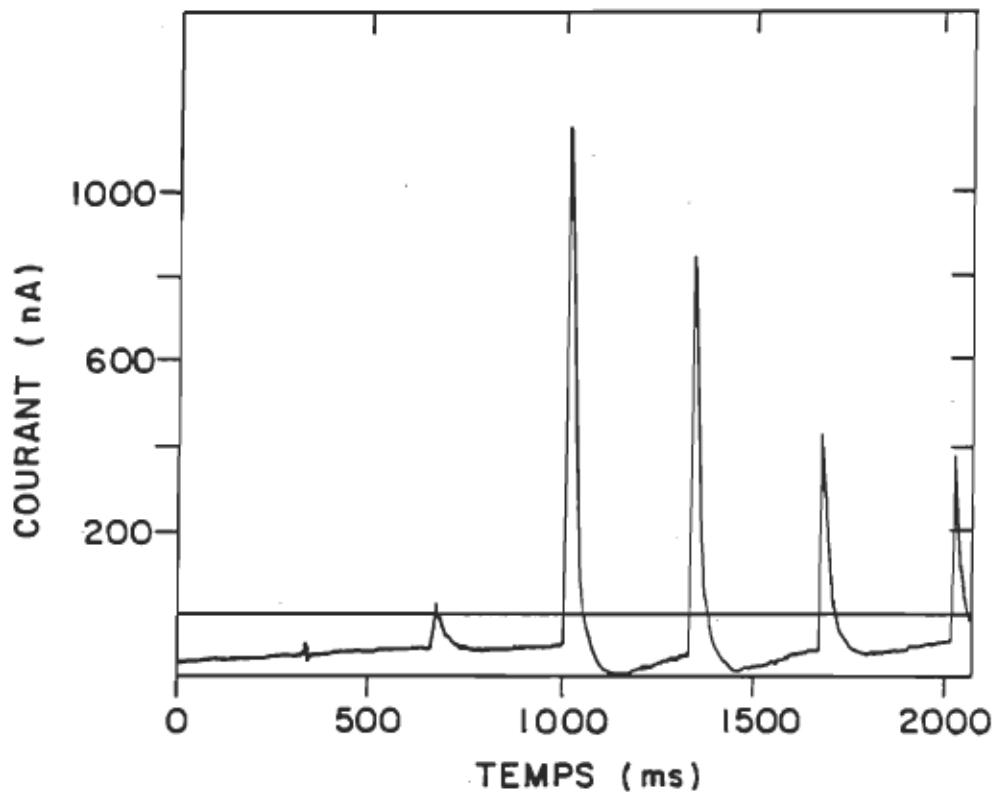


Figure 2.2.3.4. Courant détecté en fonction du temps.

L'oxygène est produit par un échantillon de D. tertiolecta, placé sur l'électrode à une concentration de 80  $\mu\text{g Chl/ml}$ . La fréquence d'acquisition des points est de 2000 Hz et l'intervalle entre les éclairs est de 333 ms. Le troisième éclair est donné une seconde après le début de l'acquisition.

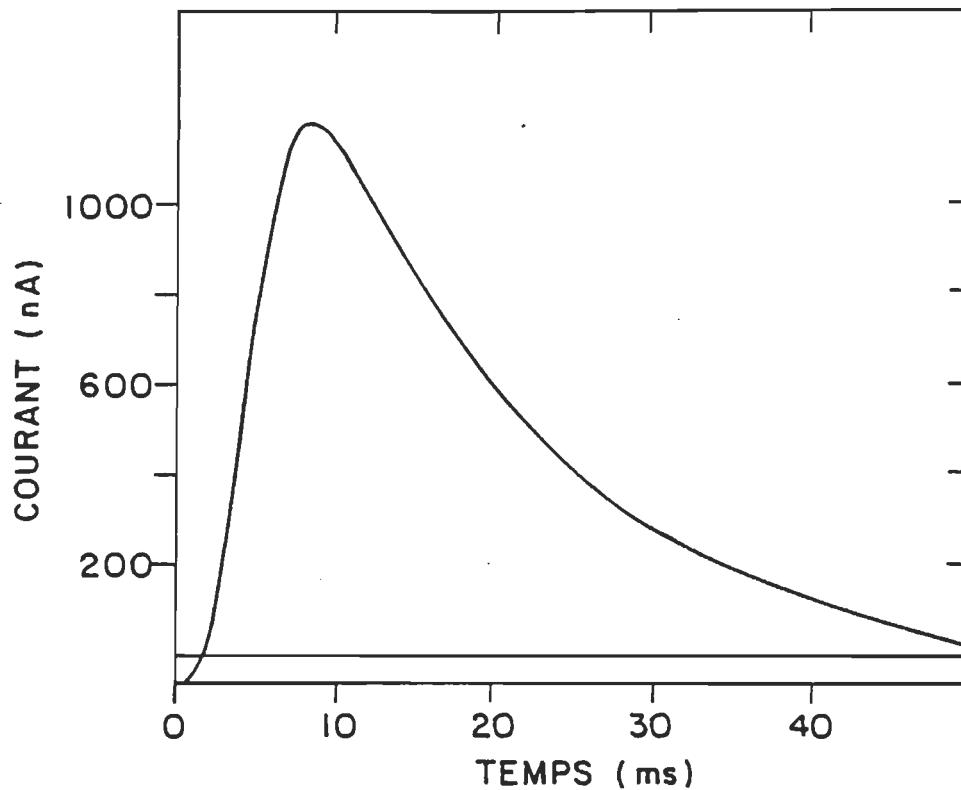


Figure 2.2.3.5. Agrandissement du signal après le troisième éclair de la Fig.2.2.3.4. (voir le texte).

L'évaluation des amplitudes de production d'oxygène est faite automatiquement par le programme Menu02, ce qui donne une précision supérieure à celle obtenue quand le graphique est tracé. Pour ce faire, il évalue la pente du signal sur 15 ms avant l'éclair, par régression linéaire. La pente est alors extrapolée après l'éclair et soustraite des données. Comme le maximum se produit 8.5 ms après l'éclair, la pente de la ligne de base n'a pas le temps de changer (en Fig.2.2.3.4., cette pente est constante pendant plus de 100

ms avant chaque éclair). De plus, l'erreur d'extrapolation est calculée de façon statistique par les variables de la régression linéaire, ce qui inclut le bruit du signal. Le maximum de production d'oxygène est alors évalué, avec un estimé de l'erreur.

En conclusion, l'application des caractéristiques optimales déduites précédemment rend mon système unique en performance; de plus sa flexibilité permet d'effectuer des expériences complexes de façon reproductible.

### 2.3. La mesure de la fluorescence

Ainsi qu'exposé précédemment, les excitons capturés dans les pigments peuvent être ré-émis en fluorescence. Cependant, lorsque les centres réactionnels sont prêts à effectuer des séparations de charges ("ouverts"), les excitons sont drainés des pigments afin d'effectuer la photochimie. Il en résulte une fluorescence minimale ( $F_0$ ), qui est causée par les chlorophylles qui n'ont pu transférer leur énergie au centre réactionnel. Quand les centres réactionnels ne peuvent plus drainer les excitons, il en résulte alors un maximum de fluorescence ( $F_{max}$ ). La fluorescence origine presque uniquement du photosystème II (Amesz et Gorkom 1978, Jursinic 1986). Les variations de la fluorescence dans le temps, entre  $F_0$  et  $F_{max}$ , sont dénommées  $F_v$  et reflètent les changements d'état redox des accepteurs d'électrons du PSII (Satoh et Fork 1983). La montée de

fluorescence  $F_v$  est caractérisée par des "niveaux" ou points d'inflexions de la courbe, dont les premiers sont dénommés I, D et P respectivement pour "Initial level", "Dip" et "Peak level". Chacun de ces niveaux a été corrélé à certains événements dans la chaîne de transport d'électrons; par exemple, la montée du niveau D à P est due à la réduction de la plastoquinone (Krause et Weis 1984, Briantais et al. 1986).

La fluorescence a été mesurée avec le système que j'ai contribué à réaliser (Morissette, Meunier et Popovic 1988). Pour mesurer la fluorescence, les échantillons adaptés à l'obscurité étaient placés dans une sphère intégrante. Sur l'ouverture d'un diaphragme, une illumination verte (475-550 nm, 3.5 W/m<sup>2</sup>) était produite par les filtres CS 4-96 et CS 3-71 combinés. Le signal de fluorescence était isolé par des filtres laissant passer la lumière d'une longueur d'ondes plus élevée qu'environ 680 nm (filtres #CS-2-64 et CS-7-59). La fluorescence isolée était mesurée par un détecteur optique Devar 539-01-5, produisant une tension proportionnelle à la puissance incidente. Cette tension était amplifiée puis soumise à un oscilloscope digital (Northwest Instr. Systems Scope-85) dans un Apple-IIe. Les données numériques étaient alors enregistrées sur disquette ou imprimées.

## CHAPITRE 3

## RESULTATS ET DISCUSSION

## 3.1. Le temps de production de l'oxygène

Le temps du dégagement d'oxygène a depuis longtemps été caractérisé comme étant autour de 1 à 3 ms (Joliot et al. 1966, Etienne 1968, Bouges-Bocquet 1973). Cependant, il a récemment été proposé, en contradiction avec ces résultats, que des temps variables de 30 à 130 ms étaient nécessaires pour le dégagement d'oxygène (Plijter et al. 1988) (voir la section 1.3.1., le temps requis pour le dégagement d'oxygène). Il est notable que ces nouveaux résultats ont été obtenus de façon non-conventionnelle, en utilisant des électrodes faiblement polarisées (Plijter et al. 1988).

Afin de mesurer le temps du dégagement d'oxygène avec des électrodes, il faut s'assurer de leur temps de réponse. Ce temps est limité suite aux éclairs très intenses qui sont donnés pour faire avancer le cycle des états-S, car les électrodes y sont sensibles. Cette sensibilité s'explique par la très grande intensité lumineuse de ces éclairs; ils contiennent de l'ordre de 0.1 to 1 joule d'énergie, répartie sur une période d'environ 10 microsecondes pour un flash au xénon (Joliot et al. 1969, Meunier et Popovic 1988a). Ceci est équivalent à une intensité d'environ 100 000 watts/cm<sup>2</sup> (pour une surface d'électrode de .1 à 1 cm<sup>2</sup>).

Sous ces éclairs très intenses, les électrodes effectuent des réactions photo-électrochimiques qui se surimposent à la mesure de la réduction de l'oxygène et la masquent. Donc, afin de mesurer le temps du dégagement d' $O_2$ , les électrodes et l'amplificateur doivent récupérer de l'éclair en un temps minimal. Le temps de récupération après l'éclair dépend non seulement de l'équipement électronique, mais aussi des électrodes, qui peuvent demander plus de 200 millisecondes dans certaines conditions (Plijter et al. 1988). Afin de caractériser mes électrodes, j'ai mesuré leur réponse à un éclair, en l'absence de matériel biologique. Avec des électrodes fraîchement polies (les électrodes sont nettoyées avec du savon Fisher en poudre; le savon est appliqué en pâte, ce qui lui donne une qualité légèrement abrasive), on observe un signal très rapide suivant l'éclair, qui retourne à la ligne de base en moins de 2 ms (Fig.3.1.1., courbe A). Cette condition des électrodes permet donc de mesurer des signaux de production d'oxygène avec précision, après un délai de 2 ms suivant l'éclair. Cependant, certaines conditions de l'électrode, comme celles obtenues après plusieurs expériences répétées sans lavage, diminuent les performances de l'électrode. Afin de démontrer l'effet du vieillissement et du salissement des électrodes, j'ai d'abord effectué des expériences (avec des algues) au cours desquelles les électrodes ont été rincées avec de l'eau

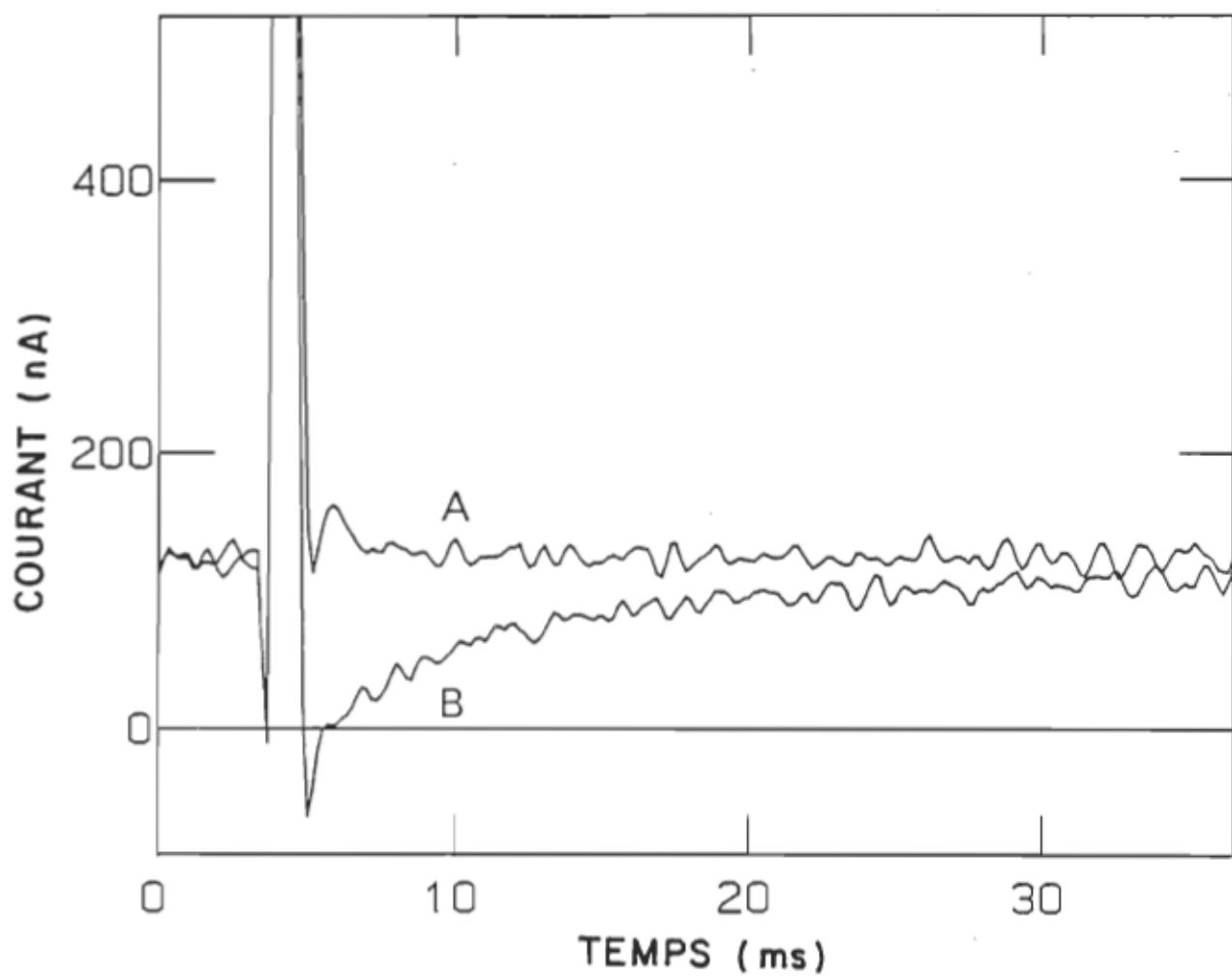


Figure 3.1.1. Réponse des électrodes à un éclair, mesuré en A avec une électrode fraîchement polie et en B avec une électrode salie volontairement. Ces courbes ont été mesurées avec une fréquence de filtrage de 750 Hz (c.f. matériels et méthodes). Le filtre passe-haut de 100 ms dans le circuit de polarisation a été changé à 1 s, afin de pouvoir mesurer la réponse des électrodes de façon plus précise.

distillée mais sans plus. Après quinze expériences consécutives, la réponse de l'électrode en absence de matériel biologique est modifiée (courbe B). On remarque l'apparition d'un signal négatif lent suite à l'éclair, qui peut causer une sous-estimation de la production d'oxygène. L'effet d'électrodes sales sur le signal est plus évident encore dans des conditions extrêmes, obtenues en répétant plusieurs fois la procédure précédente avec un temps de séchage entre chaque répétition (Fig.3.1.2). Dans ces conditions, l'électrode produit un très grand signal négatif qui prend plus de 200 ms pour disparaître. Avec un échantillon en plus, la production d'oxygène au second éclair apparaît tout simplement comme un signal négatif plus faible, et la production d'oxygène au troisième éclair est diminuée de moitié. Ceci démontre que la propreté de l'électrode est une considération importante pour son fonctionnement correct. Il est remarquable que la réponse à un éclair de l'électrode de platine, rapportée dans l'article de Plijter et al., montre un fort signal négatif très lent, similaire à celui de la figure 3.1.2.. Ce signal était présent en présence ou en absence de particules de PSII, même à de basses polarisations (c.f. Fig.2A dans Plijter et al. 1988). Ceci introduit un doute quant à l'état de leurs électrodes.

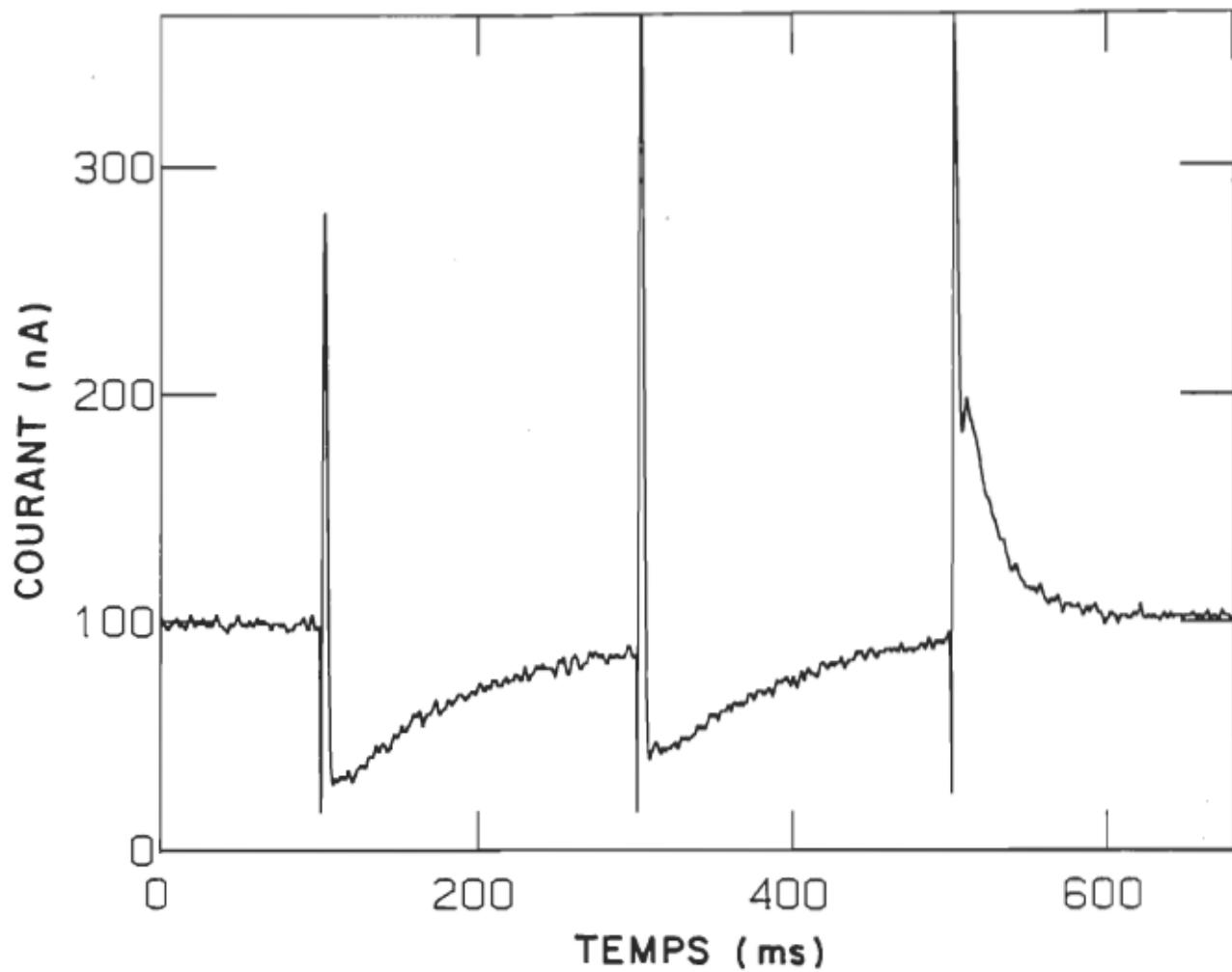


Figure 3.1.2. Mesure de la production d'oxygène avec des électrodes malpropres, à une fréquence d'éclairs de 5 Hz. Seulement les trois premiers éclairs sont montrés.

La réponse des électrodes à la production d'oxygène dépend aussi du voltage de polarisation utilisé. Il a été recommandé de déterminer le potentiel idéal de polarisation selon un graphique du courant de détection en fonction du voltage de polarisation, appelé polarogramme (Myers and

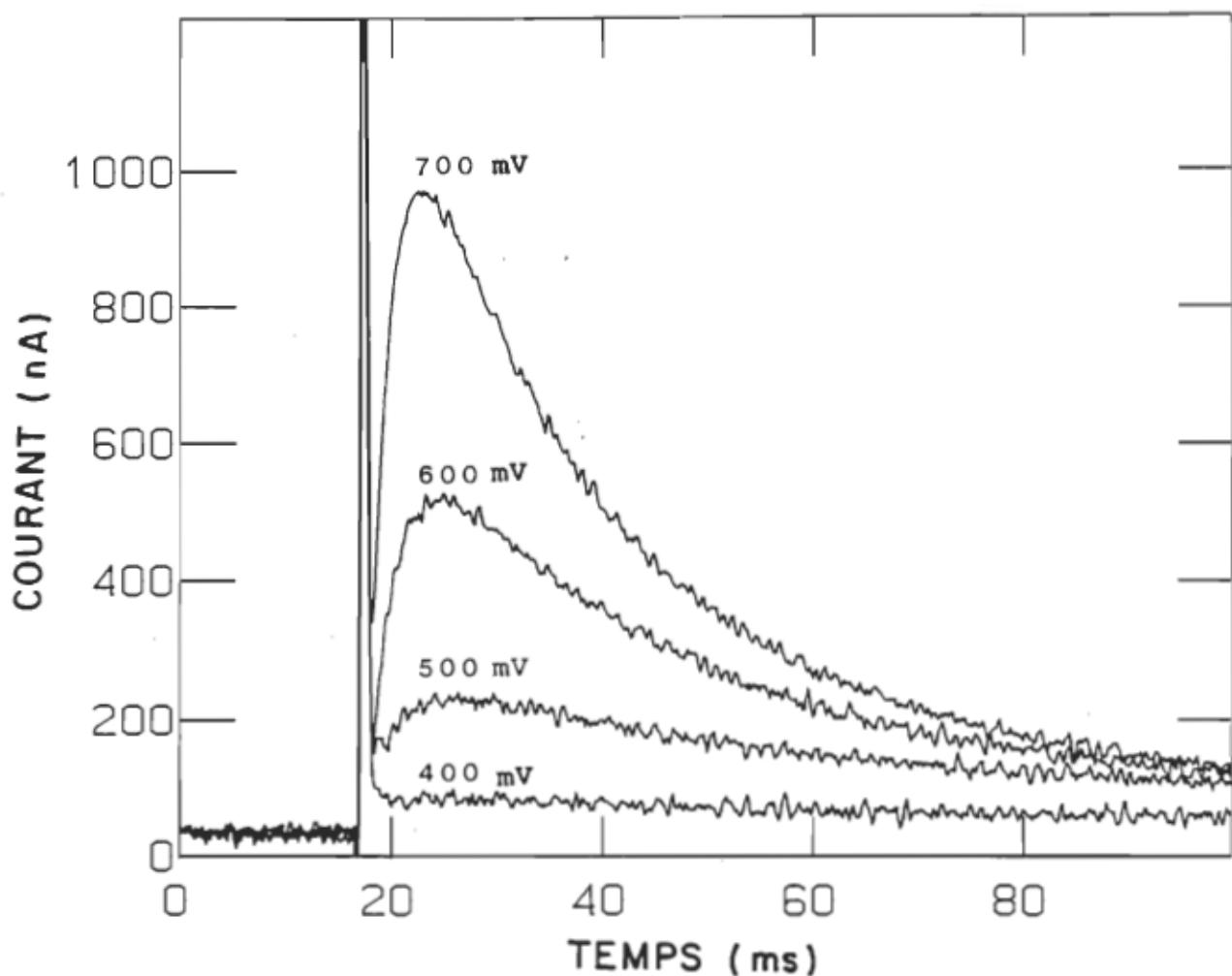


Figure 3.1.3. Réponse d'électrodes fraîchement polies à la production d'oxygène au troisième éclair, pour des polarisations de 400, 500, 600 et 700 mV. Les échantillons étaient adaptés au noir. Le circuit de polarisation a été temporairement modifié pour ces expériences afin de pouvoir varier le voltage de polarisation entre 400 et 800 mV (fréquence de filtrage: 750 Hz).



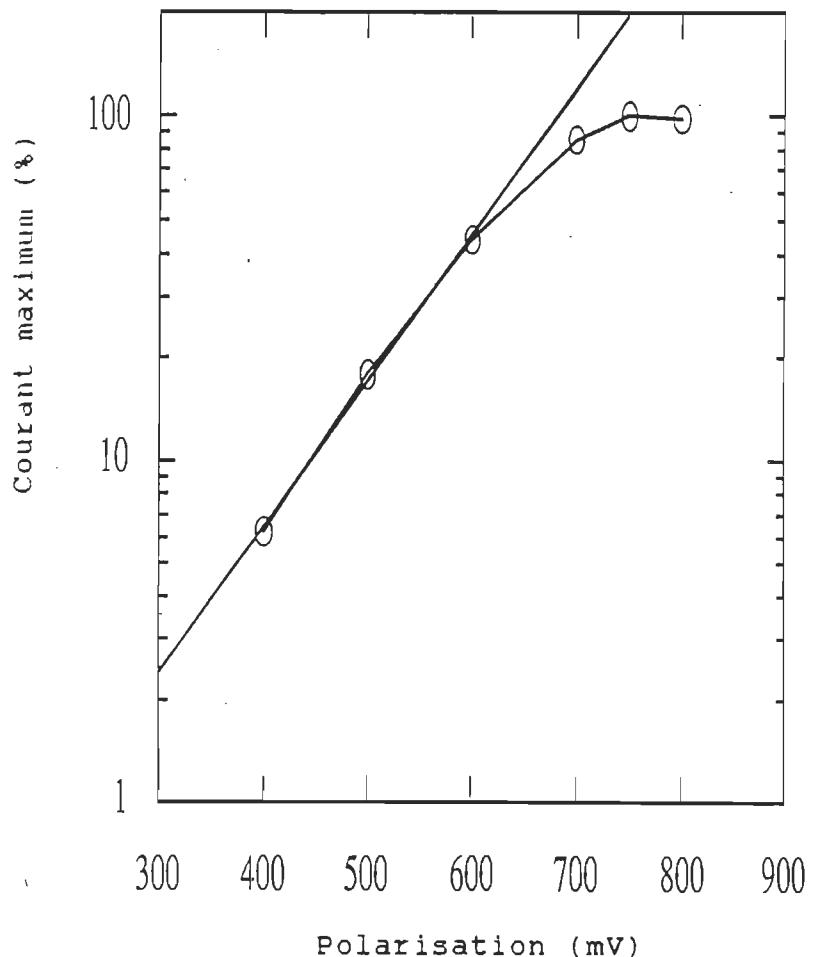


Figure 3.1.4. Polarogramme, montrant le logarithme naturel du courant maximum de détection en fonction du voltage de polarisation (pour des électrodes polies). La ligne droite représente l'efficacité de l'électrode en l'absence d'effets de diffusion.

réduction de l'oxygène par l'électrode (Myers and Graham 1963). On constate dans la Fig.3.1.4., qu'à de faibles voltages de polarisation, un courant qui cause une variation

de la polarisation de seulement 12 mV produira une chute de 10% dans l'efficacité de l'électrode. La reproductibilité dépend alors de la stabilité et de la répétition précise d'expérience en expérience du voltage de polarisation. Il est donc proposé de façon générale d'utiliser une grande polarisation (autour du plateau), puisque le courant est alors insensible à de petites variations du voltage de polarisation. En plus, ceci donne l'avantage supplémentaire du meilleur rapport signal/bruit possible. Cependant, l'utilisation d'une grande polarisation possède des inconvénients: si les électrodes sont polarisées longtemps (5 min), le dégagement d'oxygène est inhibé (Vermaas et al. 1984, Plijter et al. 1988, Meunier and Popovic 1988b). Mais ce problème est éliminé aisément en utilisant des temps de polarisation courts (10-30 s) avant les mesures (Vermaas et al. 1984, Meunier and Popovic 1988a, 1988b). En conclusion, la meilleure façon de mesurer la production d'oxygène est d'utiliser une grande polarisation, autour de 750 mV avec mes électrodes, tout en gardant le temps de polarisation très court.

La réponse négative de l'électrode à un éclair, dans de mauvaises conditions de propreté (Figs. 3.1.1 et 3.1.2), possède le même polarogramme que le dégagement d'oxygène. Ce signal est donc sûrement dû à une consommation d'oxygène. Le signal négatif rapporté par Plijter est lui aussi de la

consommation d'oxygène (Plijter 1988). Ce signal teste donc le temps de réponse de l'électrode à un changement de concentration en oxygène. Mon électrode répond en moins de 2 ms (Fig. 3.1.1.); cependant l'électrode de Plijter et al. répond en environ 50 ms. Le dégagement d'oxygène en 30-130 ms correspond donc au temps de réponse de leur électrode, et est donc un artefact dû à une condition anormale de leur électrode. Le fait que leur électrode est une grille, avec plus de 100 000 intersections de fils microscopiques qu'il est impossible de nettoyer mécaniquement, contribue sûrement à cette condition.

Afin d'expliquer les cinétiques de la réponse de l'électrode à la production d'oxygène, plusieurs modèles ont été proposés. Ces modèles tiennent compte de la diffusion (Meunier et al. 1987), du temps de production d'oxygène (Plijter et al. 1988), et de la réponse des électrodes elles-mêmes (Meunier and Popovic 1988b). En combinant toutes ces considérations, j'ai élaboré un modèle (décrit complètement dans l'annexe 3) où la réponse des électrodes est donnée par une somme de trois exponentielles: une pour le temps du dégagement d'oxygène, une pour la réponse des électrodes, et une pour la diffusion:

$$\begin{aligned}
 [3.1, 1] \quad I = & \quad K \left[ \exp(-t/T) / (1/T - Dp^2)(1/T - 1/RC) \right. \\
 & + \exp(-Dp^2 t) / (Dp^2 - 1/T)(Dp^2 - 1/RC) \\
 & \left. + \exp(-t/RC) / (1/RC - Dp^2)(1/RC - 1/T) \right]
 \end{aligned}$$

où  $T$  est la constante de temps pour le dégagement d'oxygène,  $Dp^2$  est la constante de temps pour la diffusion,  $RC$  est la constante de temps du filtre formé par la capacité de l'électrode de platine et la somme de toutes les résistances dans le système, et  $K$  est une constante de proportionnalité (N.B.:  $K$  possède la même valeur pour les trois exponentielles; la forme de la réponse est donc déterminée uniquement par les constantes de temps). En ajustant l'Eq. (3.1,1) aux données, on voit que la courbe théorique suit de très près la réponse expérimentale de l'électrode (Fig.3.1.5; le coefficient de détermination est  $R^2 = 0.9997$ ). La procédure d'ajustement (programme RefFit, annexe 4) donne des constantes de temps, pour les trois exponentielles, de 25 ms, 1.7 ms and 1.3 ms. Chacune de ces exponentielles doit être assignée à un des trois phénomènes. La constante de temps pour la diffusion peut être calculée approximativement par  $D(\pi/2d)^2$  (voir l'appendice); en prenant "d", l'épaisseur d'une couche d'algues Dunaliella tertiolecta sur l'électrode de platine, comme étant environ 10  $\mu\text{m}$ , on obtient une constante de temps de 25 ms. La constante de temps formée par la capacité de l'hydrogène adsorbé (40  $\mu\text{F}$ , Meunier and Popovic 1988b) et la somme de toutes les résistances dans le circuit (mesurée comme étant 29 ohms par des mesures d'impédance en courant alternatif) est 1.2 ms, ce qui doit correspondre à la constante de temps de 1.3 ms. La constante

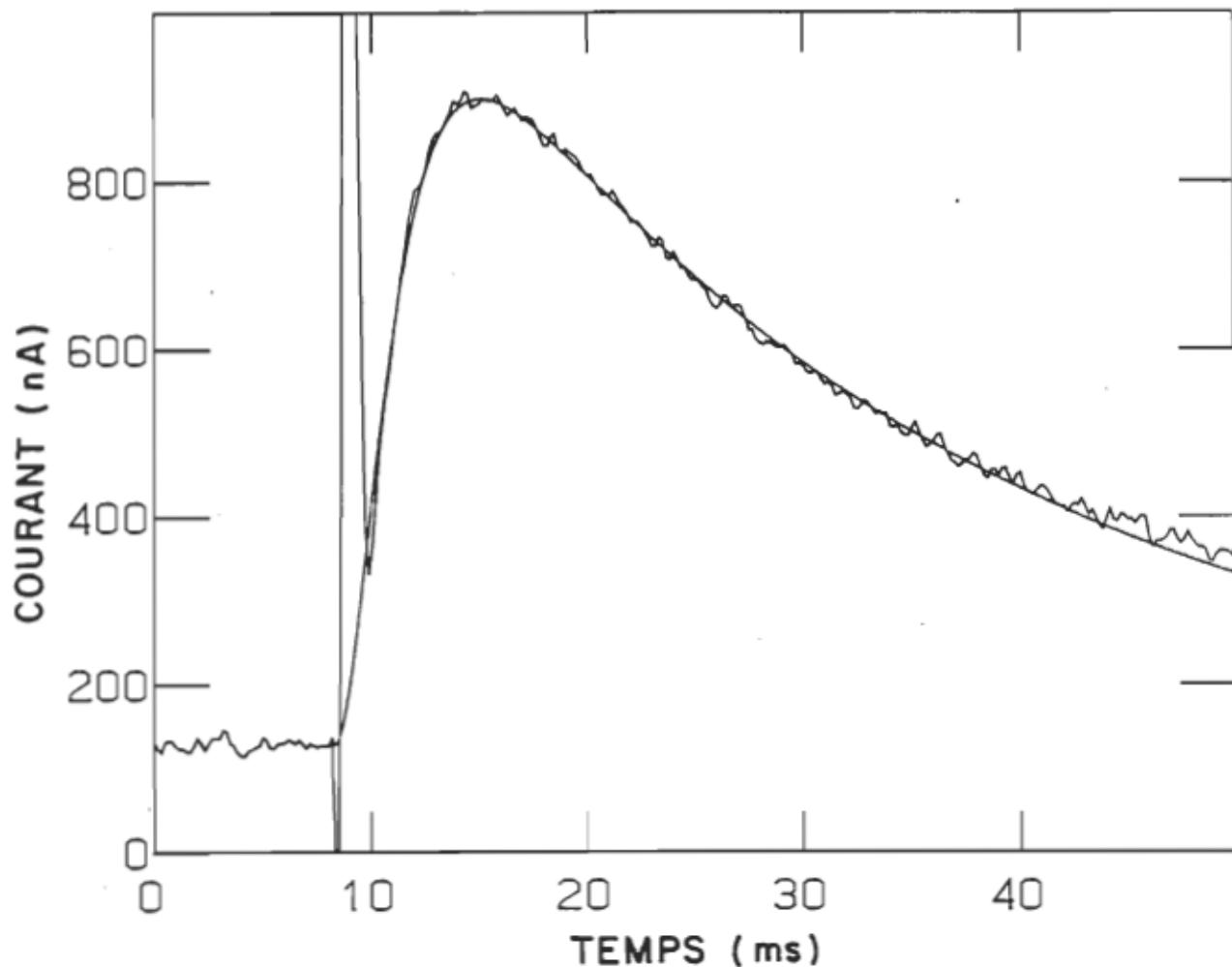


Figure 3.1.5. Courbes expérimentale et théorique de la réponse de l'électrode à la production d'oxygène sous éclairs. La courbe théorique a été ajustée par la méthode du simplex, en maximisant le coefficient de détermination  $R^2$ . Le coefficient de détermination était évalué par une régression linéaire ( $y = ax + b$ ) sans tenir compte de l'artefact dû à l'éclair, et où  $y$  est la courbe expérimentale,  $x$  la courbe théorique (c.f. appendice 4).

de temps de 1.7 ms correspond approximativement à un dégagement d'oxygène en moins de 2 ms, comme observé en Fig.3.1.2. Donc, la forme des cinétiques de réduction d'oxygène peut être expliquée par un modèle très simplifié des phénomènes se produisant sur l'électrode, avec seulement trois exponentielles. Ce modèle, qui tient compte la convolution des contributions des différents phénomènes, s'accorde avec les constantes de temps rapportées précédemment pour le dégagement d'oxygène (Joliot et al. 1966, Etienne 1968, Canaani et al. 1988) et le transport d'électrons (Bouges-Bocquet 1973, Cole et Sauer 1987).

En conclusion, des facteurs importants pour la performance des électrodes sont leur propreté qui modifie leur temps de récupération après l'éclair, et leur voltage de polarisation. Des électrodes sales peuvent donner l'impression d'un dégagement d'oxygène lent, de par leur réponse à l'éclair; avec des électrodes polies, on voit que le dégagement d'oxygène demande moins de 2 ms. De plus, la réponse de l'électrode peut être déconvoluee pour obtenir le temps de la production d'oxygène, ce qui donne un temps de 1.7 ms. Donc, je conclus de ces preuves expérimentales que le dégagement d'oxygène se produit en moins de 2 ms. Le transport d'électrons est donc simultané au dégagement d'oxygène, et il n'y a pas de limitation du transport d'électrons par le temps du dégagement d'oxygène.

### 3.2. Etude des modèles du dégagement d'oxygène

En Fig. 3.2.1. se trouve une mesure typique du dégagement d'oxygène sous des éclairs donnés à une fréquence de 10 Hz, utilisant le système développé. Au premier éclair, le dégagement d'oxygène est nul, très faible au deuxième éclair, et présente un maximum au troisième éclair. Il oscille par la suite, avec un amortissement progressif, ainsi qu'il a été rapporté précédemment (Joliot et al 1969, Delrieu 1980, Jursinic 1981).

Les différents modèles du dégagement d'oxygène (c.f. introduction) peuvent être ajustés aux données présentées en Fig.3.2.1., en minimisant l'écart-type entre les données expérimentales et les modèles théoriques (c.f. programme Menu02, appendice 2). L'écart-type minimal est alors un indice de la pertinence de ces modèles. L'équation de récurrence du dégagement d'oxygène et les modèles de Lavorel, Delrieu et Kok donnent respectivement un écart-type de 0.69%, 0.96%, 0.99%, et 1.70%. Cependant, le nouveau système que j'ai construit permet d'obtenir une erreur très faible sur les mesures, d'environ 0.1% à 0.2%. Cette erreur est beaucoup plus petite que l'écart-type entre les données et les modèles; la précision de mon système me permet donc de conclure qu'aucun de ces modèles ne peut expliquer exactement le mécanisme du dégagement d'oxygène.

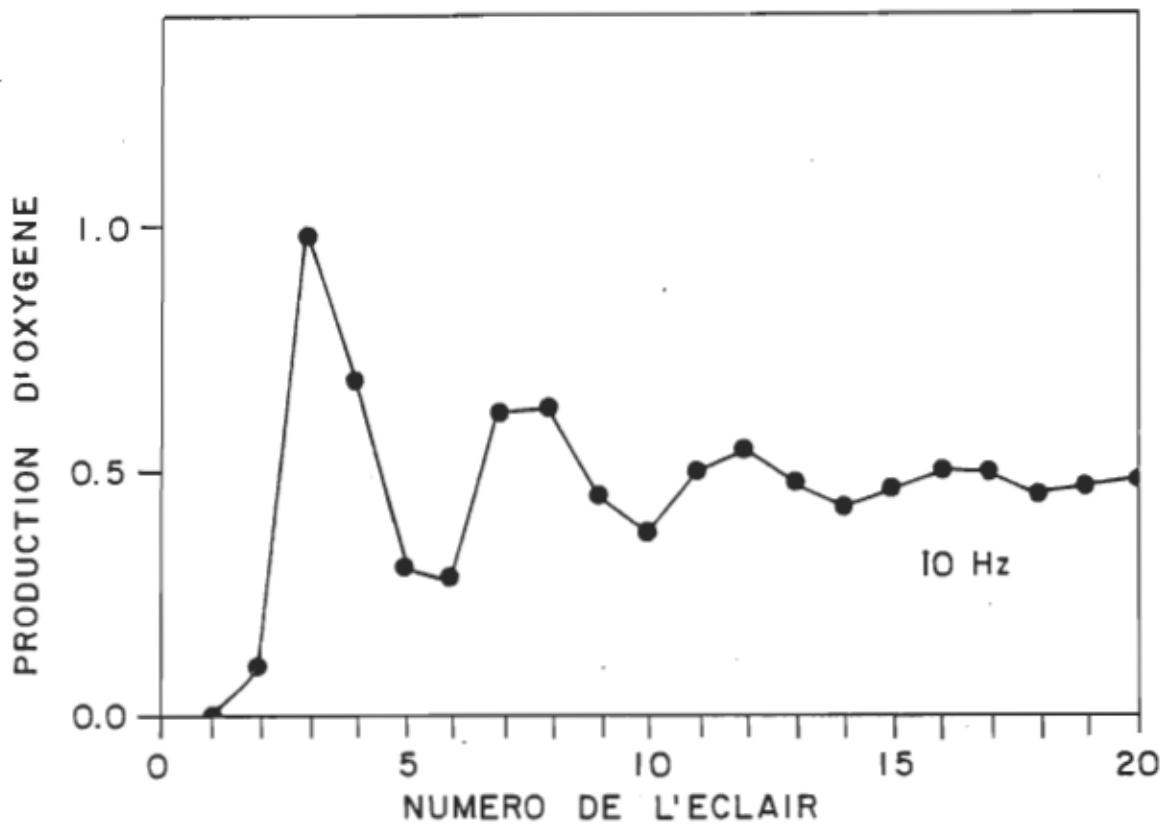


Figure 3.2.1. Production d'oxygène en fonction du numréro de l'éclair, pour un échantillon d'algues D. tertiolecta, normalisée relativement au troisième éclair.

La façon habituelle de calculer l'erreur (écart-type) est de répéter une expérience plusieurs fois. Ceci mesure la reproductibilité des expériences. Des expériences très reproductibles donneront des estimations des probabilités de transitions avec de très petits écarts-types. Cependant, les probabilités de transitions sont obtenues à partir d'un modèle, et ne sont pas des valeurs directement mesurées.

Pour des valeurs calculées à partir d'un modèle, la reproductibilité n'est pas la seule source d'erreur. Il y a une incertitude qui résulte de la détermination elle-même des probabilités à travers un modèle, et qui dépend de la pertinence du modèle. Par exemple, tous les modèles du dégagement d'oxygène assument que les probabilités de transitions sont constantes dans le temps. Si ces propriétés changent, les valeurs qui sont calculées sur plusieurs éclairs possèderont une incertitude ou une indétermination due au changement. Donc, même avec des expériences absolument précises, avec une erreur due à la reproductibilité de zéro, il reste une erreur due à la détermination des valeurs à travers un modèle. Jusqu'à maintenant, aucune méthode n'a été trouvée pour évaluer cette erreur pour les modèles de dégagement d'oxygène.

Afin d'évaluer l'erreur due au modèle, j'ai introduit l'utilisation de la régression linéaire multivariée. En effet, l'équation de récurrence du dégagement d'oxygène se présente comme une somme de variables multipliées par des coefficients constants, et l'équation connue (c.f. introduction):

$$[3.2, 1] \quad Y_{n+4} + a_1 Y_{n+3} + a_2 Y_{n+2} + a_3 Y_{n+1} + a_4 Y_n = 0$$

peut s'exprimer aussi comme:

$$[3.2, 2] \quad Y = a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3 X_3 + a_4 X_4$$

en remplaçant  $Y_{n+4}$  par  $-Y$ ,  $Y_{n+3}$  par  $X_1$ ,  $Y_{n+2}$  par  $X_2$ ,  $Y_{n+1}$  par  $X_3$  et  $Y_n$  par  $X_4$ . Les constantes  $a_n$  dans l'équation [3.2, 2] peuvent se déterminer par régression linéaire multivariée (Kleinbaum et Kupper 1978). Le nombre minimal d'éclairs nécessaires pour ajuster cette équation aux données est de 8, car l'équation [3.2, 1] a huit degrés de liberté; et pour calculer l'écart-type, il faut ajouter une donnée de plus pour un total de neuf (9). Cet écart-type tient alors compte non seulement de la reproductibilité, mais aussi de l'erreur due au modèle.

L'écart-type entre les données et les modèles ne donne qu'une indication globale. Cependant un avantage supplémentaire de la régression multivariée est qu'elle permet d'assigner une erreur à chacun des coefficients déterminés. Ceci permet de préciser davantage la source de l'écart entre les données et le modèle, comme une hypothèse concernant les ratés, les doubles transitions, ou les transitions simples. Un estimé de l'erreur sur chaque coefficient sigma est aisément obtenu en utilisant le calcul matriciel (Kleinbaum et Kupper 1978; voir en appendice 2, le programme MenuO<sub>2</sub>).

Afin d'exprimer les coefficients sigma sous la forme plus compréhensible des probabilités de transitions, j'ai utilisé les équations suivantes de transformation (Eqs. 3 et 5, Lavorel 1976; j'ai développé l'équation 4):

$$[3.2, 3] \quad \alpha = -a1/4$$

$$[3.2, 4] \quad \tau = (-a4 + (a1a3)/4)^{1/4}$$

$$[3.2, 5] \quad \beta = 1 - \alpha - \tau$$

où  $\alpha$  est la probabilité moyenne de ratés,  $\beta$  est la probabilité moyenne de doubles transitions et  $\tau$  est la probabilité moyenne de simples transitions. Ces équations découlent de ce que les coefficients sigma sont les traces de la matrice de transition  $K$ , en utilisant la matrice  $K$  du modèle de Kok (Lavorel 1976). Les déviations standard des probabilités de ratés, de doubles transitions et de simples transitions peuvent être déterminées à partir des déviations standard des coefficients sigma. Pour ce faire, j'ai développé les équations 6, 7 and 8 respectivement à partir des Eq. 3, 4 et 5 selon les règles du calcul d'erreur (Tremblay et Chassé 1970, Kleinbaum et Kupper 1978):

$$[3.2, 6] \quad d\alpha = |da1|/4$$

$$[3.2, 7] \quad d\tau = ((da4/4)^2 + (a3 da1/16)^2 + (a1 da3/16)^2)^{1/2}/\tau^2$$

$$[3.2, 8] \quad d\beta = (d\alpha^2 + d\tau^2)^{1/2}$$

où  $d\alpha$ ,  $d\tau$  and  $d\beta$  sont respectivement les déviations standard des probabilités de ratés, simples transitions et doubles transitions; les an sont les coefficients sigma;  $da1$ ,  $da3$  et  $da4$  sont respectivement les déviations standard des coefficients  $a1$ ,  $a3$  et  $a4$ .

Pour les analyses suivantes, les données de dégagement d'oxygène présentées en Table 3.2.1. seront utilisées. Ces données ont été normalisées relativement au dégagement d'oxygène à l'état stationnaire. Puisque le bruit rms ("root mean square", équivalent à l'écart-type) est environ 0.09% de la production d'oxygène à l'état stationnaire, j'estime que les erreurs non-systématiques (au hasard) sont d'environ 0.1%. Le dégagement d'oxygène négatif au premier éclair est probablement dû à une photoconsommation d'oxygène (Schmid et Thibault 1979, Badger 1985).

Tableau 3.2.1.

## Dégagement d'oxygène sous éclairs de 10 Hz

ECLAIR #	PRODUCTION D'O <sub>2</sub> (±0.001)	ECLAIR #	PRODUCTION D'O <sub>2</sub> (±0.001)
1	-0.003	16	1.011
2	0.210	17	0.969
3	1.867	18	0.935
4	1.282	19	0.967
5	0.641	20	0.999
6	0.618	21	0.987
7	1.221	22	0.970
8	1.180	23	0.978
9	0.868	24	0.984
10	0.796	25	0.996
11	1.024	26	0.990
12	1.066	27	1.010
13	0.942	28	1.000
14	0.887	29	1.001
15	0.971	30	0.998

Le fait que seulement neuf éclairs sont nécessaires pour obtenir une valeur des coefficients sigma et de leurs déviations standard permet de déterminer leurs valeurs pour différents groupes de données expérimentales. Ainsi, les probabilités moyennes de ratés, de simples transitions et de doubles transitions sont montrées en Fig.3.2.2., en fonction du numéro du premier éclair dans le groupe de neuf. On voit que la probabilité moyenne de ratés change dans le temps: il est évident qu'une ligne horizontale ne peut passer à travers les barres d'erreurs. L'application d'une régression linéaire avec poids sur la probabilité de ratés donne comme résultat:

$$[3.2, 9] \quad \alpha = 12.83 - 0.354 N$$

où  $\alpha$  est la probabilité de ratés en pourcentage, N le numéro du premier éclair utilisé, et l'écart-type de la pente est 0.059. J'ai alors testé statistiquement l'hypothèse suivante: est-il possible que la pente soit réellement zéro. En utilisant un intervalle de confiance de 99.9%, on trouve selon les règles de tests d'hypothèses (Kleinbaum et Kupper 1978) que cette hypothèse doit être rejetée. Donc, cette mesure démontre avec 99.9% de certitude que la probabilité de ratés n'est pas constante lors d'une mesure.

La probabilité de simples transitions (Fig. 3.2.2. B) a une valeur de:

$$[3.2, 10] \quad \tau = 79.94 + 0.384 N$$

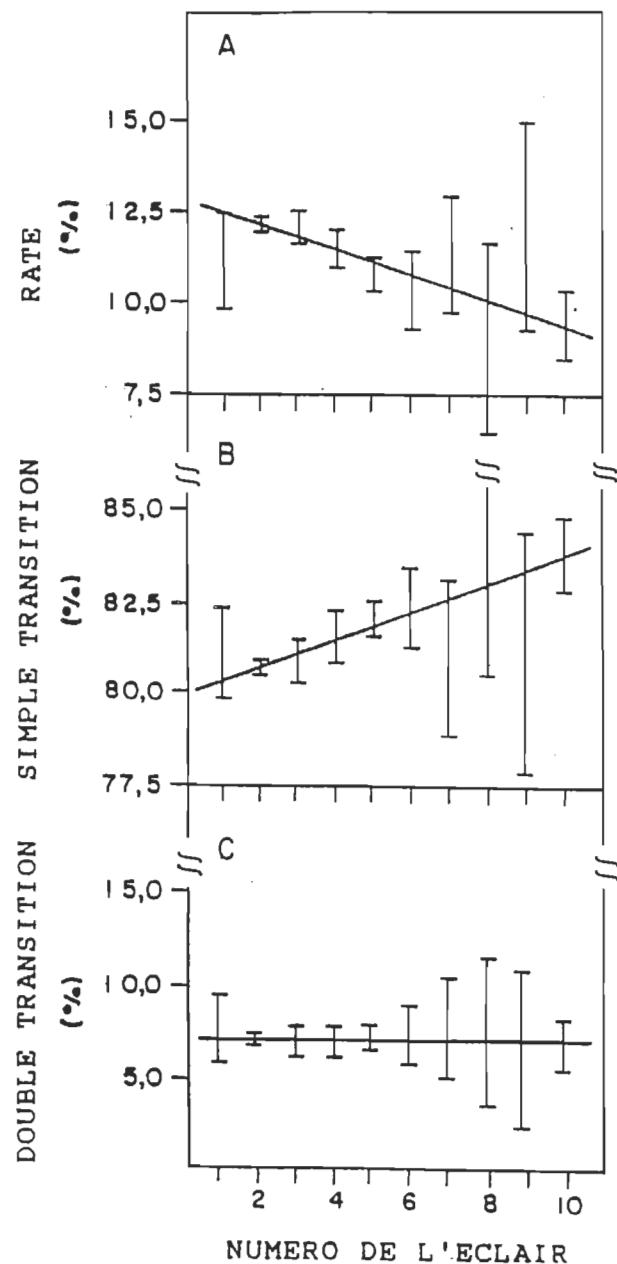


Figure 3.2.2. Probabilités de transition des états-S, mesurées en utilisant des groupes de neuf éclairs consécutifs, indiquées en fonction du premier éclair dans le groupe.

où  $\tau$  est la probabilité de simples transitions,  $N$  le numéro du premier éclair utilisé, et l'écart-type de la pente est 0.045. En utilisant un intervalle de confiance de 99.9%, on trouve que la pente ne pourrait être de zéro. Il est à remarquer que les pentes des probabilités de simples transitions et de ratés sont égales mais de signe opposé. Ainsi, la probabilité de doubles transitions demeure constante (Fig.3.2.2. C).

On pourrait supposer qu'une augmentation de la probabilité de simples transitions, avec une diminution des ratés, devrait augmenter le dégagement d'oxygène moyen. Dans la Table 3.2.1., la production moyenne d'oxygène des cinq derniers éclairs a été normalisée à 1. En effectuant la moyenne de la production d'oxygène sur n'importe quel autre groupe d'éclairs précédents, excepté le troisième éclair, le résultat est plus petit que 1. Ceci montre que la production d'oxygène a augmenté avec le numéro de l'éclair.

Une analyse similaire des coefficients sigma a déjà été tentée, et les résultats montraient des variations aléatoires ou de période deux (Lavorel and Lemasson 1976). Cependant, les variations rapportées étaient plus petites que les erreurs de reproductibilité mentionnées (les erreurs dues au modèle n'étaient pas évaluées), et ces variations n'étaient donc pas significatives. Ceci montre l'importance de la

précision des mesures que l'on peut obtenir avec mon nouveau système.

Des résultats différents peuvent aussi avoir été produits par l'utilisation d'une équation de récurrence différente. En effet, j'ai utilisé la loi de Thibault (Thibault 1978) qui utilise quatre coefficients sigma, alors que la loi utilisée par Lavorel et Lemasson, développée précédemment (Lavorel 1976), n'en utilise que trois:

$$[3.2, 11] \quad Y_{n+4} - Y_n - a_1(Y_{n+3} - Y_n) + a_2(Y_{n+2} - Y_n) \\ - a_3(Y_{n+1} - Y_n) = 0$$

où  $Y_n$  représente le dégagement d'oxygène au  $n^{\text{ème}}$  éclair, et les  $a_n$  sont les coefficients sigma qui reflètent les propriétés du CDO. On remarque qu'il y a un coefficient sigma de moins,  $a_4$ . Thibault a démontré que la loi de Lavorel pouvait être obtenue de la sienne en assumant que la somme des quatre coefficients donnait 1 (Thibault 1978). Cette hypothèse est équivalente à dire que la production d'oxygène doit être constante. Cependant, dans les données rapportées (Lavorel and Lemasson 1976) ainsi qu'ici, la production d'oxygène n'est pas constante. De plus, en utilisant les données de la Table 3.2.1. avec l'équation de Lavorel, l'erreur évaluée selon ma méthode augmente aussi, et est plus grande que les variations des coefficients. Ceci démontre premièrement que l'évaluation des erreurs dues au modèle est

importante, et de deuxièmement, que l'équation présentée par Thibault possède un meilleur accord avec les données.

En conclusion, les modèles des propriétés du dégagement d'oxygène ne peuvent s'accorder de façon précise aux données, parce que tous ces modèles font l'hypothèse que les propriétés en sont constantes. Au contraire, je viens de démontrer que les probabilités changent dans le temps. De plus, la variation des propriétés du dégagement d'oxygène entre le premier et le second éclair pourrait être à l'origine de l'anomalie sous le premier éclair, qui ne pouvait être expliquée jusqu'à maintenant que par un hypothétique état S-1 (c.f. introduction).

### 3.3. La dépendence des ratés envers l'état redox de la plastoquinone

Selon les modèles connus du dégagement d'oxygène, les propriétés du cycle des état-S sont constantes. Ceci peut laisser croire que ces propriétés ne dépendent que du CDO, indépendamment de l'état des accepteurs d'électrons du PSII (Butko 1988). Cependant, j'ai démontré en section 3.2. que ces propriétés ne sont pas constantes. J'émets donc l'hypothèse que la variation des ratés dans le temps est due à la variation de l'état redox des accepteurs d'électrons du PSII. Ceci peut s'expliquer par ce que les vitesses de désactivation des états  $S_1$  and  $S_2$  dépendent des états redox des accepteurs d'électrons du photosystème II, en particulier

de la plastoquinone (Radmer and Kok 1973, Diner 1977). Les désactivations causent alors des ratés, comme on peut le démontrer en utilisant la figure 1.3.2.2. de l'introduction. Un CDO dans l'état  $S_1$ , qui effectue une simple transition à l'état  $S_2$ , peut se désactiver à l'état  $S_1$  dans l'intervalle de noirceur entre deux éclairs. L'effet résultant d'une simple transition suivie d'une désactivation est donc identique à l'effet d'un "vrai" raté dans l'état  $S_1$ . Donc, dans la séquence de production d'oxygène, une simple transition suivie d'une désactivation ne peut être distinguée d'un "vrai" raté (Radmer and Kok 1975). Même à une fréquence d'éclairs élevée (5 Hz), des désactivations à partir de  $S_2$  se produisent (Packham et al. 1988).

La fluorescence variable est un indicateur de l'état rédox de la plastoquinone (Krause et Weis 1984). Afin d'étudier l'état rédox de la plastoquinone en fonction du numéro de l'éclair, j'ai donc mesuré la courbe d'induction de fluorescence après avoir donné un certain nombre d'éclairs. Pour donner les éclairs, la fibre optique de la lampe à éclairs du système de dégagement d' $O_2$  a été insérée dans la sphère intégrante du système de fluorescence. La quantité d'algues utilisée pour les mesure de fluorescence était équivalente à la quantité utilisée pour la mesure du dégagement d' $O_2$ . La courbe d'induction de fluorescence était alors mesurée en moins de 1 s après le dernier éclair.

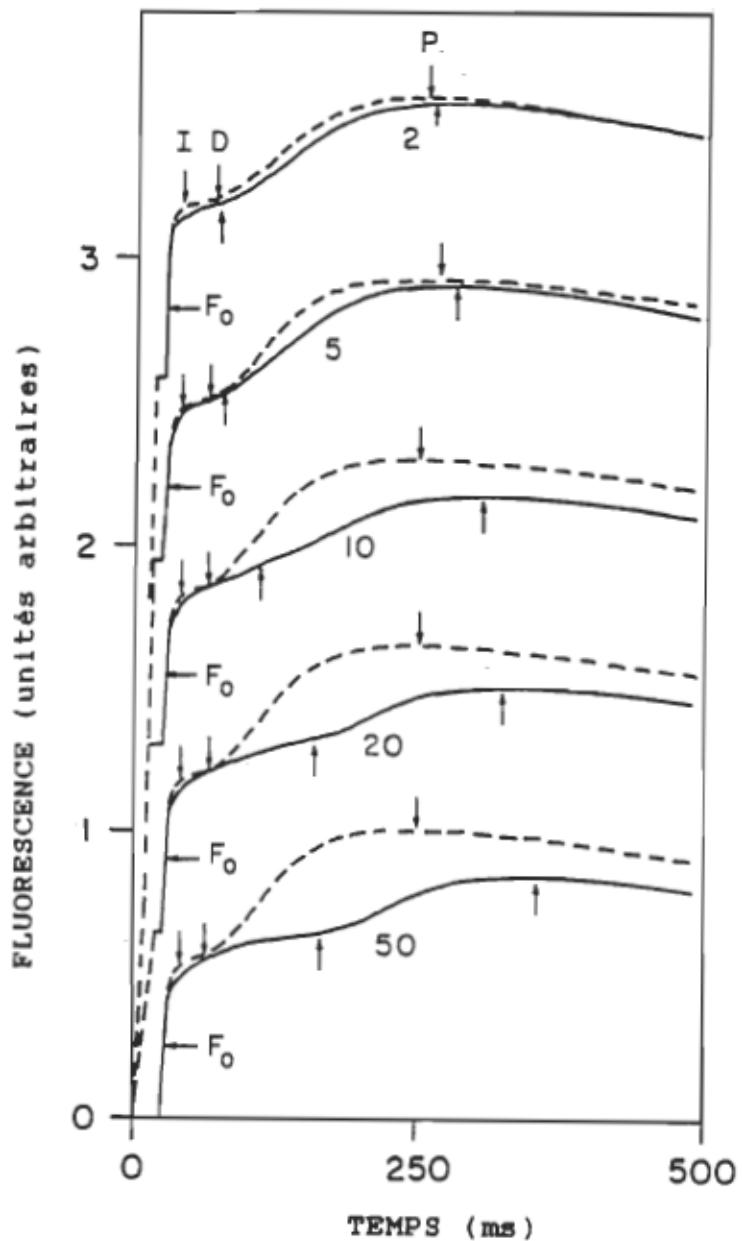


Figure 3.3.1. Courbes d'induction de fluorescence mesurées après N éclairs (voir le texte). Le nombre d'éclairs est indiqué sous chaque courbe. Les niveaux D et P ont été déterminés d'après les points d'inflexion de la courbe sur les graphiques originaux.

En Fig.3.3.1 se trouvent les courbes d'induction de fluorescence obtenues après avoir donné 2, 5, 10, 20 ou 50 éclairs à une fréquence de 10 Hz. Les expériences de contrôle, sans éclairs, sont montrées en lignes pointillées; les expériences avec éclairs sont montrées en ligne continue. Les niveaux I, D and P des contrôles sont indiqués avec des flèches vers le bas, et les niveaux D et P des expériences avec éclairs sont indiqués avec des flèches vers le haut. Aucun effet n'était produit par plus de 50 éclairs (résultats non montrés). Le niveau  $F_0$  était identique avec ou sans éclairs, et les deux ne peuvent être distingués en Fig.

3.3.1. Cependant on constate que plus le nombre d'éclairs est grand, plus le transient du niveau D à P est retardé. Comme la montée de fluorescence du niveau D à P dépend de la réduction du bassin de plastoquinone (Krause and Weis 1984), j'interprète le retard de la montée D-P, qui est induite par les éclairs, comme étant due à un état plus oxidé de la plastoquinone. L'oxidation de la plastoquinone par des éclairs saturants a déjà été observée dans Chlamydomonas, et est due au PSI (Peltier et al. 1987). Cette oxidation peut s'expliquer parce qu'après l'adaptation au noir, l'efficacité des photoréactions du PSII est diminuée et celle du PSI augmentée, comme dans l'état 2 (Williams and Salamon 1976, Williams et al. 1980). Une autre contribution à l'oxidation de la plastoquinone est probablement due au nombre

généralement plus élevé de PSI que de PSII dans Dunaliella tertiolecta (Sukenic et al. 1987). Donc, l'oxidation de la plastoquinone est due à un plus grand nombre de séparations de charges par PSI que par PSII.

Pour quantifier l'oxidation de la plastoquinone, j'ai calculé le retard entre le niveau D du contrôle et de l'expérience avec des éclairs. Puisque l'on connaît déjà la probabilité de ratés en fonction du numéro de l'éclair (Meunier et Popovic 1989), les deux peuvent être mis en graphique (Fig.3.3.2.). La relation entre la probabilité de ratés et le retard du niveau D est bien représentée par une ligne droite qui a été trouvée par régression linéaire. J'en

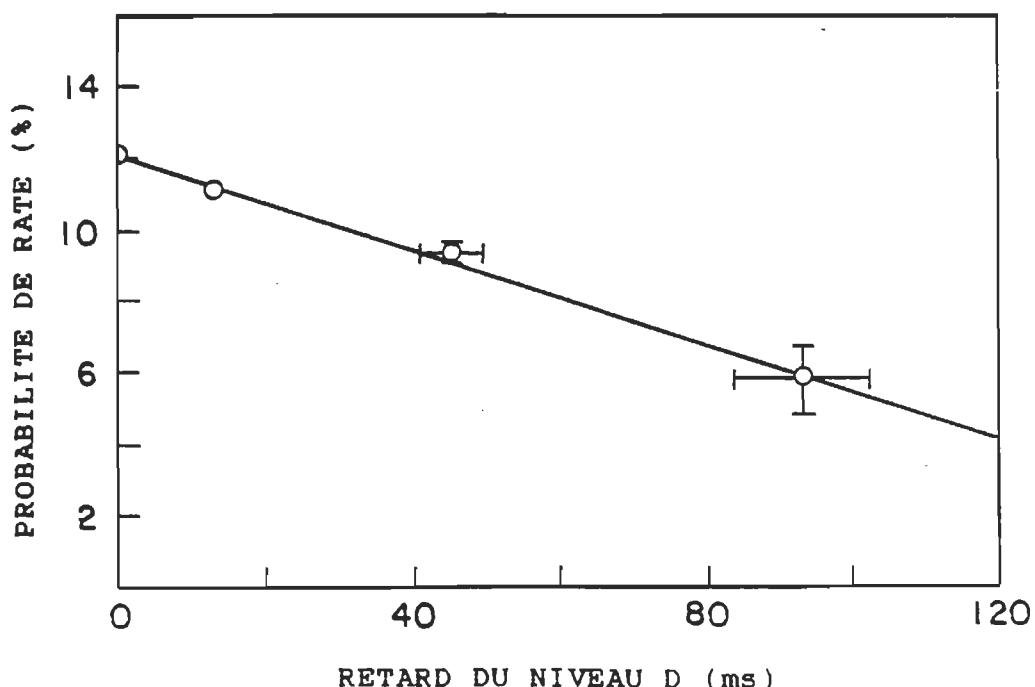


Figure 3.3.2. La probabilité moyenne de raté (en pourcentage) en fonction du retard du niveau D.

conclus que la variation de la probabilité de ratés avec le nombre d'éclairs est hautement corrélée (coefficient de détermination:  $R^2=0.996$ ) avec l'oxidation progressive de la plastoquinone.

La probabilité de ratés varie aussi avec la fréquence

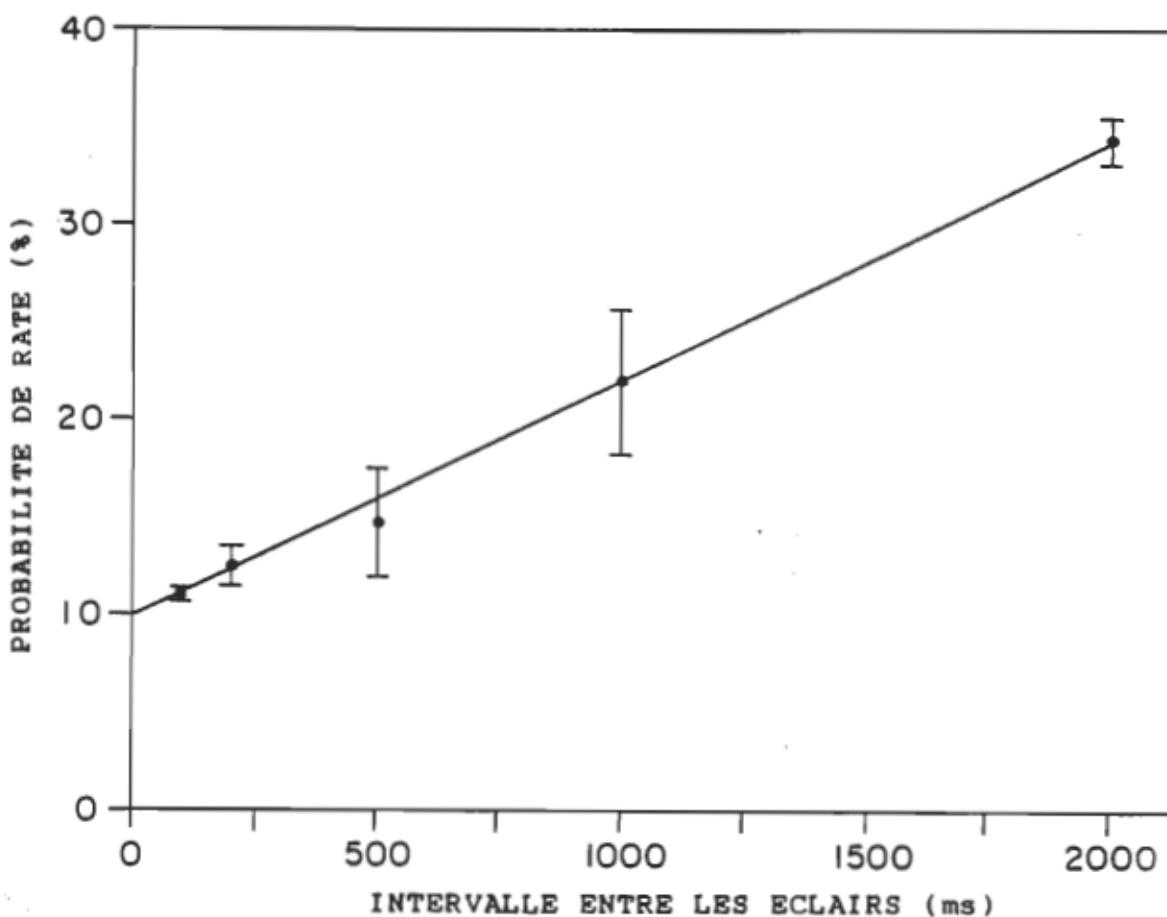


Figure 3.3.3. La probabilité moyenne de raté (en pourcentage) en fonction de l'intervalle entre les éclairs. La ligne droite a été calculée par régression linéaire pondérée, et est égale à:  $\alpha = 9.89 + 12.19 \cdot T$

Cette relation semble suivre une droite, comme montré sur le graphique. Selon la fréquence des éclairs, on peut s'attendre à ce que l'état rédox de la plastoquinone varie aussi; ceci peut être étudié en mesurant les courbes d'induction de fluorescence après 20 éclairs de fréquences variées (Fig.3.3.4.). Comme auparavant, les expériences de contrôle, sans éclairs, sont montrées en lignes pointillées; les expériences avec éclairs sont montrées en ligne continue. Les niveaux I, D and P des contrôles sont indiqués avec des flèches vers le bas, et les niveaux D et P des expériences avec éclairs sont indiqués avec des flèches vers le haut. On constate que plus haute est la fréquence, plus grand est le retard du niveau D. Ceci démontre que la plastoquinone est plus oxidée par une série de 20 éclairs donnés à haute fréquence qu'à basse fréquence. Il semble que l'intervalle de noirceur entre les éclairs annule partiellement l'effet oxidant des éclairs; j'en conclus que la plastoquinone est réduite dans le noir. Le retard du niveau D en fonction de l'intervalle de noirceur entre les éclairs est montré en Fig. 3.3.5. La relation suit de très près une exponentielle décroissante d'une constante de temps de 420 ms ( $R^2=0.991$ , évalué par une régression linéaire sur le logarithme du retard). Ceci indique que la réduction de la plastoquinone dans le noir, et l'annulation de l'effet oxidant des éclairs, obéissent à des cinétiques du premier ordre. Dans

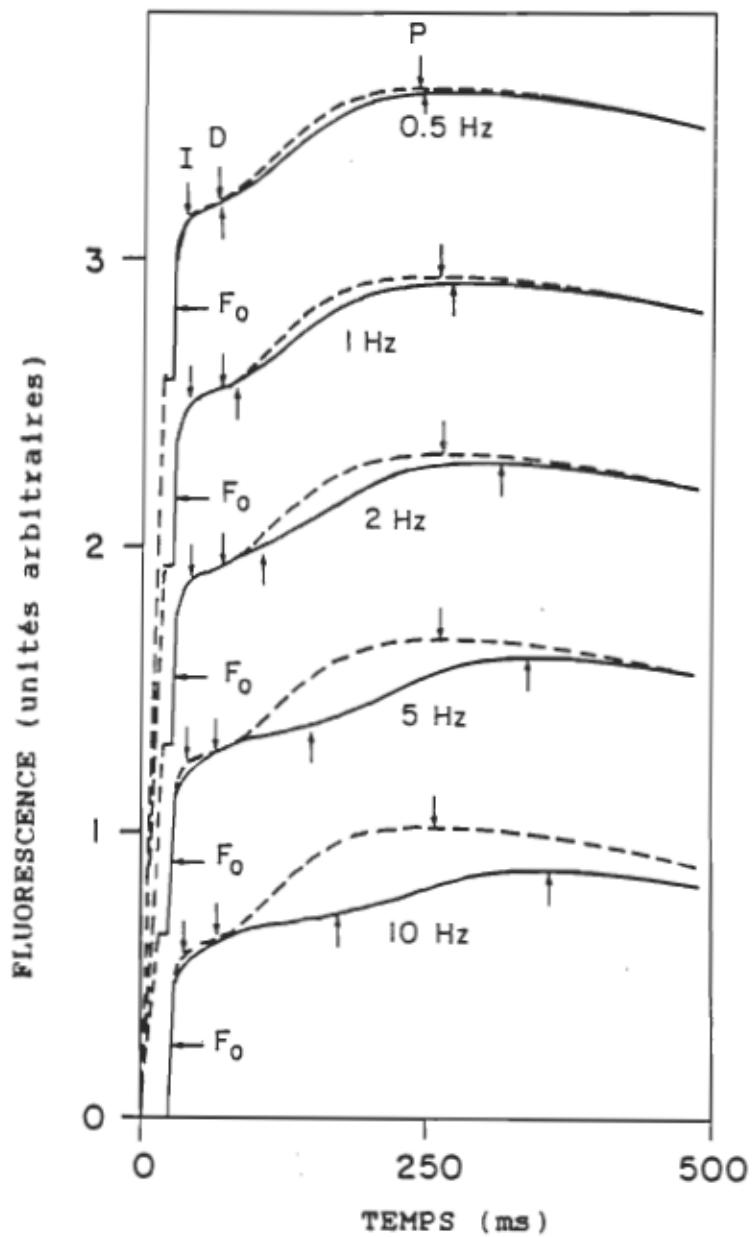


Figure 3.3.4. Courbes d'induction de fluorescence mesurées après 20 éclairs donnés à la fréquence indiquée (voir le texte).

l'intervalle de noirceur entre les éclairs, l'état redox de la plastoquinone retourne vers un état redox d'équilibre, obtenu après une adaptation au noir. Il semble donc, d'après ces expériences, que l'état redox de la plastoquinone est régulé dans le noir. La plastoquinone est utilisée comme transporteur d'électrons par la chaîne respiratoire et la chaîne photosynthétique dans les chloroplastes (Dominy and Williams 1987). La plastoquinone est réduite par l'activité d'une NADH-PQ-oxidoréductase (Godde and Trebst 1980, Godde 1982), dans le noir, pendant le cours de la chlororespiration

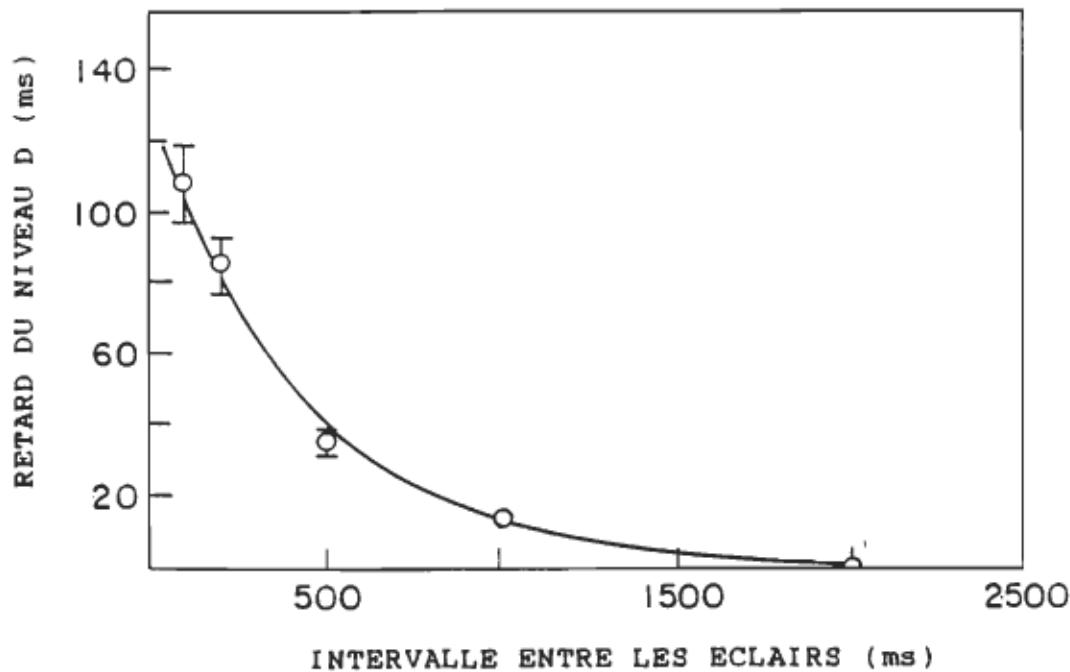


Figure 3.3.5. Le retard du niveau D, mesuré en Fig.3.3.4, en fonction de l'intervalle entre les éclairs. La ligne continue est une exponentielle décroissante d'une constante de temps de 420 ms (voir texte).

(Bennoun 1982). J'en conclus que le transport d'électrons de la chaîne chlororespiratoire est à l'origine de la réduction dans le noir de la plastoquinone. Il s'ensuit que l'état redox de la plastoquinone en fonction de l'intervalle entre les éclairs (Fig.3.3.5.) représente la compétition entre l'oxidation causée par les éclairs et la réduction causée par la chlororespiration. La constante de temps de 420 ms indique donc que dans les conditions utilisées, les vitesses d'oxidation et de réduction se compensent l'un l'autre quand l'intervalle entre les éclairs est de 0.5 s.

D'après la relation entre l'état redox de la plastoquinone et l'intervalle entre les éclairs (Fig.3.3.5.), ainsi que la relation entre la probabilité de ratés et l'intervalle entre les éclairs (Fig.3.3.3), on trouve la relation entre la probabilité de ratés et l'état redox de la plastoquinone. Donc, d'après les Figs.3.3.3 et 3.3.5, la probabilité de ratés dépend de façon exponentielle de l'état redox de la plastoquinone; cependant, en Fig.3.3.2, la relation montrée est linéaire. Cette contradiction apparente s'explique par ce que les conditions expérimentales diffèrent: en Fig.3.3.2., une fréquence d'éclairs constante (10 Hz) a été utilisée, alors qu'en Figs. 3.3.3. et 3.3.5., la fréquence d'éclairs était variable. Examinons comment les ratés peuvent dépendre de l'état redox de la plastoquinone et de la fréquence des éclairs. La plastoquinone contrôle la

quantité de Qa réduit (Diner 1977). Les Qa réduits ferment les PSII à la photochimie, ce qui augmente les "vrais" ratés. Cependant, ce mécanisme ne peut expliquer nos résultats, puisque la probabilité dépendrait seulement de l'état rédox de la plastoquinone. Cependant, il est à remarquer que les Qa réduits accélèrent la désactivation de l'état S2 (Diner 1977), et augmentent les ratés. Donc, plus l'intervalle de temps entre les éclairs est grand, plus le nombre de désactivations possible est grand. L'existence de désactivations à partir de S2, qui produisent des ratés même à haute fréquence (5 Hz), a été prouvée dans les thylakoides (Packham et al. 1988). En conclusion, les phénomènes que j'ai observés ne peuvent être expliqués que par un grand nombre de désactivations, qui dépendent de l'intervalle entre les éclairs et l'état rédox de la plastoquinone.

Cette théorie peut être exprimée mathématiquement et comparée aux résultats expérimentaux. L'état rédox de la plastoquinone dépend de l'intervalle entre les éclairs selon une exponentielle de 420 ms (Fig.3.3.5):

$$[3.3, 1] \quad [PQH_2] = K_1 (1 - \exp(-T/420 \text{ ms}))$$

où  $[PQH_2]$  est la quantité de plastoquinone réduite,  $K_1$  est la quantité maximum de plastoquinone réduite, et  $T$  est l'intervalle de temps entre les éclairs. La plastoquinone réduite augmente la quantité de Qa réduit, ce qui active les désactivations de l'état S2 (Diner 1977). Afin de simplifier

les équations, supposons que la relation entre la quantité de  $Qa^-$  et la quantité de plastoquinone réduite est linéaire, ce qui est justifiable quand moins de 75% de la plastoquinone est réduite (Diner 1977). Les désactivations de S2 sont biphasiques, avec une phase environ 10 fois plus lente que l'autre (Vermaas et al. 1984, Packham et al. 1986). En négligeant la contribution de la phase lente, on peut approximer que la désactivation de l'état S2 suit une exponentielle sur l'intervalle de temps qui nous intéresse.

Alors on a:

$$[3.3, 2] \quad S2(T) = C \exp(-K_2 [PQH_2] T)$$

où  $S2(T)$  est la quantité de CDO dans l'état S2 au temps  $T$ ,  $C$  est la quantité de CDO dans l'état S2 à  $T=0$  (i.e. quand les transitions de S1 à S2 après l'éclair ont eu le temps de se produire) et  $K_2$  exprime la dépendance de la constante de temps de désactivation de l'état S2 envers la quantité de plastoquinone réduite. La quantité de désactivations qui se sont produites dans l'intervalle de temps  $T$  est donc donnée par  $C - S2(T)$ . Puisque les désactivations apparaissent comme des ratés (c.f. introduction), cette quantité s'ajoute aux ratés qui semblent s'être produits à l'éclair précédent. Ainsi, la probabilité de ratés en fonction de l'intervalle entre les éclairs est:

$$[3.3, 3] \quad \alpha = \alpha_0 + C(1 - \exp(-K_2 [PQH_2] T))$$

où  $\alpha$  est la probabilité de ratés (exprimée de 0 à 1) et  $\alpha_0$  est la probabilité des ratés qui ne sont pas dus aux désactivations. En prenant 1 (i.e. 100%) comme le maximum possible de ratés,  $\alpha_0 + C$  doit donner 1; en remplaçant dans [3.3, 3], on obtient:

$$[3.3, 4] \quad \alpha = 1 - C \exp(-K_2 [PQH_2] T)$$

En combinant les Eqs. [3.3, 1] et [3.3, 3], on obtient:

$$[3.3, 5] \quad \alpha = 1 - C \exp(-K_2 K_1 T (1 - \exp(-T/420 \text{ ms})))$$

où les symboles ont la même signification qu'auparavant. Une régression linéaire du logarithme de cette équation avec les données en Fig.4 donne un coefficient de détermination ( $R^2$ ) of 0.998,  $C = 0.892 \pm 0.004$ , and  $(K_1 \times K_2) = 0.153 \pm 0.004$ . Cet accord quantitatif supporte ma théorie, et la courbe résultante est pratiquement indistinguable de la ligne montrée en Fig.3.3.3.

La quantité  $1-C$ , qui est la probabilité d'un raté produit autrement que par une désactivation, est environ de 10%. Afin de déterminer si ces ratés dépendent aussi de l'état rédox de la plastoquinone, un accepteur d'électrons artificiel peut être ajouté. Dans les algues halophylliques, la benzoquinone accepte les électrons du bassin de plastoquinone et d'un site près de Qb (Preston and Critchley 1988). En Fig.3.3.6, l'effet de 0.25mM benzoquinone sur les accepteurs du PSII de *Dunaliella tertiolecta* a été

caractérisé par la mesure de la fluorescence. Le niveau I de fluorescence est diminué, et le transient P est complètement éliminé par l'addition de benzoquinone, ce qui montre qu'à 0.25 mM, les accepteurs d'électrons du PSII sont oxidés et le demeurent. Afin de mesurer le dégagement d'oxygène sous éclairs dans les mêmes conditions, le gel de polyacrylamide a été trempé pendant 10 min. avant les mesures dans 0,25 mM de benzoquinone. Ceci permet à la benzoquinone de diffuser dans le gel, de sorte que l'échantillon est gardé à une concentration constante de benzoquinone durant l'adaptation au noir.

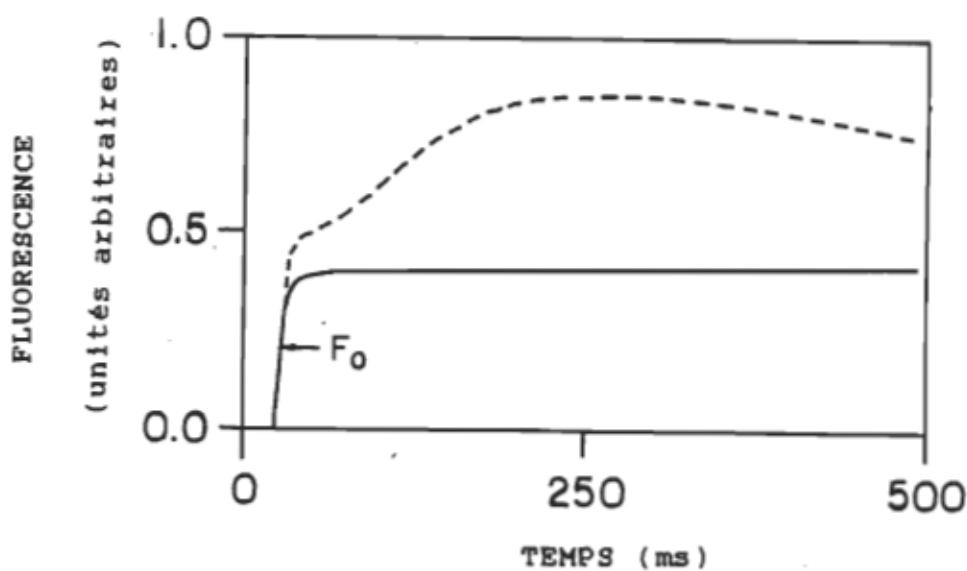


Figure 3.3.6. Courbe d'induction de fluorescence de D. tertiolecta incubé pendant 5 min avec 0.25 mM de benzoquinone (méthanol total: 0.5%; ligne pointillée: contrôle).

Dans les séquences de production d'oxygène, la plus grande quantité de ratés qu'il est possible de déterminer se produit à une fréquence de 0.5 Hz (Fig. 3.3.3.). Les séquences de production d' $O_2$  à une fréquence de 0.5 Hz, avec et sans 0.25 mM benzoquinone, sont montrées en Fig. 3.3.7. Dans le contrôle, l'amortissement de l'oscillation est très rapide, et est dû principalement aux ratés (l'analyse sigma donne une probabilité moyenne de ratés de 34%, comparé à 7% pour une double transition). En présence de benzoquinone, l'amortissement est très lent, et est dû principalement aux

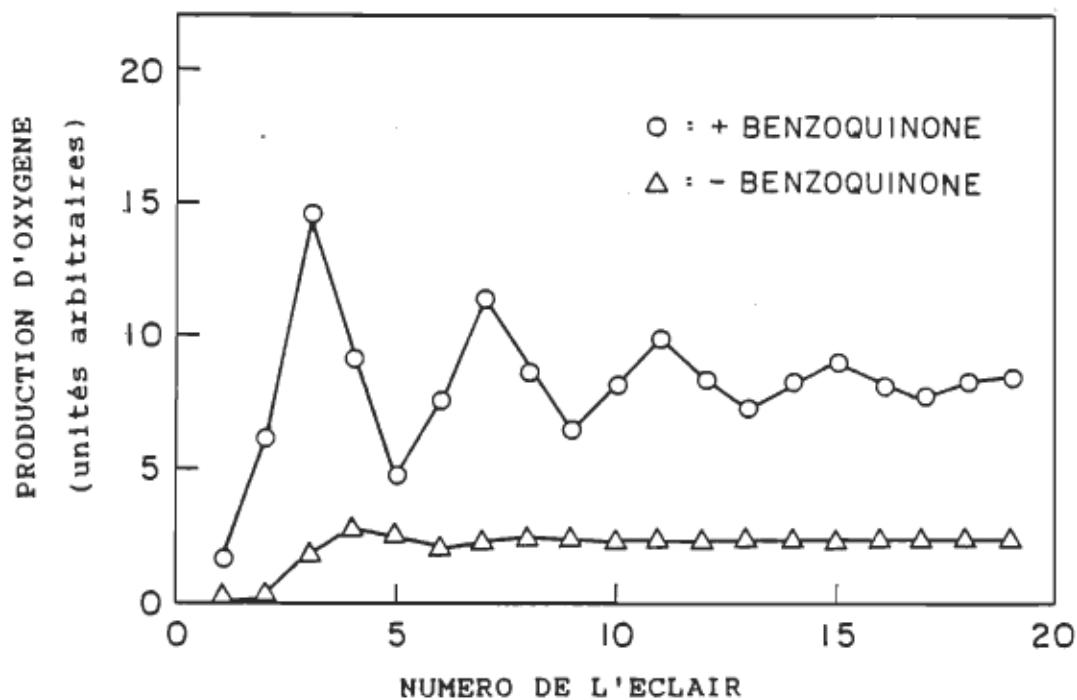


Figure 3.3.7. Production d'oxygène en fonction du numéro de l'éclair, à une fréquence de 0.5 Hz (triangles), et avec 0.25 mM benzoquinone (cercles).

doubles transitions (la probabilité moyenne de ratés est 3% alors que la probabilité de doubles transitions est 13%). On remarque aussi qu'en présence de benzoquinone, plus d'oxygène est produit. Une augmentation de la production d'oxygène, corrélée avec une baisse des ratés, implique un mécanisme produisant des pertes d'équivalents rédox, i.e. une perte des trous accumulés pour le dégagement d' $O_2$  (Lavorel 1978). Cependant, le modèle de ratés selon un transporteur de charges "C" implique une absence de perte d'équivalents rédox; de plus, l'activité de "C" n'est pas supposée dépendre de l'état rédox des accepteurs d'électrons du PSII (Lavorel et Maisond-Peteri 1983). Donc, selon nos données, la contribution maximum du transporteur "C" aux ratés dans Dunaliella tertiolecta est la partie qui n'est pas affectée par la benzoquinone, i.e. 3% de probabilité. J'en conclus que des 10% de probabilité de ratés qui ne sont pas dus aux désactivations, environ 7% dépendent tout de même de l'état rédox de Qa. La seule possibilité raisonnable est que ces ratés sont dus à la fermeture des PSII par Qa<sup>-</sup>.

L'effet de la benzoquinone sur une autre algue, Chlorella sp., a été rapporté (Greenbaum and Mauzerall 1976). À de basses concentrations d' $O_2$  (10 ppm) et à une très basse fréquence d'éclairs (0.1Hz), la production d'oxygène par Chlorella est très proche de nos résultats avec D. tertiolecta (Fig. 3.3.7.). Cependant, la chlororespiration

n'avait pas encore été découverte à ce temps (Bennoun 1982). Les conditions anaérobiques résultent en la réduction de la plastoquinone (Diner 1977), parce que les électrons de la chaîne chlororespiratoire ne peuvent être drainés (Peltier et al. 1987). Dans les expériences de Greenbaum et Mauzerall, la basse concentration d' $O_2$  permet la réduction de la plastoquinone par l'enzyme NADH-PQ-oxidoréductase. La plastoquinone réduite gardait Qa réduit, ce qui produisait des désactivations et un amortissement rapide du dégagement d'oxygène. Leur addition de benzoquinone (à 0.1 mM) a enlevé presque tous les ratés en gardant Qa oxidé. Ceci démontre que les ratés dans Chlorella ne peuvent pas être dus à un transporteur de charges "C", par le même raisonnement utilisé pour les expériences rapportées ici. La nature des ratés n'est donc pas conservatrice, mais résulte en une perte d'équivalents rédox.

Il a été proposé que l'état rédox de la plastoquinone à la noirceur dépendait d'un équilibre entre des processus de réduction et d'oxidation impliquant l'oxygène (Diner and Mauzerall 1973). On sait que dans le noir, la chlororespiration est active (Bennoun 1982) et utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons final (Williams and Allen 1987). Je propose donc que l'état rédox de la plastoquinone dans le noir est déterminé par la chlororespiration; ceci a pour conséquence que la

probabilité de ratés au début de l'illumination est déterminée par la chlororespiration.

En conclusion, j'ai montré que les ratés sont causés principalement par deux mécanismes non-conservatifs, qui dépendent de l'état rédox de la plastoquinone. Une partie des ratés est due aux Qa- qui ferment les centres réactionnels du PSII pour la photochimie, ce qui produit des "vrais" ratés. Ces ratés dépendent seulement de l'état rédox de la plastoquinone, et pas de l'intervalle entre les éclairs. Une importante contribution aux ratés est produite dans les états-S où les désactivations sont possibles (S3 et S2), parce que les désactivations apparaissent comme des ratés. Donc, ces ratés sont répartis de façon inégale dans les états-S, et ils dépendent de l'intervalle de temps entre les éclairs. Parce que l'état rédox de la plastoquinone dans le noir est déterminé par la chlororespiration, la quantité de ratés aux premiers éclairs est déterminée par la chlororespiration. L'état rédox de la plastoquinone change durant l'illumination, ce qui résulte en un changement de la probabilité de ratés. Ainsi, la probabilité de ratés n'est pas une propriété constante de l'ensemble PSII-CDO comme il a déjà été assumé (Butko 1988); au contraire, elle varie avec le temps, la concentration d'oxygène et l'illumination, comme l'état rédox de la plastoquinone.

### 3.4. Détermination des probabilités de ratés dus au désactivations pour chaque état-S

On a vu à la section précédente que les ratés sont composés d'une partie minimale de 3% qui est indépendante de l'état rédox des transporteurs d'électrons. Une partie supplémentaire de 7% est due à l'existence de Qa réduit, qui ferme les centres réactionnels du PSII et qui produit des ratés qui sont nécessairement homogènes pour tous les états-S. Ces Qa réduits sont dus à l'équilibre dynamique des électrons entre le bassin de plastoquinone et Qa (Diner 1977). Finalement, les désactivations des états-S dans l'intervalle entre les éclairs produit un effet semblable à une quantité de ratés additionnelle, qui n'est pas homogène. Cependant on ne connaît pas comment ces ratés additionnels se distribuent dans les états-S.

Afin de caractériser les ratés dus aux désactivations, j'ai élaboré une nouvelle approche basée sur le concept de l'état stationnaire dans le dégagement d'oxygène. Dans l'état stationnaire, le dégagement d'oxygène dépend en partie de la probabilité de ratés dans l'état S3 (voir Eq. 4 dans Joliot et Kok 1975); mais elle dépend aussi d'une contribution des doubles transitions à partir de S2, dont j'ai tenu compte dans l'équation suivante:

$$[3.4, 1a] \quad S3ss (1 - \alpha_{S3}) + \tau S2ss = Yss$$

où  $S_{Xss}$  est la quantité de CDO dans l'état SX à l'état stationnaire,  $Y_{ss}$  dénote l'amplitude du dégagement d'oxygène à l'état stationnaire,  $\alpha_{S3}$  dénote la probabilité de ratés dans l'état S3, et  $\tau$  est la probabilité de doubles transitions. La probabilité de doubles transitions est homogène pour tous les états-S, parce que une double transition suivie d'une désactivation apparaît simplement comme un raté supplémentaire dans un autre état-S et une transition simple de moins. La probabilité de doubles transitions est donc indépendante de la présence de désactivations, comme constaté précédemment.

Dans l'état stationnaire du dégagement d'oxygène, la quantité d'oxygène produite à chaque éclair, par définition, est constante. La quantité de CDO qui effectuent la transition de S4 à S0, à chaque éclair, peut être comparée à un "flux" de CDO vers l'état S0. Par un flux vers un état  $S_n$ , j'entends non seulement les CDO qui finissent dans cet état, mais aussi ceux qui continuent à l'état  $n+1$  par une double transition. A l'état stationnaire, le flux vers S0 est constant à chaque éclair et égal à la production d'oxygène. Dans l'état stationnaire, la quantité de CDO dans chaque état-S est aussi constante; il s'ensuit que le flux de CDO vers l'état S0 (égal à  $Y_{ss}$ ) doit être contrebalancé par un flux égal, sortant de l'état S0 et vers l'état S1. Ce flux de CDO vers l'état S1 est égal à la quantité de CDO qui

n'effectuent pas un raté dans  $S_0$ , plus les doubles transitions venant de  $S_3$ :

$$[3.4, 1b] \quad S_{0ss} (1 - \alpha_{S0}) + \tau S_{3ss} = Y_{ss}$$

où les symboles ont la même signification qu'auparavant. Il faut remarquer que les doubles transitions à partir de  $S_3$  contribuent aux deux flux de CDO vers  $S_0$  et vers  $S_1$ , et sont donc présentes des deux côtés de l'Eq. [3.4, 1b]: implicitement dans  $Y_{ss}$  et explicitement dans l'expression du flux vers  $S_1$ . De la même manière, le flux vers  $S_1$  (égal à  $Y_{ss}$ ) doit être contrebalancé par un flux égal sortant de  $S_1$  vers l'état  $S_2$ :

$$[3.4, 1c] \quad S_{1ss} (1 - \alpha_{S1}) + \tau S_0 = Y_{ss}$$

et, en étendant ce raisonnement, tous les flux vers n'importe quel état- $S$  doivent être égaux au dégagement d'oxygène à l'état stationnaire:

$$[3.4, 1d] \quad S_{2ss} (1 - \alpha_{S2}) + \tau S_{1ss} = Y_{ss}$$

Les probabilités de ratés peuvent être isolées des équations précédentes:

$$[3.4, 2a] \quad \alpha_{S3} = (S_{3ss} + \tau S_{2ss} - Y_{ss}) / S_{3ss}$$

$$[3.4, 2b] \quad \alpha_{S2} = (S_{2ss} + \tau S_{1ss} - Y_{ss}) / S_{2ss}$$

$$[3.4, 2b] \quad \alpha_{S1} = (S_{1ss} + \tau S_{0ss} - Y_{ss}) / S_{1ss}$$

$$[3.4, 2b] \quad \alpha_{S0} = (S_{0ss} + \tau S_{3ss} - Y_{ss}) / S_{0ss}$$

où les symboles ont la même signification que précédemment. Ces nouvelles équations expriment les probabilités de ratés pour chaque état-S en fonction du dégagement d'oxygène à l'état stationnaire et de la distribution des CDO à l'état stationnaire. De plus, elles démontrent que, pour un  $Y_{SS}$  donné, la distribution des ratés correspond à une seule distribution de CDO à l'état stationnaire.

La distribution des CDO, dans l'état stationnaire, dépend des conditions d'illumination. En changeant brusquement ces conditions, une oscillation du dégagement d'oxygène apparaît, jusqu'à ce qu'un nouvel état stationnaire soit atteint (Lavorel et Maison-Peteri 1983). A mon avis, cette oscillation est caractéristique de la transition entre les deux états stationnaires, et renferme donc des informations sur les différences entre ces deux états. En connaissant un des états stationnaires, l'autre peut alors être connu. J'ai donc mesuré l'oscillation résultant de la transition de l'état stationnaire à une basse fréquence, jusqu'à l'état stationnaire à une fréquence de 5 Hz. Les dégagements d'oxygène suivant le changement de fréquence dépendent alors de la distribution des états-S au précédent état stationnaire. Ainsi, la distribution des états-S à une fréquence de 5 Hz sert de référence, à partir de laquelle les différences dans la distribution des CDO et des ratés peuvent être connues. A 5 Hz, il y a peu de désactivations et la

distribution des ratés est à toute fin pratique homogène; ainsi la distribution des états-S à la fréquence précédente peut être calculée. Pour ce calcul, on peut utiliser des équations présentées auparavant (Eqs. 3a-d dans Joliot and Kok 1975). Cependant, ces équations ne peuvent être utilisées que quand les doubles transitions sont négligeables puisque elles n'en tiennent pas compte. Afin de tenir compte des doubles-transitions, j'ai modifié les équations présentées par Joliot et Kok. Les équations améliorées sont les suivantes:

$$[3.4, 3a] Y_1 = (1 - \alpha)S_3 + \tau S_2$$

$$[3.4, 3b] Y_2 = \alpha Y_1 + (1 - \alpha)(\theta S_2 + \tau S_1) + \tau \theta S_1 + \tau^2 S_0$$

$$[3.4, 3c] Y_3 = 2\alpha Y_2 + (\tau^2 - \alpha^2)Y_1 + (1 - \alpha)(\theta^2 S_1 + 2\theta\tau S_0) \\ + \theta^2\tau S_0 + 2\theta\tau^2 S_3$$

$$[3.4, 3d] Y_4 = 3\alpha Y_3 + 3(\tau^2 - \alpha^2)Y_2 + 3\theta^2\tau Y_1 + (1 - \alpha)\theta^2 S_0 \\ + \theta^2\tau S_3$$

où  $Y_n$  représente le dégagement d'oxygène au  $n^{\text{ème}}$  éclair,  $\alpha$  est la probabilité moyenne de ratés à 5 Hz,  $\theta$  est la probabilité de simples transitions à 5 Hz,  $\tau$  est la probabilité de doubles transitions à 5 Hz, et  $S_X$  représente la fraction de CDO dans l'état  $S_X$  à l'état stationnaire. Les termes contenant la troisième puissance en  $\tau$  et/ou en  $\alpha$  ont été négligés dans l'Eq. [3.4, 3d], puisque ils ont des valeurs de l'ordre de  $10^{-3}$  ou moins. Afin de minimiser la grosseur des équations, je les ai exprimées tant que possible

en termes des dégagements d'oxygènes expérimentaux. En isolant les termes en  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ , et  $S_3$  dans les Eqs. [3.4, 3] donne:

$$[3.4, 4a] S_3 = (Y_1 - \tau S_2) / (1 - \alpha)$$

$$[3.4, 4b] S_2 = (Y_2 - \alpha Y_1 - (1 - \alpha) \tau S_1 - \tau \beta S_1 - \tau^2 S_0) / \beta (1 - \alpha)$$

$$[3.4, 4c] S_1 = \frac{Y_3 - 2\alpha Y_2 - (\tau^2 - \alpha^2) Y_1 - 2\tau^2 \beta S_3}{\beta^2 (1 - \alpha)} - \frac{2\tau S_0}{\beta} - \frac{\tau S_0}{(1 - \alpha)}$$

$$[3.4, 4d] S_0 = \frac{Y_4 - 3\alpha Y_3 - 3(\tau^2 - \alpha^2) Y_2 - 3\beta^2 \tau Y_1 - \tau \beta^2 S_3}{\beta^3 (1 - \alpha)}$$

où les symboles ont la même signification qu'auparavant. Les équations [3.4, 4] permettent de déterminer la distribution des CDO en donnant une série d'éclairs, qui produisent alors des dégagements d'oxygène qui dépendent des quantités de  $S_3$ ,  $S_2$ ,  $S_1$  and  $S_0$  dans les conditions précédant les éclairs de mesure. Comme les équations de Joliot et Kok (1975), ces équations améliorées peuvent être utilisées dans une variété de conditions de pré-illumination. Dans ce cas-ci, la pré-illumination consiste à donner des éclairs à une basse fréquence pour atteindre l'état stationnaire à cette fréquence. Les éclairs à 5 Hz donnent alors l'information sur la distribution des CDO à l'état stationnaire précédent, qui peut être calculée avec les Eqs. [3.4, 4]. La distribution des CDO est ensuite interprétée avec les Eqs. [3.4, 2] comme la présence d'une distribution de ratés inégale dans les conditions de pré-illumination. J'aimerais souligner que le résultat de l'interprétation, des ratés

inhomogènes, ne s'applique qu'aux conditions précédentes de pré-illumination, et est sans lien avec la distribution des ratés à 5 Hz.

Afin de connaître les probabilités de transitions à 5 Hz, comme requis par les Eqs.[3.4, 4], la production d'oxygène dans des algues D. tertiolecta adaptées au noir a été mesurée à une fréquence de 5 Hz (Fig.3.4.1). L'analyse mathématique par l'équation de récurrence donne une probabilité moyenne de ratés de 11.16% (+/-0.18%), une probabilité de simples transitions de 82.94% (+/-0.19%) et une probabilité de doubles transitions de 5.90% (+/-0.26%).

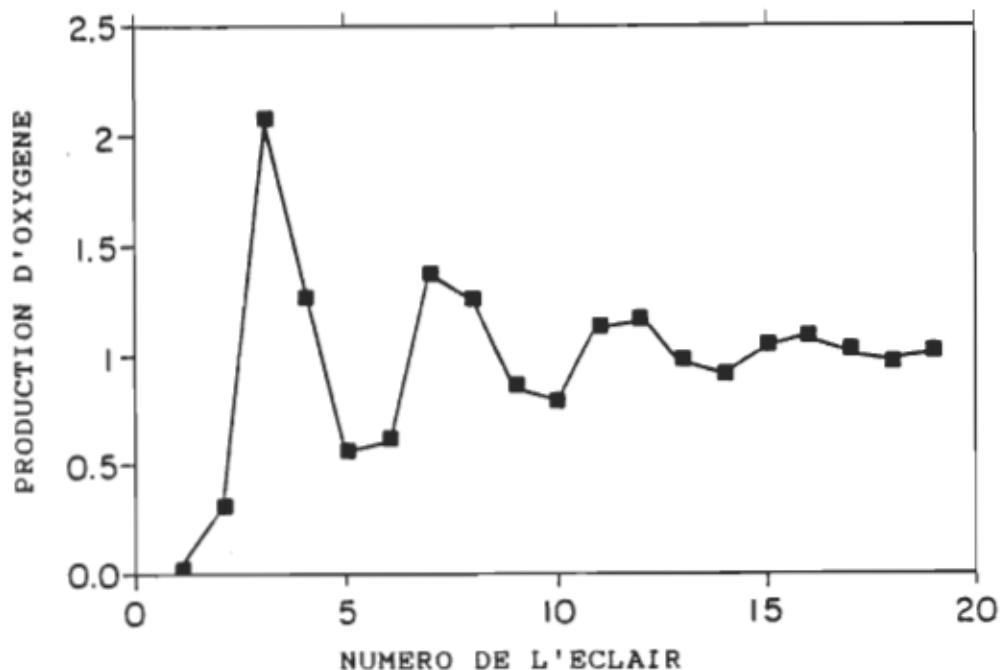


Figure 3.4.1. Oscillation de la production d'oxygène d'algues adaptées au noir, en fonction du numéro de l'éclair (fréquence de 5Hz).

A des fréquences d'éclairs plus basses que 5 Hz, les désactivations deviennent plus importantes. Par conséquent, plus la fréquence est basse, plus la distribution des CDO est affectée par les désactivations; par définition, les désactivations à partir de l'état S3 diminuent la quantité de CDO dans l'état S3. Cependant, il faut remarquer que la distribution des CDOs n'est pas constante dans l'intervalle entre les éclairs, puisque des désactivations se produisent durant tout cet intervalle de noirceur. Conséquemment, dans l'état stationnaire obtenu en donnant des éclairs, la distribution des CDO n'est pas unique et varie dans l'intervalle de noirceur entre les éclairs. Je définis la distribution des CDO de l'état stationnaire comme celle produisant le dégagement d'oxygène observable à l'état stationnaire. Ainsi, le dégagement d'oxygène à l'état stationnaire, obtenu par des éclairs à basse fréquence, résulte d'une distribution particulière de CDOs qui n'est présente que juste avant un de ces éclairs. On peut mesurer cette distribution de CDO en remplaçant un de ces éclairs, à l'état stationnaire, par une série d'éclairs à 5 Hz. Les dégagements d'oxygène qui en résultent, quand utilisés avec les Eqs. [3.4, 4], permettent de calculer la distribution de CDO à la fréquence précédente (relativement à la distribution à 5 Hz, comme mentionné précédemment).

Les mesures de la distribution de CDO à l'état stationnaire de deux fréquences, 0.5 Hz et 0.2 Hz, sont montrées en Fig.3.4.2. Pour les deux fréquences, les échantillons ont atteint l'état stationnaire avec un pré-traitement de 25 éclairs. Seulement les éclairs #20 à 25 des pré-traitements sont montrés; les carrés noirs correspondent au pré-traitement à 0.2 Hz et les triangles blancs au pré-traitement à 0.5 Hz. On voit que les amplitudes des cinq éclairs de pré-traitement à 0.5 Hz et à 0.2 Hz sont constantes, ce qui indique que l'état stationnaire a été

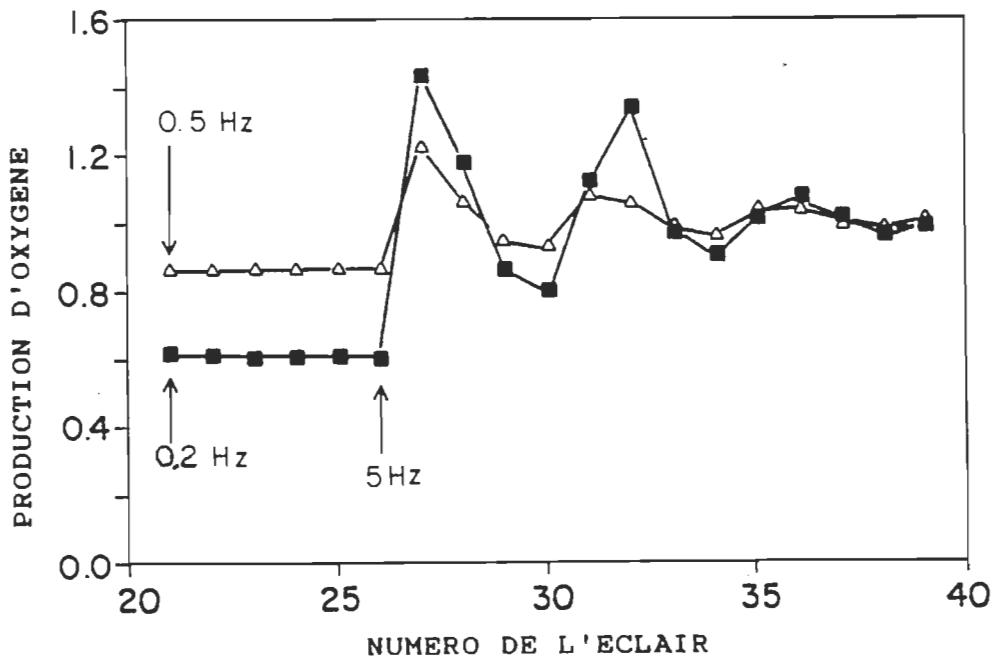


Figure 3.4.2. Oscillation du dégagement d'oxygène en fonction du numéro de l'éclair, qui résulte d'un changement de fréquence, de 0.2 Hz (carrés noirs) et de 0.5 Hz (triangles blancs) à 5 Hz.

atteint. Ensuite, la distribution des CDO a été mesurée en donnant une série d'éclairs à 5 Hz. Les éclairs à 5 Hz sont numérotés sur le graphique à partir de 26; les amplitudes de dégagement d'oxygène sont normalisées relativement à l'état stationnaire à 5 Hz. Les amplitudes stationnaires de dégagement d'oxygène à 0.5 Hz et à 0.2 Hz sont respectivement 13% et 40% plus basses qu'à 5 Hz. Ceci est une indication certaine que les désactivations à 0.2 Hz et 0.5 Hz produisent

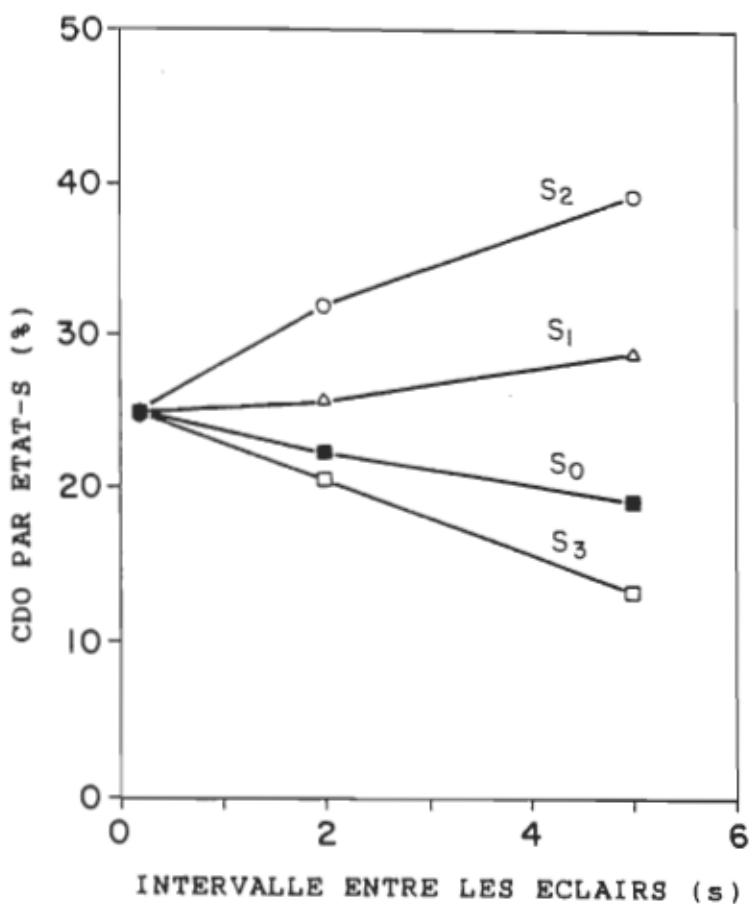


Figure 3.4.3. Pourcentage de CDOs dans chaque état-S, en fonction de l'intervalle entre les éclairs.

une perte de puissance oxidante utilisable pour séparer l'eau.

La distribution calculée des CDOs est présentée en Fig.3.4.3. en fonction de l'intervalle entre les éclairs. A un intervalle de 0.2s entre les éclairs (5 Hz), le pourcentage de CDO dans chaque état-S est homogène (par hypothèse), i.e. il est de 25% pour tous les états-S. A mesure que l'intervalle entre les éclairs augmente, le pourcentage de CDO dans l'état S2 augmente le plus vite, alors que le pourcentage de CDO dans l'état S3 devient le plus bas. Le pourcentage de CDO dans l'état S1 augmente légèrement, alors que le pourcentage de CDO dans l'état S0 diminue. J'interprète ce phénomène comme la conséquence des désactivations, par l'argument suivant. D'une part, les CDO qui vont de S2 à S3 suite à un éclair, et qui reviennent à S2 par désactivation, semblent demeurer dans l'état S2; d'autre part, à chaque éclair il y a un flux de CDO vers S2, en provenance de S1 et S0. Ce débordement, entre la difficulté de quitter l'état S2 et la facilité d'y entrer, produit l'augmentation de la population de CDO dans l'état S2. Il en résulte que la quantité de CDO dans l'état S3 devient plus basse, parce que pendant l'intervalle de noirceur entre les éclairs des CDO dans S3 se sont désactivés à S2. Plus la population de CDO dans S3 diminue, moins il y a de CDO allant à S0 suite à un éclair; par conséquent, la

population de CDO dans  $S_0$  diminue. La baisse de la population de CDO dans  $S_0$  est plus petite que la baisse dans l'état  $S_3$ , parce que la plus grande population de  $S_2$  résulte en un plus grand nombre de doubles transitions de  $S_2$  à  $S_0$ . La population de CDO dans l'état  $S_1$  augmente légèrement, ce qui s'explique par l'existence de désactivations de  $S_2$  à  $S_1$  qui produisent une accumulation de CDO dans  $S_1$  par le même

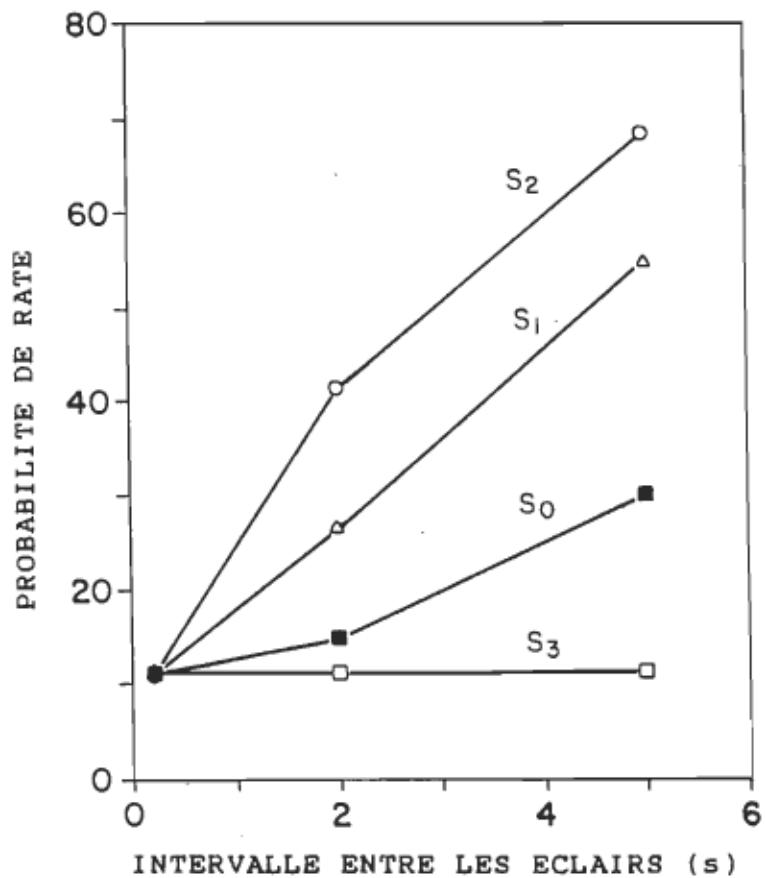


Figure 3.4.4. Probabilité de ratés (en pourcentage) en fonction de l'intervalle entre les éclairs, calculée à partir de la Fig. 3.4.3.

mécanisme décrit pour S2. Donc, j'ai trouvé que la distribution de CDO à de basses fréquences (jusqu'à 0.2 Hz) est très inhomogène, avec la plus grande population de CDO dans S2, suivi de S1, S0 et S3.

La distribution de CDO à l'état stationnaire permet de calculer la distribution des probabilités de ratés, en utilisant les Eqs.[3.4, 3]. La distribution des ratés sur chaque état-S est montrée en Fig. 3.4.4 en fonction de l'intervalle entre les éclairs. Avec un intervalle de 0.2 s entre les éclairs (5 Hz), les probabilités de ratés sont homogènes (par hypothèse) et ont une valeur 11.2%. En augmentant l'intervalle entre les éclairs, la probabilité de ratés sur S2 augmente le plus vite. La probabilité de ratés sur S1 augmente aussi avec l'intervalle entre les éclairs, avec une pente légèrement inférieure. La probabilité de ratés sur S0 augmente lentement, et la probabilité de ratés sur S3 est constante. L'augmentation des ratés avec l'intervalle entre les éclairs reflète l'augmentation des désactivations qui apparaissent comme des ratés. On a vu dans la section précédente que les désactivations d'un état  $S_{x+1}$  jusqu'à  $S_x$  apparaissent comme des ratés sur l'état  $S_x$ ; par exemple, les désactivations de S3 à S2 apparaissent comme des ratés sur S2. Donc, en Fig.3.4.4, j'interprète l'augmentation de la probabilité de ratés sur S2 comme indiquant un plus grand nombre de désactivations de S3 à S2.

De même, l'augmentation de la probabilité de ratés sur S1 s'explique par un plus grand nombre de désactivations de S2 à S1. Puisqu'il est connu que les désactivations vers l'état S3 n'existent pas (Govindjee et al. 1985), la probabilité de ratés sur S3 doit demeurer constante, comme nous avons observé. La probabilité de ratés sur S0 augmente lentement; ceci semble indiquer des désactivations jusqu'à l'état S0. Des désactivations de S2 à S0, qui ont déjà été proposées (Joliot et al. 1971), pourraient expliquer ce résultat. Des désactivations de S1 à S0 ne sont pas possibles (Vermaas et al. 1984); donc, l'augmentation des ratés sur S0 ne peut s'expliquer que par des désactivations de S2 à S0.

Dans la première tentative pour mesurer la distribution des CDO à l'état stationnaire, il a été observé que la somme du pourcentage de CDO dans l'état S3 (%S3), et le pourcentage de CDO dans l'état S1 (%S1), était invariante par rapport à la fréquence des éclairs (Lavorel et Maison-Peteri 1983). Ce résultat a été expliqué en termes d'un transporteur de charges appelé "C", qui désactiverait des CDO dans l'état S3 jusqu'à l'état S1. Cependant, dans les résultats montrés en Fig.3.4.3, cette somme (%S3 + %S1) diminue, plutôt que d'être constante. Cette différence est sûrement due au fait que j'ai tenu compte des doubles transitions, et que le nouveau système de mesure que j'ai développé permet de meilleurs résultats. En effet, en plus de la précision supplémentaire

des mesures, le système permet une approche expérimentale différente. La méthode utilisée précédemment pour stimuler les désactivations consistait à changer l'intensité des éclairs, au lieu de changer la fréquence; pour ce faire, des filtres devaient être changés dans l'intervalle entre deux éclairs. Ceci empêchait l'utilisation d'une fréquence plus élevée que 1 Hz pour la mesure, fréquence où les ratés ne peuvent être considérés comme homogènes. Cependant, les équations utilisées considèrent les ratés comme homogènes, ce qui produit donc une erreur dans les calculs. Le contrôle par ordinateur permet de changer plutôt la fréquence, de façon précise et reproductible; ainsi, j'ai pu utiliser une fréquence d'éclairs où les ratés sont plus homogènes. Ceci indique que la contribution du transporteur de charges "C" aux désactivations n'est pas observable.

En conclusion, la nouvelle méthode de mesure, avec les équations que j'ai développées, permettent d'obtenir des informations importantes sur la distribution des ratés dus aux désactivations. Ces résultats indiquent qu'à de basses fréquences, les probabilités de ratés deviennent très inhomogènes, avec des hautes probabilités de ratés sur les états S1 et S2. Ceci est dû à des désactivations rapides des états S3 et S2, et une petite quantité de désactivations de S2 à S0. Ainsi, la façon dont les désactivations contribuent aux ratés est caractérisée pour la première fois.

## CHAPITRE 4: CONCLUSIONS

Un premier objectif de cette thèse était d'obtenir des mesures plus précises, afin de pouvoir différencier les meilleurs modèles du dégagement d'oxygène. A cette fin, j'ai développé un système original qui permet de nouvelles approches expérimentales grâce à sa flexibilité, et qui augmente la précision et la fiabilité des mesures. Ce faisant, j'ai clarifié la confusion régnant dans la méthodologie de la mesure du dégagement d'oxygène. Cette confusion était notable au niveau de la conception des électrodes, de l'entretien du système, des conditions expérimentales et de l'interprétation des cinétiques des électrodes. Aussi, j'ai clairement montré les avantages de l'utilisation d'un potentiostat plutôt qu'un circuit résistif et d'un filtre passe-haut plutôt qu'un différentiateur.

Récemment le temps requis pour le dégagement d'oxygène, établi depuis longtemps par une variété de techniques, a été contesté par l'utilisation du dégagement d'oxygène sous éclairs. Cette contradiction d'importance fondamentale avait remis en question une vingtaine d'années de recherches. Ainsi, des chercheurs en photosynthèse avaient commencé à croire que le transport d'électrons était limité par le temps du dégagement d'oxygène. J'ai démontré qu'il n'en est rien, et que cette contradiction avait été produite par de mauvaises pratiques expérimentales.

Par la suite, les résultats obtenus ont indiqué de façon claire que les modèles pour le mécanisme de dégagement d'oxygène ne peuvent s'accorder avec une grande précision aux résultats. J'ai démontré que cette limitation était causée par la variation dans le temps des propriétés de ce mécanisme. L'étude de ces variations a mis en évidence la grande dépendance des ratés envers l'état rédox de la plastoquinone. Ceci est une découverte importante, car on pensait auparavant que les propriétés du dégagement d'oxygène ne dépendaient que du côté oxidant du photosystème II. Il est connu que l'état rédox de la plastoquinone dépend de la concentration d'oxygène, de l'activité de la chaîne chlororespiratoire, de la distribution de l'énergie lumineuse entre les photosystèmes, de la proportion de PSII relativement aux PSI, et de la qualité spectrale des éclairs. Ainsi, la quantité de ratés, d'une expérience à une autre et d'un laboratoire à un autre, peut présenter des variations importantes (incompréhensibles auparavant) selon l'état physiologique de l'algue ou de la plante étudiée. De plus, l'état rédox de la plastoquinone varie constamment dans le temps, comme l'indiquent les mesures de fluorescence; il s'ensuit que la quantité de ratés varie de la même façon.

La raison pour laquelle les ratés sont si sensibles à l'état rédox de la plastoquinone a ensuite été étudiée. La quantité de ratés augmentait avec l'intervalle entre les

éclairs, d'une façon qui n'était pas directement reliée à l'état rédox de la plastoquinone. J'ai réussi à expliquer la variation des ratés selon un modèle de désactivation des états-S, tenant compte de la variation de l'état rédox de la plastoquinone selon la fréquence des éclairs. Cependant, une probabilité de ratés de 10% semblait ne pas être due aux désactivations. En oxidant la plastoquinone avec de la benzoquinone, 7% ont été enlevés. Ceci a été expliqué par le fait que la plastoquinone réduite peut réduire l'accepteur Qa, ce qui ferme les centres réactionnels à la photochimie et augmente les ratés de façon homogène.

La façon dont les désactivations contribuent aux ratés a ensuite été caractérisée par une nouvelle approche expérimentale de l'état stationnaire du dégagement d'oxygène. J'ai montré qu'en connaissant la distribution des CDO dans les états-S à l'état stationnaire, on peut connaître la distribution des ratés. Ainsi, la distribution des ratés due aux désactivations a montré que les désactivations de l'état S3 à S2 sont les plus importantes, suivies des désactivations jusqu'à l'état S1. Des désactivations jusqu'à l'état S0 ont aussi été détectées, montrant que le processus de désactivation peut impliquer deux électrons. La distribution des CDO à l'état stationnaire a donc pu être expliquée par des désactivations, sans avoir besoin d'un "transporteur de charges C" (modèle de Lavorel). J'ai donc résolu le problème

de la nature des ratés, à savoir si les charges étaient perdues lors d'un raté, ou si les ratés représentaient simplement la redistribution au hasard des charges par un "transporteur de charges C": les observations que tous les ratés sauf 3% sont dépendants de l'état rédox de la plastoquinone, que le dégagement d'oxygène diminue avec l'augmentation des ratés, et que toutes les données peuvent être expliquées sans le transporteur "C", suggèrent fortement que ce transporteur est inexistant.

Il émerge de cette thèse une image claire et nouvelle du mécanisme de production d'oxygène. Les réactions de production d'oxygène en elles-mêmes avancent facilement à chaque séparation de charges, et ont peu de chances de "rater" (3%). Les ratés dans le dégagement d'oxygène sont plutôt produits par les centres réactionnels fermés par les Qa réduits, ou encore par le renversement du transport d'électrons. Le renversement du transport d'électrons est très facile après les transitions de S1 à S2 et de S2 à S3, qui sont hautement réversibles. Ceci produit des ratés apparents sur S1 et sur S2, qui dépendent de l'état rédox des accepteurs du PSII. De plus, le dégagement d'oxygène, après un cycle complet des états-S, est simultané avec le transport d'électrons. Donc, il y a une connexion très intime entre le CDO et la chaîne de transport d'électrons, au point où les

propriétés de l'un se confondent avec le comportement de l'autre.

## ANNEXE 1

Acquisition en continu par le programme "GRAPHITI"

## A1. Introduction.

L'acquisition de données en continu est la mesure d'une courbe sans interruption, pendant laquelle mesure des éclairs peuvent être donnés à certains intervalles choisis par l'utilisateur. Par ailleurs, il faut aussi gérer l'adaptation au noir des échantillons et la polarisation des électrodes. Ainsi, le programme "GRAPHITI" s'occupe de la gestion de la carte d'acquisition de données DT-2814, de la polarisation des électrodes, du déclenchement des éclairs, du traitement des données, de la sauvegarde des données ainsi que de leur lecture ultérieure, et de l'impression à l'écran et sur table traçante. Il a été compilé par le Turbo Pascal 3.0, avec les sous-routines Turbo-Graphix du fabricant (InitGraphic, LeaveGraphic, DefineWorld, DefineHeader, etc... contenues dans les fichiers TYPEDEF.SYS, GRAPHIX.SYS, KERNEL.SYS, AXIS.HGH, POLYGON.HGH qui sont standards et ne sont pas imprimés ici) pour le dessin à l'écran, et avec un sous-programme (routines AssignAux, SetSerial) inclus dans le manuel du Turbo Pascal 3.0 pour gérer l'interface RS-232. Cette interface doit être connectée à une table traçante

configurée pour 9600 bauds, 1 bit d'arrêt, 7 bits de données, et pas de parité.

#### A1.1. L'acquisition des données.

L'acquisition des données est basée sur la conversion sous forme numérique du signal provenant du potentiostat. Celle-ci est effectuée par le convertisseur analogue-digital (DT-2814 de Data Translation) présent dans l'ordinateur. Le voltage appliqué à l'entrée du convertisseur doit se situer entre 0 et 5 volts, et puisque la carte a une précision de 12 bits, le nombre obtenu varie entre 0 et 4095. La carte doit être calibrée de telle sorte qu'une tension de 5.000 volts à l'entrée produise une lecture de 4096. Afin de connaître le voltage appliqué à l'entrée, le nombre obtenu doit donc être multiplié par 5 et divisé par 4096. Une variété de sous-procédures pouvant être utiles à la gestion de la carte sont groupées dans le sous-programme ADCrouti.SYS. Par exemple, la procédure "voltmètre" effectue le calcul mentionné plus tôt et renvoie la moyenne de 1000 conversions; ceci permet de calibrer la carte (N.B.: cette procédure ne sert que très rarement, et doit être compilée indépendamment de Graphiti pour fonctionner).

La gestion de la carte est contrôlée par la procédure maître GereAcquisition, en utilisant les sous-procédures groupées dans le sous-programme ADCrouti.SYS. Cette

procédure maître permet à l'utilisateur de définir l'intervalle de temps entre les points mesurés, le nombre de points mesurés, de spécifier l'intervalle de temps entre les éclairs (si des éclairs sont désirés), ainsi que le temps d'adaptation au noir des échantillons. Quand le temps d'adaptation est écoulé, l'électrode est polarisée par la sous-procédure "GetElectrodeReady". Cette procédure examine continuellement la tension appliquée à l'entrée de la carte, et lorsque le courant détecté par le potentiostat est stabilisé, le contrôle est retourné au programme principal. La mesure est alors effectuée par la sous-procédure Mesure\_Optimisée. Cette procédure vérifie d'abord si la vitesse de l'acquisition désirée est rapide ou lente. Si elle est trop rapide pour un programme PASCAL, une routine en langage machine est appelée. Cette routine interdit les demandes d'interruption du micro-processeur, car des données pourraient être perdues pendant une interruption. Si une ou plusieurs données sont perdues, la carte le signale; le nombre de fois où cela se produit est additionné et affiché à la fin de la mesure comme un "nombre d'erreurs". Si des erreurs sont signalées, il faut reprendre la mesure à une vitesse d'acquisition plus faible. Cependant, pour le fonctionnement de l'ordinateur, il n'est pas bon d'interdire trop longtemps les demandes d'interruption. La procédure

`Mesure_Optimisee` optimise l'interdiction, i.e. la routine en langage machine n'est appelée que si nécessaire.

Les valeurs numériques représentant le courant du potentiostat en fonction du temps sont placées dans un vecteur d'un maximum de 4096 points (pour changer ce maximum, il suffit de changer le type "Index" dans le sous-programme `STDFILE_.SYS`. S'il manque alors de mémoire, il faut alors diminuer la limite maximum du type "FileSelector" dans le programme Graphiti). Par la suite, l'électrode est dépolarisée par la sous-procédure "Depolarize", et l'opérateur est invité à spécifier les conditions de son expérience.

#### A1.2. Le format et la sauvegarde des données.

Suite à une expérience, l'opérateur peut désirer sauvegarder sur disque les données afin de les examiner ou imprimer plus tard. Par exemple, l'impression finale au propre par la table traçante, pour publication, peut demander certains ajustements d'échelle qu'il n'est pas pratique de faire au milieu d'une série d'expériences. Il convient donc d'enregistrer le plus de détails possible concernant les conditions expérimentales, pour références futures. L'expérimentateur peut aussi désirer envoyer ses données à un collègue dans une autre université. C'est dans cette optique que le format utilisé a été choisi pour sa compatibilité avec un appareil TN-1710 de la compagnie Tracor-Northern, afin de

pouvoir éventuellement échanger des fichiers avec les usagers de cet appareil à l'université Simon Fraser (Vancouver). Les données sont emmagasinées sous forme d'un fichier séquentiel ASCII; l'arrangement des différentes variables est défini par le sous-programme STDFILE\_.SYS. Plusieurs de ces variables ne servent qu'à maintenir la compatibilité entre le système développé et le TN-1710. Chaque fichier contient, en ordre, un entier (DX) servant d'index pour situer le début ("l'adresse") des données enregistrées dans le vecteur de 4096 points; un entier (FX) pour situer la fin des données enregistrées dans le vecteur de 4096 points; un nombre réel (DW) qui spécifie l'intervalle de temps attendu entre chaque point mesuré; un entier (NC) qui spécifie le nombre d'acquisitions effectuées pour obtenir les données enregistrées (les données sont alors la moyenne de ces acquisitions); un entier (PR) qui indique le délai attendu entre le signal de déclenchement et le déclenchement véritable de l'acquisition (pour TN-1710 seulement); un entier (FF) servant d'index dans le vecteur de 4096 points, qui spécifie le moment où le premier éclair a été donné à l'échantillon; un entier (LF) servant d'index dans le vecteur de 4096 points, qui spécifie le moment où le dernier éclair a été donné à l'échantillon; un entier (NF) qui spécifie le nombre d'éclairs donné; un nombre réel (SF) qui spécifie l'échelle verticale des données; une chaîne alpha-

numérique (TI) donnant un titre ou bref résumé des conditions expérimentales; une chaîne alpha-numérique (DA) donnant la date ou autres remarques utiles; puis les données proprement dites, une suite de (FX-DX +1) entiers. La variable Ch sert de séparateur entre les variables de spécification.

Les routines utilisées dans le sous-programme STDFILE\_.SYS ont été développées par l'auteur (sauf les routines fournies avec le Turbo Graphix ou Turbo Pascal), soit durant son séjour à l'université Simon Fraser (ce qui explique que certaines routines soient en anglais) ou à l'université du Québec à Trois-Rivières.

On remarquera que chaque variable est définie en plusieurs exemplaires, de sorte que plus d'une mesure peut être en mémoire à un instant donné. Ceci est offert aussi sur le TN-1710, et peut être utile à un expérimentateur trop pressé par les exigences des manipulations pour sauvegarder immédiatement ses résultats (l'ordinateur est un vieux modèle assez lent), ou qui désire effectuer des opérations sur plusieurs mesures sans avoir à les charger à chaque fois. Le nombre de mesures est déterminé par la spécification du type FileSelector. Dans la version présentée ici, FileSelector varie entre 0 et 3; il peut donc y avoir 4 mesures en mémoire à un instant donné. Chaque variable est donc répétée en quatre exemplaires indépendants, organisés dans un tableau (array). Les opérations demandées dans le menu ne

s'appliquent qu'à une seule des mesures mises en mémoire; la mesure affectée est sélectionnée par l'utilisateur dans la procédure "DefaultFile" contenue dans le programme principal. La sauvegarde et la lecture des données est effectuée par le sous-programme STDFILE\_.SYS, respectivement dans les procédures SaveData et InputData. Ces procédures peuvent lire ou écrire sur disque n'importe quelle des 4 mesures en mémoire.

Les routines d'acquisition en langage machine utilisent toujours l'espace de mesure #0, et les résultats d'opérations comme le filtrage sont mis dans l'espace de mesure #0. Pour éviter d'écraser des données, il faut donc pouvoir interchanger les mesures de place. Les routines d'interchange IntegerSwap, RealSwap et AlphanumSwap servent à la procédure Copie, qui change les mesures de place. Dans le programme principal (GRAPHITI), la procédure "Exchange" s'occupe de la gestion de l'échange et appelle la sous-procédure "Copie".

D'autres routines d'entrée-sortie et de gestion des fichiers sont incluses dans le sous-programme STDFILE\_.SYS. Les entrées au clavier par l'utilisateur sont tamponnées par les routines BuffInput et BuffAlphanum, ce qui permet de spécifier des valeurs 'par défaut': quand l'utilisateur

presse la clé 'enter' sans avoir rien écrit, la valeur 'par défaut' est retournée au programme principal.

### A1.3. Le traitement des données.

Le premier traitement des données est le filtrage, afin de réduire le bruit. Le programme permet d'utiliser 4 filtres digitaux: deux filtres passe-haut et deux filtres passe-bas. Les caractéristiques de ces filtres peuvent être de deux sortes: un simple filtre RC (résistif-capacitif), ou un filtre de type Butterworth. Ce filtre Butterworth permet habituellement un filtrage plus efficace des données, car il est du deuxième ordre (i.e. il donne une atténuation égale au carré de celle d'un filtre RC aux fréquences indésirables). L'utilisateur n'a qu'à spécifier la fréquence de coupure pour le filtrage.

Le deuxième traitement des données est le masquage des artefacts non-significatifs. Dû à la très grande intensité des éclairs, les électrodes produisent des signaux indésirables à chaque éclair. Ces signaux ne donnent aucune information et sont esthétiquement indésirables. Le programme permet donc à l'utilisateur de défendre l'impression des points correspondant aux signaux indésirables, que ce soit à l'écran ou sur la table traçante. Il le fait en se servant d'une variable du type "Masque", qui est un tableau booléen (i.e. dont le contenu ne peut être que des "vrai" ou "faux"). La procédure "PutMask" permet de

spécifier les points interdits en mettant des valeurs "faux" aux positions correspondantes, ainsi que de remettre des "vrai" si désiré.

#### A1.4. L'impression des données.

Les données peuvent être imprimées soit à l'écran, soit sur une imprimante à points ou sur une table traçante. Dans tous les cas, l'utilisateur doit spécifier les limites du graphique en faisant appel à la procédure "SpecifyRange".

L'impression à l'écran et sur l'imprimante à points est effectuée par la procédure Dessine, qui utilise les sous-routines de Turbo-Graphix, un logiciel commercial.

Quant à la table traçante, les options doivent en être spécifiées, telles que le type de ligne, les symboles pour les points, les unités et les titres des axes. Le programme s'occupe de déterminer le meilleur préfixe correspondant aux données (milli, micro, nano, etc...). De plus, les échelles sont graduées automatiquement selon un multiple de 1, 2 ou 5. Les graphiques peuvent être imprimés selon des dimensions continuellement variables jusqu'à 11" x 17".

## A1.5. Code PASCAL du programme GRAPHITI:

```

Program Graphiti(Input, Output, Aux);
  {$R+ index range checking}
  {$I IODRIVER.SYS} (*Procédure incluse dans le manuel du turbo*)
    (*PASCAL 3.0 pour gérer l'interface RS-232*)
Type
  FileSelector= 0..3;
  {$I STDFILE_.SYS}
Type
  Masque= array[FileSelector] of array[Index] of Boolean;
  {$I TYPEDEF.SYS} (*Routines commerciales pour l'écran*)
  {$I GRAPHIX.SYS} (*Incluses dans TURBOGRAPHIX*)
  {$I KERNEL.SYS}
  {$I AXIS.HGH}
  {$I POLYGON.HGH}
Var
  C : FileSelector;
  M : Masque;
  WantSound: BOOLEAN;
  Scratch, { general buffer}
  MAX, { index to the highest element of Y[c][] }
  MIN { index to the smallest element of Y[c][] }
  : INTEGER;
  I { counter }
  : Index;

  nDX, { new start of curve }
  nFX, { new end of curve }
  Npoints { Number of points in the new curve }
  : array[FileSelector] of INTEGER;

  rep, { buffer for inputs }
  LineType, { for the plotter }
  TickLength, { percentage of the plotter window }
  NTicks, { Minimum number of thicks }
  PatternLength,{ if LineType<7 }
  ChrHeight, SymbolSize,
  ChrWidth,
  Yscale, { numerically: (Y[c][MAX]-Y[c][MIN])*SF[c] }
  Xscale, { " : (nFX[c] -nDX[c])*DW[c] }
  FrequenceFlash,
  FreqDiv, Ymin, Ymax

  : REAL;

  Dummy, entree, { as a buffer }
  xlabel, ylabel,{ legends under the axis }
  UnitX, Unity { symbol representing the unit }

```

```

: WrkString;

Ch { corresponds to the routine actually executed }
:CHAR;

Symbol { symbol written at each point }
: String[1];

Contour, { if the user wants the scales and axis to be drawn }
NoScale { To check if the procedure SpecifyRange has been done }
: BOOLEAN;

{ $I ADCRouti.SYS}

Procedure CallOperator;
begin
  if WantSound then begin
    Writeln('Pressez une cle');
    Repeat
      Sound(500);
      Delay(500);
      NoSound;
      Delay(200);
    until Keypressed;
  end;
end;

Procedure SpecifyRange;
Var
  rep: REAL;
  I: INTEGER;
begin
  Writeln('Les données sont de ',DX[c],', à ',FX[c],'.');
  Writeln('Quelle portion voulez-vous?');
  If NoScale then begin
    nDX[c]:=DX[c];
    nFX[c]:=FX[c];
  end;
  Repeat
    Writeln('Début? (Défaut=',nDX[c],')');
    Readln(nDX[c]);
    Writeln('Fin? (Défaut=',nFX[c],')');
    Readln(nFX[c]);
  until nFX[c] > nDX[c];
  Npoints[c]:=nFX[c]-nDX[c]+1;
  I:=nDX[c];
  while (not M[c][I]) and (I<nFX[c]) do I:=I+1;
  MIN:=I;
  MAX:=MIN;
  If I < nFX[c] then begin
    For I:=I to nFX[c] do

```

```

        if M[c][I] then if Y[c][I] > Y[c][MAX] then MAX:=I
                           else if Y[c][I] < Y[c][MIN] then MIN:=I;
        end;
        Ymin:=Y[c][MIN];
        Ymax:=Y[c][MAX];
        Writeln('Entrez la valeur min de l''echelle;
default=',round(Ymin));
        Readln(Ymin);
        Writeln('Entrez la valeur max de l''echelle;
default=',round(Ymax));
        Readln(Ymax);
        Yscale:=Ymax*SF[c]-Ymin*SF[c];
        Xscale:=nFX[c]*DW[c]-nDX[c]*DW[c];
        NoScale:= False;
        end;

procedure Dessine;
Var
  Reste, SansDessin, Npolygones : INTEGER;
  Depart :INTEGER;
  P : PlotArray;
begin
  If NoScale then SpecifyRange;
  DefineWindow(1, 0, 0, XmaxGlb, YmaxGlb);
  DefineHeader(1, TI[c]);
  DefineWorld(1, nDX[c]*DW[c], Ymax*SF[c],
              nFX[c]*DW[c], Ymin*SF[c]);
  SelectWorld(1);
  SetHeaderOn;
  SelectWindow(1);
  EnterGraphic;
  DrawBorder;
  DrawAxis(4,4,0,0,0,0,0,0, true);
  For Npolygones:=0 to trunc((Npoints[c]-1)/99) do
    begin
      Depart:= Npolygones*99 + 1;
      Reste:= Npoints[c] - Depart;
      Depart:= Depart -1 + nDX[c];
      if Reste > 100 then Reste:=100;
      if Reste > 1 then begin
        SansDessin:= 0;
        for I:=0 to Reste-1 do
          if M[c][I+Depart] then begin
            P[I+1-SansDessin, 2]:=Y[c][I + Depart]*SF[c];
            P[I+1-SansDessin, 1]:=(I + Depart)*DW[c];
          end else SansDessin:=SansDessin + 1;
        if Reste-SansDessin >= 2 then begin
          DrawPolygon(P , 1, Reste-SansDessin, 0,1,0);
          ResetAxis;
        end;
      end;
    end;
  end;

```

```

        end;
      if Ch='H' then Hardcopy(false, 1)
      else begin
        repeat until KeyPressed;
        Read(Kbd,Ch);
      end;
      LeaveGraphic;
    end;

procedure ChkPlotter;
  var
    errorstat: INTEGER;
  begin
    Write(aux, 'OE;');
    Readln(aux, errorstat);
    if errorstat>0 then
      Writeln('Erreur de la table traçante#', errorstat);
  end;

Function PlotterReady: BOOLEAN;
  var
    PlotterStatus: BYTE;
  begin
    Write(aux, 'OS;');
    Readln(aux, PlotterStatus);
    if (PlotterStatus and 32) = 32 then ChkPlotter;
    PlotterReady:=(PlotterStatus and 16) = 16;
  end;

Procedure GetPlotterReady;
  var
    ExtPlotStat: BYTE;
  begin
    if not PlotterReady then
    begin
      Write(aux, chr(27), '.0');
      Readln(aux, ExtPlotStat);
      if ExtPlotStat=0 then repeat until PlotterReady
      else begin
        Writeln('S.V.P. Insérez le papier ');
        repeat until PlotterReady;
      end;
    end;
  end;

Procedure BuffString(var Default :WrkString);
  begin
    Readln(Dummy);
    if Dummy <> '' then Default:=Dummy;
  end;

```

```

procedure SpecifyOptions;
begin
  Write(aux,'IN;DF;');
  ChkPlotter;
  Repeat
    Writeln('Type de ligne:');
    Writeln;
    Writeln('(0)- Points seulement');
    Writeln('(1)- . . . . .');
    Writeln('(2)- ____ ____');
    Writeln('(3)- ____ ____ .');
    Writeln('(4)- ____ . ____ .');
    Writeln('(5)- ____ - ____ -');
    Writeln('(6)- ____ - ____ - ____ -');
    Writeln('(7)- ligne continue');
    Writeln('Valeur par défaut : ', Linetype:2:0);
    Readln(Linetype);
  until (Linetype>=0) and (Linetype<=7);
  if Linetype<7 then
  begin
    Writeln('longueur des traits: un pourcentage de la ',
           'dimension diagonale du papier');
    Writeln('Valeur par défaut: ', PatternLength:3:1);
    Readln(PatternLength);
  end;
  Writeln('S.V.P. donnez la longueur des marques;',
         ' Valeur par défaut= ', TickLength:2:2, ' (%)');
  Readln(TickLength);
  Writeln('Nombre de marques: (Défaut=', NTicks, ')');
  Readln(NTicks);
  NTicks:= round(NTicks);
  Writeln('Please enter a symbol to be drawn at each point');
  Readln(Symbol);
  If Symbol<>'' then begin
    Writeln('Donnez la dimension du symbole');
    Readln(SymbolSize);
  end;
  if contour then Ch:='Y' else Ch:='N';
  Writeln('Voulez-vous les échelles (Défaut :',
         Ch, ')');
  Readln(Dummy);
  if Dummy <>'' then contour:=(Dummy='Y') or (Dummy='y');
  if contour then
  begin
    Writeln('S.V.P. Donnez la légende des X (Défaut:',
           xlabel, ')');
    BuffString(xlabel);
    Writeln('Donnez le symbole de l''unité employée',
           ' (Défaut : ', Unitx, ')');
    BuffString(Unitx);
  end;
end;

```

```

      Writeln('S.V.P. Donnez la légende des Y (Défaut:',
      Ylabel,'));
      BuffString(Ylabel);
      Writeln('Donnez le symbole de l''unité employée',
      ' (Défaut :, Unity, ')');
      BuffString(Unity);
end; {if contour}
Writeln('S.V.P. donnez la grosseur de caractère à utiliser.');
Writeln('Largeur? (en cm; défaut=',ChrWidth:3:2,' )');
Readln(ChrWidth);
Writeln('Hauteur? (défaut=',ChrHeight:3:2,' )');
Readln(ChrHeight);
Writeln('Largeur=',ChrWidth:3:2);
Write(aux,'SI',ChrWidth:3:2,',',ChrHeight:3:2,';');
Writeln('Hauteur=',ChrHeight:3:2);
end; { SpecifyOptions }

Function RemoveExp(R:REAL; Expo:INTEGER): REAL;
{ The number R is multiplied by 10^-Expo }
begin
  RemoveExp:=R*exp(-Expo*ln(10.0));
end; { RemoveExp }

Procedure Plot;
Const
  Prefix :array[-6..4] of
    String[1] = ('a','f','p','n','u','m','','K','M','G','T');
    { These engineering prefixes precede the unit name }
type
  Increment = 0..500;
  { This type is the number indicating the value at each thick
}
  Puissance3= -6..4; { Donc un exposant de -18 a +12 }
  { This selects the engineering prefix to be used }
var
  ChrBuffer: String[20];
  { Buffer for labels, etc... }

  Lx, Ly,
  { These define the lower left corner of the curves }
  P1x, P1y,
  { Lower left corner of the drawing area }
  P2x, P2y,
  { Higher right corner of the drawing area }
  Xpos, Ypos,
  Code
    : INTEGER;

  nPuissance3_X, nPuissance3_Y
    : Puissance3;

```

```

    { Selects the engineering prefix for the X and Y scales }

IncrementX, IncrementY
    : Increment;
    { The difference in value between each thick }

SelectPen,
Xrange, Yrange, OffsetY,
PperCH, { number of plotter points per chr heigth }
PperCW { " " " " " " width }
    : REAL;
DrawXaxis :BOOLEAN;

Function GetExponent(X1: REAL): INTEGER;
{ If X1 was expressed in scientific notation, }
{ GetExponent would be its exponent in base 10 }
begin
    GetExponent:=0;
    if X1 <> 0.0 then if abs(X1) >= 1.0
        then GetExponent:=trunc(ln(abs(X1))/ln(10.0))
        else GetExponent:=-trunc(abs(ln(abs(X1)))/ln(10.0) +
1.0);
    end;

Function PlotInput: Integer;
var
    StrBuf: String[40];
    Pointeur, Code: INTEGER;
begin
    Pointeur:=pos(',', entree);
    if Pointeur=0 then pointeur:=1 + length(entree);
    StrBuf:=Copy(entree, 1, pointeur-1);
    Delete(entree, 1, pointeur);
    Writeln(entree);
    Val(Strbuf, pointeur, Code);
    if Code<>0 then begin
        Writeln('erreur: code=',Code,' in:',Strbuf);
        Writeln('voir manuel pour la fonction Val');
        halt;
    end;
    PlotInput:=Pointeur;
end;

begin
    PperCH:= ChrHeight*2/0.0025;
    PperCW:= ChrWidth*1.5/0.0025;
    ChkPlotter;
    { **** }
    { * Find the drawing area           * }
    { **** }

```

```

        Write(aux, 'IP;', { Assume Valeur par défauts for the drawing
area }
        'OP'); { Output these values to the computer }
        Readln(aux, Entree);
        Delete(Entree, 1, 1);
        P1x:= PlotInput;
        P1y:= PlotInput;
        P2x:= PlotInput;
        P2y:= PlotInput;
        Writeln('Specifiez les limites du graphique:');
        Writeln;
        Writeln('8,5" X 11" couche: 0 <ret> 0 <ret> 10320 <ret> 7920
<ret>');
        Writeln('8,5" X 11" debout (deux graphiques)');
        Writeln('Partie inferieure: 0 <ret> 0 <ret> 7600 <ret> 5300
<ret>');
        Writeln('Partie superieure: 0 <ret> 5500 <ret> 7600 <ret>
10800 <ret>');
        Writeln('11" X 17": 0 <ret> 0 <ret> 15200 <ret> 10800 <ret>');
        Writeln('Axe des X, limite extreme gauche=',P1x);
        Readln(P1x);
        Writeln('Axe des Y, limite inferieure=',P1y);
        Readln(P1y);
        Writeln('Axe des X, limite extreme droite=',P2x);
        Readln(P2x);
        Writeln('Axe des Y, limite superieure=',P2y);
        Readln(P2y);
        GetPlotterReady;
        { ****
        { * L'axe des X
        { ****
        If NoScale then SpecifyRange;
        { * Trouve l'increment
        Scratch:=GetExponent(Xscale);
        { Xscale was given a value in the SpecifyRange procedure }
        { It is the total span: Max(X) - Min(X) }
        Xrange:=RemoveExp(Xscale, Scratch);
        IncrementX:=0;
        Repeat
          if Xrange/5 >= NTicks then IncrementX:=5
          else if Xrange/2 >= NTicks then IncrementX:=2
          else if Xrange >= NTicks then IncrementX:=1
          else begin { Multiply by ten }
            Scratch:=Scratch-1;
            Xrange:=RemoveExp(Xscale, Scratch);
          end;
        until IncrementX > 0;
        { * Trouve le prefixe
        if Scratch>=0 then nPuissance3_X:=Scratch DIV 3
        else nPuissance3_X:=(Scratch-2) DIV 3;

```

```

IncrementX:=round(RemoveExp(IncrementX, 3*nPuissance3_X-
Scratch));
Xrange:=RemoveExp(Xscale, 3*nPuissance3_X);
{ ****
{ * l'axe des Y * }
{ **** }
Scratch:=GetExponent(Yscale);
Yrange:=RemoveExp(Yscale, Scratch);
IncrementY:=0;
Repeat
  if Yrange/5 >= NTicks then IncrementY:=5
  else if Yrange/2 >= NTicks then IncrementY:=2
  else if Yrange >= NTicks then IncrementY:=1
  else begin
    Scratch:=Scratch-1;
    Yrange:=RemoveExp(Yscale, Scratch);
  end;
until IncrementY >0;
if Scratch>=0 then nPuissance3_Y:=Scratch DIV 3
  { plot in engineering units }
else nPuissance3_Y:=(Scratch-2) DIV 3;
  { the exponent must be a factor of 3 }
IncrementY:=round(RemoveExp(IncrementY, 3*nPuissance3_Y-
Scratch));
Yrange:=RemoveExp(Yscale, 3*nPuissance3_Y);
DrawXaxis:=(Ymin<=0) and (Ymax>0);
if DrawXaxis then OffsetY:=(-Ymin/(Ymax-Ymin))*Yrange
else OffsetY:=0;
{ *** *** }
{ *** Compute the area for the curves *** }
{ *** *** }
Str(trunc(Yrange/IncrementY)*IncrementY,Dummy);
Code:=Length(Dummy);
Writeln('Combien de chiffres pour ecrire l''echelle
verticale?',
      ' (defaut=',Code,')');
Readln(Code);
Lx:=P1x + round(PperCH) + round(Code*PperCW);
Ly:=P1y + round(2*PperCH);
Writeln('lx=', Lx);
WRiteln('ly=', Ly);
{ *** *** }
{ *** Draw scales and border *** }
{ *** if contour = true *** }
if contour then begin
  SelectPen:=1;
  Writeln('Quelle plume utiliser pour les echelles? (Defaut=',
         SelectPen:2:0,')');
  Readln(SelectPen);
  Write(aux, 'SP', SelectPen:2:0, ';');
  Dummy:=Ylabel + ' (' + prefix[nPuissance3_Y] + Unity + ')';

```

```

        Write(aux,'PA', P1x + round(PperCH/2), ','
              ,P1y + round(PperCH), ';');
        Write(aux,'DI0,1;CP',
              round(((P2y-P1y-PperCH)/PperCW-length(Dummy))/2),
              ',0;');
        Write(aux, 'LB', Dummy, Chr(3), ';');
        Write(aux, 'PA', Lx, ',', Ly, ';');
        GetPlotterReady;
        Dummy:=Xlabel1 + ' (' + prefix[nPuissance3_X] + UnitX + ')';
        Write(aux, 'DI1,0;CP',
              round(((P2x-Lx)/PperCW-length(Dummy))/2), ',,-2;');
        Write(aux, 'LB', Dummy, Chr(3), ';');
        { go to lower corner without plotting: }
        Write(aux, 'PA', Lx, ',', Ly, ';');
        { Draw border }
        Write(aux, 'PD', Lx, ',', Ly, ',', Lx, ',',
              P2y, ',', P2x, ',', P2y, ',', P2x, ',', Ly, ',',
              Lx, ',', Ly, ';PU;');
        { Draw X axis if the curve crosses it }
        if DrawXaxis then begin
          Scratch:=Ly + round((P2y-Ly)/Yrange*OffsetY);
          Write(aux, 'PA', Lx, ',', Scratch, ';PD', Lx,
                ',', Scratch, ',', P2x, ',', Scratch, ';PU;');
        end;
        { Draw thicks }
        Write(aux,'TL',TickLength:2:1,',0;');
        Str(IncrementX*trunc(Xrange/IncrementX), ChrBuffer);
        for Scratch:=0 to trunc(Xrange/IncrementX) do begin
          Xpos:=round((P2x-Lx)/Xrange*IncrementX*Scratch+Lx);
          if Xpos <= P2x-length(ChrBuffer)/2*PperCW then begin
            Write(aux,'PA',Xpos,',',Ly,');');
            GetPlotterReady;
            Str(Scratch*IncrementX,Dummy);
            Write(aux,'XT;CP-',length(Dummy)/2:2:2,'-1;');
            Write(aux,'LB',Dummy,chr(3),');');
          end;
        end;
        Write(aux,'TL0,',TickLength:2:1,';');
        for Scratch:=0 to trunc(Xrange/IncrementX) do begin
          Xpos:=round((P2x-Lx)/Xrange*IncrementX*Scratch+Lx);
          if Xpos <= P2x-length(ChrBuffer)/2*PperCW then
            Write(aux,'PA',Xpos,',',P2y,';XT;');
        end;
        GetPlotterReady;
        Write(aux,'TL',TickLength:2:1,',0;');
        for Scratch:=-trunc(OffsetY/IncrementY)
          to trunc((Yrange-OffsetY)/IncrementY) do begin
          Ypos:=round((P2y-
Ly)/Yrange*(IncrementY*Scratch+OffsetY)+Ly);
          if Ypos <= P2y-PperCH then begin
            Write(aux,'PA',Lx,',',Ypos,');');

```

```

GetPlotterReady;
Str(Scratch*IncrementY,Dummy);
Write(aux,'YT;CP-',length(Dummy),',-0.25;');
Write(aux,'LB',Dummy,chr(3),';');
end;
end;
Write(aux,'TL0,',TickLength:2:1,';');
for Scratch:=-trunc(OffsetY/IncrementY)
  to trunc((Yrange-OffsetY)/IncrementY) do begin
  Ypos:=round((P2y-
Ly)/Yrange*(IncrementY*Scratch+OffsetY)+Ly);
  if Ypos <= P2y-PperCH then
    Write(aux,'PA',P2x,',',Ypos,';YT;');
  end;
  Write(aux,'PU;');
  ChkPlotter;
end; { contour }
{*****};
{*** Plot the curve *****};
{*****};
Write(aux,'IP',Lx,',',Ly,',',P2x,',',P2y,';');
Write(aux,'IW',Lx,',',Ly,',',P2x,',',P2y,';');
Write(aux, 'SC', nDX[c], ',', nFX[c], ',',
      Ymin:6:0,
      ',', Ymax:6:0, ';');
ChkPlotter;
If Symbol<>'' then begin
  Write(aux,'SI',SymbolSize:3:2,',',SymbolSize:3:2,';');
  Write(aux,'SM',Symbol,';');
end;
SelectPen:=2;
Writeln('Quelle plume utiliser pour le graphique? (Défaut=',
        SelectPen:2:0,')');
Readln(SelectPen);
Write(aux,'SP',SelectPen:2:0,';');
if LineType<7 then
  Write(aux,'LT',LineType:2:0,',',PatternLength:3:1,';');
ChkPlotter;
Code:=nDX[c];
while (not M[c][Code]) and (Code<nFX[c]) do Code:=Code+1;
Write(aux,'PA',Code,',',Y[c][Code],';');
if Code<nFX[c] then
  if (Symbol<>'') then begin
    for I:=Code to nFX[c] do
      if M[c][I] then begin
        Repeat until PlotterReady;
        Write(aux,'PD',I,',',Y[c][I],');'
      end;
    end else
      for I:=Code to nFX[c] do begin
        if M[c][I] then Write(aux,'PD',I,',',Y[c][I],');'
        delay(50);
      end;
    end;
  end;

```

```

        end;
        Write(aux, 'PU;');
        ChkPlotter;
        Writeln('Fin du tracage');
        Write(aux,'SM;IW;LT;');
        ChkPlotter;
        Write(aux,'SP0;PA;IP;SC;');
        ChkPlotter;
        end; { Plot }

procedure PutMask;
  var
    Desire : BOOLEAN;
    Flash,There,
    SoManyP : INTEGER;
    PperFlash : REAL;
  begin
    Writeln('S.V.P. voulez-vous enlever (0) ',
           'ou remettre (1) des données?');
    Readln(Scratch);
    Desire:= Scratch=1;
    Writeln('Combien de points après l''éclair voulez-vous
affecter?');
    Readln(SoManyP);
    Writeln('Premier éclair:',FF[c],' Dernier éclair:',LF[c]);
    PperFlash:=(LF[c]-FF[c])/(NF[c]-1);
    for Flash:=0 to NF[c]-1 do
      for I:=0 to SoManyP do begin
        There:=I+FF[c]+trunc(Flash*PperFlash);
        if (There<=FX[c]) and (There>=DX[c]) then
          M[c][There]:=Desire
        else Writeln('Contactez Pascal: Flash=',Flash,
                    'There:',There);
      end;
    end; { PutMask }

Procedure DéfautFile;
  Var
    d : FileSelector;
  begin
    Repeat
      For d:=0 to 3 do Writeln(d,'=',TI[d]);
      Writeln('Choisissez un fichier#');
      {$I-}
      Readln(c);
      {$I+}
    until IOr esult=0;
    (*Jusqu'à ce qu'il n'y ait pas d'erreur*)
  end;

Procedure Exchange;

```

```

var
  a,b,d: FileSelector;
begin
  For d:=0 to 3 do Writeln(d,'=',TI[d]);
  Writeln('Entrez le # du premier fichier');
  {$I-} (*directive du compilateur pour les erreurs IO*)
  Readln(a);
  writeln('Entrez le # du deuxième fichier');
  Readln(b);
  {$I+} (*directive du compilateur pour les erreurs IO*)
  if IOresult=0 then Copie(a,b);
  (*s'il n'y a pas d'erreur, les fichiers sont échangés*)
end;

Procedure GereAcquisition;
Var
  CADfreq, (*Fréquence interne du convertisseur *)
            (*analogique-digital*)
  Fréquence, (*Exposant de 10 pour diviser CADfreq*)
  Nacquis, (*Nombre de points expérimentaux*)
  Compteur,
  PointsParFlash (*Intervalle entre les éclairs*)
    : Integer;
  WithFlash (*Si des éclairs sont désirés*)
    : BOOLEAN;
  R (*Fréquence d'acquisition calculée*)
    : REAL;
begin
  (*initialisation de l'appareillage*)
  Depolarize;
  Ready_ADC;
  (*Conditions de l'expérience*)
  Writeln('La fréquence de base de l''horloge du C.A.D. est de
?(KHz)');
  Writeln('défaut=60');
  CADfreq:=60;
  Readln(CADfreq);
  Writeln('Veuillez entrer un entier qui sera la puissance de
10');
  Writeln('du diviseur de fréquence. ( de 1 à 7 ) ');
  Writeln('Défaut=',FreqDiv:1:0,' , i.e. si vous n''entrez
rien');
  Repeat Readln(FreqDiv) until (FreqDiv<=7) and (FreqDiv>=1);
  Fréquence:=round(FreqDiv);
  R:=exp(-Fréquence*ln(10))*1000.0*CADfreq;
  Writeln('La fréquence d''échantillonage sera ',R:6:0,' Hz');
  Writeln('La période d''échantillonage sera ',1/R:8:6,' s');
  Writeln;
  Writeln('Désirez-vous des éclairs?');
  Readln(Ch);
  Ch:=UpCase(Ch);

```

```

if (Ch='O') or (Ch='Y') then begin
  Repeat
    Writeln('Veuillez indiquer à quelle fréquence le flash
doit');
    Writeln('être activé (en Hertz,
Défaut=',FrequenceFlash:4:2,');');
    Readln(FrequenceFlash);
    Until (FrequenceFlash<R) and (FrequenceFlash>0);
    PointsParFlash:=round(R/FrequenceFlash);
    WithFlash:=True;
  end else begin
    WithFlash:=False;
    PointsParFlash:=32767;
    FrequenceFlash:=3;
  end;
  Writeln;
  Writeln('Veuillez entrer combien de points vous desirez. Ce
nombre');
  Writeln('de points devrait etre une puissance de deux (mais
pas ');
  Writeln('obligatoirement.');
  Readln(Nacquis);
  Writeln('Quelle duree d''adaptation au noir (en secondes)?');
  Readln(Compteur);
  Writeln('Placez l''echantillon sur l''electrode et pressez',
         ' une cle');
  Repeat until Keypressed;
  Writeln;
  Writeln('Vous pouvez vaquer a d''autres occupations...');

  (*L'expérience commence...*)
  For Compteur:=Compteur downto 0 do delay(1000);
  GetElectrodeReady;
  Mesure_Optimisee(0, Frequence, Nacquis, PointsParFlash,
WithFlash);
  Depolarize;
  (*L'expérience est finie *)

  (*Préparation des données pour la sauvegarde*)
  (*selon le format de fichiers Tracor-Northern modifié*)
  DX[0]:=0; (*début des données*)
  FX[0]:=Nacquis-1; (*Fin des données*)
  NC[0]:=1; (*Nombre de courbes moyennées *)
  FF[0]:=trunc(PointsParFlash/2); (*Premier éclair*)
  (*Nombre d'éclairs*)
  NF[0]:=trunc((Nacquis + FF[0])/PointsParFlash);
  (*Dernier éclair*)
  LF[0]:=NF[0]*PointsParFlash - FF[0];
  DW[0]:=1/R; (*"Dwell time": intervalle de temps/point*)
  CallOperator;
  Writeln('Echelle selectionnée sur l''amplificateur?');

```

```

Writeln('en micro-amperes, i.e. 10 uA= 10');
Readln(Reponse);
SF[0]:=Reponse/4096*1E-6; (*Facteur d'échelle*)
Writeln('Donnez un titre a cette courbe, pas plus de 40
chr.');
Readln(TI[0]);
Writeln('Entrez une date ou une note, pas plus de 40 chr.');
Readln(DA[0]);
Writeln;
Writeln('La sequence de production d''oxygene est dans le
fichier 0');
Writeln('***** SAUVEZ LA TOUT DE SUITE SUR DISQUE *****');
Delay(1000);
end;

Procedure FilterData;
var
  Filtre: REAL; (*constante de temps de filtrage*)
  Poids: array[0..2000] of REAL;
  (*Filtrage= moyenne pondérée*)
  PoidsSum: array[0..2000] of REAL;
  (*Somme des poids de 0 à x*)
  Npoints, Choix: Integer;
  Aire, PoidsRel: REAL;
  Buf: Integer;
  Ybuf: DataFile; (* 0..4095 of integer *)
Function DoCalc(A:integer):REAL;
begin
  DoCalc:=Poids[Buf-A]*Y[c][I-Buf+A];
end;
begin
  Writeln('Filtrage des donnees');
  Writeln;
  Writeln('Frequence d''acquisition=',1/DW[c],' Hz');
  Writeln('Entrez la frequence de filtrage, en Hz');
  Readln(Filtre);
  Filtre:=Filtre*2*Pi;
  Writeln('constante de temps de filtrage =',1/Filtre);
  Filtre:=Filtre*Dw[c];
  (*Filtre est transformé en nombre de points*)
  Npoints:=trunc(ln(4096)/Filtre) +1;
  Writeln(Npoints,'points seront utilisés pour le calcul');
  (*le nombre de points à utiliser est selon la *)
  (*précision des calculs. 1/4096= exp(-Npoints/Filtre) *)

  If Npoints > 2000 then halt;
  Writeln('Spécifiez le type de filtre à utiliser:');
  Writeln('(1)- filtre RC passe-bas');
  Writeln('(2)- filtre Butterworth passe-bas, 2me ordre');
  Writeln('(3)- filtre RC passe-haut');
  Writeln('(4)- filtre ButterWorth passe-haut, 2me ordre');

```

```

Repeat Readln(Choix) until (Choix>0) and (Choix<5);
Case Choix of
    (*Réponse impulsionale d'un filtre RC*)
    1,3 : For I:=0 to Npoints do Poids[I]:=exp(-Filtre*I);
    (*Réponse impulsionale d'un filtre Butterworth*)
    2,4 : For I:=0 to Npoints do
            Poids[I]:=exp(-Filtre*I)*sin(Filtre*I);
    end;
    (*Calcul de la pondération du filtre*)
    PoidsSum[0]:=Poids[0]/2;
    For I:=1 to Npoints do PoidsSum[I]:=PoidsSum[I-1]+Poids[I];
    (*Début du filtrage*)
    For I:=DX[c] to FX[c] do begin
        Buf:=Npoints;
        Aire:=0;
        if I-Npoints < DX[c] then Buf:=I - DX[c];
        If Buf=0 then Ybuf[I]:=Y[c][I]
        else begin
            PoidsRel:=PoidsSum[Buf];
            For Buf:=Buf downto 1 do
                Aire:=Aire + Poids[Buf]*Y[c][I-Buf];
            Aire:=Aire + Poids[0]*Y[c][I]/2;
            Ybuf[I]:=round(Aire/PoidsRel);
            end;
            (*Filtre passe-haut = 1- filtre passe-bas*)
            If choix>2 then Ybuf[I]:=Y[c][I]-Ybuf[I];
        end;
        Y[0]:=Ybuf;
    end;

begin { main }
  NoScale:= true;
  AssignAux(1);
  SetSerial(1,9600,1,7,None);
  InitGraphic;
  LeaveGraphic;
  LineType := 7      { for the plotter };
  TickLength:= 3.0    { percentage of the plotter window };
  NTicks :=3.0;
  PatternLength:= 4   { if LineType<7 };
  ChrHeight := 0.60;
  ChrWidth  := 0.40;
  Xlabel    :='TIME';
  Ylabel    :='CURRENT';
  UnitX    :='s';
  Unity     :='A';
  FreqDiv:=2;
  FrequenceFlash:=3;
  For c:=0 to 3 do begin
    for I:=0 to 4095 do M[c][I]:=true;
    TI[c]:='';

```

```

    DA[c]:='';
end;
c:=0;
WantSound:=false;
Repeat
  if Wantsound then Done;
  if not KeyPressed then
  begin
    Writeln('Menu: (les résultats d'opérations sont mises dans
le fichier #0)');
    Writeln;
    Writeln('(1)- Donner un éclair');
    Writeln('(2)- Polariser l''électrode');
    Writeln('(3)- Dépolariser l''électrode');
    Writeln('(4)- filtrer des données ');
    Writeln('(5)- sauvegarde de données (fichier sélectionné)');
    Writeln('(A)- Acquisitionner des données: (fichier 0)');
    Writeln('(E)- Echanger deux fichiers');
    Writeln('(F)- sélectionner un fichier autre que #',c);
    Writeln('(H)- faire une copie sur papier à l''imprimante');
    Writeln('(I)- Lire des données (fichier sélectionné)');
    Writeln('(M)- Masquer des données');
    Writeln('(O)- specifier les Options (à faire avant (P)');
    Writeln('(P)- tracer sur la table');
    Writeln('(Q)- terminé!');
    Writeln('(R)- spécifier les échelles à utiliser: à faire ');
    Writeln('      avant d'imprimer !');
    Writeln('(S)- Dessiner à l'écran');
    Writeln('(W)- Avec ou sans signal sonore');
  end;
  Readln(Ch);
  Ch:=Upcase(Ch);
  case Ch of
    '1': Flash;
    '2': Polarize;
    '3': Depolarize;
    'A': GereAcquisition;
    '4': FilterData;
    'F': DéfautFile;
    'E': Exchange;
    'I': begin InputData(c); NoScale:=true; end;
    '5': SaveData(c);
    'R': SpecifyRange;
    'S','H': Dessine;
    'O': SpecifyOptions;
    'P': Plot;
    'M': PutMask;
    'W': WantSound:= not WantSound;
  end;
  until Ch='Q';
end. { Graphiti }

```

## A1.6.Code PASCAL de la sous-routine ADCrouti.sys:

```

(* Routines d'acquisition de données pour carte DT-2814,*)
(* de gérance des éclairs et de la polarisation *)
var
  Nerrors, bufad, CompteFlash, Flashreg, PointsEntreFlash:
integer;
  bufbyte: byte;

Procedure Outbyte(addrresse: INTEGER; outbyte: BYTE);
begin
  bufad:=addrresse;
  bufbyte:=outbyte;
  inline($8B/$16/bufad/ { MOV dx, bufad   }
        $A0/bufbyte/    { MOV al, bufbyte  }
        $EE              { OUT (dx), al   } );
end;

Function Inbyte(addrresse: INTEGER): BYTE;
begin
  bufad:=addrresse;
  inline($8B/$16/bufad/ { MOV dx, bufad   }
        $EC/           { IN al, (DX)    }
        $A2/bufbyte    { MOV bufbyte, al  } );
  Inbyte:=bufbyte;
end;

Procedure Ready_ADC;
var
  Bufbyte: BYTE;
begin
  Outbyte($0220,0);
  delay(1);
  bufbyte:=Inbyte($0221);
  bufbyte:=Inbyte($0221);
end;

Function Conversion(Channel:BYTE):INTEGER;
var
  Valbuf: integer;
begin
  Outbyte($0220,Channel and 15);
  Valbuf:=Inbyte($0221);
  Conversion:=(Inbyte($0221) shr 4) or (Valbuf shl 4);
end;

Procedure Depolarize;
begin
  Outbyte($027A,1);
end;

```

```

Procedure Polarize;
begin
  Outbyte($027A,0);
end;

Procedure Flash;
begin
  Outbyte($0278,0);
  Outbyte($0278,1);
end;

Function Voltmetre(Canal:byte): REAL;
var
  compteur: integer;
  moyenne: real;
begin
  moyenne:=0;
  For compteur:=1 to 1000 do
  moyenne:=moyenne+Conversion(Canal);
  Voltmetre:=moyenne*5.0/4096.0/1000.0;
end;

Procedure Mesure_Sans_Flash (Canal, frequence:byte; Nacquis:
integer);
begin
  { Acquisition sans flash, sans ajustement d'echelle }
  { frequence: de 1 a 7, = puissance de 10 par laquelle}
  { la frequence de base =200 KHz sera divisee }
  { Canal: de 0 a 15 }
  Bufbyte:=16 or ((frequence and 7) shl 5) or (Canal and 15);
  bufad:=Nacquis;
  inline($BE/Y/           { MOV si, Y }
        $BB/>$0000/       { MOV bx, 0000 }
        $8B/$0E/bufad/    { MOV cx, (Nacquis) }
        $A0/Bufbyte/      { MOV al, (ctrlreg) }
        $BA/$0220/         { MOV dx, $0220 }
        $EE/               { OUT (dx), al }
  {wait} $EC/             { IN al, (dx) }
        $24/$80/           { AND al, $80      Data ready? }
        $74/$FB/           { JZ -wait }
        $42/               { INC dx      Premiere
acquisition }
        $EC/               { IN al, (dx) = fausse }
        $EC/               { IN al, (dx) }
        $4A/               { DEC dx }
  {WAIT} $EC/             { IN al, (dx) }
        $24/$80/           { AND al, $80      test data ready
bit }
        $74/$FB/           { JZ -WAIT }
        $42/               { INC dx      dx=$0221 }

```

```

$EC/           { IN al, (dx)      input high byte }
$88/$C4/       { MOV ah, al      }
$EC/           { IN al, (dx)      input low byte }
$89/$00/       { MOV (si+bx), ax }
$43/           { INC bx          next word }
$43/           { INC bx          }
$4A/           { DEC dx          dx=$0220 }
$49/           { DEC cx          -1 acquisition }
$75/$EE/       { JNZ -WAIT      jusqu'a cx=0 }
$B0/$00/       { MOV al, $00      RESET ADC }
$EE/           { OUT (dx), al    "      }
$42/           { INC dx          "      }
$EC/           { IN al, (dx)    "      }
$EC           { IN al, (dx)    "      });

for bufad:=0 to Nacquis do
  Y[0][bufad]:=Y[0][bufad] shr 4;
end;

Procedure Mesure_Avec_Flash (Canal, Frequence: byte; Nacquis,
Flcount:integer);
begin
  { acquisition avec flash, sans ajustement d'echelle }
  Bufbyte:=16 or ((frequence and 7) shl 5) or (Canal and 15);
  bufad:=Nacquis;
  Nerrors:=0;
  CompteFlash:=trunc(Flcount/2);
  PointsEntreFlash:=Flcount;
  writeln('Procedure mesure avec flash');
  inline($FA/           { CLI           *no interrupts * }
         $BE/Y/          { MOV si, Y }
         $BB/>$0000/     { MOV bx, 0000      }
         $8B/$0E/bufad/ { MOV cx, (Nacquis) }
         $A0/Bufbyte/   { MOV al, (ctrlreg) }
         $BA/$0220/     { MOV dx, $0220      }
         $EE/           { OUT (dx), al    }
         {wait} $EC/      { IN al, (dx)      }
         $24/$80/       { AND al, $80      Data ready? }
         $74/$FB/       { JZ -wait      }
         $42/           { INC dx          Premiere
acquisition }
         $EC/           { IN al, (dx)      = fausse }
         $EC/           { IN al, (dx)      }
         $4A/           { DEC dx          }
         {WAIT} $EC/      { IN al, (dx)      }
         $A8/$40/       { TEST al, $40      test error bit }
         $74/$04/       { JZ - NoError }
         $FF/$06/Nerrors/ { INC Nerrors }
         {NoError} $24/$80/ { AND al, $80      test data ready
bit }
         $74/$F3/       { JZ -WAIT      }
         $42/           { INC dx          dx=$0221 }

```

```

$EC/           { IN al, (dx)      input high byte }
$88/$C4/       { MOV ah, al      }
$EC/           { IN al, (dx)      input low byte }
$89/$00/       { MOV (si+bx), ax }
$43/           { INC bx          next word }
$43/           { INC bx          }
$4A/           { DEC dx          dx=$0220 }
$FF/$0E/CompteFlash/ { DEC compteflash }
$75/$17/       { JNZ -noflash   }
$8B/$06/PointsEntreFlash/ { MOV ax, (PointsEntreFlash)
}

$89/$06/CompteFlash/ { MOV (compteflash), ax}
$BA/$0278/      { MOV dx, $0278   }
$A0/flashreg/   { MOV al, (flashreg) }
$24/$FE/        { AND al, $FE    }
$EE/            { OUT (dx), al   }
$0C/$01/        { OR  al, $01    }
$EE/            { OUT (dx), al   }
$BA/$0220/      { MOV dx, $0220   }

{noflash} $49/ { DEC cx          -1 acquisition  }
$75/$C9/       { JNZ -WAIT      jusqu'a cx=0  }
$B0/$00/       { MOV al, $00      RESET ADC  }
$EE/            { OUT (dx), al   "   "  }
$42/            { INC dx          "   "  }
$EC/            { IN  al, (dx)    "   "  }
$EC/            { IN  al, (dx)    "   "  }
$FB             { STI  *interrupts allowed * });

Writeln('Il y a eu ',Nerrors:6,' erreurs de conversion');
for bufad:=0 to Nacquis do
  Y[0][bufad]:=Y[0][bufad] shr 4;
end;

Procedure Done;
begin
  Sound(5000);
  Delay(500);
  NoSound;
end;

Procedure GetElectrodeReady;
var
  Compteur: INTEGER;
  memoire1, memoire2: integer;
begin
  Compteur:=0;
  Writeln('L''electrode est en cours de polarisation');
  Polarize;
  Delay(10000);
  Repeat
    Delay(1000);
    Compteur:=Compteur + 1;

```

```

memoire2:=memoire1;
memoire1:=Conversion(0);
until (memoire1 >=380);
Writeln('Le temps de polarisation a ete
de:',Compteur+5:4,'secondes');
end;

Procedure Mesure_Optimisee (Canal, Frequence: BYTE;
                           Nacquis, Flcount: INTEGER;
                           DoFlash: BOOLEAN);
var
  Bufad, Nerreurs, Nflash, compteur, Valbuf: INTEGER;
  Bufbyte: BYTE;
begin
  Writeln('il y aura ',Nacquis/Flcount:4,' flashes');
  if Frequence<1 then begin
    Writeln('La frequence choisie est inacceptable');
    halt;
  end else if Frequence<2 then
  if DoFlash then begin
    Writeln('Mesure avec flash');
    Mesure_Avec_Flash(Canal, Frequence, Nacquis, Flcount);
  end else Mesure_Sans_Flash(Canal, Frequence, Nacquis)
  else begin
    Nerreurs:=0;
    Nflash:=trunc(Flcount/2);
    Bufbyte:=16 or ((frequence and 7) shl 5) or (Canal and 15);
    bufad:=Nacquis;
    Outbyte($0220,Bufbyte);
    Repeat bufbyte:=Inbyte($0220) until (bufbyte and $C0) >0;
    bufbyte:=Inbyte($0221);
    bufbyte:=Inbyte($0221);
    For Compteur:=0 to Nacquis do begin
      Repeat bufbyte:=Inbyte($0220) until (bufbyte and $C0) >0;
      if (bufbyte and $40) =$40 then Nerreurs:=Nerreurs + 1;
      if (bufbyte and $80) =$80 then begin
        Valbuf:=Inbyte($0221);
        Valbuf:=(Inbyte($0221) shr 4) or (Valbuf shl 4);
        Y[0][Compteur]:=Valbuf;
        Nflash:=Nflash - 1;
        if Nflash < 1 then begin
          if DoFlash then Flash;
          Nflash:=Flcount;
        end;
      end else compteur:=compteur-1;
    end;
    Ready_ADC;
    Writeln(Nerreurs,' erreurs de conversion ont ete faites');
  end; (*fin du 'if'*)
end;

```

## A1.7. Code PASCAL des sous-routines STDFILE\_.SYS

```

(* standard formats for file input/output*)
Type
  Index= 0..4095;
  DataFile= array[Index] of INTEGER;
  AllData= array[FileSelector] of DataFile;
  FileSpecInt= array[FileSelector] of INTEGER;
  FileSpecReal=array[FileSelector] of REAL;
  Alphanum= string[40];
  FileSpecAlpha= array[FileSelector] of alphanum;

Var
  Y      : AllData;
  DX,   { start of curve }
  FX,   { end of curve }
  NC,   { number of averaged curves }
  PR,   { preset time on TN-1710 }
  FF,   { location of first flash }
  LF,   { location of last flash }
  NF    { number of flashes }
      : FileSpecInt;

  SF,   { scale factor }
  DW   { dwell time on TN-1710 }
      : FileSpecReal;

  TI,DA { title and date }
      : FileSpecAlpha;

Procedure InputData(c:FileSelector);
  Var
    Filvar : TEXT;
    Filename : Alphanum;
    CH: Char;
    I: integer;
  begin
    Write('Donnez: Lecteur:\Chemin\NomDuFichier=');
    Readln(Filename);
    Assign(Filvar,Filename);
    {$I-      no io error check }
    Reset(Filvar);
    {$I+      enable error check }
    I:=IOresult;
    if I=0 then begin
      Readln(Filvar,CH,DX[c],FX[c],DW[c],NC[c],PR[c],FF[c],LF[c],
             NF[c],SF[c]);
      Readln(Filvar,TI[c]);
      Readln(Filvar,DA[c]);
      Writeln('Lecture en cours :',TI[c],', ',DA[c]);
      For I:=DX[c] to FX[c] do Readln(Filvar,Y[c][I]);
    end;
  end;

```

```

        Writeln('lecture terminée ');
end else writeln('Erreur: voir le manuel, erreur E/S #',I);
Close(Filvar);
end; {InputData}

Procedure SaveData(c:FileSelector);
Var
  Filvar : TEXT;
  Filename : Alphanum;
  Ch: Char;
  I : integer;
begin
  Write('Donnez: Lecteur:\Chemin\NomDuFichier=');
  Readln(Filename);
  Assign(Filvar,Filename);
  Rewrite(Filvar);
  Ch:=' ';
  Writeln(Filvar,Ch,DX[c],Ch,FX[c],Ch,DW[c],Ch,NC[c],Ch,PR[c],Ch,
          FF[c],Ch,LF[c],Ch,NF[c],Ch,SF[c]);
  Writeln(Filvar,TI[c]);
  Writeln(Filvar,DA[c]);
  Writeln('Ecriture de :',TI[c],' ',DA[c]);
  For I:=DX[c] to FX[c] do Writeln(Filvar,Y[c][I]);
  Writeln('Sauvegarde terminée');
  Close(Filvar);
end; {SaveData}

Procedure BuffInput(Défaut : REAL; var Nombre : REAL);
var
  Dummy: Alphanum;
  Code: integer;
begin
  Readln(Dummy);
  if Dummy<>'' then Val(Dummy,Nombre,Code)
  else Nombre:=Défaut;
end;

Procedure BuffAlphanum(Défaut : Alphanum; var texte : Alphanum);
var
  Dummy: Alphanum;
begin
  Readln(Dummy);
  if Dummy<>'' then texte:=Dummy
  else texte:=Défaut;
end;

Procedure IntegerSwap(var X,Y:integer);
var
  tampon: integer;
begin
  tampon:= X;

```

```
X:= Y;
Y:=tampon;
end;

Procedure RealSwap(var X,Y:REAL);
var
  tampon: REAL;
begin
  tampon:= X;
  X:= Y;
  Y:=tampon;
end;

Procedure AlphanumSwap (var X,Y: Alphanum);
var
  tampon: alphanum;
begin
  tampon:= X;
  X:= Y;
  Y:=tampon;
end;

Procedure Copie (a,b:FileSelector);
var
  tampon: DataFile;
begin
  tampon:= Y[b];
  Y[b]:= Y[a];
  Y[a]:= tampon;
  IntegerSwap(DX[a],DX[b]);
  IntegerSwap(FX[a],FX[b]);
  IntegerSwap(NC[a],NC[b]);
  IntegerSwap(PR[a],PR[b]);
  IntegerSwap(FF[a],FF[b]);
  IntegerSwap(LF[a],LF[b]);
  IntegerSwap(NF[a],NF[b]);
  RealSwap(DW[a],DW[b]);
  RealSwap(SF[a],SF[b]);
  AlphanumSwap(TI[a],TI[b]);
  AlphanumSwap(DA[a],DA[b]);
end;
```

## ANNEXE 2:

Acquisition aux temps sélectionnés, par le programme Menu02

## A2. Introduction

Dans l'acquisition de données en continu, seulement une partie des données sont utiles. D'après les cinétiques du dégagement d'oxygène, il suffit d'enregistrer les données durant 15 ms avant de donner un éclair pour mesurer la ligne de base, et durant 15 ms après l'éclair pour mesurer le pic de production d'oxygène. Ainsi, les fichiers de données prennent moins d'espace et peuvent contenir plus d'éclairs.

Menu02 est aussi plus flexible dans le conditionnement de l'échantillon; l'utilisateur programme et définit la séquence des événements (nombre d'éclairs et intervalle variable entre eux, délais, mesures), en utilisant des "macro-codes". Chaque macro-code définit une opération (attendre, donner un éclair, etc..) qui fait appel à une sous-routine spécialisée; la séquence des macro-codes constitue le programme des opérations du système. Les macro-codes sont organisés dans un vecteur de caractères ("Commande" dans le module Acquis02), et sont représentés par une lettre. Quand le macro-code nécessite une spécification (nombre de secondes à attendre, etc...), celle-ci est incluse

dans l'élément correspondant du vecteur d'entiers "champ".

Ceci donne une flexibilité très grande à l'appareil.

De plus, le programme Menu02 s'occupe de l'évaluation automatique des amplitudes de production d'oxygène, et peut tester tous les modèles existants de la production d'oxygène. Il permet aussi de faire la moyenne d'observations à partir de fichiers sur disque; ceci permet de diminuer le bruit des mesures comme la racine carrée du nombre d'observations dont on fait la moyenne (pour des mêmes conditions expérimentales).

Les différentes tâches du programme sont divisées en différents modules (units). Le module Acquis02 s'occupe de l'acquisition des données; le module FlashIO s'occupe d'entrées/sorties pour contrôler la polarisation des électrodes, les éclairs, etc...; Traite02 s'occupe de leur traitement et de l'ajustement de modèles matriciels et de l'équation de récurrence du dégagement d'oxygène, et Maths s'occupe des régressions linéaires et multivariées et des inversions de matrices dont a besoin traite02. Le format des fichiers est celui de Graphiti. Les fichiers de données sont compatibles de Menu02 à Graphiti; cependant certaines opérations de Menu02 peuvent donner de mauvais résultats si elles sont utilisées avec des fichiers provenant de Graphiti. Ceci est parce que dans Graphiti la gestion de la carte est

variable (fréquence d'acquisition, etc...), alors que dans Menu02 elle est optimisée et fixe.

Il ne devrait jamais y avoir d'erreur signalée, sauf si des opérations d'entrée-sortie sont impliquées. Dans ce cas vérifier le contenu et l'état des disquettes. Turbo Pascal peut aussi arrêter le programme si l'imprimante est débranchée alors qu'un message y est envoyé. Ce programme a été écrit pour la version 4.0 du Turbo Pascal.

## A2.1. Code PASCAL du programme Menu02

```

Program Menu02 (input, Output);
{$N+ 8087 mode}
{$M 65520,0,655360}

Uses Dos, CRT, Printer, {$U B:Flash} FlashIO, {$U B:Maths}
Maths,
{$U B:Acquis02} Acquis02, {$U b:traiteo2.pas} Traite02;

Var
  Ch: CHAR;
  TheEnd: BOOLEAN;

PROCEDURE Lecture;
  var
    Filvar: TEXT;
    Filename: STRING[40];
    Ch: CHAR;
    I, Compteur: INTEGER;
    Scale: REAL;
  BEGIN
    Write('Donnez: Lecteur:\Chemin\NomDuFichier=');
    Readln(Filename);
    Assign(Filvar, Filename);
    {$I-  no I/O error check}
    Reset(Filvar);
    {$I+  enable I/O error check}
    I:=IOresult;
    IF I=0 THEN BEGIN
      Readln(Filvar, Ch, I, I, Scale, I, I, I, I, FlashNum,
      Scale);
      Readln(Filvar, FIlename);
      Readln(Filvar, Filename);
      Writeln('Lecture de:',Filename);
      FOR Compteur:=1 TO FlashNum DO
        FOR I:=1 TO Npoints DO Readln(FilVar, Y[Compteur][I]);
      Writeln('Lecture terminée');
      Close(FIlnar);
    END else writeln('voir dans le manuel l''erreur #',I);
  END;

PROCEDURE Sauve;
  var
    Filvar: TEXT;
    Filename: STRING[40];
    Ch: CHAR;
    I, Compteur: INTEGER;
    Scale: REAL;
  BEGIN

```

```

Write('Donnez: Lecteur:\Chemin\NomDuFichier');
Readln(Filename);
Assign(Filvar, Filename);
{$I-  no I/O error check}
Rewrite(Filvar);
{$I+  enable I/O error check}
I:=IOresult;
IF I=0 THEN BEGIN
  Write('Donnez l''échelle du potentiostat, en µA');
  ReadLn(Scale);
  Scale:=Scale*1e-06/16384.0;
  Ch:=' ';
  Writeln(Filvar, Ch, 0, Ch, Flashnum*Npoints, Ch, 1/2000,
Ch, 0,
          Ch, 0, Ch, 20, Ch, FlashNum*Npoints-40, Ch,
FlashNum,
          Ch, Scale);
  Writeln(Filvar, 'Programme Mesure02: Fichier special:');
  Writeln(Filvar, Filename);
  Writeln('Sauvegarde de :',Filename);
  FOR Compteur:=1 TO FLashNum DO
    FOR I:=1 TO Npoints do Writeln(Filvar, Y[Compteur][I]);
  Writeln('Sauvegarde terminée');
  Close(Filvar);
END else Writeln('Voir le manuel, erreur E/S #',I);
END;

PROCEDURE Moyenne;
var
  Ymoy: Array[1..MaxFlash] of array[1..Npoints] of REAL;
  Nfichiers: REAL;
  Ch: CHAR;
  Flash, Compteur: Integer;
BEGIN
  Writeln('Moyenne de fichiers de même longueur');
  Nfichiers:=0;
  FOR Flash:=1 TO MaxFlash do
    FOR Compteur:=1 TO Npoints do
      Ymoy[Flash][Compteur]:=0;
  REPEAT
    Nfichiers:=Nfichiers + 1;
    Writeln('Veuillez entrer les donnees du fichier
#',Nfichiers);
    Lecture;
    FOR Flash:=1 TO FlashNum DO
      FOR Compteur:=1 TO Npoints DO
        Ymoy[Flash][Compteur]:=Ymoy[Flash][Compteur] +
          Y[Flash][Compteur];
    Writeln('Voulez-vous ajouter un autre fichier avant de',
          ' faire la      moyenne (O/N)?');
    Readln(Ch);
  
```

```

UNTIL Upcase(Ch) <> 'O';
FOR Flash:=1 TO FlashNum DO
  FOR Compteur:=1 TO NPoints DO
    Y[Flash][Compteur]:=

      Round(Ymoy[Flash][Compteur]/Nfichiers);
      Writeln('Moyenne terminee');
END;

Procedure Directory;
var
  Ch:CHAR;
  Path: STRING;
  SRec: SearchRec;
Begin
  Write('Lecteur?:');
  Ch:=ReadKey;
  Writeln(Ch);
  Ch:=UpCase(Ch);
  If (Ch>='A') and (Ch<='Z') then begin
    Path:=Ch + ':*.*';
    FindFirst(Path, AnyFile, Srec);
    While DosError = 0 do begin
      Writeln(SRec.Name);
      FindNext(SRec);
    End;
  end;
end;

PROCEDURE WriteMenu;
BEGIN
  ClrScr;
  Writeln('Programme de mesure de degagement d''oxygene');
  Writeln('Menu principal:');
  Writeln;
  Writeln('(A)- Acquisition de donnees experimentales');
  Writeln('(D)- Directory (Noms des fichiers disponibles)');
  Writeln('(L)- Lire des donnees sur disque');
  Writeln('(M)- Moyenne de plusieurs donnees sur disque');
  Writeln('(S)- Sauver les donnees sur disque');
  Writeln('(T)- Traiter des donnees');
  Writeln('(Q)- Quitter ce programme');
END;

BEGIN
  TheEnd:=False;
  ClrScr;
  WriteMenu;
  REPEAT
    Entree(Ch);
    Case Ch of
      'Q': TheEnd:=true;

```

```
'A': Acquisition;
'D': Directory;
'T': Traite;
'S': Sauve;
'M': Moyenne;
'L': Lecture;
else WriteMenu;
END;
UNTIL TheEnd;
END.
```

## A2.2. Code PASCAL du module FlashIO

```

Unit FlashIO;

Interface
  Uses CRT;
  Procedure Ready_ADC;
  Procedure Depolarize;
  Procedure Polarize;
  Procedure Flash;
  Procedure Entree(Var A:CHAR);

Implementation
var
  reponse: String[1];
  Ch: CHAR;
  bufad: INTEGER;
  bufbyte: BYTE;

Procedure Outbyte(addrresse: INTEGER; outbyte: BYTE);
begin
  bufad:=addrresse;
  bufbyte:=outbyte;
  inline($8B/$16/bufad/ { MOV dx, bufad      }
        $A0/bufbyte/    { MOV al, bufbyte   }
        $EE              { OUT (dx), al    } );
end;

Function Inbyte(addrresse: INTEGER): BYTE;
begin
  bufad:=addrresse;
  inline($8B/$16/bufad/ { MOV dx, bufad      }
        $EC/           { IN al, (DX)      }
        $A2/bufbyte   { MOV bufbyte, al } );
  Inbyte:=bufbyte;
end;

Procedure Ready_ADC;
var
  Bufbyte: BYTE;
begin
  Outbyte($0220,0);
  delay(1);
  bufbyte:=Inbyte($0221);
  bufbyte:=Inbyte($0221);
end;

Procedure Depolarize;
begin
  Outbyte($027A,0);

```

```
end;

Procedure Polarize;
begin
  Outbyte($027A,1);
end;

Procedure Flash;
begin
  Outbyte($0278,0);
  Outbyte($0278,1);
end;

Procedure Entree(Var A:CHAR);
begin
  Readln(Reponse);
  If Length(Reponse) = 1 then Inline(
    $A0/Reponse +1/ { MOV al, (Reponse +1) }
    $A2/Ch          { MOV (Ch), al      })
  else Ch:=' ';
  A:=UpCase(Ch);
end;

Begin
end.
```

## A2.3. Code PASCAL du module Acquis02

```

Unit Acquis02;

Interface
  Uses Dos, CRT, Printer, {$U b:Flash} FlashIO;
  Const
    MaxFlash = 50;
    Npoints = 180;
  Type
    O2gush = array[1..Npoints] of INTEGER;
  Var
    FlashNum: INTEGER;
    Y: array[1..Maxflash] of O2gush;
  Procedure Acquisition;

Implementation
  Const
    Nlignes = 100;
  Var
    Commande : array[1..Nlignes] of CHAR;
    Champ: array[1..Nlignes] of INTEGER;
    Fincode: BOOLEAN;
    Ytemp: O2gush;
    Ch: CHAR;

PROCEDURE ClearMem;
  VAR Compteur: INTEGER;
  BEGIN
    FOR Compteur:=1 TO Nlignes DO Commande[Compteur]:=Chr(255);
  END;

PROCEDURE WriteMenu;
  BEGIN
    ClrScr;
    Writeln('Programme de mesure de degagement d''oxygene');
    Writeln('Menu:');
    Writeln;
    Writeln('(A)- Aide-memoire: description des commandes');
    Writeln('(C)- Changer une commande');
    Writeln('(E)- Effacer les commandes en memoire');
    Writeln('(I)- Imprimer les commandes en memoire');
    Writeln('(L)- Lister les commandes en memoire');
    Writeln('(P)- Programmer les operations');
    Writeln('(R)- Retourner au menu principal');
    Writeln('(1)- Executer les commandes');
  END;

PROCEDURE EcritCom(Car: CHAR);
  BEGIN

```

```

Case Car of
  'A': Write('Attends');
  'B': Write('Bip-Bip');
  'P': Write('Polarise');
  'D': Write('Depolarise');
  'F': Write('Flash');
  'M': Write('Mesure (30 ms)');
  'S': Write('Secondes');
  'R': Write('Repete');
  'J': Write('Jusqu''ici');
  else fincode:=true;
END;
END;

PROCEDURE Programme;
  VAR Compteur: INTEGER;
BEGIN
  ClrScr;
  Fincode:=false;
  Writeln('Commande <ret> Champ <ret>');
  Compteur:=1;
  REPEAT
    Ch:='B';
    Write('Commande?');
    Entree(Ch);
    EcritCom(Ch);
    IF (Ch='A') or (Ch='S') or (Ch='R')
    THEN BEGIN
      Write(': Champ?');
      Readln(Champ[Compteur]);
    END else Writeln;
    IF fincode THEN Commande[Compteur]:=Chr(255)
    else Commande[Compteur]:=Ch;
    Compteur:=Compteur + 1;
  UNTIL fincode;
  Ch:=' ';
END;

PROCEDURE Liste;
  VAR Compteur:INTEGER;
BEGIN
  ClrScr;
  Fincode:=false;
  Writeln('Ligne: Commande Champ');
  Compteur:=1;
  REPEAT
    Write(Compteur);
    GotoXY(6, Compteur + 1);
    Write(': ');
    Ch:=Commande[Compteur];
    EcritCom(Ch);
  
```

```

      GotoXY(20, Compteur + 1);
      IF (Ch='A') or (Ch='S') or (Ch='R') THEN
          Writeln(' ',Champ[Compteur]) else writeln;
          Compteur:=Compteur + 1;
      UNTIL fincode;
END;

PROCEDURE Change;
  VAR Compteur: INTEGER;
BEGIN
  Fincode:=false;
  Writeln('Entrez le # de ligne:');
  REPEAT
    Readln(Compteur);
  UNTIL Compteur <= Nlignes;
  Writeln('Entrez la commande');
  Entree(Ch);
  EcritCom(Ch);
  IF fincode THEN Commande[Compteur]:=Chr(255)
  else Commande[Compteur]:=Ch;
  IF (Ch='A') or (Ch='S') or (Ch='R')
  THEN BEGIN
    Write(' : Champ?');
    Readln(Champ[Compteur]);
  END else Writeln;
  Ch:=' ';
END;

PROCEDURE Help;
BEGIN
  Writeln('A  x: Attends x millisecondes');
  Writeln('B  : Emet un signal sonore (Bip-Bip)');
  Writeln('P  : Polarise les electrodes');
  Writeln('D  : Depolarise les electrodes');
  Writeln('F  : Donne un Flash');
  Writeln('M  : Mesure la production d''oxygene',
         ' ( 15 ms avant le flash + 15 ms apres)');
  Writeln('S  x: Attends x secondes');
  Writeln('R  x: Repete ce qui suit x fois (un seul niveau)');
  Writeln('J  : Jusqu''ici (repetition)');
END;

Procedure Bip_Bip;
begin
  Sound(2000);
  Delay(500);
  NoSound;
end;

PROCEDURE Seconds(X: Integer);
  var I: integer;

```

```

BEGIN
  FOR I:=1 TO X DO Delay(1000);
END;

PROCEDURE MesureGush;
var
  Index, Valbuf: INTEGER;
BEGIN
  FlashNum:=FlashNum + 1;
  InLine( { *** INITIALIZATION *** }
    $FA/           { CLI      * No Interrupts *}
    $BE/Ytemp/     { MOV si, Ytemp * Data storage *}
    $BB/>$0000/    { MOV bx, $0000 * Depl = 0  *}
    $B9/>$00B4/    { MOV cx, $00B4 * = 180 points*}
    $B0/$30/       { MOV al, $30 * On channel #0*}
    $E8/>$0033/    { CALL SetChannel}
    { *** START OF ACQUISITION *** }

  {*** Boucle ***}
    $91/           { XCHG ax, cx   }
    $3C/$5A/       { CMP al, $5A   * = 90 points*}
    $75/$10/       { JNE - NoFlash }
    $91/           { XCHG ax, cx   }
    $BA/$0278/     { MOV dx, $0278 }
    $24/$FE/       { AND al, $FE   }
    $EE/           { OUT (dx), al  }
    $0C/$01/       { OR al, $01   }
    $EE/           { OUT (dx), al  }
    $B0/$38/       { MOV al, $38   * On Channel #8 *}
    $E8/>$001F/    { CALL SetChannel}
    $91/           { XCHG ax, cx   }

  {*** NoFlash ***}
    $3C/$3C/       { CMP al, $3C   }
    $75/$07/       { JNZ - Channel }
    $91/           { XCHG ax, cx   }
    $B0/$30/       { MOV al, $30   * On Channel #0 *}
    $E8/>$0014/    { CALL SetChannel}
    $91/           { XCHG ax, cx   }

  {*** Channel ***}
    $91/           { XCHG ax, cx   }
    $E8/>$0013/    { CALL Lecture }
    $89/$00/       { MOV (si+bx), ax }
    $43/           { INC bx      * next word * }
    $43/           { INC bx      }
    $49/           { DEC cx      * -1 acquisition*}
    $75/$D5/       { JNZ -BOUCLE * jusqu'a cx=0 *}
    $B0/$00/       { MOV al, $00   * Reset ADC  *}
    $E8/>$0003/    { CALL SetChannel}
    $FB/           { STI       * Interrupts  *}
    $EB/$18/       { JMP +$18   * Fin du programme*}

  {*** SetChannel ***}
    $BA/$0220/     { MOV dx, $0220 *ADC base address}

```

```

$EE/                                {OUT (dx), al *Control Register*}
{*** Lecture ***}                  { IN  (DX), al *Status Register*}
$EC/                                { AND al, $80 *Test Finish Flag*}
$24/$80/                             { JZ -wait #1    * until set  *}
$74/$FB/                             { INC dx        * Data Register*}
$42/                                { IN  (dx), al  *Read High byte*}
$EC/                                { MOV ah, al   }
$88/$C4/                             { IN  (dx), al  *Read Low byte* }
$EC/                                { ROR (ax), 04  * rotation a droite
de 4 *}
$C3                                { RET }    );
Y[FlashNum]:=Ytemp;
END;

PROCEDURE Execute;
var
  Flag, Nfois, Compteur: Integer;
  Heure, Minute, Seconde, Sec100, TSeconde, Tsec100: Word;
  MHeure, MMinute, Mseconde, Msec100: Word;

Procedure SetIteration;
BEGIN
  Flag:=Compteur;
  Nfois:=1;
END;

Procedure Goback;
BEGIN
  IF Nfois < Champ[Flag] THEN BEGIN
    Nfois:=Nfois + 1;
    Compteur:=Flag;
  END;
END;

BEGIN
  Flag:=0;
  Fincode:=False;
  FlashNum:=0;
  Compteur:=1;
  REPEAT
    Case Commande[Compteur] of
      'A': Delay(Champ[Compteur]);
      'B': Bip_Bip;
      'P': Polarize;
      'D': Depolarize;
      'F': Flash;
      'S': Seconds(Champ[Compteur]);
      'M': MesureGush;
      'R': BEGIN Flag:=Compteur; Nfois:=1; END;
      'J': IF Nfois < Champ[Flag] THEN BEGIN

```

```

        NFois:=NFois + 1;
        Compteur:=Flag;
    END;
    else Fincode:=true;
END;
Compteur:=Compteur + 1;
UNTIL fincode;
Writeln('Execution terminee');
END;

PROCEDURE Imprime;
VAR Compteur: INTEGER;
BEGIN
    Fincode:=false;
    Writeln(Lst, 'Ligne: Commande Champ');
    Compteur:=1;
    REPEAT
        Write(Lst, Compteur:5);
        Write(Lst, ':');
        Ch:=Commande[Compteur];
        Case Ch of
            'A': Write(Lst, 'Attends':10);
            'B': Write(Lst, 'Bip-Bip':10);
            'P': Write(Lst, 'Polarise':10);
            'D': Write(Lst, 'Depolarise':10);
            'F': Write(Lst, 'Flash':10);
            'M': Write(Lst, 'Mesure':10);
            'S': Write(Lst, 'Secondes':10);
            'R': Write(Lst, 'Repete':10);
            'J': Write(Lst, 'Jusqu''ici':10);
            else fincode:=true;
        END;
        IF (Ch='A') or (Ch='S') or (Ch='R') THEN
            Writeln(Lst, ',Champ[Compteur]) else Writeln(Lst);
        Compteur:=Compteur + 1;
    UNTIL fincode;
END;

Procedure Acquisitionne;
begin
    WriteMenu;
    Repeat
        Entree(Ch);
        Case Ch of
            'A': Help;
            'C': Change;
            'E': ClearMem;
            'R':;
            'I': Imprime;
            'L': Liste;
            'P': Programme;

```

```
'1': Execute;
      else WriteMenu;
      end;
      UNTIL Ch='R';
      end;

BEGIN
  Ready_ADC;
END.
```

## A2.4. Code PASCAL du module Traite02

```

Unit Traite02;
{$N+ 8087 mode }

Interface
  Uses CRT, Printer, {$U B:Maths} Maths,
    {$U b:Flash} FlashIO, {$U B:Acquis02.TPU} Acquis02;
  Procedure Traite;

Implementation
  Const
    Smin = -1;
    Smax = 3;
  Var
    LinVar, {If the model has a linear variation of
deactivations}
    DoubleHits, {Si presence de double-hits }
    StateS3, {Si etat S3 dans le noir }
    StateS2, {Si etat S2 dans le noir }
    StateS_1, {Si le modele comprend l'etat S-1}
    DeactivS2S0, {Si Deactiv de S2 a S0 }
    DeactivS2, {Si le modele comprend la désactivation de S2}
    DeactivS3, {Si Désactivations sur S3}
    HomoMisses,{Si Misses dus a D}
    MissQa {Si Misses dus a Qa reduit}
      : BOOLEAN;
    Ch: CHAR; { Commande de l'usager }
    Nvertex, Nvar, { Algorythme du simplex: Nvertex = Nvar +1 }
    Offset, { Premier flash a traiter }
    FlNum2, { Dernier flash a traiter }
    Modele { Modelisation du degagement d'O2; # modele choisi
}
      : INTEGER;
    Dhit, MQa: EXTENDED;
    Weighted_Average, { Steady-state O2 production }
    Pente, { Regression proportionnelle entre modele et donnees
}
    B0,
    Trace { Coefficient signal determine par Lavorel ou
Thibault }
      : REAL;
    O2yield: Array[1..MaxFlash] of INTEGER;
    O2Noise: Array[1..MaxFlash] of REAL; { Donnees
experimentales }
    QuadDevSimplex {Erreurs respectives p/r aux donnees des
vertex du simplex }
      : array [0..8] of EXTENDED;
    Predicted {Valeurs de prod d'O2 predites par les differents
modeles}
      : array[1..MaxFlash] of REAL;

```

```

NomD: String[20];

Type
  vecteur= array[Smin..Smax] of EXTENDED; { Pour etats S-1 a
S3 }
  matrice= array[Smin..Smax] of vecteur;
  Para= array[1..7] of EXTENDED;
var
  D, ST, DT, T: Matrice;
  Scalc, { Vecteur resultant du calcul des etats-S }
  S, O2Prod: Vecteur;
  AvVertex: Para; { Moyenne des Simplex }
  Simplex: array[0..8] of Para;

Function Prod(Var A, B: Vecteur): EXTENDED;
var
  C1: Integer;
  Sum: EXTENDED;
BEGIN
  Sum:=0.0;
  FOR C1:=Smin TO Smax DO Sum:=Sum + A[C1]*B[C1];
  Prod:=Sum;
END;

Function CompQuadDev(z: Para):EXTENDED;
  VAR
    Colonne, Ligne, C2: INTEGER;
    Stemp, { Vecteur des etats-S, temporaire pour calcul}
    QaReduit {Pourcentage de Qa reduit ds chaque etat-S}
    : Vecteur;
    SSE, X, Y, SX, SY, SX2, SXY, SY2, SSX, SSY, SSXY, N:
    EXTENDED;
    HorsLimite: BOOLEAN;

Procedure DeactS2S3(Flash: INTEGER);
  VAR
    Colonne, Ligne, C2: INTEGER;
    Stemp, Scalc: Vecteur;
  BEGIN { 4 variables, no miss + desactivation sur S2 S3}
    D[0][0]:=1;
    D[0][1]:=0;
    D[0][2]:=0;
    D[0][3]:=0;
    D[1][0]:=0;
    D[1][1]:=1;
    D[1][2]:=z[2]-(z[3]-0.5)*Flash/10;
    D[1][3]:=D[1][2]*D[1][2];
    D[2][0]:=0;
    D[2][1]:=0;
    D[2][2]:=1-D[1][2];
    D[2][3]:=D[1][2]*(1-D[1][2]);
  END;

```

```

D[3][0]:=0;
D[3][1]:=0;
D[3][2]:=0;
D[3][3]:=1-D[1][2];
ST[0][0]:=0;
ST[0][1]:=0;
ST[0][2]:=0.2*z[4]; { 0.2*z[4] = DOUBLE-HITS }
ST[0][3]:=1 - 0.2*z[4];
ST[1][0]:=ST[0][3];
ST[1][1]:=ST[0][0];
ST[1][2]:=0;
ST[1][3]:=ST[0][2];
ST[2][0]:=ST[0][2];
ST[2][1]:=ST[0][3];
ST[2][2]:=ST[0][0];
ST[2][3]:=0;
ST[3][0]:=0;
ST[3][1]:=ST[0][2];
ST[3][2]:=ST[0][3];
ST[3][3]:=ST[0][0];
O2Prod[0]:=0;
O2Prod[1]:=0;
O2Prod[2]:=ST[0][2];
O2Prod[3]:=ST[0][3] + ST[1][3];
FOR Ligne:=0 TO 3 DO
  FOR Colonne:=0 TO 3 DO BEGIN
    FOR C2:=0 TO 3 DO Stemp[C2]:=ST[C2][Colonne];
    T[Ligne][Colonne]:=Prod(D[Ligne], Stemp);
  END;
END;

Procedure VarDeact(Flash: Integer);
  VAR
    Colonne, Ligne, C2: INTEGER;
    Stemp, Scalc: Vecteur;
  BEGIN { 4 variables, Kok + desactivation sur S2 }
    D[0][0]:=1;
    D[0][1]:=0;
    D[0][2]:=0;
    D[0][3]:=0;
    D[1][0]:=0;
    D[1][1]:=1;
    D[1][2]:=z[2]-(z[3]-0.5)*Flash/10;
    D[1][3]:=0;
    D[2][0]:=0;
    D[2][1]:=0;
    D[2][2]:=1-D[1][2];
    D[2][3]:=0;
    D[3][0]:=0;
    D[3][1]:=0;
    D[3][2]:=0;
  END;

```

```

D[3][3]:=1;
ST[0][0]:=Z[4]; { Z[4] = MISSES }
ST[0][1]:=0;
ST[0][2]:=0.2*z[5]; { 0.2*z[5] = DOUBLE-HITS }
ST[0][3]:=1 - 0.2*z[5] -ST[0][0];
ST[1][0]:=ST[0][3];
ST[1][1]:=ST[0][0];
ST[1][2]:=0;
ST[1][3]:=ST[0][2];
ST[2][0]:=ST[0][2];
ST[2][1]:=ST[0][3];
ST[2][2]:=ST[0][0];
ST[2][3]:=0;
ST[3][0]:=0;
ST[3][1]:=ST[0][2];
ST[3][2]:=ST[0][3];
ST[3][3]:=ST[0][0];
O2Prod[0]:=0;
O2Prod[1]:=0;
O2Prod[2]:=ST[0][2];
O2Prod[3]:=ST[0][3] + ST[1][3];
FOR Ligne:=0 TO 3 DO
  FOR Colonne:=0 TO 3 DO BEGIN
    FOR C2:=0 TO 3 DO Stemp[C2]:=ST[C2][Colonne];
    T[Ligne][Colonne]:=Prod(D[Ligne], Stemp);
  END;
END;

Procedure VarMiss(Flash: integer);
begin
  ST[0][0]:=z[2]-(z[4]-0.5)/10*Flash;
  ST[0][1]:=0;
  ST[0][2]:=0.3*z[3];
  ST[0][3]:=1 - 0.3*z[3] -ST[0][0];
  ST[1][0]:=ST[0][3];
  ST[1][1]:=ST[0][0];
  ST[1][2]:=0;
  ST[1][3]:=ST[0][2];
  ST[2][0]:=ST[0][2];
  ST[2][1]:=ST[0][3];
  ST[2][2]:=ST[0][0];
  ST[2][3]:=0;
  ST[3][0]:=0;
  ST[3][1]:=ST[0][2];
  ST[3][2]:=ST[0][3];
  ST[3][3]:=ST[0][0];
  O2Prod[0]:=0;
  O2Prod[1]:=0;
  O2Prod[2]:=ST[0][2];
  O2Prod[3]:=ST[0][3] + ST[1][3];
  T:=ST;

```

```

END;
Procedure MissFFlash(Flash: INTEGER);
begin
  If Flash>1 then begin
    ST[0][0]:=0.4*z[2];
    ST[0][1]:=0;
    ST[0][2]:=0.2*z[3];
    ST[0][3]:=1 - 0.2*z[3] -ST[0][0];
    ST[1][0]:=ST[0][3];
    ST[1][1]:=ST[0][0];
    ST[1][2]:=0;
    ST[1][3]:=ST[0][2];
    ST[2][0]:=ST[0][2];
    ST[2][1]:=ST[0][3];
    ST[2][2]:=ST[0][0];
    ST[2][3]:=0;
    ST[3][0]:=0;
    ST[3][1]:=ST[0][2];
    ST[3][2]:=ST[0][3];
    ST[3][3]:=ST[0][0];
    O2Prod[0]:=0;
    O2Prod[1]:=0;
    O2Prod[2]:=ST[0][2];
    O2Prod[3]:=ST[0][3] + ST[1][3];
    T:=ST;
  END else begin
    ST[0][0]:=0.4*(z[2] +z[4]);
    ST[0][1]:=0;
    ST[0][2]:=0.2*z[3];
    ST[0][3]:=1 - 0.2*z[3] -ST[0][0];
    ST[1][0]:=ST[0][3];
    ST[1][1]:=ST[0][0];
    ST[1][2]:=0;
    ST[1][3]:=ST[0][2];
    ST[2][0]:=ST[0][2];
    ST[2][1]:=ST[0][3];
    ST[2][2]:=ST[0][0];
    ST[2][3]:=0;
    ST[3][0]:=0;
    ST[3][1]:=ST[0][2];
    ST[3][2]:=ST[0][3];
    ST[3][3]:=ST[0][0];
    O2Prod[0]:=0;
    O2Prod[1]:=0;
    O2Prod[2]:=ST[0][2];
    O2Prod[3]:=ST[0][3] + ST[1][3];
    T:=ST;
  end;
end;

Procedure InitReducQa;

```

```

var
  Compteur: INTEGER;
Begin { Misses quand Qa est reduit ds S2 et S3 + etat S-1 }
  { Variables determinant le modele:
    StateS2, Si etat S2 dans le noir;
    StateS_1, Si le modele comprend l'etat S-1;
    DeactivS2, Si le modele comprend la deactivation
    de S2;
    DeactivS3, Si Désactivations sur S3;
    HomoMisses, Si Misses homogenes  }
  C2:=2;
  If StateS_1 then begin
    S[-1]:=z[1]*0.3;
    S[0]:=z[2]*0.7;
    C2:=3;
    S[1]:=1 -S[0] -S[-1];
  end;
  If StateS2 then begin
    S[2]:=z[C2]*S[1];
    S[1]:=S[1]*(1-z[C2]);
    C2:=C2+1;
  end;
  If DoubleHits then begin
    Dhit:=0.3*z[C2];
    C2:=C2 +1;
  end;
  If MissQa then begin
    MQa:=0.3*z[C2];
    C2:=C2 +1;
  end;
  For Compteur:=Smin to Smax do QaReduit[Compteur]:=z[C2];
End;

Procedure ReductionQa(Flash: Integer);
var
  Colonne, Ligne, C3: INTEGER;
  Stemp: Vecteur;
  TempQa, {Pourcentage de Qa reduit }
  TempS {Quantite d'etats S}
  : Vecteur;
  Compteur: INTEGER;
  S2deact, S3deact: EXTENDED;
BEGIN { 4 variables, Kok + desactivation sur S2
dependant de Qa}
  C3:=C2;
  Predicted[Flash]:=Scalc[3]*(1-MQa*QaReduit[3])
  + Dhit*Scalc[2]*(1-MQa*QaReduit[2]);
{ Debut: TempQa=qte de Qa reduit pour chaque etat-S}
  TempQa[0]:=Scalc[3]*(1-Dhit)*(1.0-QaReduit[3]);

```

```

        TempQa[0]:=TempQa[0] + Scalc[-1]*(1-Dhit)*(1.0-
QaReduit[-1]);
        TempQa[0]:=TempQa[0] + Scalc[2]*Dhit*(1-
MQa)*QaReduit[2];
        TempQa[1]:=Scalc[0]*(1-Dhit)*(1.0-QaReduit[0]);
        TempQa[1]:=TempQa[1] + Scalc[-1]*Dhit*(1-
MQa)*QaReduit[-1];
        TempQa[1]:=TempQa[1] + Scalc[3]*Dhit*(1-
MQa)*QaReduit[3];
        TempQa[2]:=Scalc[1]*(1-Dhit)*(1.0-QaReduit[1]);
        TempQa[2]:=TempQa[2] + Scalc[0]*Dhit*(1-
MQa)*QaReduit[0];
        TempQa[3]:=Scalc[2]*(1-Dhit)*(1.0-QaReduit[2]);
        TempQa[3]:=TempQa[3] + Scalc[1]*Dhit*(1-
MQa)*QaReduit[1];
{ Calcul des transitions }
TempS[-1]:=(1+Dhit)*MQa*Scalc[-1]*QaReduit[-1];
TempS[0]:=(1-Dhit-MQa*QaReduit[3])*Scalc[3]
           + Scalc[-1]*(1-Dhit-MQa*QaReduit[-1])
           + Dhit*(1-MQa*QaReduit[2])*Scalc[2]
           + (1+Dhit)*MQa*QaReduit[0]*Scalc[0];
TempS[1]:=(1-Dhit -MQa*QaReduit[0])*Scalc[0]
           + Dhit*(1-MQa*QaReduit[3])*Scalc[3]
           + Dhit*(1-MQa*QaReduit[-1])*Scalc[-1]
           + (1+Dhit)*MQa*QaReduit[1]*Scalc[1];
TempS[2]:=(1-Dhit -MQa*QaReduit[1])*Scalc[1]
           + Dhit*(1-MQa*QaReduit[0])*Scalc[0]
           + (1+Dhit)*MQa*QaReduit[2]*Scalc[2];
TempS[3]:=(1-Dhit -MQa*QaReduit[2])*Scalc[2]
           + Dhit*(1-MQa*QaReduit[1])*Scalc[1]
           + (1+Dhit)*MQa*QaReduit[3]*Scalc[3];
{ Calcul des désactivations dues a Qa reduit}
If LinVar then begin
  If DeactivS3 then begin
    S3Deact:=z[C3]*exp(Flash*ln(z[C3+1]));
    C3:=C3 +2;
  end else C3:=C3 +1;
  If DeactivS2 then begin
    S2Deact:=z[C3]*exp(Flash*ln(z[C3-1]));
    C3:=C3 +1;
  end;
  end else begin
    If DeactivS3 then begin
      S3Deact:=z[C3];
      C3:=C3 +1;
    end;
    If DeactivS2 then begin
      S2Deact:=z[C3];
      C3:=C3 +1;
    end;
  end;
end;

```

```

If DeactivS3 then begin
  TempS[2]:=TempS[2] + TempQa[3]*S3Deact;
  TempS[3]:=TempS[3] - TempQa[3]*S3Deact;
  TempQa[3]:=TempQa[3]*(1-S3Deact);
end;
If DeactivS2 then begin
  TempS[1]:=TempS[1] + TempQa[2]*S2Deact;
  TempS[2]:=TempS[2] - TempQa[2]*S2Deact;
  TempQa[2]:=TempQa[2]*(1-S2Deact);
end;
If HomoMisses then begin
  { Calcul des désactivations dues à D réduit, sur S2-S3
}
  TempS[1]:=TempS[1] + TempS[2]*z[C3];
  TempS[2]:=TempS[2]*(1-z[C3]);
  TempQa[1]:=TempQa[1] + TempQa[2]*z[C3];
  TempQa[2]:=TempQa[2]*(1-z[C3]);
  TempS[2]:=TempS[2] + TempS[3]*z[C3];
  TempS[3]:=TempS[3]*(1-z[C3]);
  TempQa[2]:=TempQa[2] + TempQa[3]*z[C3];
  TempQa[3]:=TempQa[3]*(1-z[C3]);
end;
For Compteur:=0 to 3 do begin
  If TempQa[Compteur]>0.0 then
    QaReduit[Compteur]:=TempQa[Compteur]/TempS[Compteur]
    else QaReduit[Compteur]:=0.0;
  end;
  Scalc:=TempS;
END;

BEGIN
  HorsLimite:=False;
  O2Prod[-1]:=0;
  For Ligne:=Smin to Smax do begin
    D[-1][Ligne]:=0;
    DT[-1][Ligne]:=0;
    ST[-1][Ligne]:=0;
    T[-1][Ligne]:=0;
    D[Ligne][-1]:=0;
    DT[Ligne][-1]:=0;
    ST[Ligne][-1]:=0;
    T[Ligne][-1]:=0;
  end;
  S[-1]:=0;
  S[0]:=z[1]*0.4;
  S[1]:=1 - S[0];
  S[2]:=0;
  S[3]:=0;
  Case modele of
    1: BEGIN      { 2 variables }

```

```

ST[0][0]:=Trace/4;
ST[0][1]:=0;
ST[0][2]:=0.3*z[2];
ST[0][3]:=1 - 0.3*z[2] -ST[0][0];
ST[1][0]:=ST[0][3];
ST[1][1]:=ST[0][0];
ST[1][2]:=0;
ST[1][3]:=ST[0][2];
ST[2][0]:=ST[0][2];
ST[2][1]:=ST[0][3];
ST[2][2]:=ST[0][0];
ST[2][3]:=0;
ST[3][0]:=0;
ST[3][1]:=ST[0][2];
ST[3][2]:=ST[0][3];
ST[3][3]:=ST[0][0];
O2Prod[0]:=0;
O2Prod[1]:=0;
O2Prod[2]:=ST[0][2];
O2Prod[3]:=ST[0][3] + ST[1][3];
T:=ST;
END;
2: BEGIN { 4 variables, Kok + desactivation }
D[0][0]:=1;
D[0][1]:=0;
D[0][2]:=0;
D[0][3]:=0;
D[1][0]:=0;
D[1][1]:=1;
D[1][2]:=Trace*z[2];
D[1][3]:=D[1][2]*0.3*z[3];
D[2][0]:=0;
D[2][1]:=0;
D[2][2]:=1-D[1][2];
D[2][3]:=0.3*z[3]*(1-D[1][2]);
D[3][0]:=0;
D[3][1]:=0;
D[3][2]:=0;
D[3][3]:=1 - 0.3*z[3];
ST[0][0]:=Trace-D[1][2]-
D[2][3]+0.2*z[4]*(D[1][2]+D[2][3]-D[1][3]);
ST[0][0]:=ST[0][0]/(4 -2*D[1][2] -D[2][3] -0.5*z[3]);
IF ST[0][0] < 0 THEN HorsLimite:=True;
ST[0][1]:=0;
ST[0][2]:=0.2*z[4];
ST[0][3]:=1 - 0.2*z[4] -ST[0][0];
ST[1][0]:=ST[0][3];
ST[1][1]:=ST[0][0];
ST[1][2]:=0;
ST[1][3]:=ST[0][2];
ST[2][0]:=ST[0][2];

```

```

ST[2][1]:=ST[0][3];
ST[2][2]:=ST[0][0];
ST[2][3]:=0;
ST[3][0]:=0;
ST[3][1]:=ST[0][2];
ST[3][2]:=ST[0][3];
ST[3][3]:=ST[0][0];
O2Prod[0]:=0;
O2Prod[1]:=0;
O2Prod[2]:=ST[0][2];
O2Prod[3]:=ST[0][3] + ST[1][3];
FOR Ligne:=0 TO 3 DO
  FOR Colonne:=0 TO 3 DO BEGIN
    FOR C2:=0 TO 3 DO Stemp[C2]:=ST[C2][Colonne];
    T[Ligne][Colonne]:=Prod(D[Ligne], Stemp);
  END;
END;
3: BEGIN { 3 variables , Lavoro}
  D[0][0]:=1 -0.2*z[2];
  D[0][1]:=0;
  D[0][2]:=0;
  D[0][3]:=0;
  D[1][0]:=0;
  D[1][1]:=1;
  D[1][2]:=0;
  D[1][3]:=0.2*z[2];
  D[2][0]:=0.2*z[2];
  D[2][1]:=0;
  D[2][2]:=1;
  D[2][3]:=0;
  D[3][0]:=0;
  D[3][1]:=0;
  D[3][2]:=0;
  D[3][3]:=1 - 0.2*z[2];
  ST[0][0]:=Trace-0.2*z[3]*0.2*z[2];
  ST[0][0]:=ST[0][0]/(4 - 2*0.2*z[2]);
  IF ST[0][0] < 0 THEN HorsLimite:=True;
  ST[0][1]:=0;
  ST[0][2]:=0.2*z[3];
  ST[0][3]:=1 - 0.2*z[3] -ST[0][0];
  ST[1][0]:=ST[0][3];
  ST[1][1]:=ST[0][0];
  ST[1][2]:=0;
  ST[1][3]:=ST[0][2];
  ST[2][0]:=ST[0][2];
  ST[2][1]:=ST[0][3];
  ST[2][2]:=ST[0][0];
  ST[2][3]:=0;
  ST[3][0]:=0;
  ST[3][1]:=ST[0][2];
  ST[3][2]:=ST[0][3];

```

```

ST[3][3]:=ST[0][0];
O2Prod[0]:=0;
O2Prod[1]:=0;
O2Prod[2]:=ST[0][2];
O2Prod[3]:=ST[0][3] + ST[1][3];
FOR Ligne:=0 TO 3 DO
  FOR Colonne:=0 TO 3 DO BEGIN
    FOR C2:=0 TO 3 DO Stemp[C2]:=ST[C2][Colonne];
    T[Ligne][Colonne]:=Prod(D[Ligne], Stemp);
  END;
END;
4: BEGIN      { 5 Variables ,inhomogeneous misses}
  ST[0][0]:=0.1*z[2];
  ST[0][1]:=0;
  ST[0][2]:=0;
  ST[0][3]:=1 - 0.4*z[5];
  ST[1][0]:=1 - 0.1*z[2];
  ST[1][1]:=0.1*z[3];
  ST[1][2]:=0;
  ST[1][3]:=0;
  ST[2][0]:=0;
  ST[2][1]:=1 - 0.1*z[3];
  ST[2][2]:=0.3*z[4];
  ST[2][3]:=0;
  ST[3][0]:=0;
  ST[3][1]:=0;
  ST[3][2]:=1 - 0.3*z[4];
  ST[3][3]:=0.4*z[5];
  z[6]:=ST[0][0] + ST[1][1] + ST[2][2] + ST[3][3] -
Trace;
  z[6]:=z[6]/(ST[0][0]*ST[1][0] +ST[1][1]*ST[2][1]
+ST[2][2]*ST[3][2]
  + ST[3][3]*ST[0][3]);
  IF Z[6] < 0 THEN HorsLimite:=True;
  DT[0][0]:=1 - z[6]*ST[1][0];
  DT[1][0]:=z[6]*ST[1][0];
  DT[2][0]:=0;
  DT[3][0]:=0;
  DT[0][1]:=0;
  DT[1][1]:=1 - z[6]*ST[2][1];
  DT[2][1]:=z[6]*ST[2][1];
  DT[3][1]:=0;
  DT[0][2]:=0;
  DT[1][2]:=0;
  DT[2][2]:=1 - z[6]*ST[3][2];
  DT[3][2]:=z[6]*ST[3][2];
  DT[0][3]:=z[6]*ST[0][3];
  DT[1][3]:=0;
  DT[2][3]:=0;
  DT[3][3]:=1 - z[6]*ST[0][3];
FOR Ligne:=0 TO 3 DO

```

```

FOR Colonne:=0 TO 3 DO BEGIN
    FOR C2:=0 TO 3 DO Stemp[C2]:=ST[C2][Colonne];
    T[Ligne][Colonne]:=Prod(DT[Ligne], Stemp);
END;
O2Prod[0]:=0;
O2Prod[1]:=0;
O2Prod[2]:=T[0][2];
O2Prod[3]:=T[0][3] + T[1][3];
END;
5: BEGIN      { 3 Variables Miss on s2-s3}
    ST[0][0]:=Trace*z[2]/4;
    ST[0][1]:=0;
    ST[0][2]:=0;
    ST[0][3]:=1 - ST[0][0];
    ST[1][0]:=1 - ST[0][0];
    ST[1][1]:=ST[0][0];
    ST[1][2]:=0;
    ST[1][3]:=0;
    ST[2][0]:=0;
    ST[2][1]:=1 - ST[0][0];
    ST[2][2]:=ST[0][0] + Trace*z[3]*1.1;
    ST[2][3]:=0;
    ST[3][0]:=0;
    ST[3][1]:=0;
    ST[3][2]:=1 - ST[2][2];
    ST[3][3]:=ST[0][0];
    z[4]:=3*ST[0][0] + ST[2][2] - Trace;
    z[4]:=z[4]/(3*ST[0][0] + ST[2][2] - 3*sqrt(ST[0][0]) -
    sqrt(ST[2][2]));
    IF Z[4] < 0 THEN HorsLimite:=True;
    DT[0][0]:=1 - z[4]*ST[1][0];
    DT[1][0]:=z[4]*ST[1][0];
    DT[2][0]:=0;
    DT[3][0]:=0;
    DT[0][1]:=0;
    DT[1][1]:=1 - z[4]*ST[2][1];
    DT[2][1]:=z[4]*ST[2][1];
    DT[3][1]:=0;
    DT[0][2]:=0;
    DT[1][2]:=0;
    DT[2][2]:=1 - z[4]*ST[3][2];
    DT[3][2]:=z[4]*ST[3][2];
    DT[0][3]:=z[4]*ST[0][3];
    DT[1][3]:=0;
    DT[2][3]:=0;
    DT[3][3]:=1 - z[4]*ST[0][3];
    FOR Ligne:=0 TO 3 DO
        FOR Colonne:=0 TO 3 DO BEGIN
            FOR C2:=0 TO 3 DO Stemp[C2]:=ST[C2][Colonne];
            T[Ligne][Colonne]:=Prod(DT[Ligne], Stemp);
        END;

```

```

O2Prod[0]:=0;
O2Prod[1]:=0;
O2Prod[2]:=T[0][2];
O2Prod[3]:=T[0][3] + T[1][3];
END;
6: BEGIN      { 3 Variables Miss on s3-s4}
  ST[0][0]:=0.2*z[2];
  ST[0][1]:=0;
  ST[0][2]:=0;
  ST[0][3]:=1 - ST[0][0] - Trace*z[3]*1.1;
  ST[1][0]:=1 - ST[0][0];
  ST[1][1]:=ST[0][0];
  ST[1][2]:=0;
  ST[1][3]:=0;
  ST[2][0]:=0;
  ST[2][1]:=1 - ST[0][0];
  ST[2][2]:=ST[0][0];
  ST[2][3]:=0;
  ST[3][0]:=0;
  ST[3][1]:=0;
  ST[3][2]:=1 - ST[0][0];
  ST[3][3]:=ST[0][0] + Trace*z[3]*1.1;
  z[4]:=3*ST[0][0] + ST[3][3] - Trace;
  z[4]:=z[4]/(3*ST[0][0] + ST[3][3] - 3*sqr(ST[0][0]) -
sqr(ST[3][3]));
  IF Z[4] < 0 THEN HorsLimite:=True;
  DT[0][0]:=1 - z[4]*ST[1][0];
  DT[1][0]:=z[4]*ST[1][0];
  DT[2][0]:=0;
  DT[3][0]:=0;
  DT[0][1]:=0;
  DT[1][1]:=1 - z[4]*ST[2][1];
  DT[2][1]:=z[4]*ST[2][1];
  DT[3][1]:=0;
  DT[0][2]:=0;
  DT[1][2]:=0;
  DT[2][2]:=1 - z[4]*ST[3][2];
  DT[3][2]:=z[4]*ST[3][2];
  DT[0][3]:=z[4]*ST[0][3];
  DT[1][3]:=0;
  DT[2][3]:=0;
  DT[3][3]:=1 - z[4]*ST[0][3];
  FOR Ligne:=0 TO 3 DO
    FOR Colonne:=0 TO 3 DO BEGIN
      FOR C2:=0 TO 3 DO Stemp[C2]:=ST[C2][Colonne];
      T[Ligne][Colonne]:=Prod(DT[Ligne], Stemp);
    END;
  O2Prod[0]:=0;
  O2Prod[1]:=0;
  O2Prod[2]:=T[0][2];
  O2Prod[3]:=T[0][3] + T[1][3];

```

```

END;
7: BEGIN { Sans restriction sur la trace }
{ Variables determinant le modele:
  StateS2, Si etat S2 dans le noir;
  StateS_1, Si le modele comprend l'etat S-1;
  DeactivD, Si désactivations dues a D
  DeactivS2, Si le modele comprend la désactivation
de S2;
  DeactivS3, Si Désactivations sur S3;
  HomoMisses, Si Misses homogenes }
C2:=2;
If StateS_1 then begin
  S[-1]:=z[1]*0.3;
  S[0]:=z[2]*0.7;
  C2:=3;
  S[1]:=1 - S[0] - S[-1];
end;
If StateS2 then begin
  S[2]:=z[C2]*S[1];
  S[1]:=S[1]*(1-z[C2]);
  C2:=C2+1;
end;
If HomoMisses then begin
  ST[0][0]:=0.7*z[C2];
  C2:=C2+1;
end else ST[0][0]:=MQa;
ST[0][1]:=0;
If DoubleHits then begin
  ST[0][2]:=0.3*z[C2];
  C2:=C2 +1;
end else ST[0][2]:=Dhit;
ST[0][3]:=1 - ST[0][2] - ST[0][0];
ST[0][-1]:=ST[0][3];
ST[-1][-1]:=ST[0][0];
ST[1][-1]:=ST[0][2];
ST[1][0]:=ST[0][3];
ST[1][1]:=ST[0][0];
ST[1][2]:=0;
ST[1][3]:=ST[0][2];
ST[2][0]:=ST[0][2];
ST[2][1]:=ST[0][3];
ST[2][2]:=ST[0][0];
ST[2][3]:=0;
ST[3][0]:=0;
ST[3][1]:=ST[0][2];
ST[3][2]:=ST[0][3];
ST[3][3]:=ST[0][0];
D[-1][-1]:=1;
If DeactivS2S0 then begin
  D[0][2]:=Z[C2];
  C2:=C2 + 1;

```

```

    end else D[0][2]:=0;
    D[0][0]:=1;
    D[0][1]:=0;
    D[0][2]:=0;
    D[0][3]:=0;
    D[1][0]:=0;
    D[1][1]:=1;
    If DeactivS2 then begin
        D[1][2]:=z[C2];
        C2:=C2 +1;
    end else D[1][2]:= 0;
    D[2][0]:=0;
    D[2][1]:=0;
    D[2][2]:=1-D[1][2] -D[0][2];
    If DeactivS3 then begin
        D[2][3]:=z[C2];
    end else begin
        D[2][3]:=0;
    end;
    D[1][3]:=0;
    D[3][3]:=1 - D[2][3];
    D[3][0]:=0;
    D[3][1]:=0;
    D[3][2]:=0;
    O2Prod[0]:=0;
    O2Prod[1]:=0;
    O2Prod[2]:=ST[0][2];
    O2Prod[3]:=ST[0][3] + ST[1][3];
    FOR Ligne:=Smin TO Smax DO
        FOR Colonne:=Smin TO Smax DO BEGIN
            FOR C2:=Smin TO Smax DO
                Stemp[C2]:=ST[C2][Colonne];
                T[Ligne][Colonne]:=Prod(D[Ligne], Stemp);
            END;
        END;
        9: VarMiss(0); { 4 variables, variation lineaire des
Miss  }
        10: VarDeact(0); { 5 variables, var lin de désactivation
sur s2}
        11: DeactS2S3(1); {Var non-lineaire de deact sur S2}
        13: MissFFlash(1); { 4 variables, Miss + premier
flash }
        14: InitReducQa; { Desactivation de S2 quand Qa est
reduit }
    END;
    SX2:=0; SY2:=0; SXY:=0; SX:=0; SY:=0;
    Scalc:=S;
    IF not HorsLimite THEN BEGIN
        FOR Colonne:=1 TO F1Num2 DO BEGIN
            Case modele of
                9: VarMiss(Colonne);

```

```

10: Vardeact(Colonne);
11: DeactS2S3(Colonne);
13: MissFFlash(Colonne);
End;
if modele=14 then ReductionQa(Colonne)
else begin
  Predicted[Colonne]:=Prod(O2Prod, Scalc);
  FOR Ligne:=Smin TO Smax DO
  Stemp[Ligne]:=Prod(T[Ligne], Scalc);
  Scalc:=Stemp;
end;
IF Colonne >= Offset THEN BEGIN
  Y:=O2Yield[Colonne];
  X:=Predicted[Colonne];
  SX:=SX +X;
  SY:=SY + Y;
  SX2:=SX2 + X*X;
  SY2:=SY2 + Y*Y;
  SXY:=SXY + X*Y;
END;
END;
N:= F1Num2 -Offset +1;
SSXY:=SXY - SX*SY/N;
SSX:=SX2 -SX*SX/N;
SSY:=SY2 -SY*SY/N;
Pente:=SSXY/SSX;
B0:=(SY -SX*Pente)/N;
SSE:=SQRT((SSY-Pente*Pente*SSX)/(N-2))/Weighted_Average;
END else SSE:=1e20*random;
CompQuadDev:=SSE;
END;

Function FindBest: INTEGER;
Var
  Compteur, Best: INTEGER;
BEGIN
  Best:=1;
  FOR Compteur:=2 TO Nvertex DO
    IF QuadDevSimplex[Compteur] < QuadDevSimplex[Best] THEN
  Best:=Compteur;
  FindBest:=Best;
END;

Function FindWorst:INTEGER;
Var
  Compteur, Worst: INTEGER;
BEGIN
  Worst:=1;
  FOR Compteur:=2 TO Nvertex DO
    IF QuadDevSimplex[Compteur] > QuadDevSimplex[Worst] THEN
  Worst:=Compteur;

```

```

      FindWorst:=Worst;
      END;

PROCEDURE Average(Worst: INTEGER);
  Var
    Vertex, Compteur: INTEGER;
  BEGIN
    FOR Compteur:=1 TO Nvar DO BEGIN
      AvVertex[Compteur]:=0;
      FOR Vertex:=1 TO Nvertex DO IF Vertex <> Worst THEN
        AvVertex[Compteur]:=AvVertex[Compteur] +
      Simplex[Vertex][Compteur];
      AvVertex[Compteur]:=AvVertex[Compteur]/Nvar;
    END;
  END;

PROCEDURE Reflect(Worst: INTEGER);
  Var
    HorsLimite:BOOLEAN;
    Compteur: Integer;
  BEGIN
    HorsLimite:=False;
    FOR Compteur:=1 TO Nvar DO BEGIN
      Simplex[0][Compteur]:=2*AvVertex[Compteur] -
    Simplex[Worst][Compteur];
      IF Simplex[0][Compteur] < 0 THEN HorsLimite:=True;
      IF Simplex[0][Compteur] > 1 THEN HorsLimite:=True;
    END;
    IF not HorsLimite THEN
      QuadDevSimplex[0]:=CompQuadDev(Simplex[0])
      else QuadDevSimplex[0]:=random*1e5;
  END;

PROCEDURE Contract(Worst: INTEGER);
  Var
    Compteur: INTEGER;
  BEGIN
    FOR Compteur:=1 TO Nvar DO

      Simplex[0][Compteur]:=(AvVertex[Compteur]+Simplex[Worst][Compteur])/2;
      QuadDevSimplex[0]:=CompQuadDev(Simplex[0]);
  END;

PROCEDURE Shrink;
  Var
    Compteur, Vertex, Best: INTEGER;
  BEGIN
    Sound(1000);
    delay(200);
    NoSound;
  END;

```

```

Writeln('-Diminution- pressez une clé pour arrêter');
Best:= FindBest;
FOR Vertex:=1 TO Nvertex DO BEGIN
  FOR Compteur:=1 TO Nvar DO
    Simplex[Vertex][Compteur]:=(Simplex[Best][Compteur] +
      Simplex[Vertex][Compteur])/2;
    QuadDevSimplex[Vertex]:=CompQuadDev(Simplex[Vertex]);
  END;
END;

PROCEDURE Expand(Worst: INTEGER);
Var
  Compteur: INTEGER;
  HorsLimite: BOOLEAN;
BEGIN
  HorsLimite:=False;
  FOR Compteur:=1 TO Nvar DO BEGIN
    Simplex[Worst][Compteur]:=(AvVertex[Compteur] -
      Simplex[Worst][Compteur])*2 + AvVertex[Compteur];
    IF Simplex[Worst][Compteur] < 0 THEN HorsLimite:=True;
    IF Simplex[Worst][Compteur] > 1 THEN HorsLimite:=True;
  END;
  IF not HorsLimite THEN
    QuadDevSimplex[Worst]:=CompQuadDev(Simplex[Worst])
    else QuadDevSimplex[Worst]:=random*1e5;
  END;

PROCEDURE Copy(Worst: INTEGER);
BEGIN
  Simplex[Worst]:=Simplex[0];
  QuadDevSimplex[Worst]:=QuadDevSimplex[0];
END;

PROCEDURE Optimize;
var
  Worst: INTEGER;
BEGIN
  Worst:=FindWorst;
  Writeln('Pire=',QuadDevSimplex[Worst]:11:8);
  Average(Worst);
  Reflect(Worst);
  IF QuadDevSimplex[Worst] < QuadDevSimplex[0] THEN BEGIN
    Contract(Worst);
    IF QuadDevSimplex[Worst] < QuadDevSimplex[0] THEN Shrink
      else Copy(Worst);
  END else BEGIN
    Expand(Worst); {Worst devient le nouveau vertex
expansionne}
    IF QuadDevSimplex[Worst] > QuadDevSimplex[0] THEN
      Copy(Worst);
  END;
END;

```

```

    END;

Procedure LstAmp02;
  Var
    Compteur: INTEGER;
  BEGIN
    Writeln(Lst,'Evaluation des amplitudes de production
d''oxygene');
    Writeln(Lst);
    Writeln(Lst,'Flash #      Amplitude      Normalisee      +/-');
  Erreur      %Erreur');
    FOR Compteur:=1 TO FlashNum DO BEGIN
      Write(Lst,Compteur:7);
      Write(Lst, ' ', O2Yield[Compteur]:9);
      IF Weighted_Average >0 THEN BEGIN
        Write(Lst, ' ',
O2Yield[Compteur]/Weighted_Average:10:7);
        Write(Lst, ' ',
O2Noise[Compteur]/Weighted_Average:10:7);
      END;
      IF O2Yield[Compteur]<>0 THEN Write(Lst, ' ',
      Abs(O2Noise[Compteur]/O2Yield[Compteur]*100):10:5)
      else Write(Lst, ' ');
      Writeln(Lst);
    END;
  END;

Procedure Lavorel;
  Var
    Donnee: VarRec;
    Compteur: INTEGER;
  BEGIN
    Writeln(Lst,'*****');
    Writeln(Lst,'* ANALYSE SIGMA      *');
    Writeln(Lst,'* (Lavorel, 1976)      *');
    Writeln(Lst,'*****');
    ClearVarSum;
    N:=3;
    Writeln(Lst,'L''analyse suivante est effectuee du flash
',Offset
      , ' au flash #',FlNum2);
    FOR Compteur:=Offset TO FlNum2-4 DO BEGIN
      With Donnee DO BEGIN
        X[1]:=O2Yield[Compteur + 3] - O2Yield[Compteur];
        X[2]:=O2Yield[Compteur + 2] - O2Yield[Compteur];
        X[3]:=O2Yield[Compteur + 1] - O2Yield[Compteur];
        Y:=- (O2Yield[Compteur + 4] - O2Yield[Compteur]);
      END;
      RegSum(Donnee);
    END;
    Regression;
  END;

```

```

Trace:=-B[1];
Writeln(Lst, 'Std deviation/moyenne de',NomD,'=',
        Sigma/Weighted_Average:11:8);
Writeln(Lst, 'Quadratic deviation=', QuadDev:11:8);
Writeln(Lst, 'Coefficient de determination R2=',R2:11:8);
Writeln(Lst, 'Parametres sigma:');
Writeln(Lst, 'S1=',B[1]:11:8,'+/-',SigB[1]:11:8);
Writeln(Lst, 'S2=',B[2]:11:8,'+/-',SigB[2]:11:8);
Writeln(Lst, 'S3=',B[3]:11:8,'+/-',SigB[3]:11:8);
Writeln(Lst, 'Hypothese homogene:');
Writeln(Lst, 'Misses=',-B[1]/4:11:8,'+/-',SigB[1]/4:11:8);
Writeln(Lst);
END;

Procedure Thibault;
Var
  Donnee: VarRec;
  N_step, Compteur, C1: INTEGER;
  X1, X2, X3: EXTENDED;

Function Ala(X: EXTENDED; E:INTEGER):EXTENDED;
Var
  Mult: EXTENDED;
  I1: INTEGER;
BEGIN
  Mult:=1;
  IF E>0 THEN FOR I1:=1 to E DO Mult:=Mult*X;
  IF E<0 THEN FOR I1:=E TO -1 DO Mult:=Mult/X;
  Ala:=Mult;
END;

Function EqCar(X: EXTENDED): EXTENDED;
(* Calcul de l'equation caracteristique *)
Var
  Mult, S: EXTENDED;
  I1: INTEGER;
BEGIN
  Mult:=1;
  S:=0;
  For I1:=N_step downto 1 do begin
    S:=S + Mult*B[I1];
    Mult:=Mult*X;
  end;
  EqCar:=S + Mult;
END;

Function DerEqCar(X: EXTENDED): EXTENDED;
(* calcul de la derivee de l'equation caracteristique *)
Var
  Mult, S: EXTENDED;
  I1:INTEGER;

```

```

BEGIN
  Mult:=1;
  S:=0;
  For I1:=N_step-1 downto 1 do begin
    S:=S + Mult*(N_step - I1)*B[I1];
    Mult:=Mult*X;
  end;
  DerEqCar:=S + Mult*N_step;
END;

Function CompErr(X: EXTENDED): EXTENDED;
  (* Derivee partielle p/r aux coefficients sigma *)
  (* + sommation des variances *)
  Var
    Mult, T, Somme, F, F_der: EXTENDED;
    I1: INTEGER;
  BEGIN
    F:=EqCar(X);
    F_der:=DerEqCar(X);
    Somme:=0;
    For I1:=1 to N_step do begin
      T:=Ala(X, N_step -I1)*F_der - F*(N_step -I1)*Ala(X,
N_step -I1 -1);
      T:=SigB[I1]*T/SQR(F_der);
      Somme:= Somme + SQR(T);
    end;
    CompErr:=SQRT(Somme);
  END;

BEGIN
  REPEAT
    Writeln('Test d''un processus a combien d''etapes?');
    Readln(N_step);
  UNTIL (N_step > 1) and (N_step <20);
  Writeln('(1)- Avec l''equation originale');
  Writeln('(2)- En ajoutant une constante en plus de (1)');
  Repeat
    Readln(C1);
  Until (C1>0) and (C1<3);
  If C1=2 then N:=N_step +1
  else n:=N_step;
  Writeln(Lst,'*****');
  Writeln(Lst,'* ANALYSE SIGMA *');
  Writeln(Lst,'* (Thibault, 1978) *');
  Writeln(Lst,'*****');
  Writeln(Lst,'* Processus a ',N_step,' etapes *');
  ClearVarSum;
  Writeln(Lst,'L''analyse suivante est effectuee du flash
#',Offset
      , ' au flash #',F1Num2);
  FOR Compteur:=Offset TO F1Num2 -N_step DO BEGIN

```

```

With Donnee DO BEGIN
  Y:=-O2Yield[Compteur + N_step];
  FOR C1:=1 TO N_step DO
    X[C1]:=O2Yield[Compteur + N_step -C1];
    X[N_step +1]:=1;
  END;
  RegSum(Donnee);
END;
Regression;
Writeln(Lst, 'Std deviation/moyenne de ',NomD,'=',
  Sigma/Weighted_Average:11:8);
Writeln(Lst, 'Quadratic deviation=', QuadDev:11:8);
Writeln(Lst, 'Parametres sigma :');
FOR C1:=1 TO N DO BEGIN
  Writeln(Lst, 'S',C1:1,'=' ,B[C1]:11:8,'+/-',
',SigB[C1]:11:8);
END;
Trace:=-B[1];
Writeln(Lst, 'Coefficient de determination R2=',R2:15:12);
Writeln(Lst,'Valeurs propres de la matrice de transition
S-States');
(* Methode de Newton-Raphson *)
(* X(n+1) = Xn - F(x)/F'(x) *)
(* Jusqu'a ce que F'(x) =0 *)
X3:=1.0;
(* La premiere valeur propre estimee est environ 1 *)
X2:=DerEqCar(X3);
REPEAT
  X1:=X3;
  X3:=X1 - EqCar(X1)/X2;
  X2:=DerEqCar(X3);
UNTIL (Int((X3-X1)*100000000) =0) or (X2=0);
Write(Lst, 'Premiere valeur propre=',X1:9:7);
Writeln(Lst,'+/-', CompErr(X1):9:7);
If N_step=4 then begin
  Writeln(Lst,'%Misses=-B[1]/4*100:6:3,'+/-',
',100*SigB[1]/4:6:3);
  X1:=SQRT(SQRT(-B[4] + B[1]*B[3]/4));
  X2:=SQRT(SQR(SigB[4]/4) + SQR(B[3]*SigB[1]/16) +
SQR(B[1]*SigB[3]/16));
  X2:=X2/X1/X1/X1;
  Writeln(Lst, '%Single-hits=', 100*X1:6:3, '+/-',
100*X2:6:3);
  Write(Lst, '%Double-hits=', 100*(1 -X1 +B[1]/4):6:3,
'+/-');
  Writeln(Lst, 100*SQRT(SQR(SigB[1]/4) +X2*X2):6:3);
  Writeln(Lst);
END;
END;

Procedure TestModele;

```

```

Var
  Compteur, Index, C2 : INTEGER;
Procedure MatDeact;
  Var I2,Index: INTEGER;
  Begin
    Writeln(Lst,'La meilleure matrice de desactivation
est:');
    FOR I2:=Smin TO Smax DO BEGIN
      FOR Index:=Smin TO Smax DO
Write(Lst,D[I2][Index]:10:7,' ');
      Writeln(Lst);
    END;
    end;
Procedure MatTS;
  Var I2,Index: INTEGER;
  begin
    Writeln(Lst,'La meilleure matrice de transition simple
est:');
    FOR I2:=Smin TO Smax DO BEGIN
      FOR Index:=Smin TO Smax DO
Write(Lst,ST[I2][Index]:10:7,' ');
      Writeln(Lst);
    END;
    END;
Procedure MatDT;
  Var I2,Index: INTEGER;
  begin
    Writeln(Lst,'La meilleure matrice de double transition
est:');
    FOR I2:=Smin TO Smax DO BEGIN
      FOR Index:=Smin TO Smax DO
Write(Lst,DT[I2][Index]:10:7,' ');
      Writeln(Lst);
    END;
    END;
Procedure MatT;
  Var I2,Index: INTEGER;
  begin
    Writeln(Lst,'Le produit des deux matrices donne:');
    FOR I2:=Smin TO Smax DO BEGIN
      FOR Index:=Smin TO Smax DO
Write(Lst,T[I2][Index]:10:7,' ');
      Writeln(Lst);
    END;
    END;
Procedure DistS;
  Var Compteur, Max, I2, Index: INTEGER;
  begin
    Writeln(Lst,'Apres un temps tres long, la distribution
des etats-S est:');
    FOR Compteur:=1 TO 20 DO BEGIN

```

```

FOR I2:=Smin TO Smax DO
  FOR Index:=Smin TO Smax DO BEGIN
    FOR Max:=Smin TO Smax DO
      O2Prod[Max]:=T[Max][Index];
      DT[I2][Index]:=Prod(T[I2], O2Prod);
    END;
    T:=DT;
  END;
  FOR Index:=Smin TO Smax DO
    Writeln(Lst,'S',Index,' =',Prod(T[Index], S):10:7);
END;

BEGIN
  Writeln('Quand l''algorythme sera a la limite du
fitting,');
  Writeln('Il indiquera ''SHRINKING''');
  Writeln('Pressez une cle jusqu''a ce que l''impression
commence');
  Writeln(Lst,'* Calcul de la matrice *');
  Write(Lst,'Modele de la matrice de transition ');
  case modele of
    1: BEGIN
      Writeln(Lst,'selon Kok');
      Nvar:=2;
      Nvertex:=3;
    END;
    2: BEGIN
      Writeln(Lst,'selon Kok + en tenant compte de
desactivation');
      Nvar:=4;
      Nvertex:=5;
    END;
    3: BEGIN
      Writeln(Lst,'selon Kok + hypothese de Lavorel');
      Nvar:=3;
      Nvertex:=4;
    END;
    4: BEGIN
      Writeln(Lst,'Coefficients inhomogenes');
      Nvar:=5;
      Nvertex:=6;
    END;
    5: BEGIN
      Writeln(Lst,'Modele de Delrieu: Miss sur la trans.
S2-S3');
      Nvar:=3;
      Nvertex:=4;
    END;
    6: BEGIN

```

```

        Writeln(Lst,'Modele d''un miss sur la trans. S3-
S4');
        Nvar:=3;
        Nvertex:=4;
    END;
7: BEGIN
        Writeln(Lst,'sans restriction sur la trace');
        Nvar:=1;
        Writeln('Desirez-vous l''evaluation des rates
homogenes (O/N)?');
        Repeat
            Entree(Ch);
        Until (Ch='O') or (Ch='N');
        If Ch='O' then begin
            HomoMisses:=true;
            Nvar:=Nvar +1;
            Writeln(Lst,'evaluation des rates homogenes');
        end else begin
            HomoMisses:=false;
            Writeln('Entrez la valeur des misses');
            Readln(MQa);
        end;
        Writeln('Desirez-vous l''evaluation des double-hits
(O/N)?');
        Repeat
            Entree(Ch);
        Until (Ch='O') or (Ch='N');
        If Ch='O' then begin
            DoubleHits:=true;
            Nvar:=Nvar +1;
            Writeln(Lst,'evaluation des double-hits');
        end else begin
            DoubleHits:=false;
            Writeln('Entrez la valeur des Double-hits');
            Readln(Dhit);
        end;
        Writeln('L''evaluation des désactivations de S2 a
S0 (O/N)?');
        Repeat
            Entree(Ch);
        Until (Ch='O') or (Ch='N');
        If Ch='O' then begin
            DeactivS2S0:=true;
            Nvar:=Nvar +1;
            Writeln(Lst,'evaluation des désactivations dues a
D');
        end else DeactivS2S0:=false;
        Writeln('L''evaluation des désactivations sur S2
(O/N)?');
        Repeat
            Entree(Ch);

```

```

        Until (Ch='O') or (Ch='N');
        If Ch='O' then begin
            DeactivS2:=true;
            Nvar:=Nvar +1;
            Writeln(Lst,'evaluation des désactivations sur
S2');
        end else DeactivS2:=false;
        Writeln('L''evaluation des désactivations sur S3
(O/N)?');
        Repeat
            Entree(Ch);
        Until (Ch='O') or (Ch='N');
        If Ch='O' then begin
            DeactivS3:=true;
            Nvar:=Nvar +1;
            Writeln(Lst,'evaluation des désactivations sur
S3');
        end else DeactivS3:=false;
        Writeln('L''evaluation de la quantite de S-1
(O/N)?');
        Repeat
            Entree(Ch);
        Until (Ch='O') or (Ch='N');
        If Ch='O' then begin
            StateS_1:=true;
            Nvar:=Nvar +1;
            Writeln(Lst,'evaluation de la quantite de S-1');
        end else StateS_1:=false;
        Writeln('L''evaluation de la quantite de S2
(O/N)?');
        Repeat
            Entree(Ch);
        Until (Ch='O') or (Ch='N');
        If Ch='O' then begin
            StateS2:=true;
            Nvar:=Nvar +1;
            Writeln(Lst,'evaluation de la quantite de S2');
        end else StateS2:=false;
        Nvertex:= Nvar +1;
    END;
9: Begin
    Writeln(Lst,'Variation lineaire des miss');
    Nvar:=4;
    Nvertex:=5;
END;
10: Begin
    Writeln(Lst,'Variation lineaire de la
désactivation sur S2');
    Nvar:=5;
    Nvertex:=6;
END;

```

```

11: Begin
    Writeln(Lst,'Variation de deact S2 S3, no miss');
    Nvar:=4;
    Nvertex:=5;
    End;
13: Begin
    Writeln(Lst,'Miss tres eleve sur premier flash');
    NVar:=4;
    Nvertex:=5;
    End;
14: Begin
    Writeln(Lst,'Desactivation sur S2 controlee par Qa-
et D-');
    Writeln(Lst,'sans restriction sur la trace');
    Nvar:=1;
    Writeln('Desirez-vous l''evaluation des deact. dues
a D (O/N)?');
    Repeat
        Entree(Ch);
    Until (Ch='O') or (Ch='N');
    If Ch='O' then begin
        HomoMisses:=true;
        Nvar:=Nvar +1;
        Writeln(Lst,'evaluation des désactivations dues a
D');
    end else HomoMisses:=false;
    Writeln('Desirez-vous l''evaluation des double-hits
(O/N)?');
    Repeat
        Entree(Ch);
    Until (Ch='O') or (Ch='N');
    If Ch='O' then begin
        DoubleHits:=true;
        Nvar:=Nvar +1;
        Writeln(Lst,'evaluation des double-hits');
    end else begin
        DoubleHits:=false;
        Writeln('Entrez la valeur des Double-hits');
        Readln(Dhit);
    end;
    Writeln('Desirez-vous l''evaluation des rates quand
Qa est reduit (O/N)?');
    Repeat
        Entree(Ch);
    Until (Ch='O') or (Ch='N');
    If Ch='O' then begin
        MissQa:=true;
        Nvar:=Nvar +1;
        Writeln(Lst,'evaluation des rates quand Qa est
reduit');
    end else begin

```

```

        MissQa:=false;
        Writeln('Entrez la valeur des misses');
        Readln(MQa);
        end;
        Writeln('L''evaluation des désactivations sur S2
(O/N)?');
        Repeat
            Entree(Ch);
            Until (Ch='O') or (Ch='N');
            If Ch='O' then begin
                DeactivS2:=true;
                Nvar:=Nvar +1;
                Writeln(Lst,'evaluation des désactivations sur
S2');
            end else DeactivS2:=false;
            Writeln('L''evaluation des désactivations sur S3
(O/N)?');
            Repeat
                Entree(Ch);
                Until (Ch='O') or (Ch='N');
                If Ch='O' then begin
                    DeactivS3:=true;
                    Nvar:=Nvar +1;
                    Writeln(Lst,'evaluation des désactivations sur
S3');
                end else DeactivS3:=false;
                If DeactivS3 or DeactivS2 then begin
                    Writeln('Avec variation lineaire des
désactivations (O/N)?');
                    Repeat
                        Entree(Ch);
                        Until (Ch='O') or (Ch='N');
                        If Ch='O' then begin
                            LinVar:=true;
                            Nvar:=Nvar +1;
                            Writeln(Lst,'Variation lineaire des
désactivations');
                        end else LinVar:=false;
                    end;
                    Writeln('L''evaluation de la quantite de S-1
(O/N)?');
                    Repeat
                        Entree(Ch);
                        Until (Ch='O') or (Ch='N');
                        If Ch='O' then begin
                            StateS_1:=true;
                            Nvar:=Nvar +1;
                            Writeln(Lst,'evaluation de la quantite de S-1');
                        end else StateS_1:=false;
                        Writeln('L''evaluation de la quantite de S2
(O/N)?');
                end;
            end;
        end;
    end;

```

```

Repeat
  Entree(Ch);
  Until (Ch='O') or (Ch='N');
  If Ch='O' then begin
    StateS2:=true;
    Nvar:=Nvar +1;
    Writeln(Lst,'evaluation de la quantite de S2');
  end else StateS2:=false;
  Nvar:=Nvar +1;
  Nvertex:= Nvar +1;
  END;
END;
FOR Compteur:=1 TO Nvertex DO BEGIN
  FOR Index:=1 TO Nvar DO
    Simplex[Compteur][Index]:=Random;

  QuadDevSimplex[Compteur]:=CompQuadDev(Simplex[Compteur]);
  END;
  REPEAT
    Optimize;
    delay(50);
  UNTIL KeyPressed;
  Compteur:=Findbest;
  QuadDevSimplex[Compteur]:=CompQuadDev(Simplex[Compteur]);
  Writeln(Lst, 'Deivation standard sur prod. d''O2=',
    QuadDevSimplex[Compteur]:10:7);
  Writeln(Lst,'Les meilleurs etats-S de depart sont:');
  FOR Index:=Smin TO Smax DO
    Writeln(Lst,'S',Index,' =',S[Index]:10:7);
  Case Modele of
    1: Begin
      MattS;
      DistS;
    end;
    2: Begin
      MatDeact;
      MattS;
      MattT;
      DistS;
    end;
    3: Begin
      MatDeact;
      MattS;
      MattT;
      DistS;
    end;
    4: Begin
      MattS;
      MatDT;
      MattT;
      DistS;
    end;
  end;

```

```
    end;
5: Begin
    MatTS;
    MatDT;
    MatT;
    DistS;
end;
6: Begin
    MatTS;
    MatDT;
    MatT;
    DistS;
end;
7: Begin
    MatTS;
    If (DeactivS2S0 or DeactivS2 or DeactivS3) then begin
        MatDeact;
        MatT;
    end;
    DistS;
end;
9: Begin
    MatTS;
    Writeln(Lst,'Les ratés de départ
sont:',Simplex[Compteur][2]:7:5);
    Writeln(Lst,'Le coefficient de variation des miss
est:',          Simplex[Compteur][4]-0.5:10:7);
    DistS;
end;
10: Begin
    MatDeact;
    MatTS;
    MatT;
    Writeln(Lst,'Les désactivations de départ sont:',      Simplex[Compteur][2]:7:5);
    Writeln(Lst,'Le coefficient de variation est:',          Simplex[Compteur][3]-0.5:10:7);
    DistS;
end;
11: Begin
    MatDeact;
    MatTS;
    MatT;
    Writeln(Lst,'Les désactivations de départ sont:',      Simplex[Compteur][2]:7:5);
    Writeln(Lst,'Le coefficient de variation est:',          Simplex[Compteur][3]-0.5:10:7);
    DistS;
end;
13: Begin
```

```

    MatTS;
    Writeln(Lst,'Miss suplementaires au 1 flash:',
             Simplex[Compteur][4]:10:7);
    DistS;
end;
14: Begin
    Writeln(Lst,'La derniere distribution des etats-S
calculee est:');
    For Compteur:=Smin to Smax do
        Writeln(Lst,'S',Compteur,' =',Scalc[Compteur]:10:7);
    C2:=2;
    If StateS_1 then C2:=3;
    If StateS2 then C2:=C2+1;
    If DoubleHits then begin
        Writeln(Lst,'Double-
hits=',0.3*Simplex[Compteur][C2]:10:7);
        C2:=C2 +1;
    end;
    If MissQa then begin
        Writeln(Lst,'Misses dus a Qa
reduit=',0.3*Simplex[Compteur][C2]:10:7);
        C2:=C2 +1;
    end;
    Writeln(Lst,'Qte de Qa reduit au
depart=',Simplex[Compteur][C2]:10:7);
    C2:=C2 +1;
    If DeactivS3 then begin
        Writeln(Lst,'La probabilite de rate de S3Qa- est:',
                 Simplex[Compteur][C2]);
        C2:=C2 +1;
    end;
    If LinVar then Begin
        Writeln(Lst,'La variation/flash des désactivations
est x:',
                 Simplex[Compteur][C2]);
        C2:=C2 +1;
    end;
    If DeactivS2 then begin
        Writeln(Lst,'La probabilite de rate de S2Qa- est:',
                 Simplex[Compteur][C2]);
        C2:=C2 +1;
    end;
    If HomoMisses then begin
        { Calcul des désactivations dues a D reduit, sur
S2S3 seul. }
        Writeln(Lst,'La probabilite de deact. due a D- sur
S2-S3 est:',
                 Simplex[Compteur][5]);
    end;
end;
End;

```

```

Writeln(Lst,'Les sequences sont donc:');
Writeln(Lst,'Flash# Observee +/- Calculee');
FOR Compteur:=1 TO F1Num2 DO
  Writeln(Lst,Compteur:6,
  O2Yield[Compteur]/Weighted_Average:11:8,
  O2Noise[Compteur]/Weighted_Average:11:8,
  (Predicted[Compteur]*Pente +
  B0)/Weighted_Average:11:8);
  Writeln(Lst, CHR(12));
END;

Procedure Numeros;
BEGIN
  Write('Numero du premier flash a utiliser?');
  Readln(Offset);
  Write('Numero du dernier flash a utiliser
(Max=',FlashNum,')?');
  Readln(F1Num2);
END;

Procedure Evaluation02;
var
  Npts, Extrapol, I1, P1, P2: INTEGER;
Procedure LinReg;
var
  NS, I1, I2, Index, Max: INTEGER;
  SSY,SSX, Sigma, SSXY, Moyenne, Fac,
  N, X, SY, B0, B1, SX, SY2, SX2, SXY: EXTENDED;
begin
  FOR I1:=1 TO FlashNum DO BEGIN
    SY:=0; SX:=0; SXY:=0; SY2:=0; SX2:=0;
    FOR Index:=P1 TO P2 DO BEGIN
      Moyenne:= Y[I1, Index];
      X:=Index;
      SX:=SX + X;
      SX2:=SX2 + X*X;
      SY:=SY +Moyenne;
      SY2:=SY2 +Moyenne*Moyenne;
      SXY:=SXY + Moyenne*X;
    END;
    N:=P2 -P1 +1.0;
    SSY:=SY2 - SY*SY/N;
    SSX:=SX2 - SX*SX/N;
    SSXY:=SXY - SX*SY/N;
    B1:=SSXY/SSX;
    B0:=(SY -SX*B1)/N;
    Sigma:=(SSY -B1*B1*SSX)/(N -2.0);
    NS:=1;
    If Npts >0 then NS:=2*Npts;
    B1:=Ns*B1;
    (* Trouver le maximum du pic de prod. d'02 *);
  end;
end;

```

```

      Max:=121 +Npts; { Premieres 5 ms apres flash sont
ignores }
      Fac:=Y[I1][Max -Npts]/2.0 + Y[I1][Max +Npts]/2.0;
      If Npts >0 then For I2:=(Max -Npts +1) to (Max +Npts -
1) do
          Fac:=Fac + Y[I1, I2];
          Fac:=Fac -B1*Max;
          FOR Index:=122 +Npts TO 180-Npts DO BEGIN
              Moyenne:= Y[I1, Index -Npts]/2.0 + Y[I1, Index
+Npts]/2.0;
              If Npts>0 then For I2:=(Index -Npts +1) to (Index
+Npts -1) do
                  Moyenne:=Moyenne + Y[I1, I2];
                  IF (Moyenne -B1*Index) > Fac THEN BEGIN
                      Max:=Index;
                      Fac:=Moyenne -B1*Max;
                  END;
                  END;
                  O2Yield[I1]:= Round(Fac/Ns -B0);
                  Sigma:=Sigma*(1 +1/N +SQR(Max -SX/N)/SSX);
                  O2Noise[I1]:= SQRT(Sigma);
              END;
          END;
      Procedure EXP100;
      var
          I1, I2, Index, Max, NS: INTEGER;
          SSY, SSX, Sigma, SSXY, Moyenne, Fac,
          X, SY, B0, B1, SX, SY2, SX2, SXY, N: EXTENDED;
      begin
          FOR I1:=1 TO FlashNum DO BEGIN
              SY:=0; SX:=0; SXY:=0; SY2:=0; SX2:=0;
              FOR Index:=P1 TO P2 DO BEGIN
                  Moyenne:= Y[I1, Index];
                  X:=Exp(-Index/600.0);
                  SX:=SX + X;
                  SX2:=SX2 + X*X;
                  SY:=SY +Moyenne;
                  SY2:=SY2 +Moyenne*Moyenne;
                  SXY:=SXY + Moyenne*X;
              END;
              N:=P2 -P1 +1.0;
              SSY:=SY2 - SY*SY/N;
              SSX:=SX2 - SX*SX/N;
              SSXY:=SXY - SX*SY/N;
              B1:=SSXY/SSX;
              B0:=(SY -SX*B1)/N;
              Sigma:=(SSY -B1*B1*SSX)/(N -2.0);
              NS:=1;
              If Npts >0 then NS:=2*Npts;
              B1:=Ns*B1;
          END;
      end;
  
```

```

(* Trouver le maximum du pic de prod. d'O2  *);
Max:=121 +Npts;  { Premieres 5 ms apres flash sont
ignores }
Fac:=Y[I1][Max -Npts]/2.0 + Y[I1][Max +Npts]/2.0;
If Npts>0 then For I2:=(Max -Npts +1) to (Max +Npts -
1) do
  Fac:=Fac + Y[I1, I2];
  Fac:=Fac -B1*Exp(-Max/600.0);
  FOR Index:=122 +Npts TO 180-Npts DO BEGIN
    Moyenne:= Y[I1, Index -Npts]/2.0 + Y[I1, Index
+Npts]/2.0;
    If Npts>0 then For I2:=(Index -Npts +1) to (Index
+Npts -1) do
      Moyenne:=Moyenne + Y[I1, I2];
      IF (Moyenne -B1*Exp(-Index/600.0)) > Fac THEN BEGIN
        Max:=Index;
        Fac:=Moyenne -B1*Exp(-Index/600.0);
      END;
    END;
    O2Yield[I1]:= Round(Fac/Ns -B0);
    If Sigma <0 then Writeln('#1:Sigma=',Sigma);
    Sigma:=Sigma*(1 +1/N +SQR(exp(-Max/600.0) -SX/N)/SSX);
    If Sigma <0 then Begin
      Writeln('#1:Sigma=',Sigma);
      O2Noise[I1]:=0;
    end else O2Noise[I1]:= SQRT(Sigma);
  END;
END;
Procedure EXP23;
  var
    Donnee: VarRec;
    I1, I2, Index, Max, NS: INTEGER;
    Moyenne, Fac: EXTENDED;

    Function CalExp(I: INTEGER): EXTENDED;
    begin
      CalExp:=B[2]*Exp(-I/600.0) + B[3]*Exp(-I/138.0);
    end;

    begin
      N:=3;
      FOR I1:=1 TO FlashNum DO BEGIN
        ClearVarSum;
        FOR Index:=P1 TO P2 DO BEGIN
          Moyenne:=Y[I1, Index];
          With Donnee do begin
            X[2]:=Exp(-Index/600.0);
            X[1]:=1.0;
            X[3]:=Exp(-Index/138.0);
            Y:=Moyenne;
          end;
        end;
      end;
    end;
  
```

```

        end;
        RegSum(Donnee);
    END;
    Regression;
    NS:=1;
    If Npts >0 then NS:=2*Npts;
    B[1]:=Ns*B[1];
    B[2]:=Ns*B[2];
    B[3]:=Ns*B[3];
    (* Trouver le maximum du pic de prod. d'O2 *);
    Max:=121 +Npts; { Premieres 5 ms apres flash sont
ignores }
    Fac:=Y[I1][Max -Npts]/2.0 + Y[I1][Max +Npts]/2.0;
    If Npts>0 then For I2:=(Max -Npts +1) to (Max +Npts -
1) do
        Fac:=Fac + Y[I1, I2];
        Fac:=Fac -CalExp(Max);
        FOR Index:=122 +Npts TO 180-Npts DO BEGIN
            Moyenne:= Y[I1, Index -Npts]/2.0 + Y[I1, Index
+Npts]/2.0;
            If Npts>0 then For I2:=(Index -Npts +1) to (Index
+Npts -1) do
                Moyenne:=Moyenne + Y[I1, I2];
                IF (Moyenne -CalExp(Index)) > Fac THEN BEGIN
                    Max:=Index;
                    Fac:=Moyenne -CalExp(Max);
                END;
            END;
            O2Yield[I1]:= Round((Fac -B[1])/Ns);
            O2Noise[I1]:= Sigma;
        END;
    END;
    BEGIN
        Repeat
            Writeln('Evaluation des amplitudes de production
d''O2');
            Writeln('Desirez-vous extrapolier la ligne de base
avec');
            Writeln('(1)- Droite ');
            Writeln('(2)- exp(100 ms)');
            Writeln('(3)- droite + exp(23 ms)');
            Readln(Extrapol);
            Until (Extrapol <4) and (Extrapol>0);
            Repeat
                Writeln('Filtrage des donnees sur combien de points?');
                Write('(Minimum 1):');
                Readln(Npts);
            Until (Npts>0) and (Npts<90);
            Writeln('90 points sont disponibles pour la regression');
            Writeln('(Point #1)=15 ms avant le flash');
    END;

```

```

Repeat
  Write('Premier point a utiliser:');
  Readln(P1);
Until (P1>0) and (P1<90);
Repeat
  Write('Dernier point a utiliser:');
  Readln(P2);
Until (P2>1) and (P2<91);
Writeln(Lst, 'Evaluation des donnees:');
Writeln(Lst, 'Filtrage: +/-',Npts,' Points');
Writeln(Lst, 'Du point #',P1:3,' au point #',P2:3);
Write(Lst, 'Par une:');
Case ExtraPol of
  1: Writeln(Lst, ' droite');
  2: Writeln(Lst, ' Exponentielle de 100 ms');
  3: Writeln(Lst, ' Exponentielle de 23 ms');
End;
Writeln(Lst);
Case Extrapol of
  1: LinReg;
  2: EXP100;
  3: EXP23;
end;
Weighted_Average:=0;
FOR I1:=FlashNum-4 TO FlashNum DO
  Weighted_Average:=Weighted_Average + O2Yield[I1];
  Weighted_Average:=Weighted_Average/5;
  Writeln('Evaluation terminee');
END;

Procedure WriteTraitMenu;
BEGIN
  Writeln('Menu du traitement de donnees pour ',NomD);
  Writeln;
  Writeln('(A)- Liste des Amplitudes de ',NomD);
  Writeln('(N)- Numeros des éclairs à utiliser');
  Writeln('(S)- Analyse Sigma selon Lavorel');
  Writeln('(T)- Analyse sigma de rang indetermine, inspiree
de Thibault');
  Writeln('MODELES AVEC RESTRICTION SUR LA TRACE DE LA
MATRICE');
  Writeln('(Trace= coefficient signal trouve par analyse
sigma)');
  Writeln(' (K)- Test du modele de Kok (coefficients
homogenes)');
  Writeln(' (L)- Test du modele de Lavorel (transp.
charges)');
  Writeln(' (D)- Test du modele: Kok + desactivation');
  Writeln(' (I)- Test du modele des coefficients
Inhomogenes');

```

```

      Writeln(' (M)- Test du modele d''un Miss supplementaire
de S2 a S3 (Delrieu)');
      Writeln(' (J)- Test du modele d''un miss supplementaire
de S3 a S4');
      Writeln('MODELES SANS RESTRICTION SUR LA TRACE DE LA
MATRICE:');
      Writeln(' (1)- Modeles a proprietes constantes (Kok,
Delrieu, etc...)');
      Writeln(' (2)- Variation lineaire des miss');
      Writeln(' (3)- Variation lineaire de la désactivation sur
S2');
      Writeln(' (4)- Variation lineaire de deact. sur S2 S3, no
miss');
      Writeln(' (5)- Kok + Miss tres eleve sur premier flash');
      Writeln(' (6)- Modele au choix, avec Desactivation de
S2+S3 quand Qa est reduit');
      Writeln(' (7)- Misses deja connus a haute frequence;
ajout de',
                           ' désactivations a basse frequence quand Qa
est reduit');
      Writeln('(Q)- Quitter ce sous-menu');
END;

PROCEDURE Traite;
BEGIN
  ClrScr;
  Offset:=1;
  FlNum2:=FlashNum;
  NomD:='degagement d''02';
  Evaluation02;
  WriteTraitMenu;
  REPEAT
    Entree(Ch);
    Modele:=0;
    Case Ch of
      'A': LstAmp02;
      'N': Numeros;
      'S': Lavorel;
      'T': Thibault;
      'K': Modele:=1;
      'L': Modele:=3;
      'D': Modele:=2;
      'I': Modele:=4;
      'M': Modele:=5;
      'J': Modele:=6;
      '1': Modele:=7;
      '2': Modele:=9;
      '3': Modele:=10;
      '4': Modele:=11;
      '5': Modele:=13;
      '6': Modele:=14;
    End;
  Until Ch='Q';

```

```
'Q':;
else WriteTraitMenu;
END;
IF Modele > 0 THEN TestModele;
UNTIL Ch='Q';
Ch:=' ';
END;

Begin
END.
```

## A2.5. Code PASCAL du module MATHS

```

Unit Maths;
{$N+ 8087 mode }

Interface
  Const
    MaxRank = 10;
    MaxRank2= 20;
  Type
    Vector= Array[1..MaxRank] of EXTENDED;
    Matrix= Array[1..MaxRank] of Vector;
    VarRec= Record
      Y: EXTENDED;
      X: Vector;
    End;
  Var
    N, G, H: INTEGER;
    B, SigB: Array[1..MaxRank] of REAL;
    Sigma, QuadDev, R2: REAL;
  Procedure ClearVarSum;
  Procedure RegSum(Var A: VarRec);
  Function DetSymMat(Var Mat: Matrix): EXTENDED;
  Procedure InvSymMat(Var A, A_1: Matrix);
  Procedure Regression;

Implementation
  Var
    SXX, X_1: Matrix;
    SYX: Vector;
    Nx : LongINT;
    SSE, SY, SSY, SY2: EXTENDED;

  Procedure ClearVarSum;
  Var
    C1, C2: INTEGER;
  Begin
    For C1:=1 to MaxRank do
      For C2:=C1 to MaxRank do SXX[C1, C2]:=0.0;
    For C1:=1 to MaxRank do SYX[C1]:=0.0;
    SY2:=0.0;
    SY:=0.0;
    Nx:=0;
  end;

  Procedure RegSum(Var A: VarRec);
  var
    C1, C2: INTEGER;
  begin
    With A do begin

```

```

      For C1:=1 to N do
        For C2:=C1 to N do
          SXX[C1, C2]:=SXX[C1, C2] + X[C1]*X[C2];
        For C1:=1 to N do SYX[C1]:=SYX[C1] + Y*X[C1];
        SY2:=SY2 +Y*Y;
        SY:=SY +Y;
      end;
      Nx:=Nx + 1;
    end;

Function DetSymMat(Var Mat: Matrix): EXTENDED;
  (* Determinant d'une matrice symetrique N x N "positive
definite" *)
  (* Forward DooLittle scheme, left side ref. p.31 tables CRC
*)
  var
    K, I, J: Integer;
    P, U, BufMat: Matrix;
    Det: EXTENDED;
  begin
    BufMat:=Mat;
    Det:=1;
    For K:=1 to N do begin
      P[K]:=BufMat[K];
      IF K>1 then For I:=K to N do
        For J:=1 to K-1 do
          P[K, I]:=P[K, I] -U[J, K]*P[J, I];
      For I:=K to N do
        U[K, I]:=P[K, I]/P[K, K];
      Det:=Det*P[K, K];
    end;
    DetSymMat:=Det;
  end;

Procedure InvSymMat(Var A, A_1: Matrix);
  (* Inversion d'une matrice symetrique N x N "positive
definite" *)
  (* DooLittle scheme, ref. p.35 tables CRC  *)
  var
    K, I, J: Integer;
    P, U: Array[1..MaxRank] of Array[1..MaxRank2] of EXTENDED;
  begin
    For I:=1 to N do P[1, I]:=A[1, I];
    P[1, N+1]:=1.0;
    For I:=1 to N+1 do
      U[1, I]:=P[1, I]/P[1, 1];
    For K:=2 to N do begin
      For I:=K to N do P[K, I]:=A[K, I];
      For I:=N+1 to N+K-1 do P[K, I]:=0.0;
      P[K, K+N]:=1.0;
      For J:=1 to K-1 do
        For I:=K to N do P[I, J]:=0.0;
      For I:=K to N do P[I, K]:=0.0;
    end;
  end;

```

```

      For I:=K to N+J do
        P[K, I]:=P[K, I] - U[J, I]*P[J, K];
      For I:=K to N+K do
        U[K, I]:=P[K, I]/P[K, K];
      end;
      For J:=1 to N do begin
        A_1[N, J]:=U[N, J+N];
        A_1[J, N]:=U[N, J+N];
      end;
      For K:=N -1 downto 1 do begin
        For J:=1 to K do begin
          A_1[K, J]:=U[K, J+N];
          For I:=N downto K+1 do
            A_1[K, J]:=A_1[K, J] - U[K, I]*A_1[I, J];
            A_1[J, K]:=A_1[K, J];
          end;
        end;
      end;

Procedure Regression;
  (* Applied Regression analysis and other multivariate
methods *)
  (* Kleinbaum, David G/Kupper, Lawrence L (Duxbury Press
1978) *)
  (* p. 519 *)
  Var
    Buf: EXTENDED;
    I, J: INTEGER;
    X_1: Matrix;
  begin
    For I:=1 to N do
      For J:=I to N do
        SXX[J, I]:=SXX[I, J];
    InvSymMat(SXX, X_1);
    SSE:=SY2;
    SSY:=SY2-SY*SY/Nx;
    For I:=1 to N do Begin
      Buf:=0.0;
      For J:=1 to N do
        Buf:=Buf + SYX[J]*X_1[I, J];
      SSE:=SSE -Buf*SYX[I];
      B[I]:=Buf;
    end;
    If (SSE>0) and (Nx>N) then Sigma:=SQRT(SSE/(Nx -N))
    else Sigma:=0;
    R2:=(SSY -SSE)/SSY;
    If SSE>0 then QuadDev:=Sqrt(SSE/SY2)
    else QuadDev:=0;
    For I:=1 to N do
      if X_1[I,I]>0 then SigB[I]:=Sigma*SQRT(X_1[I, I])
      else Writeln('Erreur: Rac. Carree n Negatif');
  end;

```

```
    end;  
Begin  
End.
```

## ANNEXE 3:

Modèle de l'électrode de platine

Un schéma représentant l'électrode de platine et le potentiostat est montré en Fig.A3.1. Dans ce schéma, les ions de chlore réagissent avec l'électrode d'argent pour former du chlorure d'argent, donnant ainsi un électron à l'électrode d'argent. L'électrode d'argent est connectée au côté positif du potentiostat, qui est représenté par une source de voltage " $V_p$ ". Le courant traversant le potentiostat traverse aussi la résistance " $R_p$ ", qui représente la somme de toutes les résistances dans le circuit; ceci produit une chute de tension. Le courant traverse aussi l'électrode de platine qui est représentée en deux parties: une partie pour la réduction de l'oxygène, et une autre partie pour la capacité du platine (Joliot 1972, Meunier and Popovic 1988b). La plus grande partie de la capacité du platine est due aux atomes d'hydrogène qui sont adsorbés très densément à la surface de l'électrode (revues du sujet: Frumkin 1963, Gilman 1969). Les atomes d'hydrogène sont adsorbés en prenant un électron de l'électrode de platine, selon l'équation suivante:



où  $H_{ads}$  dénote un atome d'hydrogène adsorbé. Il faudrait remarquer que la capacité de l'électrode produit un filtre

résistif-capacitif (RC) avec la somme des résistances  $R_P$  (Meunier and Popovic 1988b).

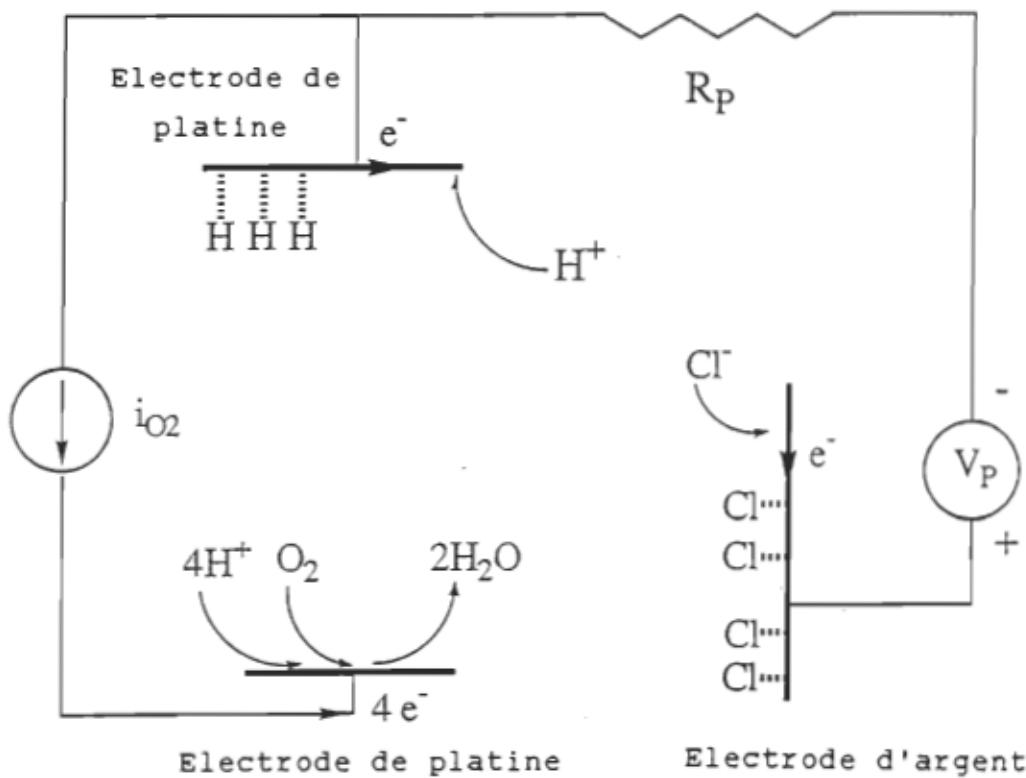


Figure A3.1. Schéma représentant le système de mesure.

L'adsorption de l'hydrogène et la réduction de l'oxygène sont représentées sur deux parties de la même électrode de platine (voir texte).

Les électrons du potentiostat peuvent aussi être utilisés pour la réduction de l'oxygène, qui est représentée par une source de courant "i<sub>O2</sub>" contrôlée par la diffusion de

l'oxygène jusqu'à l'électrode. La réduction de l'oxygène se produit selon la stoichiométrie suivante (Hoare 1968):



Le courant résultant de la réduction de l'oxygène produit une augmentation de la chute de tension à travers  $R_p$ , à moins que la capacité du platine s'oppose au changement de voltage (comme toutes les capacités le font). La capacité du platine peut le faire en renversant la réaction 1, i.e. en relâchant l'hydrogène adsorbé afin d'obtenir des électrons pour la réduction de l'oxygène. Ainsi, le courant qui est observé au potentiostat n'est pas simultané avec la réduction de l'oxygène, mais est retardé par le filtre RC formé par la capacité du platine et la résistance  $R_p$ . Cependant, il devrait être évident que ce filtre RC ne prévient pas une réduction rapide de l'oxygène diffusant jusqu'à l'électrode, puisque cette réduction utilise des électrons précédemment emmagasinés dans les atomes d'hydrogène adsorbé. Ce modèle de la réponse de l'électrode que je propose peut s'exprimer en équations dans le développement mathématique qui suit.

D'après le modèle, à un voltage de polarisation suffisant, la réduction de l'oxygène est limitée seulement par la diffusion, indépendamment du courant instantané entre les électrodes. La diffusion de l'oxygène jusqu'à l'électrode obéit à la loi de Fick; en combinant la loi de

Fick et la réduction de l'oxygène selon l'Eq.2, on obtient que le courant de réduction de l'oxygène,  $i_{O_2}$ , est donné par:

$$[A3, 3] \quad i_{O_2} = 4D \frac{dC(x)}{dx}$$

où D est le coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'eau, C(x) est la concentration d'oxygène à une distance x de l'électrode, et la dérivée dans l'équation est évaluée pour  $x=0$ . A un voltage de polarisation de 750 mV, la concentration d'oxygène à l'électrode est pratiquement nulle; ceci constitue une condition aux limites pour la résolution de l'Eq.3. Pour la configuration de notre électrode (comme avec une électrode du type Joliot), l'échantillon a une épaisseur finie "d" (en opposition à une épaisseur infinie). L'électrode de platine avec une membrane au-dessus de l'échantillon, et une solution d'électrolyte coulant par-dessus (Myers and Graham 1963, Joliot 1969), impose une autre condition aux limites. A la membrane, le flux d'oxygène quittant l'échantillon est proportionnel à la concentration d'oxygène (condition aux limites de Fourier). La concentration d'oxygène dans l'électrolyte circulant est alors assumée comme étant constante. Il peut être démontré que le courant  $i_{O_2}$ , en réponse à de l'oxygène soudainement libéré dans l'échantillon, est donné par:

$$[A3, 4] \quad i_{O_2} = A_n D p_n \exp(-Dp_n^2 t)$$

où les  $A_n$  et  $p_n$  sont des coefficients dépendants respectivement de la distribution des PSII dans l'échantillon et de la perméabilité de la membrane à l'oxygène. Les coefficients  $p_n$  sont définis par l'équation:

$$[A3, 5] \quad -Dp_n/K = \tan (p_n d - n \pi)$$

où  $D$  est le coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'eau,  $d$  est l'épaisseur de l'échantillon,  $n$  est un entier positif, et  $K$  est la perméabilité de la membrane. A de basses perméabilités, l'équation 5 se réduit à:

$$[A3, 6] \quad p_n = (2n + 1) \pi / 2D$$

où les symboles ont la même signification qu'auparavant. Pour  $n=1$ , la constante de temps de l'exponentielle est 9 fois plus petite que pour  $n=0$ ; pour  $n=2$ , elle est 25 fois plus petite. On voit que pour  $n$  plus grand que zéro, les exponentielles augmentent rapidement de constante de temps comme  $2n + 1$  au carré. Pour une constante de temps de 25 ms correspondant à  $n=0$ , seuls  $n=1$  et  $n=2$  peuvent avoir de l'importance. Pour  $n$  plus grand que 2, les exponentielles décroissantes sont négligeables après les 2 ms que dure l'artefact de l'éclair. On peut démontrer aussi que les amplitudes  $A_n$  diminuent selon  $1/(2n+1)$  (assumant une distribution uniforme des PSII dans l'épaisseur de l'échantillon). Ainsi,  $A_1=A_0/3$  et  $A_2=A_0/5$ . De plus, dans les résultats de l'ajustement, l'amplitude de l'exponentielle

due à la diffusion est respectivement 3 et 4 fois plus faible que les amplitudes des composantes de 1.3 et 1.7 ms. Ainsi, les composantes exponentielles dues à la diffusion pour  $n=1$  et 2 sont respectivement 12 et 15 fois plus petites que les autres exponentielles, et peuvent donc être négligées. Je peux donc écrire:

$$[A3, 7] \quad i_{o2} \approx ADp \exp(-Dp^2 t)$$

L'équation 7 est valide pour une production d'oxygène instantanée; mais si l'oxygène est produit avec une constante de temps  $T$ , d'une façon exponentielle, la production d'oxygène et la diffusion seront convolées ensemble. De plus, le courant mesuré  $I$  est différent de  $i_{o2}$  par l'action du filtre RC des électrodes. Donc, la réponse du filtre RC sera aussi convolée avec la production d'oxygène et la diffusion. Ces effets de convolution sont calculés aisément par des transformées de Laplace, qui donnent pour le courant mesuré  $I$ :

$$[A3, 8] \quad I = K [ \exp(-t/T) / (1/T - Dp^2) (1/T - 1/RC) + \exp(-Dp^2 t) / (Dp^2 - 1/T) (Dp^2 - 1/RC) + \exp(-t/RC) / (1/RC - Dp^2) (1/RC - 1/T) ]$$

où  $T$  est la constante de temps du dégagement d'oxygène,  $Dp^2$  est la constante de temps de diffusion,  $RC$  est la constante de temps du filtre formé par la capacité de l'hydrogène, et  $K$  est une constante de proportionnalité.

## ANNEXE 4:

Ajustement de courbe par le programme Reffit3

## A4. Introduction.

Ce programme ajuste l'équation théorique développée en annexe 3 à la cinétique expérimentale de l'électrode après un éclair. L'équation est exprimée en PASCAL comme:

$$[A5, 1] \quad F(T) = A * (1/(k1-k2)/(k1-k3) * EXP(-T * k1) + 1/(k2-k1)/(k2-k3) * EXP(-T * k2) + 1/(k3-k1)/(k3-k2) * EXP(-T * k3)) + B$$

où  $F(T)$  est la cinétique en fonction du temps,  $A$  est une constante d'amplitude (appelée  $K$  dans le développement en appendice 4), les  $k_n$  sont l'inverse des constantes de temps du modèle, "EXP" dénote le calcul d'une exponentielle, et  $B$  est une constante égale à la ligne de base du signal. Le facteur d'amplitude  $A$  est trouvé aisément par une régression linéaire sans partie constante,  $y = A x$ , où les  $y$  sont les données expérimentales et les  $x$  les calculs théoriques. Il y a donc trois variables à ajuster:  $k1$ ,  $k2$  et  $k3$ . L'ajustement se fait par la méthode du simplex, qui n'est ni plus ni moins qu'un algorithme d'optimisation par essais et erreurs. Cet algorithme essaie de maximiser le coefficient de détermination  $R^2$  trouvé lors de la régression linéaire.

Les courbes ajustées peuvent être sauvées sur disque, ce qui permet d'utiliser Graphiti pour les imprimer au propre avec la table traçante; le format des fichiers est exactement le même. Ce programme a été écrit pour le Turbo PASCAL 4.0.

## A4.1. Code PASCAL du programme REFFIT3

```

Const
  Nvar = 3; (* nombre de variables à ajuster *)
  Nver = 4; (* nombre de vertex du simplex = Nvar +1 *)

Type
  WrkString = STRING[100];
  Karray = array[1..Nvar] of REAL;
Var
  Y, (* Données expérimentales *)
  Y2 : array[0..4095] of INTEGER;
  M (* Masque qui définit les points à utiliser dans
      l'ajustement, afin d'éviter l'artefact de l'éclair *)
      : array[0..4095] of BOOLEAN;
  K,
  EK : Karray; { estimate of coefficents }

  DX, { start of curve }
  FX, { end of curve }
  NC, { number of averaged curves }
  PR, { preset time on TN-1710 }
  FF, { location of first flash }
  LF, { location of last flash }
  NF, { number of flashes }
  NIterations,
  Speed,Nglb,
  SoManyP, NPAF { Number of Points After the Flash }
  : INTEGER;

  DW, { dwell time on TN-1710 }
  SF, { scale factor }
  R2,SigmaA,SigmaB,
  Sigma,A,B,
  Moyenne
  : REAL;

  TI,DA, { title and date }
  Dummy, { as a buffer }
  SaveFilename,
  InputFilename
  : WrkString;

  Ch : CHAR;

procedure InputData;
  Var
    I: INTEGER;
    Filvar : TEXT;
begin

```

```

Write('Donnez: Lecteur:\Chemin\NomDuFichier=');
Readln(InputFilename);
Assign(Filvar,InputFilename);
Reset(Filvar);
Readln(Filvar,CH,DX,FX,DW,NC,PR,FF,LF,NF,SF);
Readln(Filvar,TI);
Readln(Filvar,DA);
Writeln('Lecture des données:',TI,' ',DA);
LF:=5*FF;
Writeln('dernier éclair:',LF,' FX:',FX);
For I:=DX to FX do
begin
  Readln(Filvar,Y[I]);
  M[I]:=true;
end;
Writeln('Lecture finie');
end; {InputData}

procedure SaveCurve;
Var
  I: INTEGER;
  Filvar : TEXT;
begin
  Write('Donnez: Lecteur:\Chemin\NomDuFichier=');
  Readln(SaveFilename);
  Assign(Filvar,SaveFilename);
  Rewrite(Filvar);
  Writeln(Filvar,' ',DX,' ',FX,' ',DW,' ',NC,' ',PR,' ',FF,'
',LF,' ',NF,' ',SF);
  Writeln(Filvar,TI);
  Writeln(Filvar,DA);
  For I:=DX to FX do Writeln(Filvar,Y2[I]);
  Close(Filvar);
end;

Procedure InputEstimates;
  var I: INTEGER;
begin
  Writeln('S.V.P. Spécifiez:');
  Writeln;
  for I:=1 to Nvar do
  begin
    Writeln('valeur estimatée de K',I,'?');
    Readln(EK[I]);
  end;
  Writeln('Nombre d''iterations?');
  Readln(NIterations);
  Writeln('Pour accélérer le processus, le nombre de points
peut être divisé.');
  Writeln('S.V.P. donnez le facteur de division.');
  Readln(Speed);

```

```

Repeat
  Writeln('Jusqu''à ',FX-LF,' points après l'éclair peuvent
être considérés. Combien?');
  Readln(NPAF);
  NPAF:=NPAF+LF;
  until NPAF < FX;
  Moyenne:=0;
  For I:=1 to 100 do Moyenne:=Moyenne + Y[LF-I];
  Moyenne:=round(Moyenne/100);
end;

Function expo(exposant : REAL):REAL;
begin
  if exposant < -87.0 then expo:=0.0
  else expo:=exp(exposant);
end;

Procedure Optimize(Estimate: Karray;NI: INTEGER);
var
  AV : Karray;
  VK : array[1..Nver] of Karray;
  VR2: array[1..Nver] of REAL;
  V,I, BadGuy: INTEGER;
  SY,SY2, N :REAL;
  Procedure SumY;
  Var
    Index: INTEGER;
    Y2: REAL;
  begin
    Index:=LF;
    N:=0.0;SY:=0.0;SY2:=0.0;
    while Index<=NPAF do
      begin
        if M[Index] then
          begin
            Y2:=Y[Index]-Moyenne;
            SY2:=SY2 + Y2*Y2;
            N:=N + 1.0;
          end;
        Index:=Index + Speed;
      end;
  end;
  Function ComputeR2(CK: Karray):REAL;
  Var
    Index: INTEGER;
    SX,SXY,SX2,SSY,SSX,SSXY,
    T,X : REAL;
  begin
    Index:=LF;
    SX:=0.0;SXY:=0.0;SX2:=0.0;
    if CK[1]<0 then ComputeR2:=10000.0*CK[1]
  end;
end;

```

```

else if CK[2]<0 then ComputeR2:=10000.0*CK[2]
else if CK[3]<0 then ComputeR2:=10000.0*CK[3]
else begin
  while Index<=NPAF do
  begin
    if M[Index] then
    begin
      T:=(Index - LF)*DW;
      X:=expo(-T*CK[1])/(CK[1]-CK[2])/(CK[1]-CK[3]);
      X:=X + expo(-T*CK[2])/(CK[2]-CK[1])/(CK[2]-CK[3]);
      X:=X + expo(-T*CK[3])/(CK[3]-CK[1])/(CK[3]-CK[2]);
      SXY:=SXY + X*(Y[Index]- Moyenne);
      SX2:=SX2 + X*X;
    end;
    Index:=Index + Speed;
  end;
  Writeln('R2=' ,SXY*SXY/SX2/SY2:7:5);
  ComputeR2:=SXY*SXY/SX2/SY2;
end;
end;
Function FindWorstV: INTEGER;
var V,Worst: INTEGER;
begin
  Worst:=1;
  for V:=2 to Nver do if VR2[V] < VR2[Worst] then Worst:=V;
  FindWorstV:=Worst;
end;
Procedure AverageVK(Worst: INTEGER);
var
  Sum, Weight: REAL;
  Index,V:INTEGER;
begin
  for Index:=1 to Nvar do
  begin
    Sum:=0;
    Weight:=0;
    for V:=1 to Nver do
      if V<>Worst then begin
        Sum:=Sum + VK[V,Index]/(1-VR2[V]);
        Weight:=Weight + 1/(1-VR2[V]);
      end;
    AV[Index]:=Sum/Weight;
  end;
end;
Procedure ReplaceWorst(Worst: INTEGER);
var
  RK,RK2 : Karray;
  R2reflected, R2contracted, R2expanded : REAL;
Procedure Reflect;
  var Index: INTEGER;
  begin

```

```

      Writeln('refl chissement');
      for Index:=1 to Nvar do
          RK[Index]:=2*AV[Index]-VK[Worst,Index];
          R2reflected:=ComputeR2(RK);
      end;
Procedure Contract;
  var Index: INTEGER;
  begin
    Writeln('Contraction');
    for Index:=1 to Nvar do
      RK[Index]:=(AV[Index]+VK[Worst,Index])/2;
      R2contracted:=ComputeR2(RK);
    end;
Procedure Expand;
  var Index: INTEGER;
  begin
    Writeln('Expansion');
    for Index:=1 to Nvar do
      RK2[Index]:=AV[Index]+2*(AV[Index]-VK[Worst,Index]);
      R2expanded:=ComputeR2(RK2);
    end;
Procedure Shrink;
  var V,Index: INTEGER;
  begin
    Writeln('Diminution');
    for V:=1 to Nver do
    begin
      for Index:=1 to Nvar do
        VK[V,Index]:=(AV[Index]+VK[V,Index])/2;
        VR2[V]:=ComputeR2(VK[V]);
      end;
    end;
  begin
    Reflect;
    if R2reflected < VR2[Worst] then
      begin
        Contract;
        if R2contracted < VR2[Worst] then Shrink
        else begin
          VR2[Worst]:=R2contracted;
          VK[Worst]:=RK;
        end;
      end
    else begin
      Expand;
      if R2expanded < R2reflected then
        begin
          VK[Worst]:=RK;
          VR2[Worst]:=R2reflected;
        end
      else begin
    end;
  end;
end;

```

```

        VK[Worst]:=RK2;
        VR2[Worst]:=R2expanded;
      end;
    end;
  end;
begin
  SumY;
  for V:=1 to Nver do
  begin
    for I:=1 to Nvar do VK[V,I]:=Estimate[I]*Random;
    VR2[V]:=ComputeR2(VK[V]);
  end;
  Repeat
    for I:=1 to NI do
    begin
      Writeln('iteration #',I);
      BadGuy:=FindWorstV;
      AverageVK(BadGuy);
      ReplaceWorst(BadGuy);
    end;
    Writeln('Combien d''iterations de plus?');
    Readln(NI);
  until NI=0;
  AverageVK(FindWorstV);
  K:=AV;
  Writeln('Terminé!');
end;

Procedure Compute;
var
  I: INTEGER;
  T: REAL;
Procedure ComputeFit(CK: Karray);
  Var
    Index: INTEGER;
    N,
    SX,SY,SXY,SX2,SY2,SSY,SSX,SSXY,
    T,X,Y2 : REAL;
begin
  Index:=LF;
  N:=0.0;SX:=0.0;SY:=0.0;SXY:=0.0;SX2:=0.0;SY2:=0.0;
  while Index<=NPAF do
  begin
    if M[Index] then
    begin
      T:=(Index - LF)*DW;
      X:=expo(-T*CK[1])/(CK[1]-CK[2])/(CK[1]-CK[3]);
      X:=X + expo(-T*CK[2])/(CK[2]-CK[1])/(CK[2]-CK[3]);
      X:=X + expo(-T*CK[3])/(CK[3]-CK[1])/(CK[3]-CK[2]);
      SX:=SX + X;
      Y2:=Y[Index] - Moyenne;
    end;
  end;
end;

```

```

        SY:=SY + Y2;
        SXY:=SXY + X*Y2;
        SX2:=SX2 + X*X;
        SY2:=SY2 + Y2*Y2;
        N:=N + 1.0;
    end;
    Index:=Index + 1;
end;
Nglb:=round(N);
R2:=SXY*SXY/SX2/SY2;
A:=SY/SX;
B:=Moyenne;
Sigma:=(SY2 + A*A*SX2 - 2*A*SXY)/(N - 1.0);
if Sigma<0 then Writeln('SIGMA NEGATIF!!!!!!!!!!!!',Sigma)
else begin
    Sigma:=SF*sqrt(Sigma);
    SigmaA:=Sigma/sqrt(SX2);
    SigmaB:=0;
end;
end;
begin
    ComputeFit(K);
    Writeln;
    Writeln('coefficient de détermination r2=',R2);
    Writeln('Amplitude=',A*SF);
    Writeln('base   =',B*SF);
    Writeln('Sigma   =',Sigma);
    Writeln('Ecart-type de l'amplitude=',SigmaA);
    Writeln('Ecart-type de la ligne de base=',SigmaB);
    for I:=DX to FX do
        if I>=LF then begin
            T:=(I-LF)*DW;
            Y2[I]:=round(A*(exp(-T*K[1])/(K[1]-K[2])/(K[1]-K[3])
                + exp(-T*K[2])/(K[2]-K[1])/(K[2]-K[3])
                + exp(-T*K[3])/(K[3]-K[1])/(K[3]-K[2])) +
B);
            end else Y2[I]:=Y[I];
        end;
    Procedure HardCopy;
    var I: INTEGER;
    begin
        Writeln(Lst,'Ceci est un message du programme REFFIT3 ');
        Writeln(Lst);
        Writeln(Lst,'Modèle mathématique de la réponse de l'électrode
');
        Writeln(Lst,'à un éclair:');
        Writeln(Lst);
        Writeln(Lst,'R(t) = A*[exp(-t*K1)/(k1-k2)/(k1-k3) ');
        Writeln(Lst,'           + exp(-t*K2)/(k2-k1)/(k2-k3) ');
        Writeln(Lst,'           + exp(-t*K3)/(k3-k1)/(k3-k2) ');

```

```

      Writeln(Lst, '           + offset');
      Writeln(Lst);
      Writeln(Lst, 'Fichier: ', InputFilename);
      Writeln(Lst);
      for I:=1 to Nvar do Writeln(Lst, 'K', I, '= ', K[I]:20:14);
      Writeln(Lst, 'coefficient de détermination r2=', R2:12:8);
      Writeln(Lst, 'Amplitude=', A*SF);
      Writeln(Lst, 'base      =', B*SF);
      Writeln(Lst, 'Sigma     =', Sigma);
      Writeln(Lst, 'Ecart-type de l''amplitude=', SigmaA);
      Writeln(Lst, 'Ecart-type de la l. de base=', SigmaB);
      Writeln(Lst, 'Nombre de points utilisé N:= ', Nglb);
      Writeln(Lst, 'Intervalle de confiance 100*(1-alpha) for A:');
      Writeln(Lst, 'A=A +/-  t[N-2][1-alpha/2]*', SigmaA);
      Writeln(Lst);
      Writeln(Lst, 'test A=ax, distribution t(N-2);:');
      Writeln(Lst, 'T= (A-ax)*', 1/SigmaA);
      Writeln(Lst, 'Nombre de points masqués:', SoManyP);
      Writeln(Lst, 'Courbe sauvée sous le nom: ', SaveFilename);
      Writeln(Lst, NPAF-LF, ' points après l''éclair ont été
utilisés.');
      end;

procedure PutMask;
var
  Desire : BOOLEAN;
  Flash, There,
  I: INTEGER;
  PperFlash : REAL;
begin
  Writeln('Spécifiez si vous voulez enlever (0) ou remettre (1)
des points');
  Readln(I);
  Desire:= I=1;
  Writeln('Combien de points après l''éclair voulez-vous
(dé)masquer?');
  Readln(SoManyP);
  Writeln('premier éclair:', FF, ' dernier éclair:', LF, ' Dernier
point:', FX);
  PperFlash:=(LF-FF)/(NF-1);
  for Flash:=0 to NF-1 do
    for I:=0 to SoManyP do
      begin
        There:=I+FF+trunc(Flash*PperFlash);
        if (There<=FX) and (There>=DX) then M[There]:=Desire
        else Writeln('Contactez Pascal: Flash=', Flash,
        'There:', There);
      end;
  end;  { PutMask }

begin  { main }

```

```
SaveFilename:='Fichier non-sauvegardé';
Repeat
  Writeln('Menu:');
  Writeln;
  Writeln('(I)- Lire des données');
  Writeln('(M)- Masquer des données');
  Writeln('(E)- donner l'Estimé des paramètres k1,k2,k3,k4');
  Writeln('(O)- Optimiser les paramètres k1,k2,k3,k4');
  Writeln('(C)- Calculer la nouvelle courbe');
  Writeln('(H)- Imprimer un message');
  Writeln('(S)- Sauvegarder la nouvelle courbe');
  Writeln('(Q)- Fin');
  Readln(Ch);
  if Ch='I' then InputData
  else if Ch='M' then PutMask
  else if Ch='E' then InputEstimates
  else if Ch='O' then Optimize(EK,NIterations)
  else if Ch='C' then Compute
  else if Ch='H' then HardCopy
  else if Ch='S' then SaveCurve;
  until Ch='Q';
end. { Reffit3 }
```

REFERENCES

Akabori K, Tsukamoto H, Tsukihara J, Nagatsuka T, Motokawa O et Toshiyama Y (1988) Disintegration and reconstitution of PSII reaction center core complex. I. Preparation and characterization of three different types of subcomplex. *Biochim Biophys Acta* 932: 345-357

Allen JF, Bennett J, Steinback KE et Arntzen CJ (1981) Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature* 291: 25-29

Amesz J et Gorkom HJ (1978) Delayed fluorescence in photosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol* 29: 47-66

Appleby AJ et Savy M (1978) Kinetics of oxygen reduction reactions involving catalytic decomposition of hydrogen peroxide. *J Electroanal Chem* 92: 15-30

Aoki K, Ideguchi T, Kakuno T, Yamashita J et Horio T (1986) Effects of NaCl and glycerol on photosynthetic oxygen-evolving activity with thylakoid membranes from halophilic green alga Dunaliella tertiolecta. *J Biochem* 100: 1223-1230

Arnason T and Sinclair J (1976) Studies on the rate-limiting reaction of photosynthetic oxygen evolution in spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 430: 517-523

Arnon DI, Allen MB et Whatley FK (1954) Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Nature* 174:394-396

Arnon DI et Chain RK (1977) Dans: Miyachi S, Katoh S, Fujita Y et Shibata K (eds) *Photosynthetic organelles: structure and function*. Edition spéciale de Plant Cell Physiol, pp. 129-147

Arnon DI et Tang GMS (1988) Cytochrome b-559 and proton conductance in oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9524-9528

Avron M (1981) Photosynthetic electron transport and photophosphorylation. Dans: Hatch MD et Boardman NK (eds) *The Biochemistry of Plants* vol 8, pp 163-191. Academic Press, New York

Babcock GT, Barry BA, Debus RJ, Hoganson CW, Atamian M, McIntosh L, Sithole I et Yocum CF (1989) Water oxidation in Photosystem II: From radical chemistry to multielectron chemistry. *Biochem* 28: 9557-9565

Bader KP, Thibault P et Schmid GH (1983) A study on oxygen evolution and on the S-state distribution in thylakoid preparations of the filamentous Blue-Green alga Oscillatoria chalybea. *Z Naturforsch* 38c: 778-792

Badger MR (1985) Photosynthetic oxygen exchange. *Ann Rev Plant Physiol* 36: 27-53

Ben-Amotz A (1980) Glycerol production in the alga *Dunaliella*. Dans: San Pietro A (ed) Biochemical and photosynthetic aspects of energy production. Academic Press, New York

Bendall DS (1982) Photosynthetic cytochromes of oxygenic organisms. *Biochim Biophys Acta* 683: 119-151

Bennoun P (1982) Evidence for a respiratory chain in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4352-4356

Benson AA et Calvin M (1950) Carbon dioxide fixation by green plants. *Ann Rev Plant Physiol* 1: 25-40

Bergstrom J et Franzen LG (1987) Restoration of high-potential cytochrome b-559 in salt-washed PSII-enriched membranes as revealed by EPR. *Acta Chem Scand Ser B* 41: 126-128

Black MT, Brearley TH et Horton P (1986) Heterogeneity in chloroplast PSII. *Photosynth Res* 8: 193-207

Bouges-Bocquet B (1973) Limiting steps in photosystem II and water decomposition in *Chlorella* and *Spinach* chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 292: 772-785

Bouges-Bocquet B, Bennoun P et Taboury J (1973) Deactivation of oxygen precursors in presence of 3(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea and phenylurethane. *Biochim Biophys Acta* 325: 247-254

Boussac A, Maison-Peteri B, Vernotte C et Etienne AL (1985) The charge accumulation mechanism in NaCl-washed and in  $Ca^{2+}$ -reactivated PSII particles. *Biochim Biophys Acta* 808: 225-230

Briantais JM, Vernotte C, Miyao M, Murata N et Picaud M (1985) Relationship between  $O_2$  evolution capacity and cytochrome b-559 high-potential form in PSII particles. *Biochim Biophys Acta* 808: 348-351

Briantais JM, Vernotte C, Krause GH et Weis E (1986) Chlorophyll a fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves. Dans: Govindjee, Amesz J et Fork DC (ed) Light Emission by Plants and Bacteria, pp 539-583. Academic Press, New York

Bricker TM (1990) The structure and function of CPa-1 and CPa-2 in photosystem II. *Photosynth Res* 24: 1-13

Britton G (1976) Biosynthesis of carotenoids. Dans: Goodwin TW (ed) Chemistry and biochemistry of plant pigments, pp 262-327. Academic Press, New York

Bruce D, Popovic R, Vidaver W and Colbow K (1983) Effect of  $O_2$  on the kinetics of the flash-induced 518 nm absorbance change *in vivo*. *Plant & Cell Physiol.* 24: 877-882.

Butko P (1988) Oxygen evolution of synchronous *Chlorella* under continuous and flash illumination. *J Photochem Photobiol B* 1: 447-450

Calvin M et Bassham JA (1962) Dans: The photosynthesis of Carbon Compounds, pp 1-127. Benjamin, New York

Campbell WH et Black CC (1982) Cellular aspects of C<sub>4</sub> leaf metabolism. Dans: Creasy LL et Hrazdina (eds) *Cellular and Subcellular Localization in Plant Metabolism, Recent Advances in Phytochemistry* vol 16, pp 223-248. Plenum Press, New York

Canaani O, Malkin S and Mauzerall D (1988) Pulsed photoacoustic detection of flash-induced oxygen evolution from intact leaves and its oscillations. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4725-4729

Chandler MT and Vidaver W (1971) Stationary platinum electrode for measurement of O<sub>2</sub> exchange by biological systems under hydrostatic pressure. *Rev Sci Instr* 42:143-146.

Chow WS, Hope AB et Anderson JM (1989) Oxygen per flash from leaf disks quantifies Photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 973: 105-108

Christou G et Vincent JB (1988) The molecular "double-pivot" mechanism for water oxidation. *Biochim Biophys Acta* 895: 259-274

Cole J et Sauer K (1987) The flash number dependence of EPR signal II decay as a probe for charge accumulation in photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 891: 40-48

Cramer WA, Theg SM et Widger WR (1986) On the structure and function of cytochrome b-559. *Photosynth Res* 10: 393-403

Crow DR (1988) Dans: *The principles and application of electrochemistry*. Chapman Hall (ed) JW Arrow Smith: London.

Crowther D et Hind G (1981) Plastoquinone function and a possible Q-cycle in photosynthetic electron transport. Dans: Skulachev VP et Hinkle PC (eds) *Chemiosmotic Proton circuit in biological membranes*, pp 245-258. Addison-Wesley, Reading Mass.

Debus RJ, Barry BA, Sithole I, Babcock GT et McIntosh L (1988) Directed mutagenesis indicates that the donor to P<sub>680</sub><sup>+</sup> in PSII is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. *Biochem* 27:9071-9074

Delieu T and Walker DA (1972) An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. *New Phytol* 71:201-225.

Delrieu MJ (1974) Simple explanation of the misses in the cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution. *Photochem Photobiol* 20: 441-454

Delrieu MJ (1980) Light intensity saturation properties of O<sub>2</sub> yields in a sequence of flashes in *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta* 592:478-494.

Delrieu MJ (1983) Evidence for unequal misses in oxygen flash yield sequence in photosynthesis. *Z Naturforsch* 38c: 247-258

Delrieu MJ (1987) Fundamental differences between period-4 oscillations of the oxygen and fluorescence yield

induced by flash excitation in inside-out thylakoids.  
Biochim Biophys Acta 892: 163-171

Deng X et Melis A (1986) Phosphorylation of the light harvesting complex II in higher plant chloroplasts: effect on photosystem II and photosystem I absorption cross-section. Photobiochem Photobiophys 13: 41-52

Diner BA (1977) Dependence of the deactivation reactions of PSII on the redox state of plastoquinone pool A varied under anaerobic conditions. Biochim Biophys Acta 460: 247-258

Diner BA, de Vitry C et Popot JL (1988) Quinone exchange in the Qa binding site of photosystem II reaction center core preparations isolated from Chlamydomonas Reinhardtii. Biochim Biophys Acta 934:47-54

Diner BA, Ries DF, Cohen BN et Metz JG (1988) COOH-terminal processing of the polypeptide D1 of the PSII reaction center of *Scenedesmus obliquus* is necessary for the assembly of the oxygen-evolving complex. J Biol Chem 263: 8972-8980

Diner B and Mauzerall D (1973) Feedback controlling oxygen production in a cross-reaction between two photosystems in photosynthesis. Biochim Biophys Acta 305: 329-352

Dominy PJ and Williams WP (1987) The role of respiratory electron flow in the control of excitation energy distribution in blue-green algae. Biochim Biophys Acta 892: 264-274

Eckert HJ Toyoshima Y, Akabori K et Dismukes GC (1987) The involvement of lipids in light-induced charge separation in the reaction center of photosystem II. Photosynth Res 14:31-41

Etienne AL (1968) Etude de l'étape thermique de l'émission photosynthétique d'oxygène par une méthode d'écoulement. Biochim Biophys Acta 153: 895-897

Feder W (1968) Bioelectrodes in the detection of flow. ANYAS 148: 222-229

Forbush B, Kok B and McGloin MP (1971) Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution-II. Damping of flash yield oscillation, deactivation. Photochem Photobiol 14: 307-321

Fork DC (1972) Oxygen electrode. In: San Pietro A (ed.) Methods in enzymology, Photosynthesis and Nitrogen fixation, pp. 123-134. New York: Academic Press

Foyer C (1984) Dans: Bittar E (ed) Photosynthesis. John Wiley and Sons, New York

Frenkel AW (1954) Light induced phosphorylation by cell-free preparations of photosynthetic bacteria. J Am Chem Soc 76: 5568-5569

Frumkin AN (1963) Hydrogen overvoltage and adsorption phenomena. In: Advances in electrochemistry and electrochemical engineering vol 3 (Delahay P ed), pp.287-391. Interscience, New York

Gerken S, Brettel K, Schlodder E et Witt HT (1988) Optical characterization of the immediate electron donor to chlorophyll  $a_{117}^+$  in  $O_2$ -evolving PSII complexes. FEBS Lett 237: 69-75

Ghanotakis DF, Yocom CF et Babcock GT (1986) ESR spectroscopy demonstrates that cytochrome b-559 remains low potential in  $Ca^{2+}$  reactivated, salt-washed PSII particles. Phototsynth Res 9: 125-134

Gibbs M, Willeford KE, Ahluwalia KJK, Gombos Z et Jun SS (1990) Chloroplast respiration. Dans: Perspectives in Biochemical and Genetic Regulation of Photosynthesis, pp. 339-353. Alan R. Liss Inc

Gille JC et Clique M (1984) Dans: Calcul matriciel et introduction à l'analyse fonctionnelle. Lidec, Montréal

Gilman S (1969) The anodic film on platinum electrodes. In: Bard AJ, ed. Electroanalytical chemistry, vol 2, pp. 111-192, New York: Marcel Dekker Inc. Publisher.

Godde D (1982) Evidence for a membrane bound NADH-plastoquinone-oxidoreductase in Chlamydomonas reinhardtii CW-15. Arch Microbiol 131: 197-202

Godde D and Trebst A (1980) NADH is an electron donor for the photosynthetic membrane of Chlamydomonas reinhardtii. Arch Microbiol 127: 245-252

Gounaris K, Whitford D et Barber J (1983) The effect of thylakoid lipids on an oxygen evolving PSII preparation. FEBS Lett 163: 230-234

Govindjee et Govindjee R (1974) The absorption of light in photosynthesis. Sci Amer 231: 68-82

Govindjee, Kambara T and Coleman W (1985) The electron donor side of photosystem II: The oxygen evolving complex. Photochem Photobiol 42: 187-210

Green BR (1988) The chlorophyll-protein complexes of higher plant photosynthetic membranes or Just what green band is that? Photosynth Res 15: 3-32

Greenbaum E and Mauzerall DC (1976) Oxygen yield per flash of Chlorella coupled to chemical oxidants under anaerobic conditions. Photochem Photobiol 23:369-372

Gregory RPF (1989) Dans: Biochemistry of photosynthesis. John Wiley & sons New York

Guiles RD, Zimmermann JL, McDermott AE, Yachandra VK, Cole JL, Dexheimer SL, Britt RD, Wieghardt K, Bossek U, Sauer K et Klien MP (1990) The S<sub>2</sub> state of PSII: Differences between the structure of the manganese complex in the S<sub>2</sub> and S<sub>3</sub> states determined by X-ray absorption spectroscopy. Biochem 29: 471-485

Hansson O et Wydrzynski T (1990) Current perceptions of Photosystem II. Photosynth Res 23:131-162

Hanssum B, Dohnt G et Renger G (1985) On the ADRY agent interaction with the PSII donor side. Biochim Biophys Acta 806: 210-220

Harrison PJ, Waters RE and Taylor FJR (1980) A broad spectrum artificial sea water medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J Phycol* 16: 28-35

Hatch MD et Slack CR (1970) Photosynthetic CO<sub>2</sub>-fixation pathways. *Ann Rev Plant Physiol* 21:141-162

Hatch MD (1978) Regulation of enzymes in C<sub>4</sub> photosynthesis. Dans: Horecher BL et Stradtman (eds) *Current Topics in Cellular regulation* 14, pp 1-27. Academic Press, New York

Haxo FT et Blinks LR (1950) Photosynthetic action spectra of marine algae. *J Gen Physiol* 33: 389-422

Heber U, Kirk MR et Boardman NK (1979) Photoreactions of cytochrome b-559 and cyclic electron flow in photosystem II of intact chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 546: 292-306

Hill R (1963) Chlorophyll. Dans: Florkin M et Stotz GH (eds) *Comprehensive Biochemistry* vol 9, pp 73-97. Elsevier, London

Hoare JP (1968) Dans: *The electrochemistry of oxygen*. Interscience, New York

Hoare JP (1985) The kinetics of platinum-oxygen local cells. *J Electrochem Soc* 132: 301-305

Homann PH (1971) Actions of carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone on electron transport and fluorescence of isolated chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 245: 129-143

Hoover JK (1984) Dans: *Chloroplasts*. Plenum Press, New York

Horvath G, Melis A, Hideg E, Droppa M et Vigh L (1987) Role of lipids in the organization and function of PSII studied by homogeneous catalytic hydrogenation of thylakoid membranes *in situ*. *Biochim Biophys Acta* 891:68-74

Janz GJ et Ives DJG (1968) Silver, silver chloride electrodes. *ANYAS* 148: 210-221

Joliot P (1965) Cinétique des réactions liées à l'émission d'oxygène en photosynthèse. *Biochim Biophys Acta* 102: 116-134

Joliot P, Hofnung M and Chabaud R (1966) Etude de l'émission d'oxygène par des algues soumises à un éclairement modulé sinusoïdalement. *J Chim Phys* 63: 1423-1441

Joliot P et Joliot A (1968) A polarographic method for detection of oxygen production and reduction of Hill reagent by isolated chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 153, 625-634

Joliot P, Barbieri G and Chabaud R (1969) Un nouveau modèle des centres photochimiques du système II. *Photochem Photobiol* 10: 309-329

Joliot P, Joliot A, Bouges B et Barbieri G (1971) Studies of system II photocenters by comparative measurements of luminescence, fluorescence, and oxygen emission. *Photochem Photobiol* 14: 287-305

Joliot P et Kok B (1975) Oxygen evolution in photosynthesis. Dans: Govindjee (ed.) Bioenergetics of photosynthesis, pp 115-181. Academic Press, New York

Jordan BR, Chow WS et Baker AJ (1983) The role of phospholipids in the molecular organization of pea chloroplast membranes: Effect of phospholipid depletion on photosynthetic activities. *Biochim Biophys Acta* 725: 77-86

Junge W et Witt HT (1968) *Z Naturforsch* 23b:244-254

Jursinic P (1981) Investigation of double turnovers in photosystem II charge separation and oxygen evolution with excitation flashes of different duration. *Biochim. Biophys. Acta* 635:38-52.

Jursinic PA (1986) Delayed fluorescence: current concepts and status. Dans: Govindjee, Amesz J et Fork DC (eds) Light Emission by Plants and Bacteria, pp. 291-328. Academic Press, New York

Kirk JTO et Tilney-Basset RAE (1978) Dans: The plastids. Their chemistry, Structure, Growth and Inheritance. 2<sup>nd</sup> edition. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam

Kleinbaum DG et Kupper LL (1978) Dans: Applied regression analysis and other multivariable methods. Duxbury Press, North Scituate (Mass.)

Kok B (1949) On the interrelation of respiration and photosynthesis in green plants. *Biochim Biophys Acta* 3: 625-631

Kok B, Forbush B and McGloin M (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution -I. A linear four step mechanism. *Photochem Photobiol* 11: 457-475

Krause GH and Weis E (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II- Interpretation of fluorescence signals. *Photosynth Res* 5: 139-157

Kuwabara T, Miyao M, Murata T et Murata N (1985) The function of the 33 KDa protein in the photosynthetic oxygen-evolution system studied by reconstitution experiments. *Biochim Biophys Acta* 806: 283-289

Kuwabara T, Reddy KJ et Sherman LA (1987) Nucleotide sequence of the gene from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2 encoding the Mn-stabilizing protein involved in PSII water oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8230-8234

Lavorel J (1976) Matrix analysis of the oxygen evolving system of photosynthesis. *J Theor Biol* 57: 171-185

Lavorel J (1978) On the origin of the damping of the O<sub>2</sub> yield in sequences of flashes. In: Metzner H, (ed.) *Photosynthetic oxygen evolution*, pp. 249-268, Academic Press, New York

Lavorel J et Lemasson C (1976) Anomalies in the kinetics of photosynthetic oxygen emission in sequences of flashes revealed by matrix analysis. *Biochim Biophys Acta* 430: 501-516

Lavorel J et Maison-Peteri B (1983) Studies of deactivation of the oxygen-evolving system in higher plant photosynthesis. *Physiol Veg* 21: 509-517

Lawlor DW (1987) Dans: *Photosynthesis: metabolism, control and physiology*. Longman Scientific and Technical en coopération avec John Wiley & Sons, New York

Levine RP (1969) The mechanism of photosynthesis. *Sci Amer* 221: 58-70

Malkin R (1987) Photosystem I. Dans: Barber J (ed) *Topics in photosynthesis* Vol 8: The light reaction, pp 495-525. Elsevier, Amsterdam

Margulis L (1981) Dans: *Symbiosis in Cell Evolution*. Freeman, San Francisco.

Mathis P (1986) Structural aspects of vectorial electron transfer in photosynthetic reaction centers. *Photosynth Res* 8: 97-111

Mathis P et Rutherford AW (1987) The primary reactions of photosystem I and II of algae and higher plants. Dans: Amesz J (ed) *New Comprehensive Biochemistry* Vol 15, *Photosynthesis*, pp. 63-96. Elsevier, Amsterdam

McCarthy RE (1979) Roles of a coupling factor for photophosphorylation in chloroplasts. *Ann Rev Plant Physiol* 30: 79-104

McCauley SW, Melis A, Tang GMS et Arnon I (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8424-8428

Mehler AH (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch Biochem Biophys* 34: 65-77

Menke W (1962) Structure and chemistry of plastids. *Ann Rev Plant Physiol* 13: 27-44

Meunier PC, Swenson SI and Colbow K (1987) A dynamic model for the bare platinum electrode. Dans: Biggins J (ed.) *Progress in Photosynthesis Research* vol I, pp 737-740. Dordrecht, Martinus Nijhoff

Meunier PC et Popovic R (1988a) Optimisation of the bare platinum electrode as an oxygen measurement system in photosynthesis. *Photosynth Res* 15: 271-279

Meunier PC and Popovic R (1988b) High-accuracy oxygen polarograph for photosynthetic systems. *Rev Sci Instr* 59: 486-491

Meunier PC and Popovic R (1989) Evidence for a linear variation of the miss and single-hit S-state probabilities with the flash number, measured by oxygen evolution in Dunaliella tertiolecta. *Photosynth Res* 22: 131-136

Mitchell PD (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144-148

Mitchell PD (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev* 41: 445-502

Miyazaki A, Shina T, Toyoshima Y, Gounaris K et Barber J (1989) Stoichiometry of cytochrome b-559 in PSII. *Biochim Biophys Acta* 975: 142-147

Miyao M, Murata N, Lavorel J, Maisond-Peteri B, Boussac A et Etienne AL (1987) Effect of the 33 KDa protein on the S-state transitions in photosynthetic oxygen evolution. *Biochim Biophys Acta* 890: 151-159

Morissette JC, Meunier P and Popovic R (1988) An automatic integrating fluorimeter using an Apple-II and Scope-85. *Rev Sci Instr* 59: 934-936

Morrison R (1986) Dans: Grounding and shielding techniques in instrumentation. 3<sup>me</sup> édition, série Wiley-Interscience; John Wiley & Sons, Totonto.

Myers and Graham (1963) Further improvements in stationary platinum electrode of Haxo & Blinks. *Plant Physiol* 38: 1-5

Nanba O et Satoh K (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 109-112

Ono T et Inoue Y (1986) Effects of removal and reconstitution of the extrinsic 33,24 and 16 KDa proteins on flash oxygen yield in PSII particles. *Biochim Biophys Acta* 850: 380-389

Ort DR (1986) Energy transduction in oxygenic photosynthesis: an overview of structure and mechanism. Dans: Pirson A et Zimmermann MH (ed.) *Photosynthesis III. Encyclopedia of plant physiology* vol 19, pp 143-196. Springer-Verlag, Berlin

Ortega JM, Hervas M et Losada M (1988) Redox and acid-base characteriation of cytochrome b-559 in PSII particles. *Eur J Biochem* 171, 449-455

Ortega JM, Hervas M et Losada M (1989) Isolation and comparison of molecular properties of cytochrome b-559 from both spinach thylakoids and PSII particles. *Z. Naturforsch* 44c: 415-422

Packham NK et Barber J (1983) Recognition of interaction between the donor electron-transfer chains of PSII under conditions of partial inhibition of oxygen evolution. *Biochim Biophys Acta* 723: 247-255

Packham NK et Ford RC (1986) Deactivation of the PSII oxidation S states by 2-(3-chloro-4-trifluoromethyl)anilino-3,5-dinitrothiophene (ANT2p) and the putative role of carotenoid. *Biochim Biophys Acta* 852: 183-190

Packham NK, Hodges M, Etienne AL and Briantais JM (1988) Changes in the flash-induced oxygen yield pattern by thylakoid membrane phosphorylation. *Photosynth Res* 15: 221-232

Parson WW et Ke B (1982) Primary photochemical reactions. Dans: Govindjee (ed.) Energy Conversion by plants and bacteria Vol I, pp 331-385. Academic Press, New York

Pearlstein RM (1982) Chlorophyll singlet excitons. Dans: Govindjee (ed.) Energy Conversion by plants and bacteria Vol I, pp 381-385. Academic Press, New York

Pecoraro VL (1988) Structural proposals for the manganese centers of the oxygen evolving complex: an inorganic chemist's perspective. *Photochem Photobiol* 48: 249-264

Peltier G, Ravenel J and Vermeglio A (1987) Inhibition of a respiratory activity by short saturating flashes in Chlamydomonas: evidence for a chlororespiration. *Biochim Biophys Acta* 893: 83-90

Peltier G et Sarry F (1988) The Kok effect and the light-inhibition of chlororespiration in Chlamydomonas reinhardtii. *FEBS Lett* 228: 259-262

Plijter JJ, Aalbers SE, Barends JPF, Vos MH and van Gorkom HJ (1988) Oxygen release may limit the rate of photosynthetic electron transport; the use of a weakly polarized oxygen cathode. *Biochim Biophys Acta* 935, 299-311

Popovic R, Bruce D, Colbow K and Vidaver W (1984) A study of the flash-induced 518 nm absorbance change kinetics under anaerobic conditions. *Photochem. Photobiol.* 40:377-380

Possingham JV (1980) Plastid replication and development in the life cycle of higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 31:113-129

Preston C and Critchley C (1988) Interaction of electron acceptors with thylakoids from halophytic and non-halophytic species. *Photosynth Res* 16: 187-202

Radmer R and Kok B (1973) A kinetic analysis of the oxidizing and reducing sides of the  $O_2$ -evolving system of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 314: 28-41

Radmer R et Kok B (1975) Energy capture in photosynthesis: photosystem II. Dans: (Snell EE, Boyer PD, Meister A et Richardson CC eds.) *Annual Review of Biochemistry*, pp 409-433. Annual Reviews, Palo Alto CA

Renger G (1971) *Z. Naturforsch* 26B: 149-153

Renger G (1973) Studies on the mechanism of destabilization of the positive charges trapped in the photosynthetic water-splitting enzyme system Y by a deactivation-accelerating agent. *Biochim Biophys Acta* 314: 390-402

Richter G (1982) Dans: *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*. Thieme, Stuttgart

Robinson HH et Crofts AR (1983) Kinetics of the oxidation-reduction reactions of the photosystem II quinone acceptor complex, and the pathway for deactivation. *FEBS Lett* 153: 221-226

Robinson SP et Walker DA (1981) Dans: Hatch MD et Boardman NK (eds) *The Biochemistry of Plants* vol 8, pp 164-193.

Rockley MG, Windsor MW, Codgell RJ et Parson WW (1975) Picosecond detection of an intermediate in the photochemical reaction of bacterial photosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA 72: 2251-2255

Samson G (1988) Modifications du transport d'électrons dans le photosystème II inhibé par le mercure et le cuivre. Thèse de doctorat (Université du Québec à Trois-Rivières).

Satoh K et Fork DC (1983) Chlorophyll fluorescence transients as indicators of changes in the redox state of plastoquinone in intact bryopsis chloroplasts. Plant Sci Lett 29:133-144

Sauer K (1975) Primary events and the trapping of energy. Dans: Bioenergetics of photosynthesis Govindjee (ed.), pp. 115-181, Academic Press: New York

Sauer K (1979) Photosynthesis- the light reactions. Ann Rev Phys Chem 30: 155-178

Schmid GH et Thibault P (1979) Evidence for a rapid oxygen uptake in tobacco chloroplasts. Z Naturforsch 34c: 414-418

Schopf JW (1978) The evolution of the earliest cells. Sci Amer 239: 84-103

Seibert M, Picorel R, Rubin AB et Connolly JS (1988) Spectral, photophysical and stability properties of isolated PSII reaction center. Plant Physiol 87: 303-306

Sinclair J and Arnason T (1974) Studies on a thermal reaction associated with photosynthetic oxygen evolution. Biochim Biophys Acta 368: 393-400

Strain HH, Cope BT et Svec WA (1972) Analytical procedures for the isolation, identification, estimation, and investigation of the chlorophylls. Meth Enzymol 23: 452-476

Sukenic A, Bennett J and Falkowski P (1987) Light-saturated photosynthesis- limitation by electron transport or carbon fixation?. Biochim Biophys Acta 891: 205-215

Sundby C et Larsson C (1985) Transbilayer organization of the thylakoid galactolipids. Biochim Biophys Acta 813: 61-67

Swenson SI, Meunier CP and Colbow K (1987) Dynamic linearity of the bare platinum electrode for oxygen exchange measurements in marine algae. In:Biggins J ed. Progress in photosynthesis research, vol I, pp.733-736, Dordrecht:Martinus Nijhoff Publishers.

Tae GS, Black MT, Cramer WA, Vallon O et Bogorad L (1988) Biochem 27: 9075-9080

Tang XS et Satoh K (1986) Reconstitution of photosynthetic water-splitting activity by the addition of 33 KDa polypeptide to urea-treated PSII reaction center complex. FEBS Lett 201: 221-224

Thibault P (1978a) A new attempt to study the oxygen-evolving complex of photosynthesis: determination of transition probabilities of a state i. *J Theor Biol* 73: 271-284

Thibault P (1978b) Essai d'interprétation des séquences d'émission photosynthétique d'oxygène sous éclairs saturants: mise en évidence d'une forte probabilité de double transition sous le premier éclair. *C R Acad Sc Paris*, t 287 Série D: 725-728

Thompson LK et Brudvig GW (1988) Cytochrome b-559 may function to protect PSII from photoinhibition. *Biochem* 27: 6653-6658

Tolbert NE (1980) Photorespiration. Dans: Davies DD (ed) *The biochemistry of plants* vol 2, pp. 487-523. Academic Press, New York

Trebst A, Depka B, Kraft B et Johanningmeier U (1988) The Qb site modulates the conformation of the PSII reaction center polypeptides. *Photosynth Res* 28: 163-177

Tremblay LM et Chassé Y (1970) Dans: *Introduction à la méthode expérimentale*. Centre éducatif et culturel, Montréal

Tsujimoto, HY et Arnon DI (1985) Differential inhibition by plastoquinone analogues of photoreduction of cytochrome b-559 in chloroplasts. *FEBS Lett* 179: 51-54.

van Grondelle R (1985) Excitation energy transfer, trapping and annihilation in photosynthetic systems. *Biochim Biophys Acta* 811: 147-195

von Fraunhofer JA et Banks CH (1972) Dans: *Potentiostat and its applications*. Butterworth & Co. Ltd, Toronto

Vermaas WFJ, Renger G and Dohnt G (1984) The reduction of the oxygen-evolving system in chloroplasts by thylakoid components. *Biochim Biophys Acta* 764: 194-202

Vermaas W, Charité J et Shen G (1990) Glu-69 of the D2 protein in photosystem II is a potential ligand to Mn involved in photosynthetic oxygen evolution. *Biochem* 29:5325-5332

Wasielewski MR, Johnson DG, Seibert M et Govindjee (1989) Determination of the primary charge separation rate in isolated PSII reaction centers with 500-fs time resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 524-528

Williams WP and Salamon Z (1976) Enhancement studies on algae and isolated chloroplasts. Part I. Variability of photosynthetic enhancement in Chlorella pyrenoidosa. *Biochim Biophys Acta* 430: 282-299

Williams WP and Allen JF (1987) State 1/State 2 changes in higher plants and algae. *Photosynth Res* 13: 19-45

Williams WP, Furtado D and Nutbeam AR (1980) Comparison between State I/State II adaptation in a unicellular green alga and high energy state quenching in isolated intact spinach chloroplasts. *Photobiochem Photobiophys* 1: 91-102

Witt HT (1979) Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods. *Biochim Biophys Acta* 505: 355-427

Yeoh HH, Badger MR et Watson L (1981) Variations in kinetic properties of ribulose-1,5-biphosphate carboxylases among plants. *Plant Physiol* 67:1151-1155