

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE PRESENTEE A
UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR
LUCIE LORRAIN

ETUDE DE LA DISSIPATION D'ENERGIE THERMIQUE
DANS DES ECHANTILLONS PHOTOSYNTHETIQUES PAR
LA SPECTROSCOPIE PAR EFFET MIRAGE

JANVIER 1991

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

RESUME

Dans le désert, nous observons la présence de mirages. Ce phénomène est dû à la déviation de rayons lumineux qui traversent une région d'indice de réfraction variable. La spectroscopie par effet mirage utilise le même principe pour mesurer la déviation d'un faisceau laser, déviation causée par l'émission intermittente de chaleur provenant d'un échantillon. Jusqu'à présent, cette méthode a été employée principalement pour mesurer les coefficients d'absorption optique et de diffusion thermique d'échantillons inorganiques. Outre l'étude en spectroscopie infra-rouge de quelques échantillons naturels tels l'ivoire et les cheveux, cette méthode n'a pas servi pour l'étude d'échantillons biologiques. Nous avons mis au point un spectrophotomètre par effet mirage qui permet l'étude de divers types d'échantillons photosynthétiques. Par exemple, nous avons obtenu des spectres de systèmes modèles tels que les films Langmuir-Blodgett de chlorophylle *a*, de chloroplastes, d'algues et de feuilles. Cependant, une des principales caractéristiques de la spectroscopie par effet mirage permet de mesurer l'emmagasinement d'énergie photochimique de la même manière qu'en spectroscopie photoacoustique. Les valeurs de l'emmagasinement d'énergie photochimique mesurées varient entre 10 % dans le

cas des algues et 50 % dans celui de jeunes feuilles de pois. Un des avantages que nous offre la spectroscopie par effet mirage est la possibilité de travailler en milieu aqueux. Nous obtenons ainsi des cinétiques d'action de l'effet d'inhibiteurs (p. ex. DCMU) ou de polluants (p. ex. phénol) sur l'activité photosynthétique. Le présent travail montre les possibilités inédites d'application de la spectroscopie par effet mirage pour l'étude d'échantillons photosynthétiques et ce, dans le but d'en arriver à une meilleure compréhension de la photosynthèse.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie mon directeur de thèse, M. Roger M. Leblanc, qui a su me faire confiance. De plus, par son appui et son encouragement soutenu, il a grandement contribué à ma formation.

Sans l'appui et les idées d'Alain Tessier, le montage de l'appareil aurait été plus laborieux. Je veux donc le remercier pour tout le temps qu'il m'a consacré.

Par sa présence, Michel Havaux m'a appris la force de la collaboration et je lui en suis reconnaissante.

De plus, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

TABLE DES MATIERES

	page
RESUME.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIERES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xiv
LISTE DES SYMBOLES.....	xv
 CHAPITRES	
I. INTRODUCTION.....	1
A) La photosynthèse.....	1
1) Morphologie.....	2
2) Processus de désexcitation de la chlorophylle a	6
B) Les méthodes photothermiques.....	10
C) Application des méthodes photothermiques à l'étude de la photosynthèse.....	14
D) Objectifs de la recherche.....	20
II. SPECTROSCOPIE PAR EFFET MIRAGE.....	24
A) Théorie.....	25
B) Applications.....	34

III. MATERIEL ET METHODE.....	41
A) Appareils de mesure.....	41
1) Spectromètre par effet mirage.....	41
B) Echantillons.....	52
C) Traitements.....	54
IV. RESULTATS ET DISCUSSION.....	56
A) Caractéristiques du spectrophotomètre.....	56
1) Estimation du diamètre du faisceau laser.....	57
2) Variation de l'amplitude du signal.....	62
3) Rapport signal sur bruit.....	69
B) Spectres en effet mirage.....	72
1) Etude de l'effet du dioxane sur des monocouches de chlorophylle <i>a</i>	83
C) Mesure de l'activité photosynthétique.....	88
1) Emmagasinement de l'énergie photo- chimique.....	88
2) Effet du DCMU.....	96
3) Effet d'un stress thermique.....	99
4) Effet du phénol.....	105
V) CONCLUSION.....	108
REFERENCES.....	113

LISTE DES TABLEAUX

	page
1. Valeurs de $(1/n \cdot \delta n / \delta T)$ pour trois milieux.....	28
2. Comparaison entre les résultats expérimentaux et théoriques de la diffusivité thermique de divers métaux.....	40
3. Valeurs de l'amplitude et de la phase du signal photothermique d'un noir de charbon dans l'air et de l'intensité du laser sur une photodiode en fonction de la distance.....	59
4. Valeurs de la température, du tampon phos- phate, dans la cellule d'effet mirage en fonction du temps suite à l'ouverture du faisceau laser.....	75
5. Valeurs de l'intensité des maximums des spectres d'effet mirage.....	87
6. Comparaison de l'emmagasinement d'énergie photochimique d'une feuille de pois mesuré à basse fréquence de modulation en effet mirage et à haute fréquence en photoacoustique.....	94
7. Effet d'un stress thermique, de 15 minutes à 40.5 °C, sur l'emmagasinement d'énergie pho- tochimique de deux variétés de blé.....	104

LISTE DES FIGURES

	page
1. Schéma représentant les principales réactions de la photosynthèse.....	2
2. Schéma d'une coupe transversale d'une feuille dicotylédone.....	3
3. Photographie d'un chloroplaste d'une feuille d'avoine.....	4
4. Schéma de la membrane photosynthétique.....	5
5. Principaux modes de désexcitation de la chlorophylle <i>a in vivo</i>	7
6. Résumé de la génération et de la détection de divers effets photothermiques.....	11
7. Schéma du mode de calcul de l'emmagasinage d'énergie photochimique.....	15
8. Tracés typiques obtenus simultanément en spectroscopie photoacoustique et en radiométrie photothermique à basse fréquence de modulation	16
9. Schéma de la méthode scalaire de calcul du dégagement d'oxygène, de l'emmagasinage d'énergie photochimique et du dégagement thermique.....	18
10. Schéma du principe d'un mirage.....	25

11.	Principe de base d'un spectrophotomètre par effet mirage.....	26
12.	Schéma du processus de génération d'un signal photothermique dans un échantillon homogène.....	30
13.	Calcul théorique de la variation du signal photothermique en fonction de la fréquence, pour différentes distances laser-échantillon.....	32
14.	Schéma du chemin d'interaction entre le laser et l'échantillon pour: A) un échantillon plat; B) un échantillon non uniforme.....	33
15.	Spectres d'absorption du didymium obtenus avec un spectrophotomètre photothermique: par la déviation du faisceau sonde; par un interféromètre et par la technique conventionnelle de transmission.....	35
16.	Spectres d'absorption de a-Si:H non-dopé et d'alliages de a-SiC:H mesurés par effet mirage.....	36
17.	Potentiel, courant et signal DC du détecteur de position en absence de lumière sur l'électrode.....	37
18.	L'intensité du signal photothermique en fonction de la concentration en Fe (II).....	38

28.	Vue de la surface de l'échantillon lorsque le faisceau laser passe complètement et partiellement au-dessus de celui-ci.....	68
29.	Effet de la fréquence de modulation sur le rapport signal sur bruit pour une feuille de pois dans l'air et d'érable dans l'eau.....	70
30.	Spectres photothermiques, en fonction du temps, de dix monocouches de chlorophylle <i>a</i> dans du tampon phosphate.....	73
31.	Spectres photothermiques de dix monocouches et d'un film amorphe de chlorophylle <i>a</i> dans un tampon phosphate.....	77
32.	Spectres photothermiques de chloroplastes et d'algues déposés sur un filtre.....	78
33.	Spectres photothermiques de feuilles mature et immature d'érable dans l'eau.....	80
34.	Spectres d'effet mirage et de photoacoustique d'une feuille de pois.....	81
35.	Spectres d'absorption de dix monocouches de chlorophylle <i>a</i>	84
36.	Spectres photothermiques de dix monocouches de chlorophylle <i>a</i> , suite à une exposition de 180 minutes aux vapeurs de dioxane.....	86

37.	Effet de la lumière actinique sur le signal d'effet mirage d'une feuille de pois. Vignette: le même signal, mesuré avec une constante de temps de 400 ms.....	89
38.	Effet de l'intensité de la lumière actinique sur l'augmentation du signal photothermique d'une feuille de pois.....	91
39.	Effet de l'intensité de la lumière modulée sur l'emmagasinement d'énergie photochimique d'une feuille de pois. Vignette: l'inverse de l'emmagasinement d'énergie photochimique en fonction de l'intensité de la lumière modulée.....	92
40.	Effet du DCMU sur l'emmagasinement d'énergie photochimique d'une feuille de pois.....	97
41.	Effet du DCMU, à différentes concentra- tions, sur l'emmagasinement d'énergie photo- chimique d'une feuille de pois.....	98
42.	Effet de la température, suite à un stress de 15 minutes, sur l'emmagasinement d'énergie photochimique d'une feuille de pois.....	100
43.	Effet de la durée d'un stress thermique sur l'emmagasinement d'énergie photochimique d'une feuille de pois.....	101

44.	Valeurs de l'inverse de l'emmagasinage d'énergie photochimique en fonction de l'intensité de la lumière modulée, chez des feuilles de pois; pour des incubations à 41.5 °C d'une durée de 0, 8 et 15 minutes.....	102
45.	Effet du phénol sur le signal photother- mique d'une feuille de pois.....	106

LISTE DES ABREVIATIONS

chl, chlorophylle

DCMU, dichlorophényldiméthylurée

EEP, emmagasinage d'énergie photochimique

EM, effet mirage

L-B, Langmuir-Blodgett

PA, photoacoustique

PS I, photosystème I

PS II, photosystème II

S/B, signal sur bruit

LISTE DES SYMBOLES

$c. t.$, constante de temps

f , fréquence de modulation

I_0 , intensité de la lumière modulée

I_a , intensité de la lumière actinique

λ , longueur d'onde

CHAPITRE I

INTRODUCTION

A) LA PHOTOSYNTHESE

La vie telle que nous la connaissons aujourd'hui n'aurait pu exister sans la présence de la photosynthèse. Par son apparition, ce processus a changé la composition gazeuse de l'atmosphère terrestre, ce qui a permis l'évolution de la terre. Aujourd'hui, les organismes photosynthétiques jouent toujours un rôle important pour la planète. En effet, en tant que producteurs primaires, ils se retrouvent à la base de presque toutes les chaînes alimentaires existantes.

La photosynthèse consiste en la fixation du gaz carbonique et en sa transformation, à l'aide de lumière, en hydrate de carbone et en oxygène. Ce phénomène se produit chez les bactéries, les algues et les plantes supérieures. Normalement la photosynthèse se divise en deux phases distinctes, dépendante et indépendante à la lumière (figure 1). Pendant la phase dépendante à la lumière, les organismes

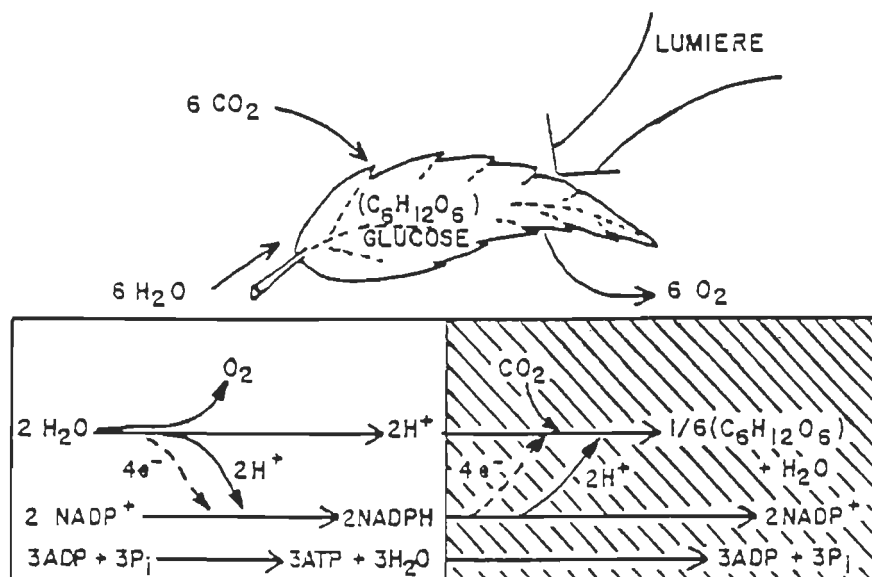


Figure 1 Schéma représentant les principales réactions de la photosynthèse.

photosynthétiques absorbent la lumière, dégagent de l'oxygène et produisent des éléments de base, tels les protons et le NADPH. Par la suite, au cours de la phase indépendante à la lumière, ces éléments servent à la formation de produits comme les sucres.

1) MORPHOLOGIE

Bien que les organismes photosynthétiques se situent au bas de la lignée évolutive, ils présentent tout de même un certain degré d'organisation. Si nous

regardons, par exemple le schéma d'une coupe transversale d'une feuille (figure 2), nous notons la présence de plusieurs types de cellules végétales. Toutes les cellules interviennent pour le maintien de la plante en activité, mais c'est uniquement au niveau des cellules du mésophylle et des cellules de garde des stomates que s'effectue la photosynthèse. A l'intérieur de ces cellules, nous retrouvons des organites spécialisés, les chloroplastes, siège de la photosynthèse.

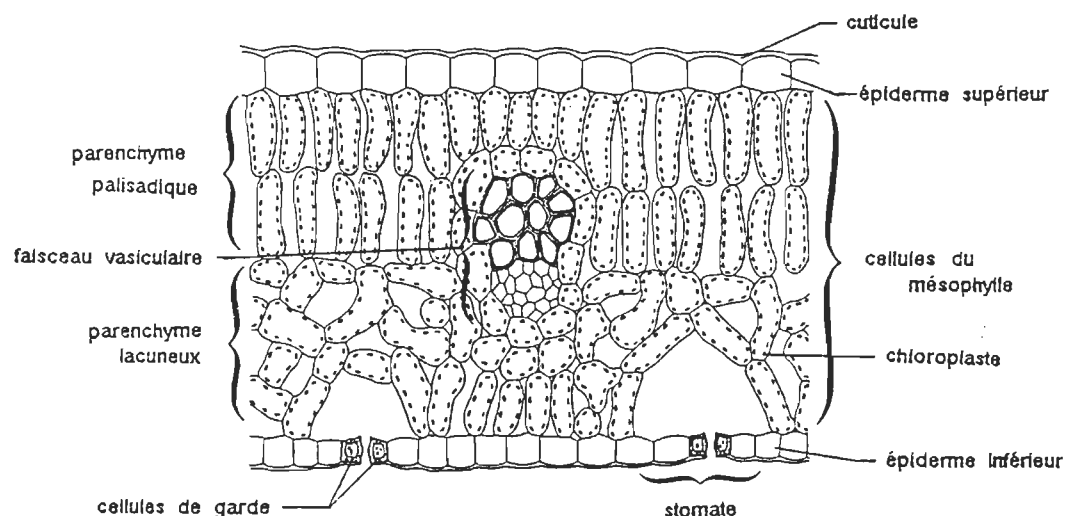


Figure 2 Schéma d'une coupe transversale d'une feuille dicotylédone.

Aujourd'hui, nous connaissons très bien la structure des chloroplastes. A la figure 3, nous présentons la photographie d'un chloroplaste de feuille d'avoine. Dans les chloroplastes, nous retrouvons une double mem-

brane. La membrane externe forme la paroi cellulaire. Par contre la membrane interne, qui contient les pigments photosynthétiques, constitue un réseau organisé dans le stroma. Chez certains chloroplastes, nous notons également la présence de grains d'amidons, une réserve d'hydrates de carbone fabriqués pendant la photosynthèse.

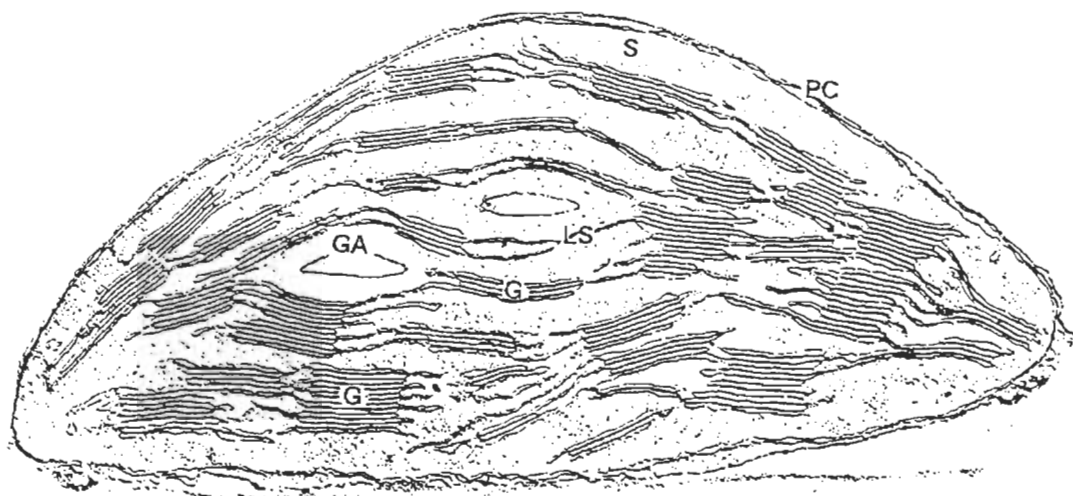


Figure 3 Photographie d'un chloroplaste d'une feuille d'avoine. G, granum; GA, grain d'amidon; LS, lamelle du stroma; PC, paroi cellulaire; S, stroma (D'après Salisbury and Ross, 1978).

Au niveau de la membrane interne, nous retrouvons premièrement des thylacoïdes, un organe en forme de sac aplati. Ceux-ci s'empilent les uns sur les autres

pour former des grana, qui sont reliés par les lamelles stromatiques. Nous pouvons regrouper les thylacoïdes et les lamelles stromatiques sous le nom de membrane photosynthétique puisque c'est à leur niveau que se produit l'absorption de la lumière. A la figure 4, nous présentons un schéma de cette membrane avec ses principales composantes. Les antennes collectrices absorbent la lumière et la transfèrent aux photosystèmes I et II (PS I et II). Au niveau du PS II, nous retrouvons le centre réactionnel P_{680} , formé d'une paire spéciale de chlorophylle *a* (chl *a*), site où se produit une séparation de charge. Un électron est injecté dans la chaîne de transport d'électrons, alors qu'un autre arrive

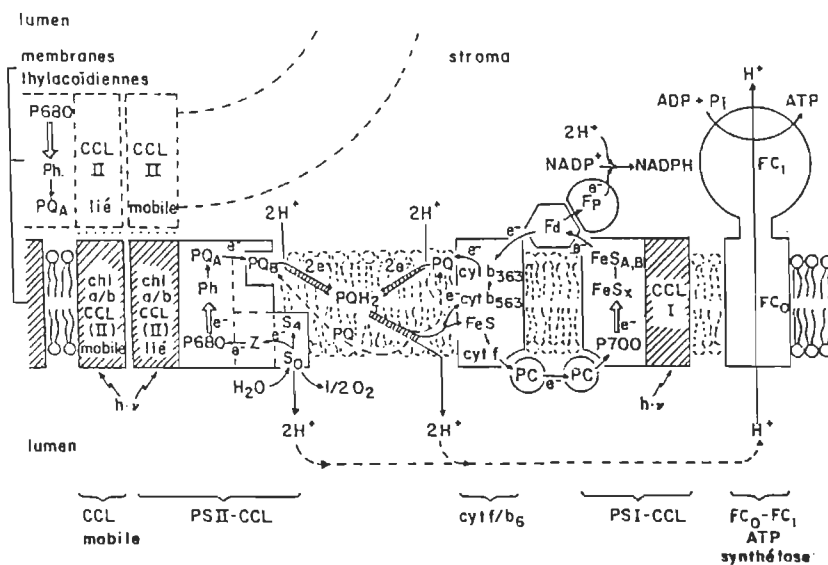


Figure 4 Schéma de la membrane photosynthétique (D'après Staehelin and Arntzen, 1983).

en provenance du site d'oxydation de l'eau et comble le trou laissé vacant au P_{680} . L'électron du PS II passe par différents accepteurs, pour arriver finalement au centre réactionnel du PS I (P_{700}). Pendant le transfert d'un électron dans la membrane, des protons entrent dans le lumen. Une séparation de charge se produit aussi au niveau du P_{700} et d'autres accepteurs transportent cet électron, qui va finalement servir pour la production du NADPH. Les protons présents dans le lumen sortent des thylacoïdes en passant par le facteur de couplage ATP synthétase et participent à la transformation de l'ADP en ATP. La plante utilise l'ATP et le NADPH avec du gaz carbonique pour produire les sucres. Cette transformation s'effectue au cours de diverses réactions thermiques lors de la phase indépendante à la lumière de la photosynthèse.

2) PROCESSUS DE DESEXCITATION DE LA CHLOROPHYLLE *a*

Nous savons que la photosynthèse débute par l'absorption de lumière par les molécules de chl *a* et les pigments accessoires. Les chlorophylles vont passer de leur état fondamental (S_0) vers des états excités supérieurs (S_n). Par la suite, il existe plusieurs voies

de désexcitation. A la figure 5, nous voyons les quatre principaux modes de désexcitation pour la chl *a in vivo*. Premièrement, la désexcitation non-radiative représente la perte de l'énergie par une production de chaleur à partir des différents états énergétiques singu-

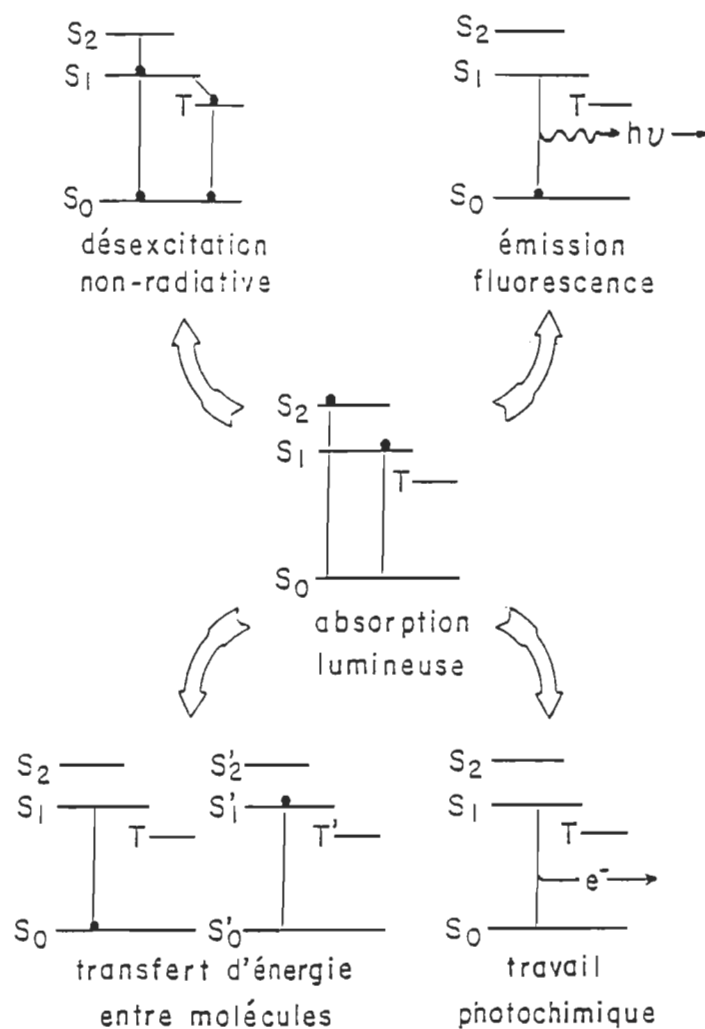


Figure 5 Principaux modes de désexcitation de la chlorophylle *a in vivo*.

lets (S_n) et triplets (T) de la molécule. Deuxièmement, lorsque l'électron passe du niveau S_1 au niveau S_0 , il peut se produire une émission de lumière, comme la fluorescence. Pour la chl *a in vivo*, nous considérons que l'émission de fluorescence est négligeable face aux autres modes de désexcitation, soit de l'ordre du pourcent (Malkin and Cahen, 1979). Une troisième voie possible consiste dans le transfert d'énergie entre les différentes molécules. Ce transfert se fait soit vers des pigments accessoires (p. ex. les caroténoïdes), soit vers d'autres molécules de chl. Le principal transfert d'énergie se produit dans les antennes collectrices de lumière, entre les molécules de chl *a*. Suite au transfert, les chl peuvent perdre leur énergie par un mode de désexcitation déjà mentionné. Le quatrième mode de désexcitation se produit uniquement au centre réactionnel. De là la paire spéciale de chl *a* émet un électron, que la plante utilise pour le travail photochimique.

Nous considérons que nous pouvons négliger l'émission de fluorescence et le transfert d'énergie entre les molécules. Il reste donc deux choix possibles aux chl *a* pour réémettre leur énergie suite à l'absorption de la lumière. Ces choix consistent en un dégagement de chaleur ou en une production d'un travail photochimi-

que. La désexcitation non-radiative et le travail photochimique entrent en compétition pour l'utilisation de l'énergie absorbée.

Pour mieux comprendre les mécanismes qui régissent la photosynthèse, plusieurs méthodes expérimentales ont été employées jusqu'à maintenant. Des méthodes aussi simples que la mesure du poids sec servent à connaître le rendement d'une plante face à un stress (Jolliffe and Hoddinott, 1988). Nous employons également l'étude de la fixation du CO_2 (Lange *et al.*, 1987) et la formation de l' O_2 (Delieu and Walker, 1981), pour estimer l'activité photosynthétique. L'étude des cinétiques de fluorescence de la chl *a* nous renseigne, pour sa part, sur les différents états transitoires de la photosynthèse (Papageorgiou, 1975). En mesurant la désexcitation non-radiative et le travail photochimique, nous aurons un aperçu de l'utilisation de l'énergie lors de l'étape primaire de la photosynthèse. Au cours des dernières années, différentes techniques expérimentales furent mises au point afin de mesurer ces deux processus. Ainsi, Schreiber *et al.* (1986) ont utilisé un fluorimètre modulé, pour discerner entre l'atténuation photochimique et non photochimique de la fluorescence de la chl *a*. Il existe également plusieurs méthodes photothermiques, qui discernent entre le dégagement de

chaleur et les réactions photochimiques. La section suivante présente un aperçu de ces méthodes et quelques unes de leurs applications.

B) LES METHODES PHOTOTHERMIQUES

Premièrement, nous allons définir ce que nous entendons par méthodes photothermiques. Pour nous, photothermique signifie un phénomène de génération de chaleur qui se produit suite à l'absorption de photons. Toutes ces techniques emploient à l'excitation une lumière modulée ou des impulsions. Ce qui diffère d'une méthode à l'autre, c'est le mode de détection de cette chaleur. A la figure 6, nous présentons un résumé de la génération et de la détection des effets photothermiques. Nous utilisons un mode de détection spécifique pour les différents phénomènes (onde sonore, déformation de surface, ...), créés par une désexcitation non-radiative. Nous allons maintenant présenter les divers modes de détection, ainsi que leur principale utilisation.

Les transducteurs pyroélectriques doivent être attachés à l'échantillon et ils servent à l'étude de films minces. Les transducteurs pyroélectriques agissent comme un calorimètre ou un thermomètre et mesurent directement les change-

ments de température de l'échantillon (Coufal, 1986 b). Coufal (1984 b) démontre qu'avec un tel mode de détection, nous mesurons un spectre avec l'angle de phase du signal, pour un échantillon d'une épaisseur inférieure à une monocouche. Pour leur part Tanaka *et al.* (1986) utilisent un tel mode de détection pour déterminer le coefficient d'absorption d'un film d'As₂S₃. Les détecteurs pyroélectriques sont un outil efficace pour l'étude de films minces (Coufal, 1984 a; Tanaka, 1987).

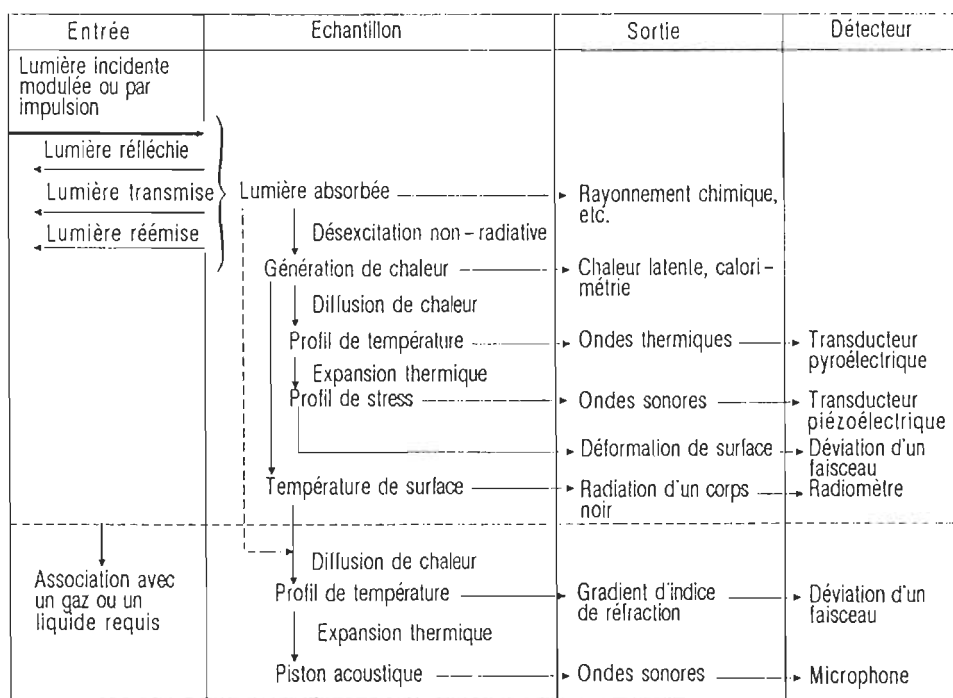


Figure 6 Résumé de la génération et de la détection de divers effets photothermiques (D'après Coufal, 1986 a).

Les transducteurs piézoélectriques doivent également être attachés à l'échantillon et ils mesurent les ondes sonores formées suite à l'expansion thermique de l'échantillon. Pour l'étude de matériaux condensés, nous utilisons préférentiellement ces transducteurs par rapport aux microphones (Tam, 1986) dû à leur résolution dans le temps de l'ordre de 10 ns (Coufal, 1984 a). A titre d'application, les détecteurs piézoélectriques peuvent servir pour obtenir l'image de la structure de surface d'un solide (Wetsel *et al.*, 1985) et pour mesurer l'absorption optique de fluides (Tam and Patel, 1979).

Il existe deux modes de détection qui utilisent la déviation d'un faisceau. Le premier mode consiste à aligner un faisceau laser à angle sur l'échantillon, pour qu'il soit réfléchi sur sa surface avant d'atteindre un détecteur. Ainsi, suite à l'absorption de la lumière d'excitation, il se produit une déformation au niveau de la surface de l'échantillon, ce qui dévie le faisceau sonde. Olmstead and Amer (1984) emploient cette méthode pour mesurer à partir de l'absorption optique, l'état de surface d'un semiconducteur.

La radiométrie photothermique utilise, pour sa part, une cellule photoélectrique dans l'infra-rouge lointain pour mesurer le dégagement de chaleur de l'échantillon. A l'aide

de cette technique, Nakamura *et al.* (1985) ont construit un microscope qui permet d'observer les micro-défectuosités des semiconducteurs. Tam and Sontag (1986) nous montrent une autre application lorsqu'ils étudient l'épaisseur d'un interstice entre un film opaque et un substrat. Cette technique non destructive sert à caractériser la force des liens d'adhésion d'un matériel formé de plusieurs couches.

Pour le deuxième mode de détection basé sur la déviation d'un faisceau, nous plaçons un laser juste au-dessus de la surface de l'échantillon. Cette fois, nous détectons, suite à l'absorption de la lumière d'excitation, la formation d'un gradient d'indice de réfraction causé par la chaleur dégagée de l'échantillon. La spectroscopie par déviation photothermique ou par effet mirage (EM) s'emploie avec plusieurs types d'échantillons, tels les matériaux stratifiés (Cielo *et al.*, 1986); les ions incorporés en faibles quantités dans des milieux aqueux (De Paula and Aegerter, 1986), ou solides (Field *et al.*, 1985); les films minces (Frosio *et al.*, 1986). Cette méthode requiert un alignement précis du laser par rapport à l'échantillon, qui doit être très plat.

Un microphone détecte les ondes sonores provoquées par la formation d'un piston acoustique dans une cellule. Suite à l'absorption d'une lumière modulée, un échantillon émet de

la chaleur. Le changement de température crée une variation de pression, ce qui cause la formation d'un piston acoustique. La spectroscopie photoacoustique (PA) a été largement utilisée pour plusieurs types d'échantillons. Ce qui a permis d'étudier entre autres des échantillons biologiques, (Boucher *et al.*, 1986), des cristaux (Dioszeghy and Mandelis, 1986), des solides (Kirkbright *et al.*, 1984) et des cristaux liquides (Louis *et al.*, 1985). Des spectrophotomètres PA ont aussi été adaptés (Boucher and Leblanc, 1981; Ikari *et al.*, 1984) pour permettre des mesures à basse température.

Nous pouvons noter que les méthodes photothermiques servent pour l'étude d'une grande variété d'échantillons. Comme nous nous intéressons principalement à la photosynthèse, nous allons regarder de quelle façon ces techniques ont été utilisées pour son étude.

C) APPLICATION DES METHODES PHOTOTHERMIQUES A L'ETUDE DE LA PHOTOSYNTHESE.

Nous avons dit précédemment que les méthodes photothermiques permettent de discerner entre la désexcitation non-radiative et le travail photochimique d'un échantillon, ce

qui nous permet de mesurer l'emmagasinement d'énergie photochimique (EEP). Pour faire une telle mesure, nous avons besoin d'une lumière actinique dont le rôle consiste à saturer la photosynthèse. A la figure 7, nous avons un schéma de la méthode de mesure de l'EEP. Premièrement, nous éclairons l'échantillon avec une lumière modulée, ce qui nous donne un certain niveau de signal (Q_m). Ensuite, nous allumons la lumière actinique, ce qui cause une augmentation du signal mesuré jusqu'à un niveau (Q_{ma}). A ce point, la photosynthèse est saturée par la lumière actinique et l'échantillon réémet toute l'énergie de la lumière modulée absorbée sous la forme d'un dégagement de chaleur.

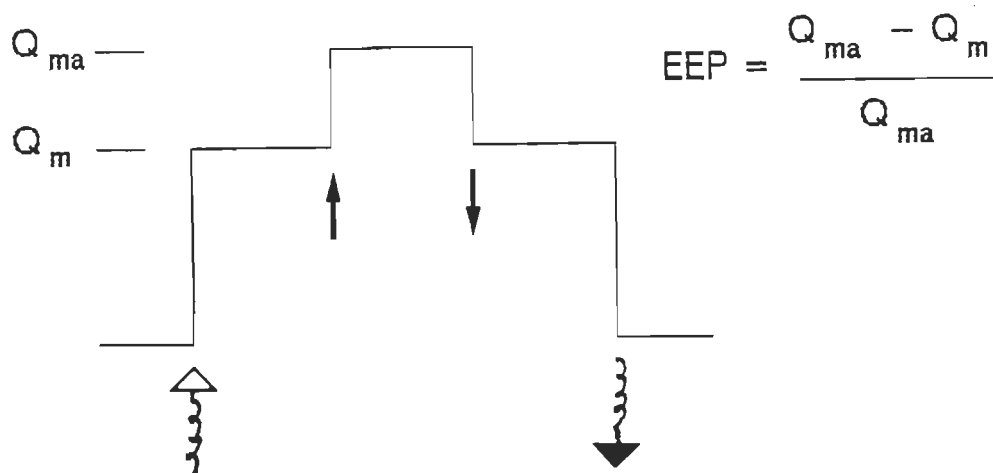


Figure 7 Schéma du mode de calcul de l'emmagasinement d'énergie photochimique (EEP). Lumière modulée allumée (\triangle) et éteinte (∇); lumière actinique allumée (\uparrow) et éteinte (\downarrow).

Des mesures d'EEP ont été faites en spectroscopie PA (Bults *et al.*, 1981) et en radiométrie photothermique (Kanstad *et al.*, 1983). A la figure 8, nous avons les signaux simultanés en spectroscopie PA et en radiométrie photothermi-

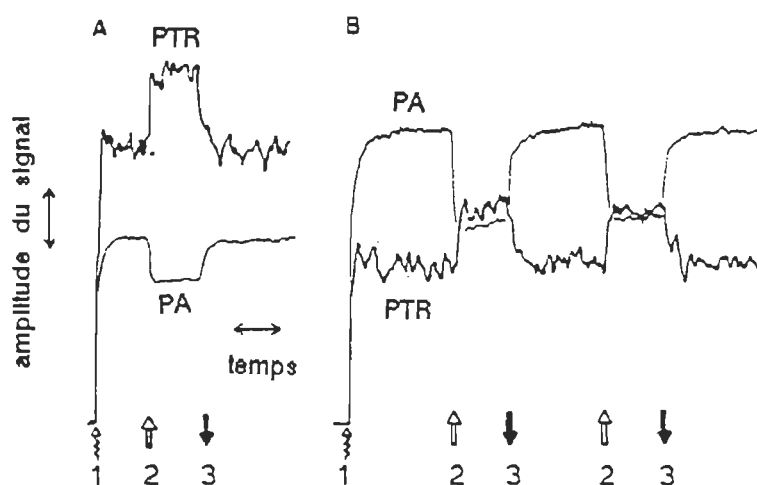


Figure 8 Tracés typiques obtenus simultanément en spectroscopie photoacoustique (PA) et en radiométrie photothermique (PTR) à basse fréquence de modulation (23 Hz). A) Pois sibérien. B) Blé. Flèche 1, lumière modulée allumée; flèches 2 et 3, faisceau actinique allumé et éteint respectivement. Echelle de temps, 2 minutes; échelle du signal, 20 μ V pour le PTR, 50 μ V pour le signal PA en A et 25 μ V en B. Lumière modulée, $\lambda = 570-660$ nm, $I_0 = 25$ W/m²; faisceau actinique, $\lambda < 720$ nm, $I_0 = 225$ W/m² (D'après Kanstad *et al.*, 1983).

que de feuilles de pois et de blé à basse fréquence de modulation. Suite à l'application de la lumière actinique, les deux techniques donnent des réponses différentes. Une hypothèse voudrait, qu'en PA, le dégagement d'oxygène par l'échantillon contribue au signal à basse fréquence de modulation. Alors qu'à haute fréquence de modulation (p. ex. 300 Hz), l'oxygène n'aurait pas le temps de diffuser pour participer au signal. Comme, à haute fréquence de modulation, l'EEP obtenu en radiométrie photothermique, correspond à celui mesuré en spectroscopie PA, l'hypothèse de la participation de l'oxygène au signal en PA serait bonne (Kansstad *et al.*, 1983). Nous pouvons estimer en PA de manière scalaire (figure 9), avec la valeur de l'EEP, quelle portion du signal PA, à basse fréquence de modulation, provient du dégagement de l'oxygène.

Si nous regardons la figure 8, nous remarquons que le signal mesuré en radiométrie photothermique est plus bruyant que celui mesuré en PA. De plus, le faible rapport signal sur bruit, nous restreint à travailler à basse fréquence de modulation. Le seul avantage de la technique radiométrique réside dans le fait que nous mesurons plus facilement l'EEP.

Il existe une autre méthode pour séparer les composantes d'EEP et du dégagement d'oxygène du signal PA d'une

feuille. C'est la méthode vectorielle mise au point par Poulet *et al.* (1983). Les désavantages de cette technique font que la détermination de l'oxygène est réalisée sur une base relative et qu'une partie des mesures doivent se prendre à haute fréquence de modulation où le signal est plus bruyant.

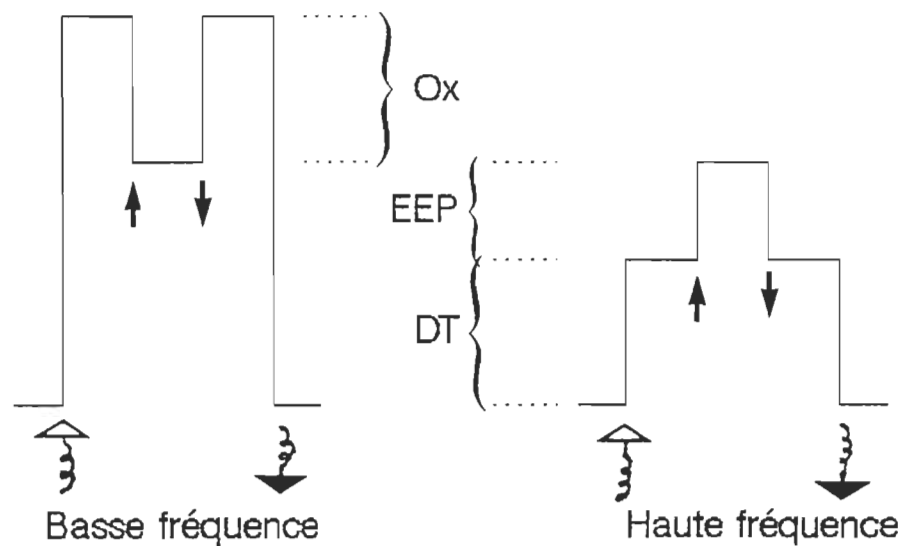


Figure 9 Schéma de la méthode scalaire de calcul du dégagement d'oxygène (Ox), de l'emmagasinement d'énergie photochimique (EEP) et du dégagement thermique (DT). Lumière modulée allumée (\uparrow) et éteinte (\downarrow); lumière actinique allumée (\uparrow) et éteinte (\downarrow).

Avec les méthodes de calculs scalaire et vectorielle, le rendement quantique du dégagement d'oxygène et l'EEP ont été mesurés pour plusieurs types d'échantillons. Jusqu'à maintenant, il a été possible de travailler avec des PS I

(Carpentier *et al.*, 1986), des PS II (Carpentier *et al.*, 1985), des chloroplastes (Lasser-Ross *et al.*, 1980), des algues (Carpentier *et al.*, 1984; Yamagishi and Katoh, 1984) et des feuilles (Bults *et al.*, 1981; Larue *et al.*, 1985).

Nous pouvons également en balayant les longueurs d'onde obtenir des spectres d'action photosynthétique. Lorsque la lumière absorbée ne sert pas lors de processus photochimiques, les spectres d'excitation photothermique sont similaires aux spectres d'absorption (Malkin and Cahen, 1979). Le spectre obtenu d'un échantillon actif diffère donc de celui d'un échantillon inactif. Nous inactivons l'échantillon en bloquant la photosynthèse avec un inhibiteur ou à l'aide de la lumière actinique. O'Hara *et al.* (1983) mesurent ainsi le spectre d'absorption d'un lichen et, en variant l'angle de phase, ils obtiennent un profil de profondeur. Nous pouvons travailler avec des photosystèmes (Camm *et al.*, 1988), des échantillons natifs (Carpentier *et al.*, 1983) ou immobilisés (Thomasset *et al.*, 1982). L'immobilisation des échantillons nous permet de travailler avec une lumière polarisée, ce qui nous renseigne sur l'orientation des pigments dans les membranes des algues (Frackowiak *et al.*, 1986) et des plantes (Frackowiak *et al.*, 1985; Lorrain *et al.*, 1987).

De Paula *et al.*, (1987) ont mis au point une cellule photothermique ouverte afin de prendre des mesures avec des

feuilles rattachées à la plante. Cependant, si nous comparons les spectres de feuilles reliées et détachées d'une plante, ils sont semblables avec un bon rapport signal sur bruit. Donc, il ne serait pas nécessaire de travailler sur des plantes entières. Les mesures prises avec ce nouveau spectrophotomètre, comparées avec celles obtenues à l'aide d'une cellule PA, ont un rapport signal sur bruit inférieur de l'ordre de 1/2.4. L'appareil qui nous est présenté est un prototype. Les auteurs espèrent pouvoir augmenter la sensibilité en travaillant avec d'autres transducteurs piézoélectriques.

La spectroscopie PA sert également à l'étude de l'effet Emerson, ce qui nous renseigne sur les états de transition des photosystèmes (Canaani *et al.*, 1982). Pour en connaître davantage sur les applications de la spectroscopie PA, pour l'étude de la photosynthèse, nous pouvons nous référer aux récentes revues de littérature (Braslavsky, 1986; Buschmann, 1989).

D) OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Afin de mieux comprendre les étapes primaires de la photosynthèse, il faut pouvoir mesurer les processus de dés-

excitation non-radiative et photochimique. Il existe présentement des techniques qui nous le permettent.

D'après la théorie établie par Schreiber *et al.* (1986), le fluorimètre à amplitude modulée pulsée ou PAM devrait nous permettre de différencier entre l'atténuation photochimique et non photochimique de la fluorescence de la chl *a* du PS II. Mais les mesures s'effectuent à 700 nm et plus, où le PS II et le PS I contribuent au signal. Comme la théorie sur laquelle se base la technique considère uniquement le PS II, nous pouvons douter de l'interprétation des résultats obtenus par cette technique.

Parmi les appareils photothermiques déjà utilisés en photosynthèse, le radiomètre et le transducteur piézoélectrique sont désavantagés comparativement au microphone à cause de leur faible rapport signal sur bruit. De loin, c'est la spectroscopie PA, qui fut la plus employée. Puisque cette technique détecte le dégagement ou la consommation de gaz, ceci interfère avec la production de chaleur mesurée pour un échantillon photosynthétique. Bien que le dégagement de l'oxygène puisse fournir des renseignements supplémentaires, cela complique l'interprétation des résultats. Pour avoir l'emmagasinement d'énergie photochimique, nous ne devons pas mesurer le dégagement de l'oxygène. Il faut donc travailler à haute fréquence de modulation, où le rapport si-

gnal sur bruit est plus faible. De plus, la cellule PA a un volume restreint, et les mesures s'effectuent donc dans des conditions limites du système photosynthétique, puisque l'échantillon se retrouve au point de compensation du CO_2 . Un autre désavantage de la technique, c'est l'obligation de travailler dans un milieu sec. Ainsi les algues, les chloroplastes, les thylacoïdes et les photosystèmes doivent être soit déposés sur un filtre, ce qui diminue leur durée de vie, soit immobilisés, ce qui réduit leur activité.

Nous devons pallier aux désavantages des techniques déjà existantes pour la mesure du dégagement thermique et de l'EEP. Le but de notre recherche consiste à adapter un spectrophotomètre par EM, pour permettre de travailler avec différents échantillons photosynthétiques tels que les systèmes modèles comme des monocouches de chl *a* ou les échantillons biologiques comme des chloroplastes, des algues ou des feuilles.

Nous nous attendons à mesurer l'EEP à basse fréquence de modulation avec la spectroscopie par EM, de la même façon qu'en spectroscopie PA à haute fréquence de modulation. De plus, la technique nous permet, en plus de travailler en milieu gazeux, de prendre des mesures en milieu aqueux. Ceci constitue un avantage lorsque nous étudions des chloroplastes ou des algues. De plus, le volume d'une cellule d'un

spectrophotomètre par EM est plus grand que celui d'une cellule PA. Ainsi, les mesures ne s'effectuent pas au point de compensation du CO_2 . L'adaptation de cette nouvelle technique à l'étude d'échantillons photosynthétiques devrait nous permettre d'augmenter nos connaissances sur la photosynthèse.

CHAPITRE II

SPECTROSCOPIE PAR EFFET MIRAGE

Le mirage est un phénomène optique, qui consiste en la production d'une image inversée à partir d'un objet éloigné. Nous rencontrons un tel phénomène, lorsque nous nous promenons sur les routes par une belle journée ensoleillée. En effet, qui n'a pas déjà observé la présence d'eau au loin sur la route. Cette eau, qui a l'habitude de disparaître, lorsque nous nous en approchons, c'est un mirage. Un exemple plus classique du mirage, est celui du voyageur perdu dans le désert, qui aperçoit une oasis au loin. Mais quand il s'en approche, l'image disparaît et le voyageur se retrouve seul face à l'immensité du désert.

A la figure 10, nous présentons un schéma d'un tel mirage. Le soleil émet de la lumière. Le sable en absorbe une partie et réémet son énergie sous forme d'un dégagement de chaleur. Ceci crée une augmentation de la température de l'air au-dessus du sol, ce qui provoque la formation d'un gradient d'indice de réfraction. La lumière se propage, de manière rectiligne dans un milieu d'indice de réfraction constant. Lorsqu'un rayon lumineux, en provenance d'un ob-

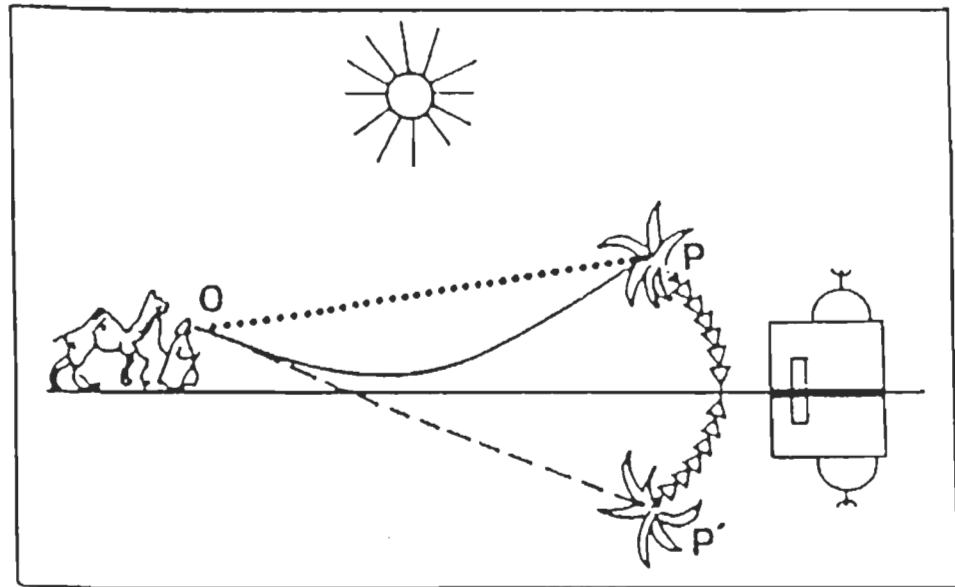


Figure 10 Schéma du principe d'un mirage (Tiré de Badoz *et al.*, 1983).

jet (P), traverse un gradient d'indice de réfraction, il se courbe. Par la suite, le rayon atteint un observateur (O). Mais, puisque l'homme est habitué à une propagation linéaire de la lumière, l'observateur va croire que l'objet se situe en P'.

A) THEORIE

Par analogie au mirage, nous voyons à la figure 11 le principe de base d'un spectrophotomètre par EM. Une lumière modulée remplace le soleil. Un échantillon absorbe la lumière

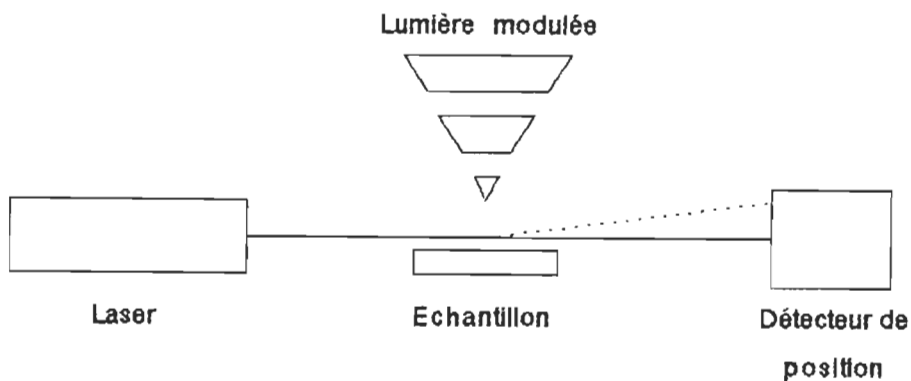


Figure 11 Principe de base d'un spectrophotomètre par effet mirage; parcours normal (—) et dévié (.....) du faisceau laser.

re et il réémet une partie de l'énergie sous la forme d'une émission de chaleur modulée. Ceci crée un changement dans l'indice de réfraction de l'air au-dessus de l'échantillon. Lorsqu'un faisceau laser traverse cette région, il dévie de son parcours normal. La déviation du faisceau se mesure à l'aide d'un détecteur de position, qui envoie le signal à un amplificateur à verrouillage de phase.

Pour construire un spectrophotomètre par EM, aussi appelé spectrophotomètre photothermique à déviation de faisceau, nous pouvons choisir différentes configurations possibles. Les principales sont, premièrement la configuration transverse pour laquelle le faisceau laser arrive perpendiculairement à la largeur de l'échantillon et la lumière modulée éclaire l'échantillon par le haut. Deuxièmement, la

configuration colinéaire où la lumière modulée provient d'un faisceau laser, afin d'avoir une bonne focalisation, et passe au-dessus de l'échantillon comme le faisceau laser sonde. De plus entre les lasers modulé et de mesure, nous retrouvons un angle le plus petit possible afin de maximiser le signal. Dans tous les cas, le principe de base est le même.

Selon Boccara *et al.* (1980 a), la déflexion (ϕ) du faisceau laser correspond à :

$$\phi = \frac{l}{n} \frac{\delta n}{\delta T} \frac{\delta T}{\delta x} \quad (1)$$

où l représente le chemin d'interaction qui est défini comme la distance parcourue par le faisceau laser sonde dans le milieu ayant un gradient de température ($\delta T/\delta x$), gradient dû à la dissipation modulée de chaleur par l'échantillon, et l'indice de réfraction du milieu (n). Nous définissons x comme la distance entre la surface de l'échantillon et le point de référence dans le milieu environnant. Cette distance est mesurée perpendiculairement à la surface de l'échantillon. La valeur de $(1/n \cdot \delta n/\delta T)$ varie en fonction de la température du fluide (Boccara *et al.*, 1980 a) et dépend également de sa nature. Au tableau 1, nous retrouvons les valeurs de $(1/n \cdot \delta n/\delta T)$ pour différents milieux. A partir de l'équation (1), nous pouvons voir que pour un même gradient

de température, avec un $(1/n \cdot \delta n / \delta T)$ supérieur, la déviation du faisceau laser sera plus importante. Si nous travaillons dans le CCl_4 , nous nous attendons à mesurer des gradients de température plus faibles comparativement à ceux estimés dans l'air. Cependant, il n'est pas recommandable de travailler dans du CCl_4 avec des échantillons biologiques. Par contre, l'utilisation de l'eau va être plus avantageuse que celle de l'air, à cause de leurs $(1/n \cdot \delta n / \delta T)$ respectifs.

Milieu	$1/n \cdot \delta n / \delta T$
Air	10^{-6}
H_2O	10^{-4}
CCl_4	5×10^{-4}

Tableau 1 Valeurs de $(1/n \cdot \delta n / \delta T)$ pour trois milieux.

Le gradient de température dépend de l'échauffement modulé créé suite à l'absorption lumineuse et de la diffusion de la chaleur dans l'échantillon. Nous retrouvons dans la littérature plusieurs théories émises pour un échantillon homogène. Certaines s'utilisent spécifiquement pour l'étude de certains échantillons, comme la matière condensée (McDonald and Wetsel, 1988) ou les semiconducteurs (Fournier and Boccara, 1987; Tanaka, 1987). Alors que d'autres théories

(Murphy and Aamodt, 1980; Jackson *et al.*, 1981; Lepoutre et Roger, 1987), diffèrent par la configuration du spectrophotomètre utilisé. Pour établir leur théorie, les auteurs se basent sur l'équation de diffusion de chaleur et sur la théorie démontrée par Rosencwaig and Gersho (1976), pour la spectroscopie PA. Les principales différences entre les méthodes d'EM et de PA consistent premièrement en une résolution de l'équation de diffusion de la chaleur monodimensionnelle en PA et tridimensionnelle en EM. Deuxièmement l'EM consiste en une technique purement thermique, alors que la PA mesure également une déformation acoustique de l'échantillon (Lepoutre, 1987).

Nous n'étudierons pas en détail une théorie, car jusqu'à maintenant, les théories s'appliquent à l'étude d'échantillons homogènes et nous travaillons avec des substrats hétérogènes. Cependant il faut savoir que le gradient de température formé dans l'échantillon après l'absorption de la lumière modulée dépend des coefficients d'absorption optique (β) et de diffusion thermique, (a_s). Avec l'inverse des coefficients, nous obtenons les longueurs d'absorption optique ($u_\beta = 1/\beta$) et de diffusion thermique ($u_s = 1/a_s$). A la figure 12, nous présentons un schéma du processus de génération d'un signal photothermique. Nous notons que le signal provient de la région de l'échantillon où l'absorption de la lumière et la diffusion de chaleur se produisent. Le

rapport qui existe entre les longueurs d'absorption optique et de diffusion thermique joue un rôle important sur la génération du signal.

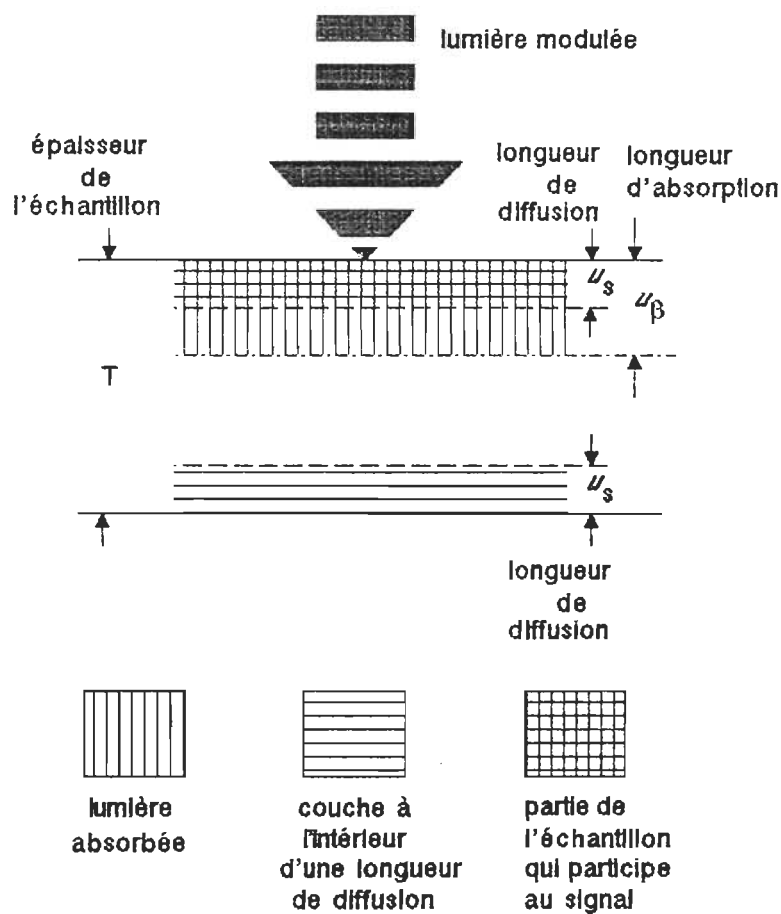


Figure 12 Schéma du processus de génération d'un signal photothermique dans un échantillon homogène (D'après Coufal and McClelland, 1988).

Le coefficient d'absorption optique dépend de la longueur d'onde de la lumière. Ceci nous permet d'obtenir le

spectre d'un échantillon, à condition que la longueur de diffusion thermique soit inférieure à la longueur d'absorption optique, $u_s < u_\beta$. Donc, en théorie la spectroscopie par EM, nous permet d'obtenir des spectres de substrats opaques.

Pour sa part la longueur de diffusion thermique dépend de la fréquence de modulation (f) de la lumière, puisque:

$$u_s = \frac{1}{a_s} = \left(\frac{2k}{\omega \rho c} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

où ω représente la fréquence angulaire ($\omega = 2\pi f$); donc à partir de (2), nous avons:

$$u_s = \left(\frac{k}{\pi \rho c f} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

où k correspond à la conductivité thermique, ρ à la densité et c à la chaleur spécifique de l'échantillon. Ainsi à basse fréquence de modulation, l'amplitude du signal mesuré est supérieure à celle obtenue à haute fréquence (figure 13), puisque l'onde thermique provient d'une épaisseur plus importante dans le substrat. Si nous mesurons des spectres à différentes fréquences de modulation, ceci nous permet d'obtenir des profils de profondeur de l'échantillon.

Comme nous pouvons le voir à la figure 13, le signal varie également en fonction de la distance laser-échantillon; en effet le signal décroît lorsque le laser s'éloigne de l'échantillon.

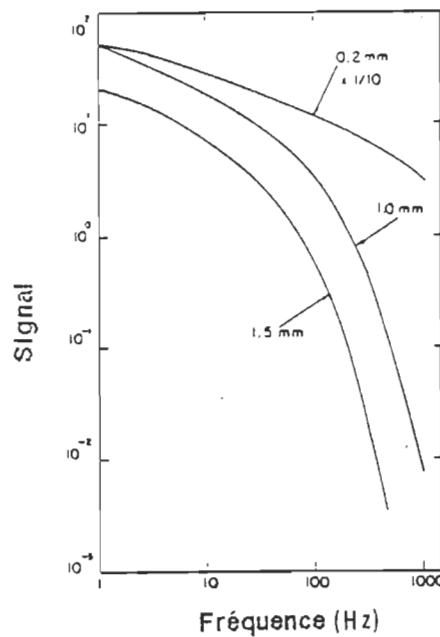


Figure 13 Calcul théorique de la variation du signal photothermique en fonction de la fréquence, pour différentes distances laser-échantillon (D'après Jackson *et al.*, 1981).

L'alignement qui existe entre le faisceau sonde et l'échantillon joue un rôle important sur le signal mesuré. De plus, le substrat doit être relativement plat et glabre,

afin que rien n'intervienne avec le faisceau laser. Si un obstacle dévie le faisceau laser, cela influence la distance laser-échantillon, mais également ,dont dépend le signal mesuré (voir équation 1),tels que présentés à la figure 14.

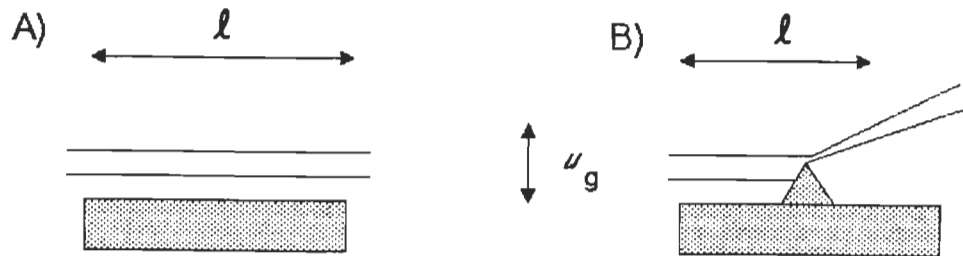


Figure 14 Schéma du chemin d'interaction entre le laser (\equiv) et l'échantillon (\blacksquare) pour: A) un échantillon plat; B) un échantillon non uniforme. u_g , longueur de diffusion thermique dans le fluide.

Plusieurs paramètres influencent la génération du signal en spectroscopie par EM. Premièrement, il y a la fréquence de modulation, qui est inversement proportionnelle à la longueur de diffusion thermique. Un autre paramètre important est la distance entre le faisceau sonde et l'échantillon. Maintenant, regardons à quels genres d'étude sert la spectroscopie par EM.

B) APPLICATIONS

L'EM s'utilise premièrement pour l'étude spectroscopique de différents échantillons. Les spectres d'EM se comparent à ceux obtenus par les méthodes traditionnelles (figure 15). Ceci est vrai tant que nous nous retrouvons dans des conditions optiques non saturantes. Pour réaliser ces conditions, il faut que la longueur de diffusion thermique soit inférieure à la longueur d'absorption optique (Coufal and McClelland, 1988). Pour rester dans ces conditions, nous pouvons faire varier la fréquence de modulation, ce qui change la longueur de diffusion thermique, ou encore varier l'épaisseur de l'échantillon. L'EM nous offre l'opportunité d'analyser des matériaux difficiles à étudier avec d'autres méthodes connues, comme des films minces (Boccara *et al.*, 1980 b) et des poudres (Tamor and Hetrick, 1985; Varlashkin *et al.*, 1986 a).

L'équipe de M. J. D. Low (Low and Severdia, 1983; Low and Morterra, 1985; Varlashkin *et al.*, 1986 a et b) a adapté un spectrophotomètre infra-rouge à l'EM. Avec leur appareil, ces chercheurs obtiennent les spectres d'échantillons en poudre, diffusants ou opaques. De plus, ils sont les seuls à avoir étudié en EM des matériaux naturels (de l'ivoire, du

sur les échantillons photosynthétiques publiés dans le cadre de ce travail (Havaux *et al.*, 1989 et 1990; Lorrain *et al.*, 1990).

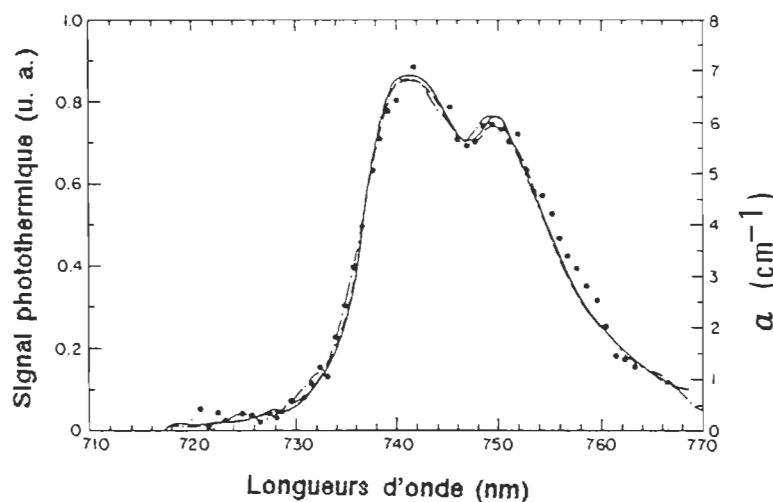


Figure 15 Spectres d'absorption du didynium obtenus avec un spectrophotomètre photothermique: par la déviation du faisceau sonde, à des pressions de $P = 0.1$ kPa (—) et $P = 2.6 \times 10^{-3}$ kPa (- - -); par un interféromètre (.....) et par la technique conventionnelle de transmission (◄-.-.->) (D'après Amer and Olmstead, 1983).

La spectroscopie par EM sert énormément à la caractérisation d'électrodes (Jackson and Amer, 1982; Asano *et al.*, 1986; Fournier *et al.*, 1986; Frosio *et al.*, 1986). La technique permet d'obtenir le spectre d'absorption (figure 16),

à partir duquel nous calculons l'énergie de Urbach et la densité de charge de l'électrode.

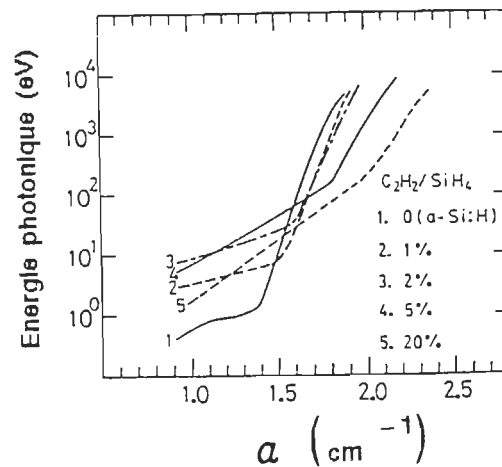


Figure 16 Spectres d'absorption de a-Si:H non dopé (1) et d'alliages de a-SiC:H (2-5) mesurés par effet mirage (D'après Asano *et al.*, 1986).

De plus, lors d'études électrochimiques, nous pouvons observer à l'interface électrode-électrolyte des échanges d'électrons (Merle *et al.*, 1983) ou encore la formation d'une couche mince (Roger *et al.*, 1983; Royce *et al.*, 1983). Lors de la formation d'une couche mince (figure 17), Roger *et al.* (1983) notent la production d'un gradient de concentration ionique, qui pourrait interférer avec le courant mesuré. Ils suggèrent alors l'utilisation d'un filtre électronique pour éliminer le signal qui provient du gradient de concentration. Pour leur part, Pawliszyn *et al.*, (1986) font plutôt une observation sélective du gradient de concentra-

tion afin d'obtenir des informations supplémentaires sur le système étudié.

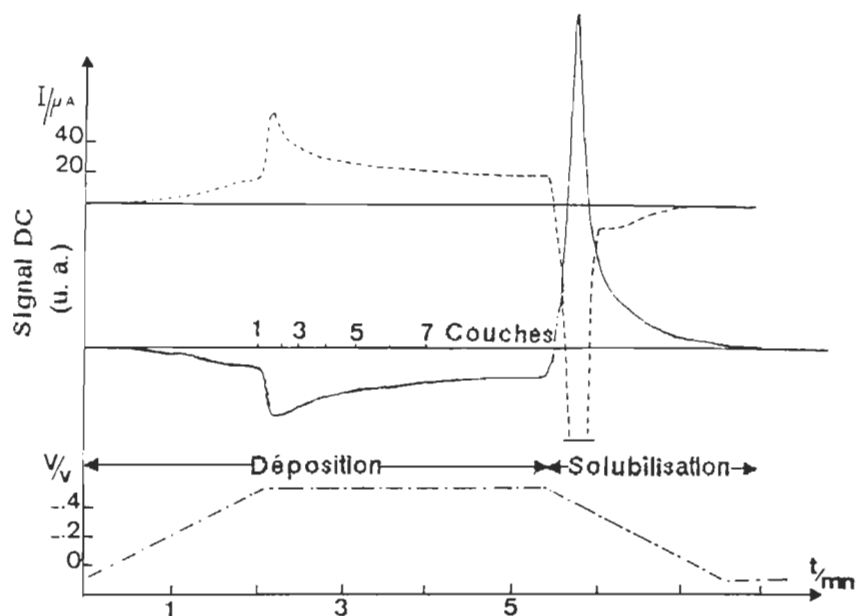


Figure 17 Potentiel (- · - · -), courant (-----) et signal DC du détecteur de position (——) en absence de lumière sur l'électrode (D'après Roger *et al.*, 1983).

Comme la méthode d'EM est très sensible, nous pouvons déterminer la concentration, de manière quantitative, d'éléments en solution aqueuse (De Paula and Aegerter, 1986; Uejima *et al.*, 1986) ou incorporés dans un gel de silice (Field *et al.*, 1985). A la figure 18, nous avons l'intensité du signal photothermique en fonction de la concentration en

Fe^{2+} . Nous remarquons une saturation du signal, aux fortes concentrations (figure 18 A). Par contre la relation est linéaire aux plus faibles concentrations (figure 18 B). Récemment, Fotiou and Morris (1986) ont adapté le densitomètre d'un chromatographe à couche mince pour utiliser comme mode de détection la déviation photothermique. L'appareil permet de mesurer une quantité aussi petite que 750 pg et le signal reste linéaire sur trois ordres de grandeur. La spectroscopie par EM s'applique donc facilement à l'analyse quantitative, mais il faut s'assurer que nous sommes dans des conditions non saturantes.

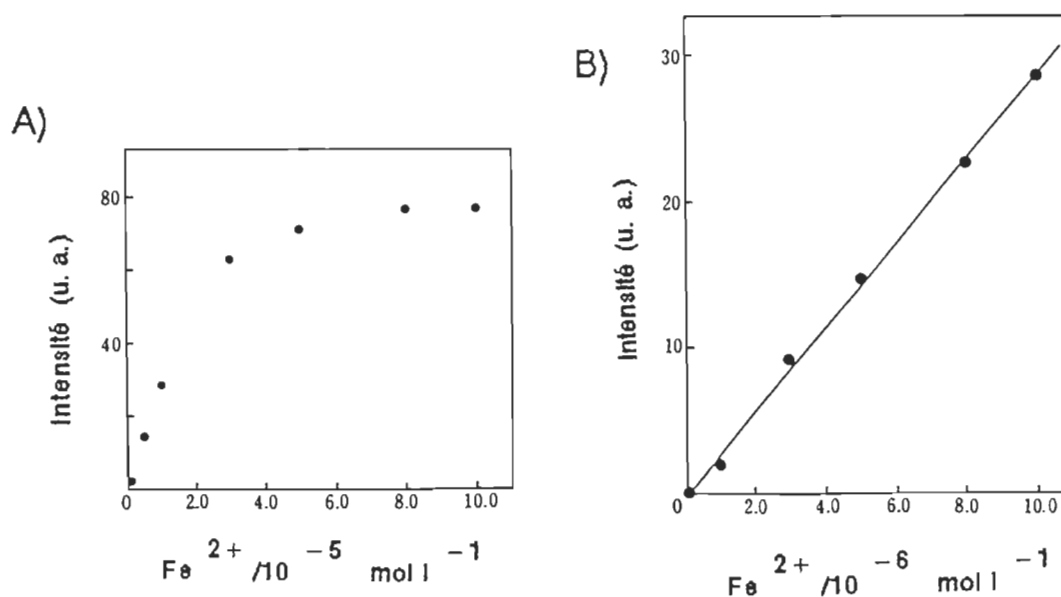


Figure 18 L'intensité du signal photothermique en fonction de la concentration en $\text{Fe}(\text{II})$.
 A) 10^{-4} à 10^{-6} mol/l B) 1 à 10×10^{-6} mol/l
 (D'après Uejima *et al.*, 1986).

Un autre domaine, où l'utilisation de l'EM est avantageuse, est l'évaluation du coefficient de diffusivité thermique de matériaux opaques. En effet, dans certaines conditions expérimentales, nous savons que le signal photothermique dépend de ce coefficient. Les résultats des expériences faites à partir d'échantillons métalliques (Rousset et Lepoutre, 1982; Kuo *et al.*, 1985; Gendre, 1987) se comparent facilement avec les données de la littérature (tableau 2).

Comme nous venons de le voir, la spectroscopie par EM sert pour plusieurs types d'études. Cependant, il faut bien choisir les conditions expérimentales selon le genre d'analyse à effectuer.

Echantillon	T (K)	Diffusivité thermique (en $10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)			
		obtenue	proposée	maximale	minimale
Nickel	320	$1,94 \pm 0,05$	2,20	2,25	1,50
	400	$1,68 \pm 0,02$	1,87	2,05	1,40
	500	$1,30 \pm 0,04$	1,56	1,60	1,20
Acier inoxydable 304	320	$0,446 \pm 0,006$	0,465	0,327
	400	$0,341 \pm 0,008$	0,423	0,343
	500	$0,348 \pm 0,003$	0,437	0,350
Cuivre	325	$11,5 \pm 0,1$	11,5	13,8	10,2
	400	$10,2 \pm 0,2$	11,1	13,0	10
	450	$10,0 \pm 0,2$	10,9	11,8	8
	500	$8,0 \pm 0,2$	10,7	11,6	7,9

Tableau 2 Comparaison entre les résultats expérimentaux et théoriques de la diffusivité thermique de divers métaux (Tiré de Gendre, 1987).

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODE

A) APPAREILS DE MESURE

Au cours de notre travail, nous prenons diverses mesures. Premièrement, en spectroscopie d'absorption, nous utilisons un Cary 17-D (Varian; Palo Alto, CA), automatisé avec un micro-ordinateur. De plus, nous nous servons du Fluorolog-2 (Spex; Metuchen, NJ) pour obtenir des spectres d'émission. Nous effectuons également des mesures avec un spectromètre PA, déjà décrit dans la littérature (Ducharme *et al.*, 1979; Carpentier *et al.*, 1983), à des fins de comparaison avec les mesures d'EM.

1) SPECTROMETRE PAR EFFET MIRAGE

Notre projet de recherche consiste à construire un spectromètre par EM et à l'adapter pour l'étude d'é-

chantillons photosynthétiques. A la figure 19, nous avons le schéma du spectromètre construit. Nous allons commencer par décrire les parties de l'appareil, qui tout au long du travail restent les mêmes. Une lampe à arc au xénon (Schoeffel Instrument Corp.; Westwood, NJ) émet de la lumière blanche, qui passe dans un monochromateur (Schoeffel Instrument Corp.; Westwood, NJ). Au niveau du monochromateur, un moteur contrôle automatiquement la vitesse de balayage à l'aide d'une boîte de contrôle reliée à un ordinateur (Apple IIe; Cupertino, CA). La lumière monochromatique se module à l'aide d'un disque à deux, cinq ou dix fentes. Nous choisissons la fréquence de modulation avec le régulateur (Scitec Instrument; Hampshire, UK) dont le signal est envoyé au fréquence mètre intégré dans l'amplificateur. Nous focalisons la lumière modulée sur l'échantillon avec une lentille (L) et un miroir (M). Lors de la mesure de spectres, un filtre passe haut (F) s'ajuste automatiquement, grâce à la boîte de contrôle, aux longueurs d'onde supérieures à 500 nm.

Pour les mesures d'activités photosynthétiques, nous utilisons une lampe halogène de 150-W, dont la lumière blanche intense est acheminée par une fibre optique. Cette lumière actinique sature la photosynthèse, ce qui nous permet d'évaluer la portion de la lu-

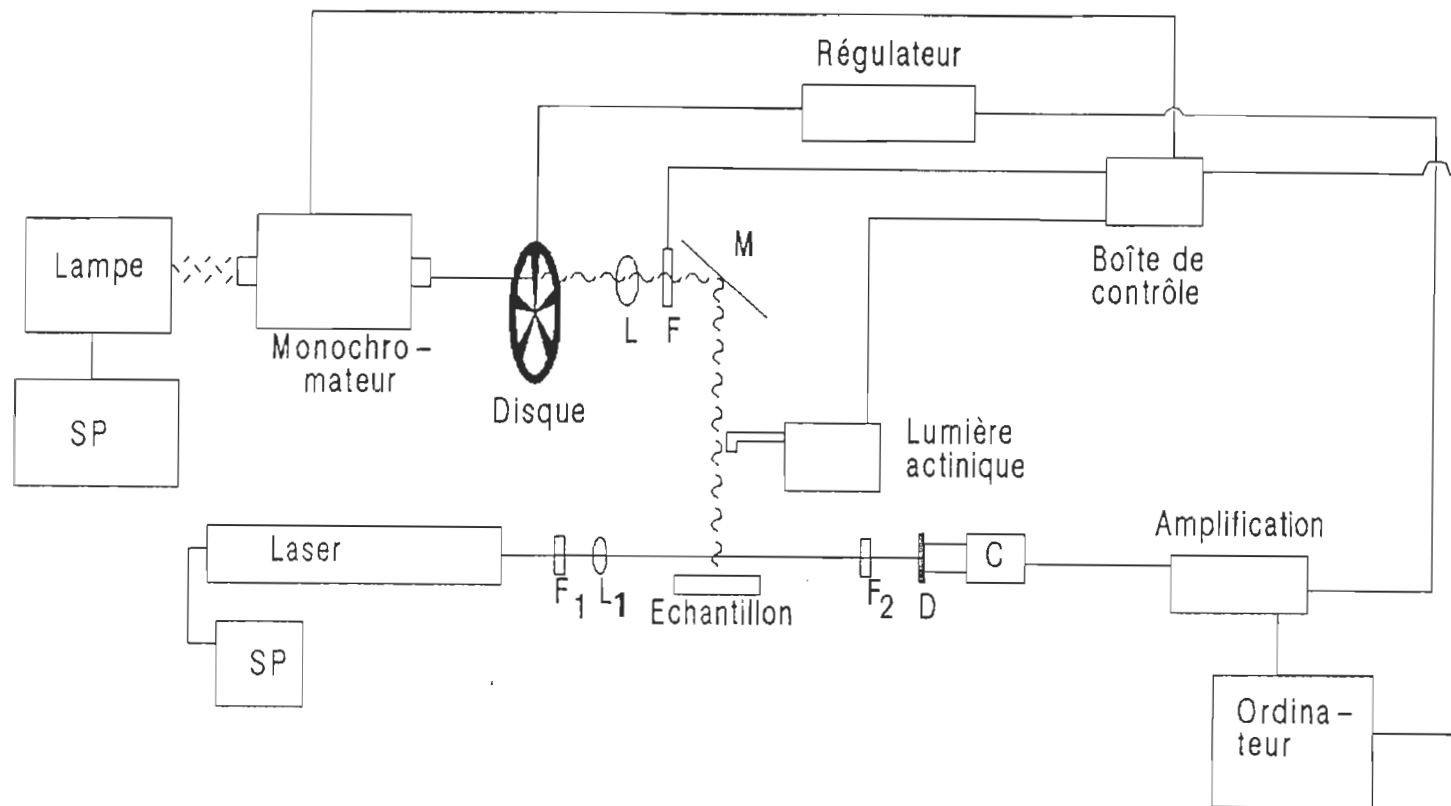


Figure 19 Schéma du spectromètre par effet mirage. C, convertisseur courant-voltage; D, détecteur de position; F, F₁ et F₂, filtres; L et L₁, lentilles; M, miroir; SP, source d'alimentation.

mière modulée absorbée, qui est emmagasinée dans les réactions photochimiques, de la même manière qu'en spectroscopie PA à haute fréquence de modulation (Bults *et al.*, 1982; Kanstad *et al.*, 1983).

Comme faisceau sonde, nous nous servons d'un laser hélium-néon, qui émet à 632,8 nm. Durant le montage de l'appareil, nous avons testé deux lasers. Premièrement le modèle 79000 (Oriel Corporation; Stratford, CT) et deuxièmement le modèle 1103 (Uniphase; Sunnyvale, CA). Notre choix final se porte sur le laser de la compagnie Uniphase, à cause d'une plus grande stabilité dans le temps. A l'avant du laser (figure 19), nous retrouvons une lentille (L_1) de type LAO (Melles Griot Optics; Nepean, ON) avec une distance focale de 30 mm et un filtre (F_1). Le filtre varie avec le laser; pour le modèle 79000, c'est un filtre de 10% de transmittance (Laser Energy Inc; Rochester, NY), alors que pour le laser 1103, nous prenons plutôt un filtre rouge d'environ 2% de transmittance à 632,8 nm.

Du reste du spectrophotomètre, seul le système de détection ne change pas. Le détecteur de position (D) (figure 19) consiste en une photodiode à quadrant (modèle SD-380-23-21, Optikon; Waterloo, ON), qui se sépare en deux surfaces actives en forme de demi-lune, avec

une distance de 0,1 mm entre elles. Devant le détecteur de position, nous retrouvons un filtre interférentiel (F_2) (632,8 nm; HBW ("half band width") 3 nm). Les signaux, qui proviennent des deux parties de la photodiode, passent dans un convertisseur courant-voltage (C) pour être ensuite acheminés vers le système d'amplification (figure 20). Dans un premier montage (figure 20 i), nous avons un doubleur aux sorties A et B du con-

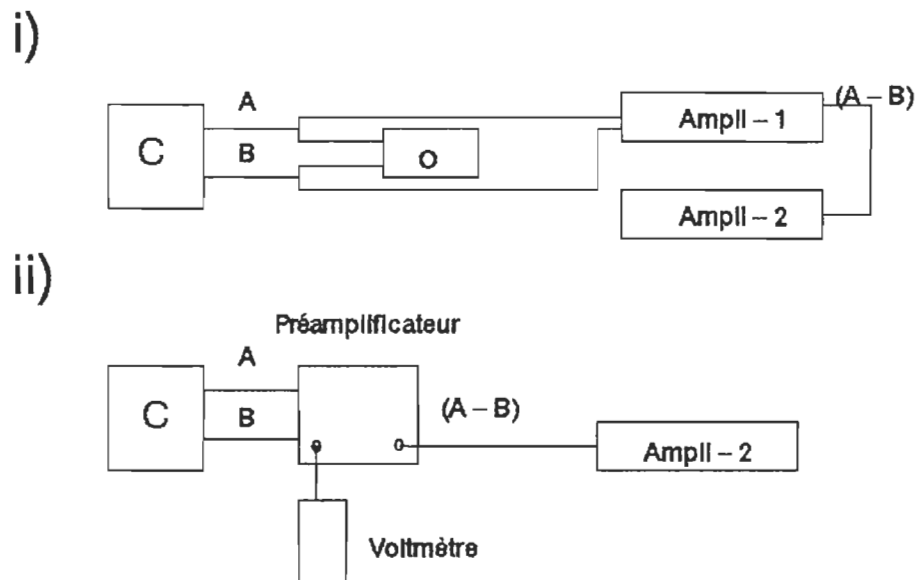


Figure 20 Schéma des deux montages d'amplification du signal d'effet mirage. i) Montage expérimental, ii) Montage final. A et B, signaux des deux photodiodes; Ampli-1 et -2, amplificateurs à verrouillage de phase; C, convertisseur courant-voltage, O, oscilloscope.

vertisseur et les signaux sont envoyés à un oscilloscope (O) et à un amplificateur à verrouillage de phase (ampli-1). Nous utilisons l'oscilloscope pour vérifier l'alignement de l'échantillon. Le premier amplificateur (SR-510, Stanford Research system Inc; Palo Alto, CA) fait la différence entre les signaux modulés de A et B, et l'achemine vers le deuxième amplificateur (modèle 393, Ithaco; Ithaca, NY). Par la suite, un préamplificateur a été construit (figure 20 ii) pour remplacer le premier amplificateur. De plus, nous utilisons un voltmètre (modèle 4060, Brunelle Instruments; St-Elie d'Orford, QC) à la place de l'oscilloscope.

A la figure 21, nous présentons le schéma de l'électronique du préamplificateur. A partir des signaux A et B, qui arrivent des photodiodes, deux sorties existent sur le préamplificateur. La première sortie est reliée au voltmètre et nous permet de voir l'intensité totale du courant provenant des deux diodes ou leur différence; A_v , B_v et $(A - B)_v$. A l'autre sortie, nous retrouvons amplifiée 100 fois la partie modulée du signal $(A - B)$, qui est dirigée vers l'amplificateur.

L'échantillon se retrouve à l'intérieur d'une cellule attachée à un bloc d'aluminium, sur lequel nous avons également le laser et le système de détection du

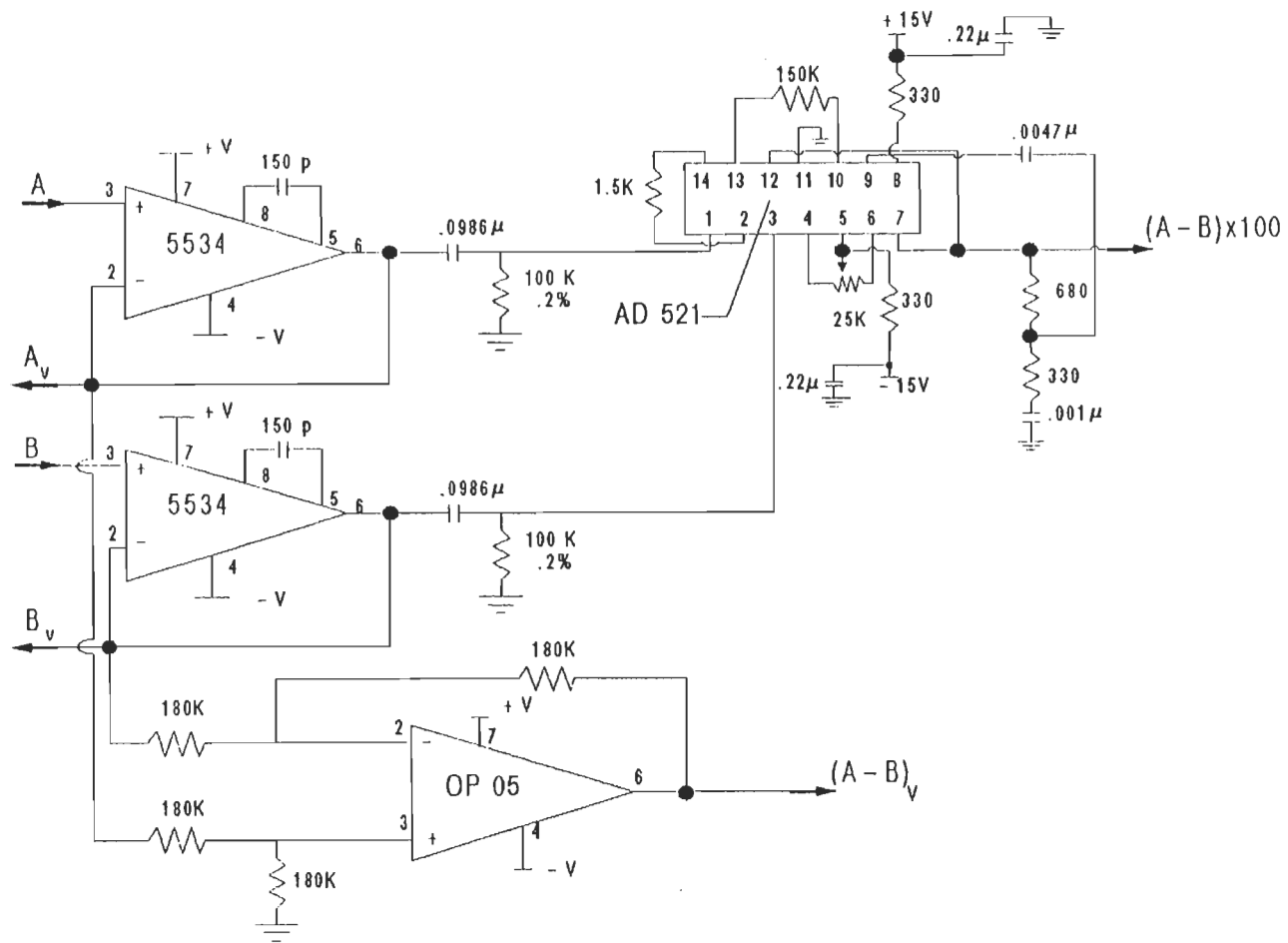


Figure 21 Schéma de l'électronique du préamplificateur.

signal (figure 22). Le bloc d'aluminium repose sur une table antivibration (modèle TLI-386, Technilab Instruments, Inc; Pequannock, NJ). Le bloc maintient l'alignement entre le laser et les photodiodes, mais en plus il stabilise la température du laser. La première cellule construite était en acier inoxydable, ce qui cause un problème. En effet, le laser réchauffe le bloc d'aluminium, qui transfère la chaleur à la cellule, pour amener une augmentation de la température du fluide dans la cellule. Cette variation crée des courants de convection dans le fluide et augmente la contribution du bruit au signal. Nous avons donc construit une deuxième cellule en Teflon pour éviter le transfert de chaleur.

Le porte-échantillon a aussi changé en cours de travail. A la figure 23, nous voyons une coupe transversale du premier porte-échantillon construit. Le porte-échantillon était fait de Teflon et, dans une cuvette, nous déposons un porte-lamelle (figure 23 B) d'aluminium. Les échantillons étudiés sont déposés sur une lamelle de verre de 9 x 25 mm. La lamelle tient en place à l'aide d'une attache. Toutefois, lorsque nous remplissons la cellule avec un liquide, la lame bouge et nous sommes incapable de prendre des mesures reproductibles dans ces conditions. L'alignement de l'échantil-

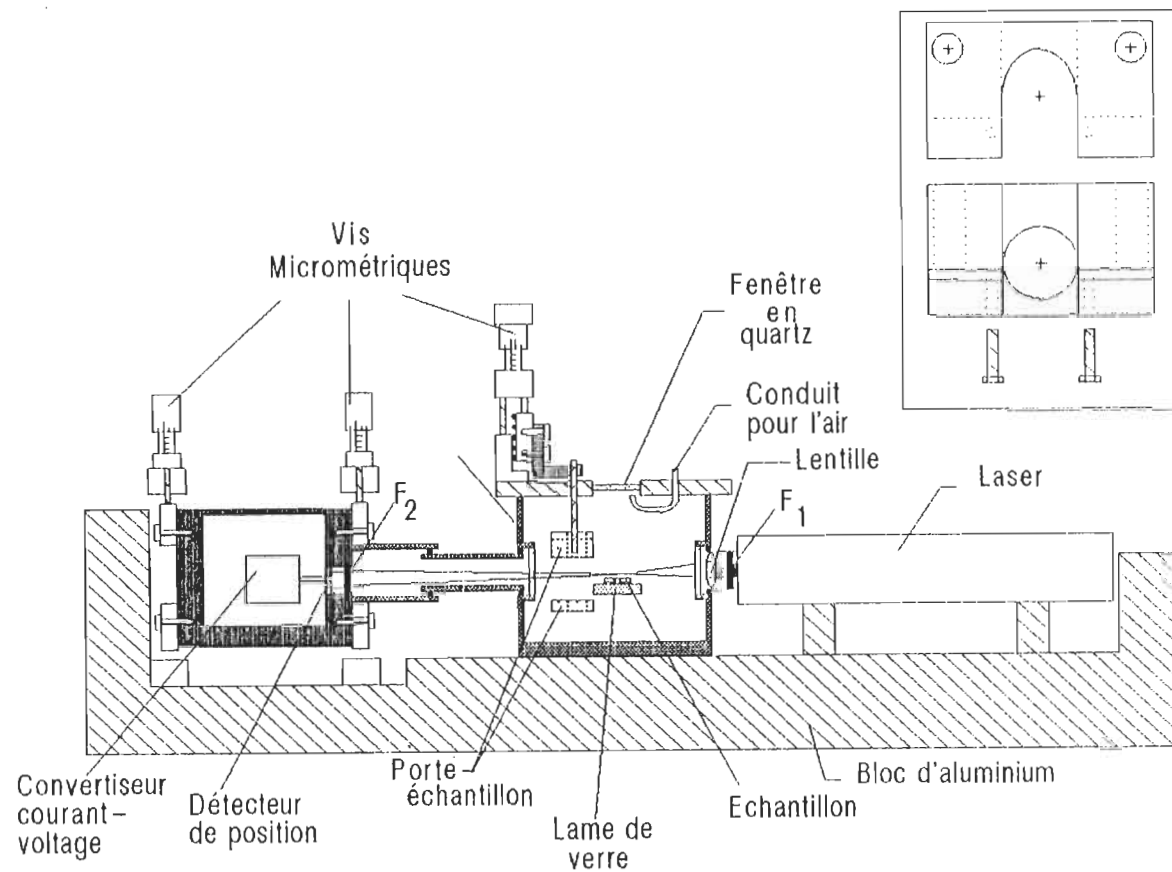


Figure 22 Coupe du bloc d'aluminium du spectromètre par effet mirage. Vignette: vue de face et du dessus du porte-échantillon. F_1 et F_2 , filtres.

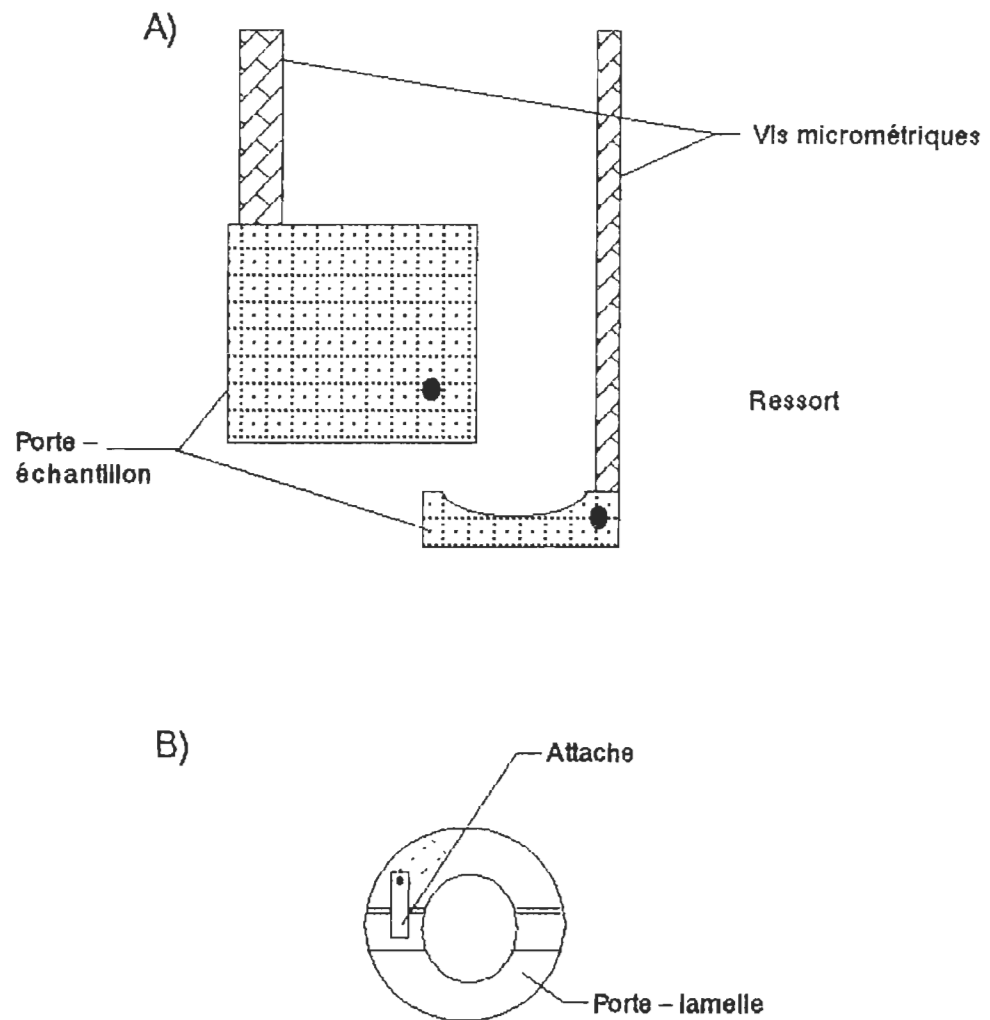


Figure 23 Coupe transversale du premier porte-échantillon (A) et schéma du porte-lamelle (B).

lon joue un rôle important en EM. Nous pouvons aligner l'échantillon à l'aide de deux vis micrométriques (figure 23 A). Une première vis sert à monter et descendre l'échantillon. Par contre avec l'autre, nous changeons

l'angle entre le laser et l'échantillon, afin d'obtenir un meilleur signal. Nous ne pouvons toutefois connaître cet angle. Or le signal d'EM varie en fonction de l'angle de frappe (Murphy and Aamodt, 1980; Jackson *et al.*, 1981). Il faut donc le connaître pour avoir des résultats reproductibles.

Pour pallier aux différents problèmes, un deuxième porte-échantillon a été construit (figure 22). Ce porte-échantillon est fabriqué de Teflon, mais cette fois, nous maintenons la lame de verre à l'aide de deux vis en plastique. L'alignement entre le laser et l'échantillon se fait avec une seule vis micrométrique, pour descendre ou monter l'échantillon. A la figure 22, nous voyons qu'il existe deux autres vis micrométriques, qui permettent l'alignement du faisceau laser par rapport aux deux photodiodes. En effet, il est nécessaire que le laser soit bien centré sur les deux diodes. Nous notons également la présence d'un conduit d'air, qui a été ajouté afin d'envoyer de l'air sur la fenêtre, à l'aide d'une pompe. Nous le faisons dans le but d'empêcher la formation de buée sur la fenêtre de quartz, ce qui causerait une variation dans l'intensité des lumières modulée et actinique. Nous calibrons l'intensité des lumières avec une diode (modèle 21A, United Detector Technologie; Hawthorne, CA).

B) ECHANTILLONS

Le spectromètre par EM nous permet de travailler avec plusieurs types d'échantillons. Par contre, une des limites de la technique, c'est qu'elle nécessite des échantillons plats pour obtenir un bon alignement entre le faisceau laser et l'échantillon.

Ainsi nous pouvons facilement étudier des films minces de chl *a*. Nous extrayons la chl *a* à partir de plantes d'avoine, selon la méthode d'Omata and Murata (1983). Nous prenons des lames de verre hydrophiles, 24 x 50 x 1 mm (Gold Seal, Fisher Scientific Company; Montréal, QC), lavées à l'acide sulfochromique (Fisher Scientific Company; Montréal, QC). Par la suite, nous préparons deux types d'échantillons, des multicouches et des films amorphes de chl *a*.

Pour former une multicouche, nous utilisons un bain de Langmuir-Blodgett (L-B) muni d'un système hydraulique de déposition (Munger *et al.*, 1987). Nous commençons par déposer cinq monocouches d'arachidate de cadmium sur les lames de verre, pour les rendre hydrophobes. La déposition de l'acide arachidique (Applied Science Laboratories Inc; Rexdale, ON) dissous dans du benzène (Anachemia; Montréal, QC), se

fait à une pression de surface de 30 mN m^{-1} , sur une sous-phase de tampon Tris-HCl ($10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) (Reagent Grade, Sigma Chemical Company; St-Louis, MO) avec du chlorure de cadmium ($10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) à un pH de 8,3 à 8,5. Par la suite, nous déposons le nombre désiré de monocouches de chl *a*, à une pression de surface de 20 mN m^{-1} , sur une sous-phase de tampon Tris-HCl ($10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$), à un pH de 8,0 à 8,3. Toutes les mesures expérimentales relatives aux méthodes de Langmuir et de L-B ont été réalisées à une température de $20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Nous déposons sur une lame de verre hydrophile une petite quantité ($\approx 10 \text{ }\mu\text{l}$) de chl *a* diluée dans du benzène, pour préparer les films amorphes. Ensuite, nous chauffons légèrement la lame pour faire évaporer le solvant. Pour les deux sortes de films, nous découpons un morceau rectangulaire de $9 \times 24 \text{ mm}$, pour servir d'échantillon.

Dans une chambre de croissance à température et humidité contrôlées, nous cultivons des plants d'avoine, de blé, d'érable à sucre, de haricot, de pois et de maïs. Nous utilisons également des plantes d'appartement: une oxalide et une vigne. À l'exception de l'avoine, toutes les variétés servent pour les mesures en EM. Nous coupons un morceau rectangulaire d'une feuille de 6 mm par environ 15 mm . Par la

suite, nous collons cet échantillon sur une lamelle de verre (9 x 24 mm), à l'aide d'un ruban gommé.

De plus, nous étudions l'algue *Dunalliella tertiolecta*, en phase stationnaire, cultivée comme le décrivent Samson *et al.* (1988). Nous isolons des chloroplastes intacts à partir de feuilles de maïs avec la méthode de Cerovic and Plesnicar (1984). Il est à noter que nous n'avons pas déterminé le pourcentage de chloroplastes intacts par rapport aux chloroplastes brisés. Cette estimation n'était pas nécessaire pour atteindre le but de notre expérience. Nous déposons les algues et les chloroplastes sur un filtre (Whatman; Maistone, UK), que nous rinçons abondamment avec le milieu de croissance ou le tampon d'extraction. Nous découpons un morceau de 6 x 15 mm du filtre, pour le coller sur la lamelle de verre.

C) TRAITEMENTS

Les multicouches de chl *a* sont soumises à divers traitements avec des vapeurs, de *p*-dioxane (Scintillation Quality A.C.S., Matheson Coleman and Bell; Norwood, OH) et des mélanges dioxane-eau, dioxane-éthanol. Nous plaçons les lames avec une multicouche dans un dessiccateur au fond duquel

nous retrouvons un plat de pétri, qui contient les différentes solutions étudiées.

Pour certaines mesures d'EM, nous remplissons la cellule d'eau distillée, ou d'une solution aqueuse comme du tampon phosphate (10^{-3} mol l⁻¹) (Baker Analyzed Reagent, J. T. Baker Chemical Company; Phillipsburg, NJ), du milieu de culture des algues ou du tampon d'extraction des chloroplastes. Dans tous les cas, nous filtrons la solution sur des filtres de 0,45 μ m (Millipore; Bedford, MA), pour éliminer les poussières.

Nous soumettons les feuilles de pois à la présence de deux inhibiteurs, soit le dichlorophényldiméthylurée (DCMU) (Sigma Chemical Company; St-Louis, MO) et le phénol (Aldrich Chemical Company, Inc.; Milwaukee, WI). Nous ajoutons directement le produit dans la cellule et suivons la cinétique du signal.

Nous prenons également des mesures de l'activité photosynthétique à la suite d'un stress thermique. Nous plaçons la feuille dans un bain thermostaté (modèle 000-5724, Haake; Montréal, QC) pour la durée du traitement et nous mesurons l'EEP avant et après le stress.

CHAPITRE IV

RESULTATS ET DISCUSSION

L'ensemble des résultats présentés ici a été obtenu avec le montage final du spectrophotomètre, sauf dans certains cas spécifiés.

A) CARACTERISTIQUES DU SPECTROPHOTOMETRE

Le signal que nous mesurons en spectroscopie par EM, varie en fonction de divers paramètres. Un des plus importants est celui de la distance entre le laser et l'échantillon. Dans la littérature, nous retrouvons deux méthodes pour l'ajustement de la distance laser-échantillon. Premièrement, le laser se place en "position rasante", c'est-à-dire qu'il est assez près de l'échantillon sans être trop coupé par celui-ci, afin d'obtenir une amplitude maximum du signal (Tamor and Hetrick, 1985). Deuxièmement, le laser se place à une distance déterminée de l'échantillon (Pawliszyn *et al.*, 1986). Nous considérons que le premier mode d'ajustement est

purement arbitraire. Cependant, pour utiliser la deuxième méthode, il faut connaître avec précision le diamètre du faisceau laser au-dessus de l'échantillon. Nous avons donc évalué ce diamètre au point focal de la lentille.

1) ESTIMATION DU DIAMETRE DU FAISCEAU LASER

A partir de la théorie de la propagation des faisceaux gaussiens (Yariv, 1975), nous calculons le diamètre du faisceau laser au point focal en employant l'équation suivante:

$$\omega_0 = \lambda f' / \pi \omega \quad (4)$$

où ω_0 représente le rayon du laser au point focal, λ , la longueur d'onde du laser (632.8 nm), f' , la longueur focale de la lentille (30 mm) et ω , le rayon du faisceau laser (0.315 mm). A partir de l'équation (4), nous trouvons un ω_0 de 19.18 μm , donc un diamètre de 38.36 μm .

Nous pouvons également déterminer expérimentalement le rayon du faisceau laser. Il suffit de placer devant le laser une fente de diamètre connu et de mesu-

rer l'intensité du laser, en absence et en présence de cette fente. Par la suite, à partir de la relation suivante (Melles Griot Optics, 1988) :

$$I_{(R)} = I_0 e^{(-2R^2/\omega_0^2)} \quad (5)$$

où $I_{(R)}$ représente l'intensité du laser avec la fente (0.207 V), I_0 , l'intensité maximum (0.504 V), R , le rayon de la fente (12.5 μm) et ω_0 , le rayon du laser au point focal, nous trouvons une valeur de 18.74 μm pour ω_0 , ce qui fait un diamètre de 37.48 μm . Cette valeur se compare bien au résultat théorique de 38.36 μm .

Puisque nous connaissons le diamètre du laser, nous devons maintenant établir une méthode standard pour l'ajustement de la distance laser-échantillon. D'abord, nous mesurons l'intensité totale du laser sur les photodiodes. Par la suite, nous approchons l'échantillon, un noir de charbon, du laser pour obtenir la moitié de l'intensité totale sur les diodes. Nous éloignons ensuite progressivement l'échantillon du laser. Nous mesurons l'amplitude et la phase du signal d'EM, ainsi que l'intensité du laser sur une des photodiodes. Au tableau 3, nous présentons la moyenne de trois ex-

Position (μm)	I (%)	φ ($^\circ$)	A (%)
0.0	64.2 ± 6.0	173.7 ± 0.2	51.4 ± 1.2
12.7	80.8 ± 7.0	176.3 ± 0.5	64.1 ± 0.9
25.4	88.6 ± 3.9	177.5 ± 1.2	72.8 ± 0.9
38.1	97.3 ± 1.5	179.4 ± 2.2	81.2 ± 1.0
50.8	100.0 ± 0.0	181.6 ± 1.4	87.3 ± 1.3
63.5	91.5 ± 4.1	183.3 ± 1.8	92.2 ± 0.5
76.2	82.6 ± 3.2	185.6 ± 2.2	95.3 ± 1.0
88.9	70.7 ± 3.2	188.9 ± 1.7	97.2 ± 1.3
101.6	66.8 ± 2.0	191.7 ± 2.0	98.5 ± 0.8
114.3	66.4 ± 3.8	194.0 ± 1.6	98.7 ± 1.0
127.0	65.1 ± 4.8	195.9 ± 2.3	98.9 ± 1.0
139.7	61.9 ± 3.7	198.9 ± 1.5	99.1 ± 1.2
152.4	58.3 ± 4.0	200.6 ± 2.2	99.8 ± 0.3

Tableau 3 Valeurs de l'amplitude (I) et de la phase (φ) du signal photothermique d'un noir de charbon dans l'air et de l'intensité du laser (A) sur une photodiode en fonction de la distance ($\lambda = 468 \text{ nm}$, $I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $f = 80 \text{ Hz}$).

périences. Nous normalisons les valeurs de l'amplitude, du signal et de l'intensité du laser à leur maximum respectif. Le maximum du signal se situe à $50.8 \mu\text{m}$ de la position initiale.

A partir de ces résultats, nous traçons un graphique de la phase du signal en fonction de la distance (figure 24). Nous obtenons une phase nulle pour une distance de $36 \mu\text{m}$. Un signal avec une phase nulle, si-

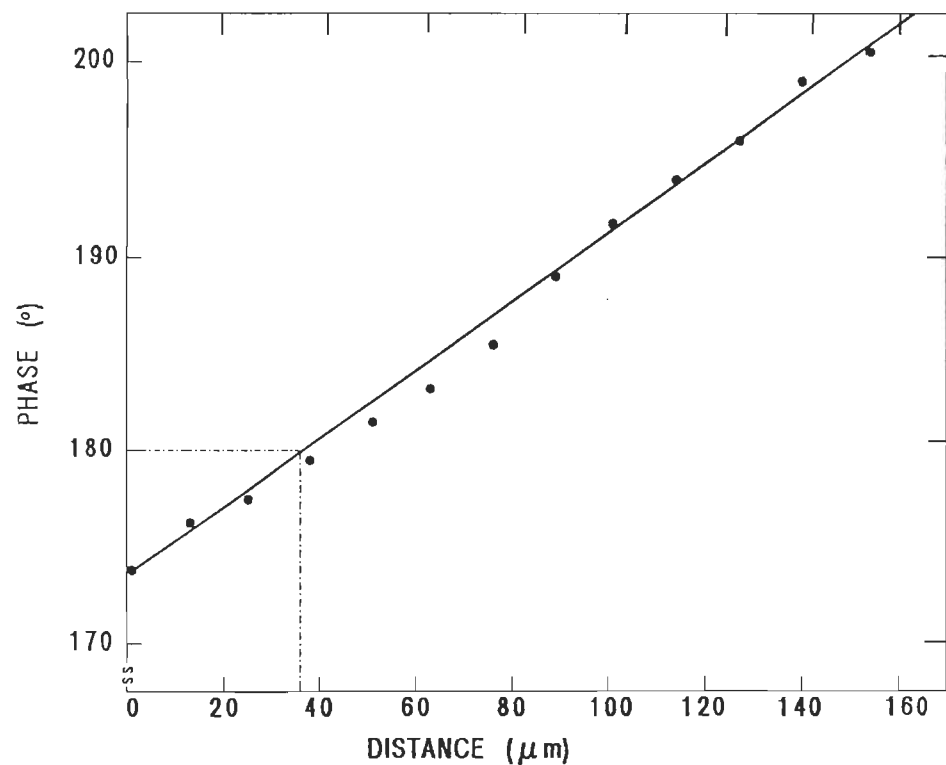


Figure 24 Valeurs de la phase du signal d'effet mirage en fonction de la distance. Résultats tirés du tableau 3.

gnifie que le signal provient directement de la surface de l'échantillon (Jackson *et al.*, 1981). Le maximum du signal d'EM (tableau 3) se produit lorsque le laser se situe à environ 15 μm de la surface de l'échantillon (50.8 - 36.0 μm).

Nous retrouvons 87.3 % de l'intensité totale du laser au maximum du signal photothermique. Le calcul du diamètre d'un faisceau laser au point focal, se fait lorsque nous avons 86.5 % de l'intensité totale (Melles Griot Optics, 1988). Pour obtenir le maximum du signal d'EM, nous devons placer l'échantillon à une distance d'environ 15 μm du centre du laser, ce qui se rapproche de la valeur du rayon ($\approx 19 \mu\text{m}$) du faisceau laser.

Pour travailler toujours à la même distance, nous allons approcher l'échantillon du faisceau laser, afin de retrouver 86.5 % de l'intensité totale du laser sur les photodiodes. Nous considérons alors que l'échantillon se trouve, par rapport au centre du laser, à une distance qui correspond au rayon, soit environ 19 μm . Maintenant que nous ajustons nos échantillons d'une manière reproductible, nous allons voir comment varie le signal d'EM.

2) VARIATION DE L'AMPLITUDE DU SIGNAL

Nous commençons par étudier la variation de l'amplitude du signal en fonction de la distance laser-échantillon. Nous présentons (figure 25) les résultats obtenus avec un noir de charbon dans l'air. Le zéro

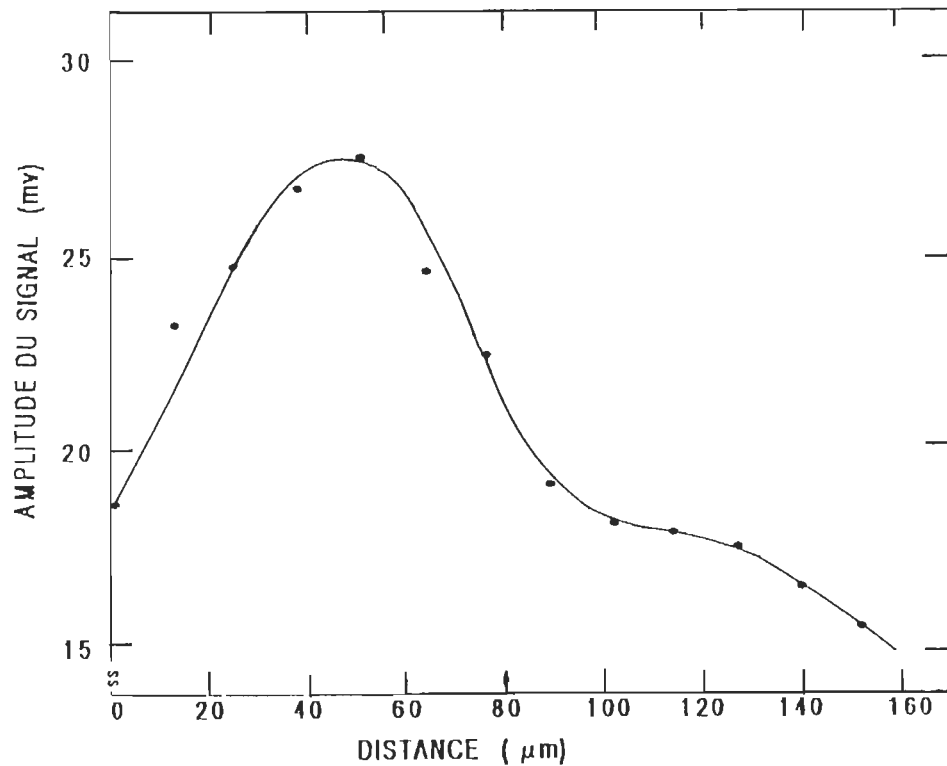


Figure 25 Valeurs de l'amplitude du signal d'effet mirage d'un noir de charbon dans l'air, en fonction de la distance laser-échantillon ($\lambda = 468 \text{ nm}$, $I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $f = 80 \text{ Hz}$).

correspond au moment où la moitié de l'intensité du faisceau laser se retrouve sur une des photodiodes. Le maximum du signal se situe à environ 50 μm de la position zéro. Nous savons (Lepoutre et Roger, 1987), que le gradient de température responsable du signal photothermique se propage selon l'équation de diffusion de la chaleur. Lorsque le faisceau sonde se rapproche de la surface de l'échantillon, une plus grande déviation du faisceau laser se produit. Pour notre part, nous notons qu'aux distances inférieures à 50 μm , l'amplitude du signal diminue. Selon (Decker *et al.*, 1987), ce phénomène se produit lorsque l'échantillon coupe une partie importante du faisceau laser. A partir du tableau 3, nous voyons qu'à 0 μm , il reste 51.4 % de l'intensité totale du faisceau laser. Afin d'obtenir un signal maximum, il faut se positionner à environ 19 μm de la surface de l'échantillon, à l'aide de la méthode déjà décrite.

La théorie nous indique que l'amplitude du signal dépend de la longueur de diffusion thermique qui, elle, varie avec la fréquence de modulation (équation 2). La longueur de diffusion thermique est plus grande aux basses fréquences de modulation. Ceci permet de sonder une épaisseur plus importante de l'échantillon. Pour

un échantillon homogène, l'amplitude du signal augmente lorsque nous diminuons la fréquence de modulation.

Selon Lepoutre (1987) en EM, nous obtenons une relation linéaire entre le logarithme de l'amplitude du signal et la racine carrée de la fréquence, pour les fréquences de modulation supérieures à a_s/l_s^2 , où a_s représente la diffusivité thermique et l_s , l'épaisseur de l'échantillon. Pour des feuilles dans l'eau, nous observons une relation linéaire aux fréquences étudiées (figure 26). Par contre, avec une feuille de pois dans l'air, nous notons une déviation de la linéarité aux fréquences inférieures à 30 Hz. Puisque nous utilisons dans l'air et dans l'eau des feuilles du même âge et qui proviennent de la même variété de pois, nous pouvons difficilement relier cette déviation à un changement des caractéristiques physiques de l'échantillon. Nous ne devons pas oublier que le gradient de température se propage non seulement dans l'échantillon, mais qu'il doit également traverser le fluide qui l'entoure. La déviation de la linéarité du signal dans l'air, serait due à une propagation de la chaleur ou un gradient d'indice de réfraction délocalisé, non uniforme en phase gazeuse par rapport à la phase liquide.

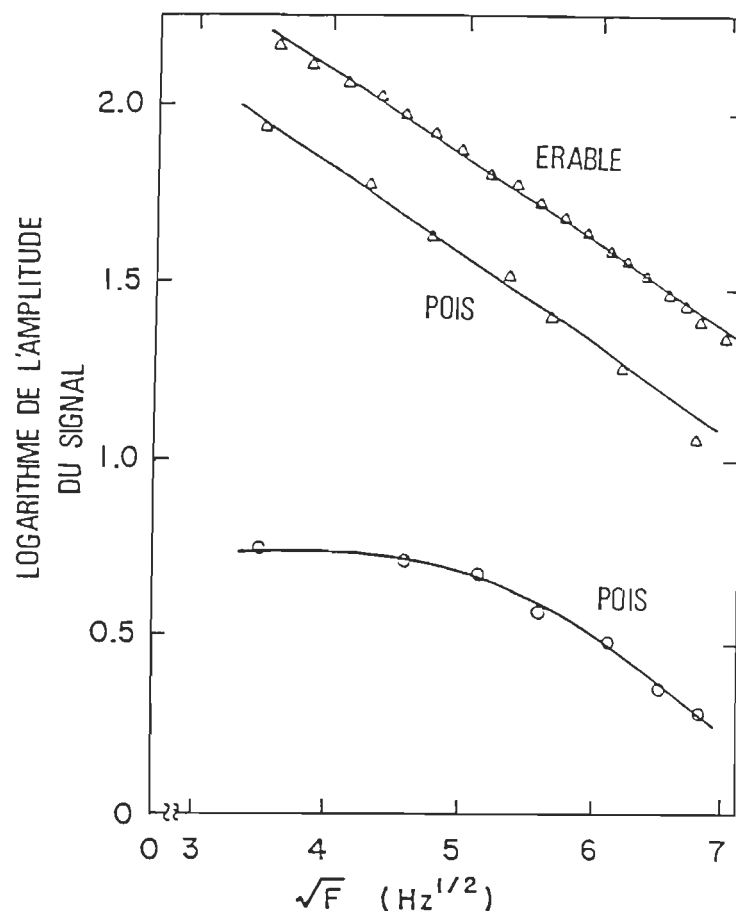


Figure 26 Logarithme de l'amplitude du signal photothermique de feuilles dans l'air (O) ou dans l'eau (Δ), en fonction de la racine carrée de la fréquence de modulation ($\lambda = 680 \text{ nm}$, $I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$).

L'amplitude du signal qui provient d'une feuille d'érable est supérieure à celle d'une feuille de pois. Cette différence peut provenir de la morphologie de la feuille, ce qui aurait une incidence sur la quantité de

lumière absorbée et par conséquent une influence sur le taux de désexcitation non-radiative des pigments ayant absorbé la lumière incidente.

Pour vérifier si le taux de désexcitation non-radiative diffère entre les échantillons, nous mesurons l'amplitude du signal et l'EEP pour des feuilles de pois et d'érable. L'EEP nous donne un indice de l'utilisation de la lumière modulée absorbée. De plus, pour évaluer la variation du signal à l'intérieur d'une feuille, nous mesurons ce signal à différentes positions sur la feuille. Nous considérons le faisceau laser comme une sonde précise, puisque nous mesurons uniquement les variations de température qui se produisent immédiatement sous le faisceau. Nous étudions des portions différentes de la feuille en déplaçant progressivement l'échantillon sur l'axe horizontale et perpendiculairement par rapport au faisceau laser.

Nous voyons (figure 27) que pour les deux types de feuilles, l'EEP reste semblable aux différentes positions et qu'il est du même ordre de grandeur (≈ 0.2). Donc les échantillons des deux espèces de plantes utilisent la lumière modulée de façon identique dans toute la feuille. Par contre, l'amplitude du signal varie en fonction de la position du faisceau laser pour la

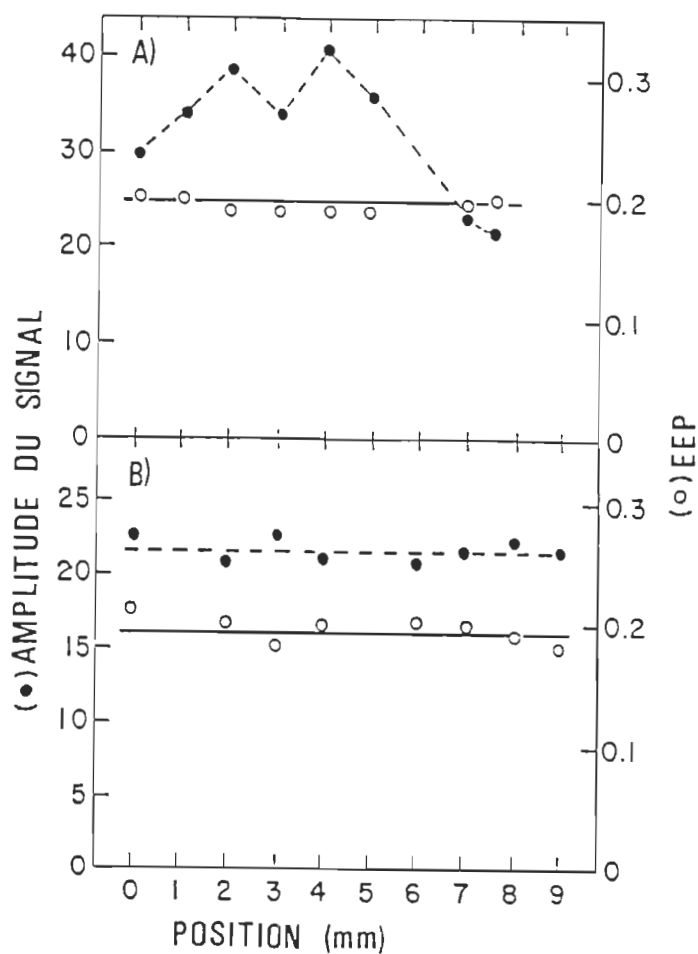


Figure 27 Valeurs de l'amplitude du signal d'effet mirage (●) et de l'emmagasinement d'énergie photochimique (EEP) (○) pour différentes positions d'une feuille de pois (A) ou d'érable (B) ($\lambda = 680 \text{ nm}$, $I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $I_a = 160 \text{ W m}^{-2}$, $f = 18 \text{ Hz}$).

feuille de pois. Cette variation peut être provoquée par un changement au niveau de l'absorption de la lumière par les pigments aux différentes positions. Mais, si nous observons comment se fait l'alignement du fais-

ceau laser, nous remarquons que celui-ci ne passe pas entièrement au-dessus de l'échantillon (figure 28). La longueur d'interaction entre le faisceau laser et le gradient thermique varie aux différentes positions. Ce changement dans la longueur d'interaction pour les feuilles de pois est dû à la présence de nervures plus nombreuses et plus grosses que dans les feuilles d'érable. L'amplitude du signal pour des échantillons de feuilles sera toujours relative, à cause de l'alignement imparfait du faisceau laser. Pour des échantillons homogènes, comme des monocouches de chl *a*, nous pouvons plus facilement avoir des mesures quantitatives. Par contre, avec l'EEP, nous pouvons comparer les échantillons de différentes espèces. Pour comparer les mesures prises en EM avec celles obtenues par d'autres techniques comme celle de la PA, il est important de connaître le rapport signal sur bruit (S/B) pour les deux spectrophotomètres.

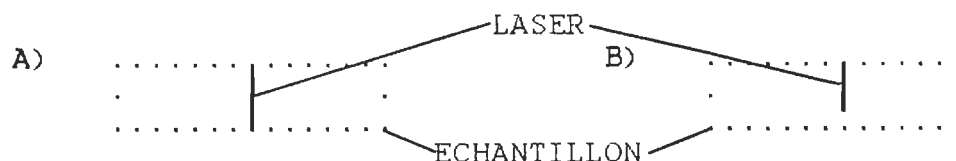


Figure 28 Vue de la surface de l'échantillon, lorsque le faisceau laser, passe complètement (A) et partiellement (B) au-dessus de celui-ci.

3) RAPPORT SIGNAL SUR BRUIT

Une façon de caractériser un spectrophotomètre consiste à mesurer le rapport (S/B) . Nous utilisons la méthode employée par Ducharme *et al.* (1979). Il suffit de prendre le signal, avec une constante de temps de 1.25 s, et de le diviser par le cinquième de la variation du signal (le bruit) enregistrée à une constante de temps de 0.125 s. Nous mesurons ainsi le rapport S/B pour différents échantillons dans l'air et dans l'eau.

A la figure 29, nous voyons les résultats pour des feuilles de pois dans l'air et d'érable dans l'eau. Le rapport S/B répond différemment dans les deux milieux. Dans l'eau, le rapport S/B augmente lorsque nous diminuons la fréquence. Ceci est dû principalement à une augmentation de l'amplitude du signal. Le bruit reste constant aux différentes fréquences. Dans l'air, nous notons un maximum du rapport S/B à environ 30 Hz. Aux fréquences plus élevées, une diminution de l'amplitude du signal cause l'atténuation du rapport S/B . Par contre, aux basses fréquences, nous observons une augmentation marquée du bruit. Cette augmentation provient de l'inefficacité de la table anti-vibration aux fréquen-

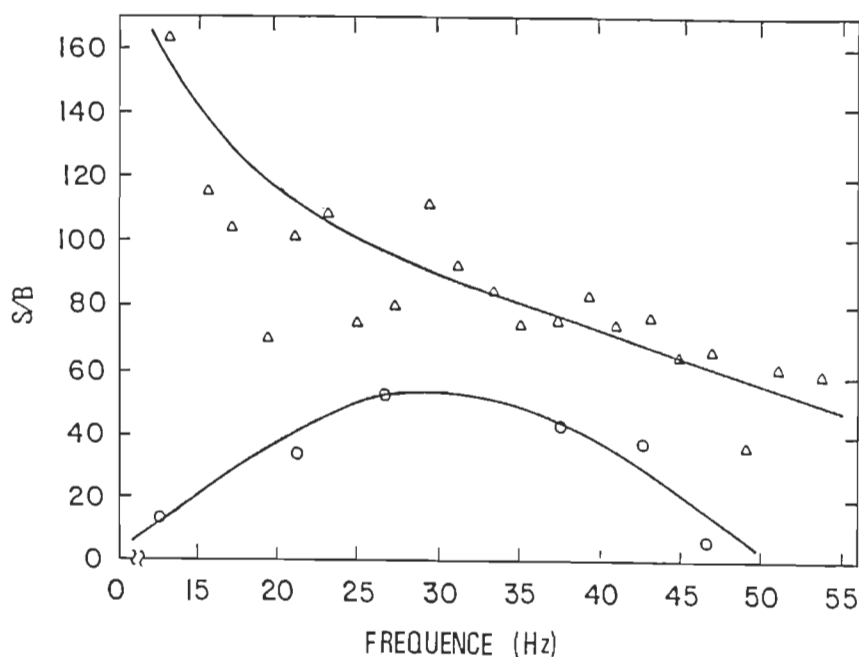


Figure 29 Effet de la fréquence de modulation sur le rapport signal sur bruit (S/B) pour une feuille de pois dans l'air (O) ou d'érable dans l'eau (Δ) ($\lambda = 680 \text{ nm}$, $I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$).

ces inférieures à 30 Hz. Nous n'observons pas le même phénomène pour un échantillon placé dans l'eau, parce que celle-ci atténue une partie des vibrations.

Les valeurs du rapport S/B en EM, pour des feuilles dans l'eau, se comparent favorablement avec celles obtenues en PA à basse fréquence de modulation. Par contre, si nous voulons mesurer l'EEP d'un échantillon

en PA, nous devons travailler à haute fréquence de modulation, où le rapport S/B est plus faible. Nous sommes donc avantagés en EM, puisque nous mesurons l'EEP à toutes les fréquences.

Bien que le rapport S/B soit plus faible dans l'air, nous pouvons aux environs de 30 Hz prendre des mesures. À cause de son volume supérieur, la cellule d'EM sera avantagée sur celle de PA pour des études de mélanges gazeux. Ainsi en EM, nous ne nous trouvons pas rapidement, comme en PA, au point de compensation du CO_2 , ce qui peut influencer l'activité photochimique.

Nous avons également mesuré le rapport S/B pour un noir de charbon dans l'air et dans l'eau. Les résultats suivent la même relation en fonction de la fréquence de modulation, qu'avec des feuilles. Cependant, les rapports S/B sont meilleurs; ainsi avec le noir de charbon dans l'air, nous obtenons des valeurs supérieures à 1000. Par contre, dans l'eau, les valeurs maximales sont de 800. Cette différence entre les rapports S/B est due au fait que nous utilisons des noirs de charbon différents dans les deux milieux. Dans l'eau, le noir de charbon consiste en une peinture sur une lamelle. Dans l'air par contre, nous prenons plutôt un noir de fumée, qui absorbe mieux la lumière. Nous ne pouvons

utiliser le noir de fumée dans l'eau car il se dissout. Les rapports S/B mesurés montrent que le spectrophotomètre par EM est aussi performant que l'appareil de PA. Puisque l'EEP se mesure à toutes les fréquences en EM, nous sommes avantagés sur ce système de mesure.

L'étape suivante de notre travail consiste à prendre des spectres de différents échantillons.

B) SPECTRES EN EFFET MIRAGE

Nous devons toujours normaliser les spectres d'EM en fonction de l'intensité de la lampe. Il suffit de diviser le spectre de l'échantillon par le profil de la lampe, obtenu avec un noir de charbon. Les deux types de noir de charbon que nous utilisons donnent le même spectre de lampe, mais le noir de fumée a un rapport S/B supérieur. Ainsi pour la normalisation des spectres, nous prenons toujours le noir de fumée dans l'air, même si l'échantillon se trouve dans un milieu aqueux.

Durant les premières expériences, nous travaillons avec un système modèle, un film de L-B. Nous voulons nous assurer de la reproductibilité des spectres d'EM. Nous utilisons le

premier montage expérimental pour cette série d'expériences. A la figure 30, nous présentons les spectres photothermiques, de la bande rouge, de dix monocouches de chl *a* dans du tampon phosphate. Nous notons, en fonction du temps, une diminution de l'intensité du signal. Pour vérifier l'inté-

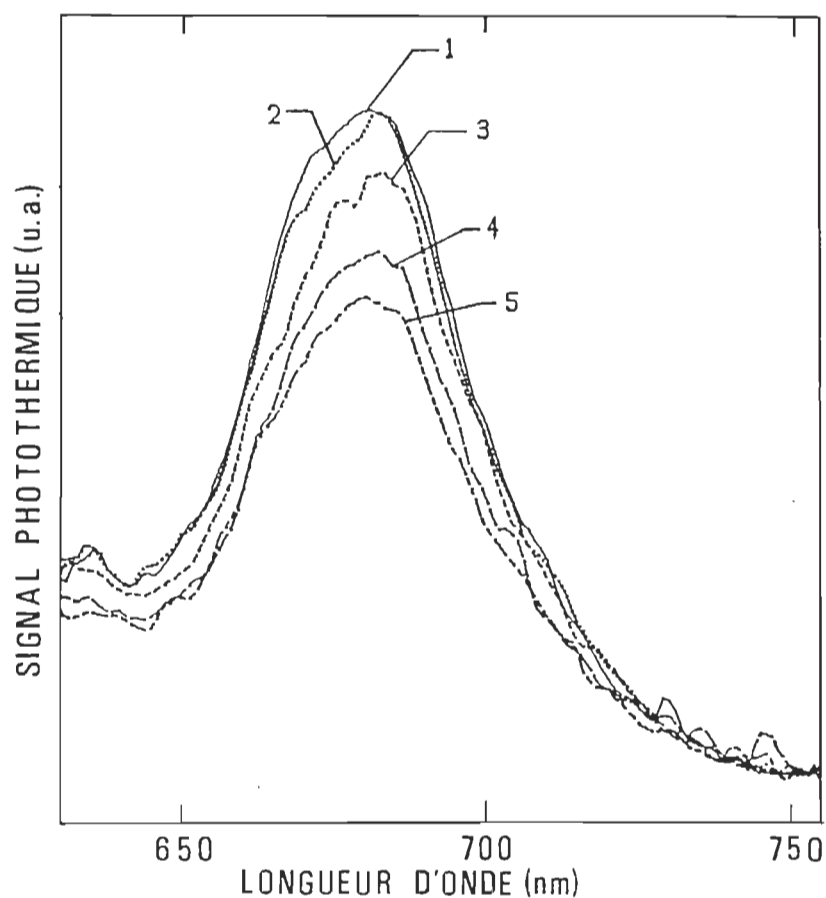


Figure 30 Spectres photothermiques, en fonction du temps, de dix monocouches de chlorophylle *a* dans du tampon phosphate. Spectres pris après 131 (1), 145 (2), 187 (3), 277 (4) et 338 (5) minutes ($I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $f = 80 \text{ Hz}$, c.t. = 4 s).

grité du film L-B, nous prenons des spectres d'absorption avant et après l'expérience et nous ne notons aucun changement dans l'intensité (résultat non présenté). Il existe donc un facteur intrinsèque au spectrophotomètre d'EM qui fait varier l'intensité du signal photothermique dans le temps.

Durant l'expérience, il se produit une dérive de l'intensité du faisceau laser sur les photodiodes, qui résulte d'une variation de la distance laser-échantillon. Si nous replaçons le laser à la distance initiale, nous retrouvons immédiatement l'intensité initiale. Après vérification de la stabilité du faisceau laser et du porte-échantillon, nous concluons qu'il se produit un phénomène au cours de l'expérience qui cause un changement dans la distance laser-échantillon. Comme les variations de la température jouent un rôle important dans nos mesures, nous avons vérifié la température du tampon dans la cellule, en fonction du temps avec un thermocouple (tableau 4). La température du tampon reste stable environ trente minutes après l'ouverture du faisceau laser, par la suite elle augmente.

Le laser et la cellule reposent sur un bloc d'aluminium (figure 22), qui sert à stabiliser la température du laser et à fournir un alignement constant au système. Le laser réchauffe le bloc d'aluminium, qui transfère la chaleur à la

cellule d'acier inoxydable, d'où l'augmentation de la température du tampon. Cette variation de la température cause un changement dans l'indice de réfraction du milieu qui entoure l'échantillon et le faisceau laser se déplace par rapport à l'échantillon. Si nous isolons thermiquement la cellule d'acier avec une feuille de Teflon ou que nous utilisons la cellule de Teflon, la température dans la cellule reste stable et nous pouvons prendre des spectres consécutifs sans noter de changement dans les valeurs d'intensité des bandes observées.

Temps (min)	Température (°C)
0	22.2
5	22.2
18	22.2
30	22.1
82	23.9
95	24.3
112	24.9
134	25.3

Tableau 4 Valeurs de la température du tampon phosphate, dans la cellule d'effet mirage, en fonction du temps suite à l'ouverture du faisceau laser.

Pour vérifier la versatilité du spectrophotomètre par EM, nous travaillons avec différents types d'échantillons, pour mesurer les spectres d'action des pigments photosynthétiques. Nous obtenons ainsi des spectres photothermiques avec des systèmes modèles comme une multicouche ou un film amorphe de chl *a* (figure 31). Le spectre d'EM du film de L-B montre les bandes d'absorption typiques de la chl *a*, près de 440 et 680 nm. La bande dans le rouge (680 nm) est plus large dans le cas du film solide, à cause d'une agrégation prononcée du pigment (oligomères de chl *a*). La présence de deux épaulements (585 et 618 nm) dans le spectre du film solide proviendrait des transitions $Q_x(0-0)$ et $Q_y(0-1)$ de la chl *a* (Petke *et al.*, 1979). Les spectres photothermiques de ces systèmes modèles mesurés en EM se comparent aux spectres d'absorption obtenus en spectroscopie électronique et PA (Désormeaux and Leblanc, 1985).

Avec des algues et des chloroplastes, nous obtenons des spectres d'EM *in vivo* (figure 32). Comme nous travaillons avec des échantillons qui possèdent une activité photosynthétique, nous utilisons une lumière actinique qui sature les réactions photochimiques. Nous savons que l'EEP change avec la longueur d'onde de la lumière d'excitation (Carpentier *et al.*, 1983; Canaani and Malkin, 1984), ce qui provoque des changements dans le spectre d'action de l'émission

de chaleur. Pour obtenir des spectres d'action réels, il suffit de bloquer la photochimie. C'est le rôle de la lumière actinique.

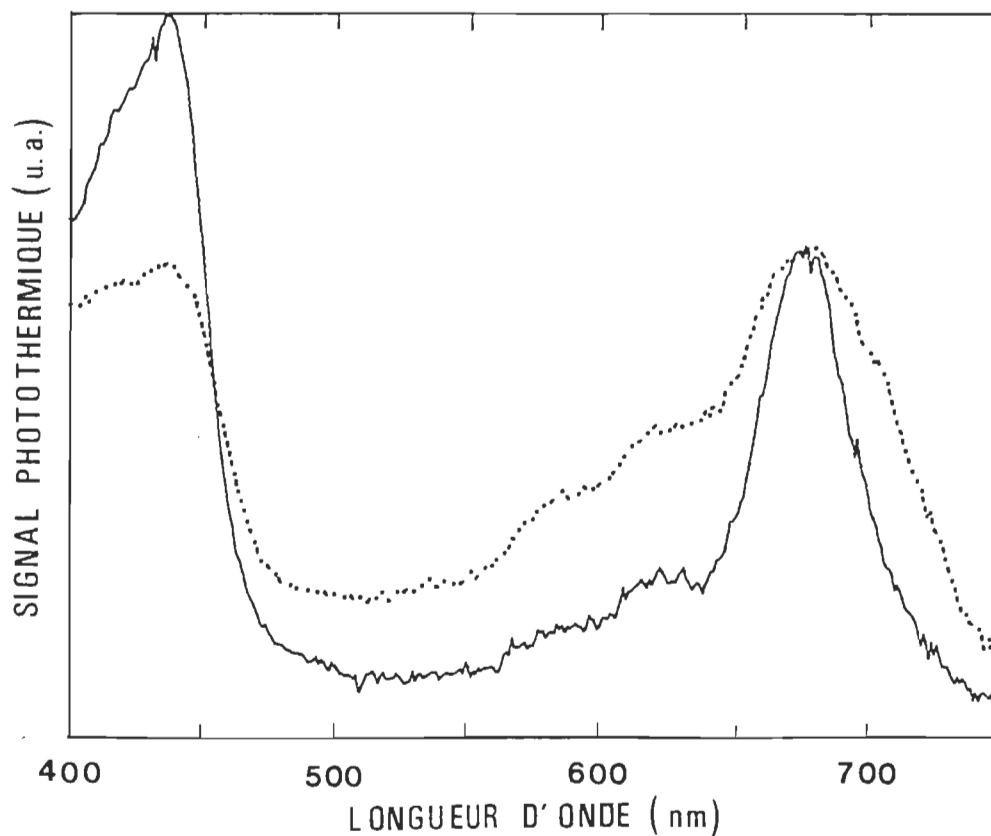


Figure 31 Spectres photothermiques de dix monocouches (—) et d'un film amorphe (····) de chlorophylle *a* dans un tampon phosphate. Les spectres représentent une moyenne de deux spectres consécutifs normalisés pour le maximum dans le rouge. ($I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $f = 80 \text{ Hz}$ (films L-B) et 18 Hz (films amorphes), c.t. = 1.25 s).

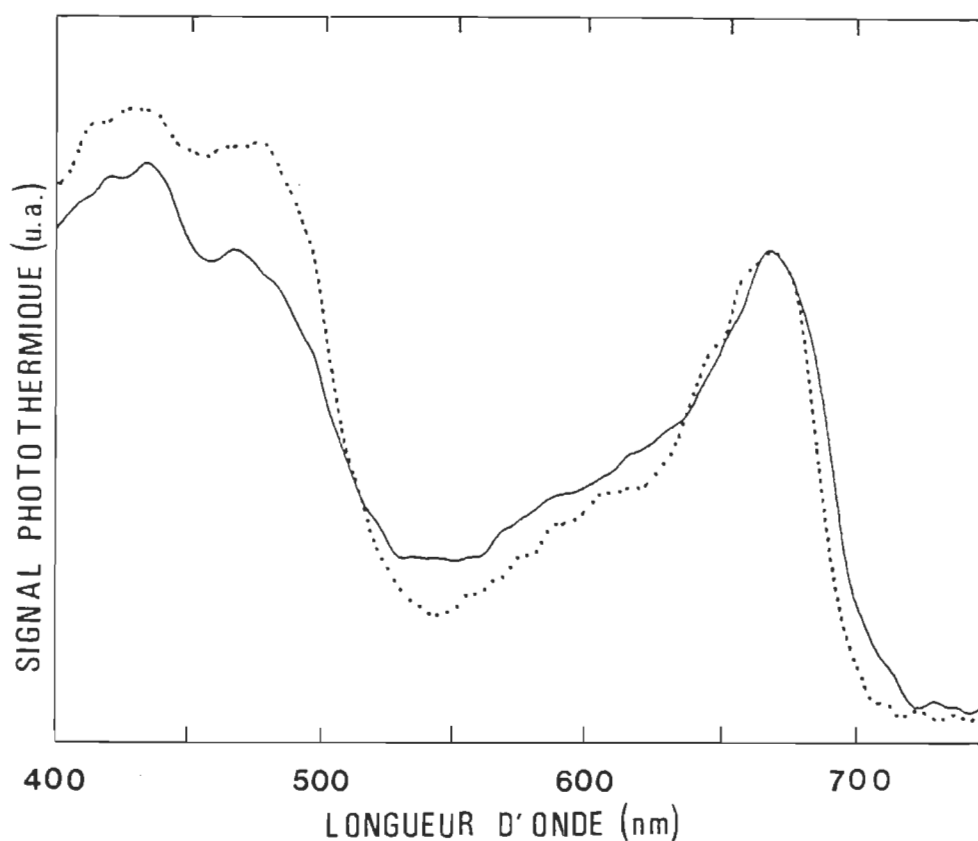


Figure 32 Spectres photothermiques de chloroplastes (—) et d'algues (···) déposés sur un filtre, dans le tampon d'extraction et le milieu de culture respectivement. Les spectres représentent une moyenne de deux spectres consécutifs normalisés pour le maximum dans le rouge. ($I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $I_a = 160 \text{ W m}^{-2}$, $f = 18 \text{ Hz}$, c.t. = 4.0 s).

Si nous comparons les spectres des chloroplastes et des algues (figure 32) avec ceux des systèmes modèles, nous notons une bande additionnelle, aux environs de 490 nm, attri-

buée à la présence de caroténoïdes dans les échantillons. Les spectres d'EM d'algues et de chloroplastes se comparent aux spectres PA (résultats non présentés).

Nous pouvons également travailler avec des feuilles dans l'air ou dans un milieu aqueux. Si nous plaçons une feuille dans l'eau, il se produit un gonflement de celle-ci pour obtenir un équilibre osmotique avec son environnement. Comme la distance laser-échantillon joue un rôle important pour le signal d'EM, il n'est pas souhaitable que ce gonflement se produise au cours d'une mesure. Pour cette raison, nous plaçons les morceaux de feuilles dans le milieu aqueux 30 minutes avant le début des expériences.

A la figure 33, nous présentons les spectres de feuilles d'érable mature et immature. Nous distinguons une bande additionnelle pour la feuille immature aux environs de 550 nm. Nous attribuons cette bande à la présence d'anthocyanine (Harborne, 1976), un caroténoïde présent dans les jeunes feuilles, qui augmente considérablement l'absorption de la lumière dans la région de 500 à 600 nm.

Nous obtenons une plus grande résolution des spectres photothermiques d'une feuille avec l'EM qu'avec la PA (figure 34). En EM, nous observons sept pics distincts et reproductibles. Par contre en PA, le spectre semble plutôt plat

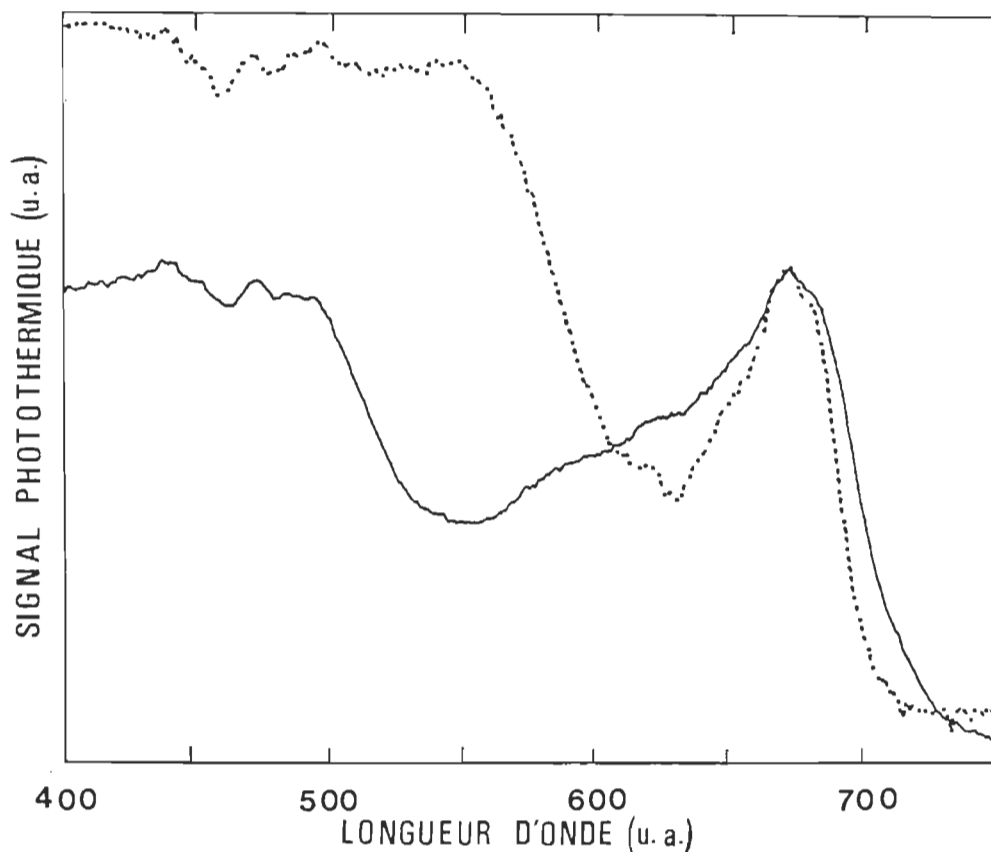


Figure 33 Spectres photothermiques de feuilles mature (—) et immature (·····) d'érable dans l'eau. Les spectres représentent une moyenne de deux spectres consécutifs normalisés pour le maximum dans le rouge. ($I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $I_a = 160 \text{ W m}^{-2}$, $f = 18 \text{ Hz}$, c.t. = 1.25 s).

avec deux larges bandes, de 400-500 nm et de 600-700 nm. Les petits épaulements du spectre de PA ne sont pas reproductibles, mais consistent principalement en du bruit inhérent à la technique. Les sept pics que nous retrouvons pour le spectre d'une feuille en EM peuvent être attribués aux dif-

férentes bandes des pigments présents dans la feuille; la chl *a* (434, 588, 613 et 673 nm), la chl *b* (464 et 646 nm) et les caroténoïdes (486 nm).

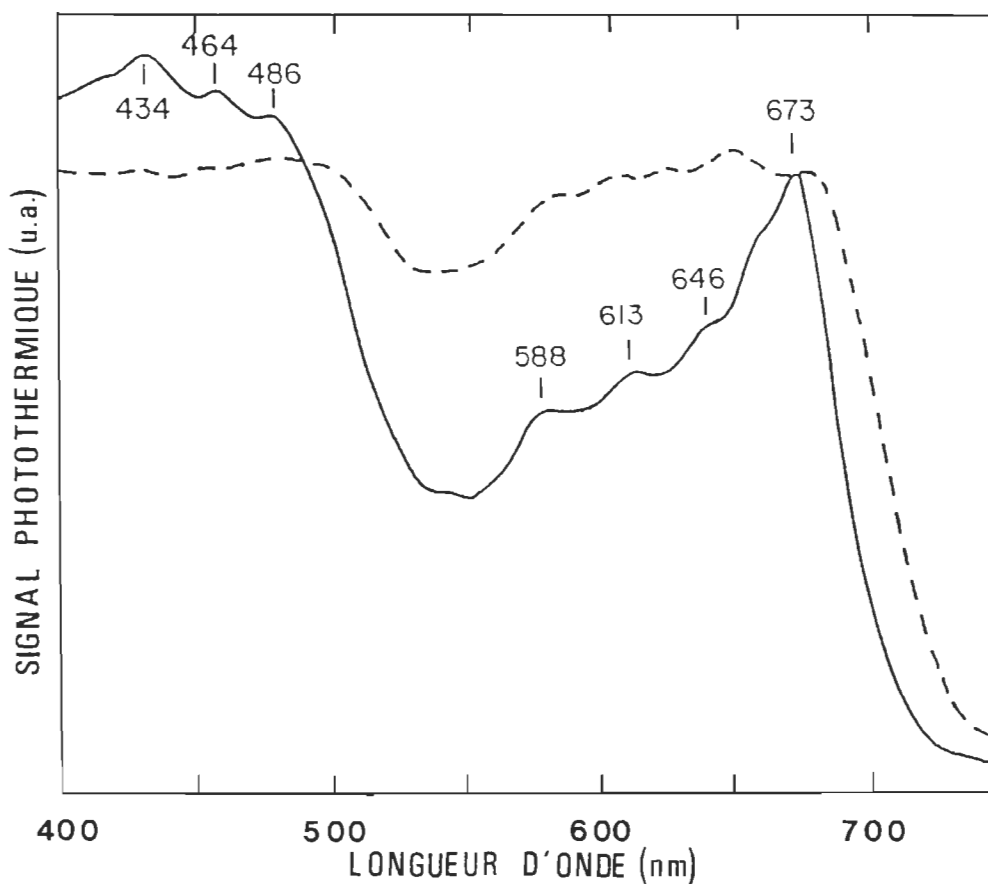


Figure 34 Spectres d'effet mirage (—) et de photoacoustique (---) d'une feuille de pois. Les spectres sont lissés et normalisés à 673 nm. Les valeurs des pics sont une moyenne de sept expériences. ($I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $I_a = 160 \text{ W m}^{-2}$, $f = 18 \text{ Hz}$, c.t. = 1.25 s).

Pour une feuille, la plus grande résolution, obtenue en EM comparée à la PA provient probablement de la différence dans la génération du signal entre les deux techniques. Comme nous l'avons vu dans la section théorique, le signal d'EM est purement thermique, alors qu'en PA nous retrouvons une participation acoustique au signal. Cette portion acoustique provoque la saturation du signal dans certaines conditions. En examinant le spectre PA (figure 34), nous notons une saturation partielle du signal.

Cette plus grande résolution spectrale pourrait nous permettre d'obtenir, en balayant la fréquence de modulation, de meilleurs profils de profondeur. Cependant le spectrophotomètre par EM, nous limite dans l'étendue de fréquence utilisable, par un faible rapport S/B aux hautes fréquences. Pour avoir un bon signal, nous travaillons entre 15 et 150 Hz, ce qui correspond à des longueurs de diffusion thermique de 57 à 18 μm . Nous nous servons de l'équation 3 et des valeurs de diffusivité thermique qui proviennent de Touloukian *et al.* (1973).

Nous savons que le signal photothermique dépend non seulement de la longueur de diffusion thermique (u_s), mais également de la longueur d'absorption optique (u_β). Lorsque u_β est plus petit que u_s , le signal provient uniquement de la région où l'absorption se produit (Coufal and McClelland,

1988). Comme u_{β} varie avec la longueur d'onde, nous pouvons dans un même spectre avoir $u_{\beta} < u_s$ et $u_{\beta} > u_s$; nous ne pouvons donc pas parler d'un vrai "profil de profondeur", puisque pour un même spectre le signal ne provient pas toujours de la même tranche de l'échantillon. Pour cette raison, nous n'avons pas effectué ce genre d'étude.

Un des avantages importants de la spectroscopie par EM, c'est la possibilité de travailler en milieu aqueux. Nous pouvons ainsi étudier l'effet de l'eau ou d'un agent actif sur l'échantillon. Afin d'observer en EM des changements spectraux induit par un produit, nous avons étudié l'effet du dioxane sur la chl *a*.

1) ETUDE DE L'EFFET DU DIOXANE SUR DES MONOCOUCHEs DE CHLOROPHYLLE *a*

Nous savons (Leblanc and Chapados, 1976) que l'exposition de films L-B de chl *a* aux vapeurs de dioxane produit un déplacement bathochromique des maximums de 8 nm, ainsi qu'une augmentation importante de l'intensité pour la bande rouge. Si nous laissons la lame dans le noirceur sous atmosphère d'azote pour quelques heures, nous retrouvons le spectre initial.

Nous préparons un film de dix monocouches de chl *a* pour ensuite l'exposer 180 minutes aux vapeurs de dioxane. A la figure 35 (1), nous avons le spectre d'absorption d'un film de L-B de chl après l'exposition aux vapeurs de dioxane. Ce spectre présente les changements caractéristiques d'une exposition au dioxane. Par la

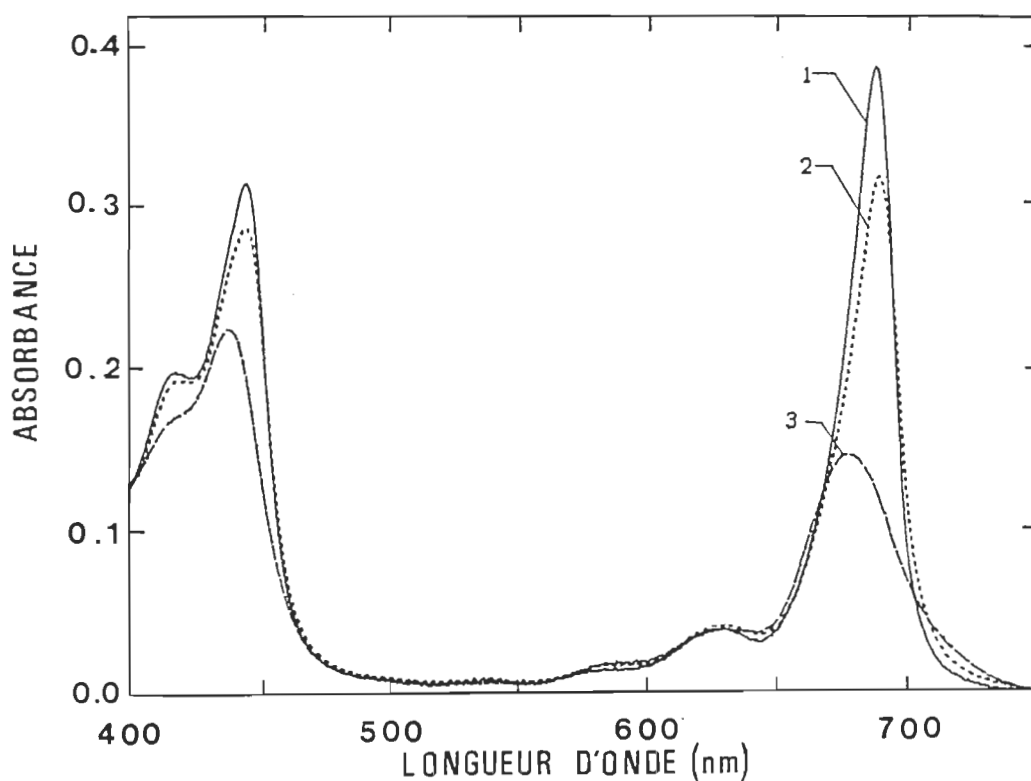


Figure 35 Spectres d'absorption de dix monocouches de chlorophylle *a*. 1, après 180 minutes d'exposition aux vapeurs de dioxane (—); 2, la lame en attente (···); 3, la lame après les mesures d'effet mirage (- - -).

suite, nous coupons la lame en deux afin d'avoir deux échantillons. Un échantillon reste à la noirceur sous vide, la lame en attente, et nous utilisons l'autre pour les mesures d'EM. A la fin de l'expérience d'EM, nous prenons les spectres d'absorption des deux échantillons (figure 35). Nous pouvons voir que la lame en attente présente une diminution d'intensité, sans changement important des maximums. Par contre, chez l'échantillon qui a servi pour les mesures d'EM, nous retrouvons un spectre d'absorption semblable à celui pris avant l'exposition aux vapeurs de dioxane. Pour les mesures d'EM, la lame séjourne dans un tampon phosphate, qui semble favoriser un retour plus rapide au spectre initial.

Nous avons voulu suivre dans le temps les changements spectraux avec l'appareil d'EM (figure 36). Nous voyons que le premier spectre pris après un séjour de 10 minutes de la lame ne présente plus l'allure typique d'un spectre d'absorption de chl a exposée au dioxane. Si nous regardons l'intensité des maximums des spectres (tableau 5), nous notons un déplacement des maximums dans le temps. Par contre, les changements plus importants se produisent trop rapidement pour suivre une cinétique, en EM.

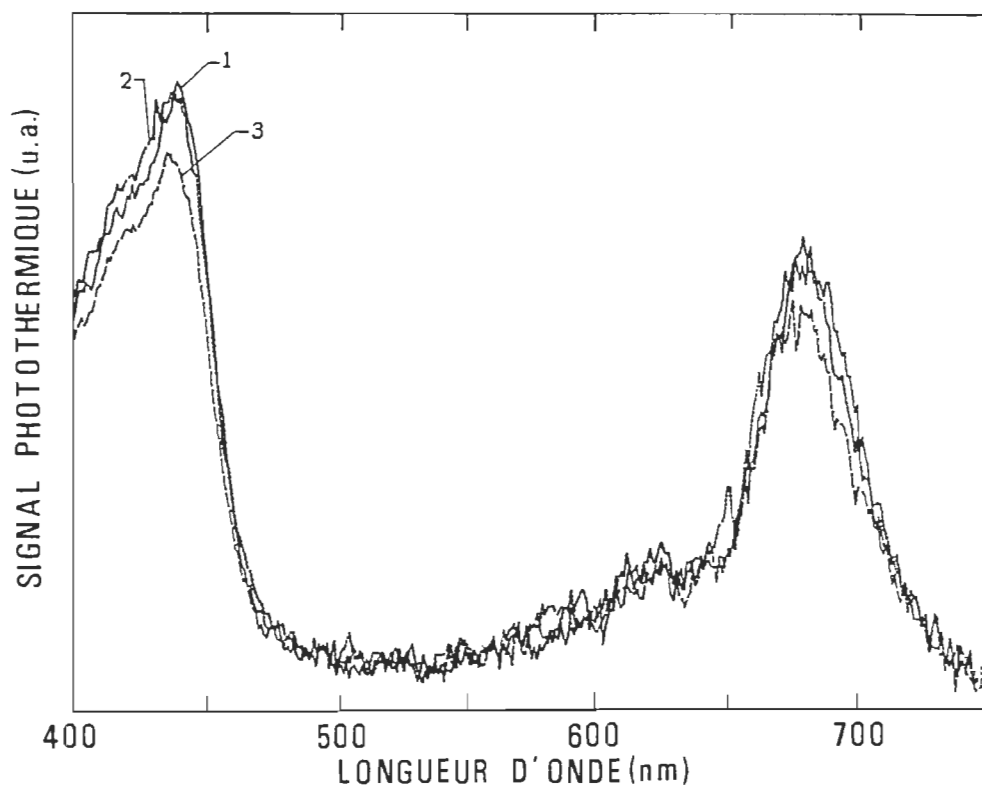


Figure 36 Spectres photothermiques de dix monocou-
ches de chlorophylle *a*, suite à une ex-
position de 180 minutes aux vapeurs de
dioxane. Spectres pris après un séjour
de 10 (1), 40 (2) et 60 (3) minutes dans
le tampon phosphate. ($I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $f =$
80 Hz, c.t. = 1.25 s).

A quelques occasions, durant les expériences d'exposition au dioxane, nous observons la présence de deux bandes dans le rouge, à 690 et 697 nm. Ces pics ne sont pas réversibles dans l'air ou dans l'eau. Nous nous sommes aperçus, par chromatographie sur couche

Spectre (#)	λ (nm)	Intensité (V)	λ (nm)	Intensité (V)
1	440	0,2063	682	0,1512
2	438	0,2026	679	0,1548
3	436	0,1828	675	0,1338

Tableau 5 Valeurs de l'intensité des maximums des spectres d'effet mirage (résultats tirés de la figure 36).

mince, que la solution de chl était partiellement dégradée. Cependant les spectres d'absorption et d'excitation ne présentaient pas de changement notable. Si nous prenons une solution fraîche de chl, nous obtenons les deux mêmes bandes, suite à l'exposition au dioxane des films L-B, pour une durée prolongée (3 jours). Il faut donc faire très attention à la solution de chl que nous utilisons, lors d'un travail en monocouches.

Nous pouvons obtenir des spectres de différents types d'échantillons. Pour travailler avec des algues, des chloroplastes et des feuilles, nous devons bloquer les réactions photochimiques, avec une lumière actinique, si nous voulons avoir un spectre d'absorption réel

des pigments. Par contre, avec ces échantillons, nous pouvons effectuer des mesures qui nous donnent une indication sur l'utilisation de la lumière modulée absorbée par l'échantillon.

C) MESURE DE L'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer l'activité d'un échantillon. Nous avons vu dans la section théorique que les méthodes photothermiques nous permettent d'obtenir l'EEP. Il suffit d'utiliser une lumière monochromatique modulée excitatrice et une lumière blanche continue saturante.

1) EMMAGASINAGE DE L'ENERGIE PHOTOCHIMIQUE

L'EEP nous donne un indice de l'utilisation de la lumière absorbée. A la figure 37, nous avons un signal d'EM typique pour une feuille de pois. Avec la lumière modulée allumée, nous mesurons la chaleur dégagée par l'échantillon *via* le processus de désexcitation non-radiative. Une partie inconnue de la lumière modulée absorbée sert lors des réactions photochimiques. Si

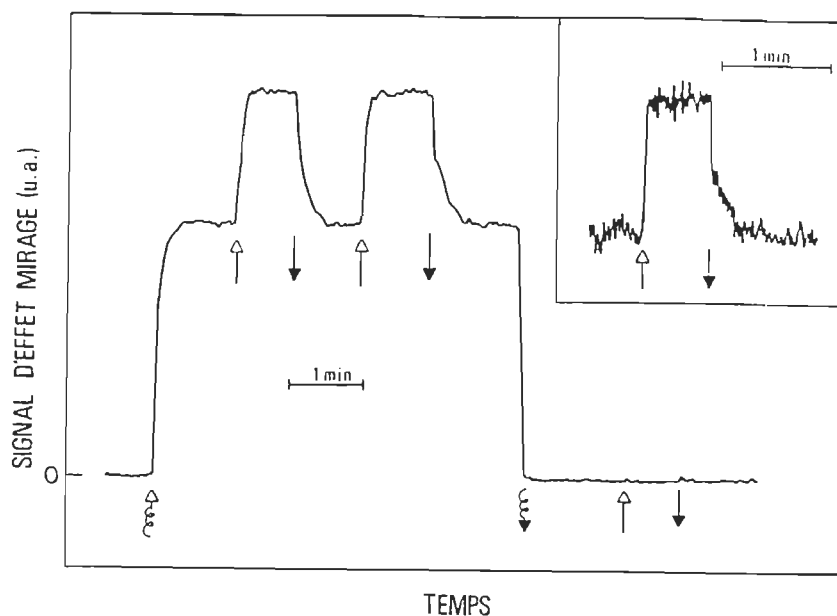


Figure 37 Effet de la lumière actinique sur le signal d'effet mirage d'une feuille de pois ($\lambda = 680 \text{ nm}$, $I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $I_a = 270 \text{ W m}^{-2}$, $f = 18 \text{ Hz}$, c.t. = 1.25 s). Lumière modulée allumée (\uparrow) et éteinte (\downarrow); lumière actinique allumée (\uparrow) et éteinte (\downarrow). Vignette: le même signal mesuré avec une constante de temps de 400 ms.

nous éclairons l'échantillon avec une lumière actinique, nous saturons les réactions photochimiques et l'échantillon réémet toute la lumière modulée absorbée sous forme de chaleur. Pour calculer l'EEP, nous prenons la différence du signal en présence et en absence de la lumière actinique, que nous divisons par le si-

gnal maximum. L'EEP représente donc la portion de la lumière modulée utilisée par la plante lors des réactions photochimiques. Par exemple, à la figure 37, la feuille de pois, avec un EEP de 0,34, utilise 34 % de la lumière modulée dans les réactions photochimiques et le reste (66 %) est dégagé sous forme de chaleur.

Nous remarquons que, suite à l'ouverture du faisceau actinique, nous avons une réponse immédiate du signal. Par contre, à la fermeture, il existe un délai de 20 à 30 secondes avant le retour au niveau initial (figure 37). Ce délai est probablement dépendant de la grosseur du "pool" d'accepteurs d'une étape limitative de la chaîne du transport d'électron de la photosynthèse.

Pour que notre raisonnement soit valable, la lumière actinique doit être saturante. Nous mesurons donc l'augmentation du signal photothermique suite à l'application du faisceau actinique, pour différentes intensités de la lumière. Pour une feuille de pois (figure 38), nous voyons une saturation du signal aux intensités supérieures à 150 W m^{-2} . Pour toutes les autres mesures d'EEP, nous travaillons toujours dans des conditions de saturation de la photosynthèse.

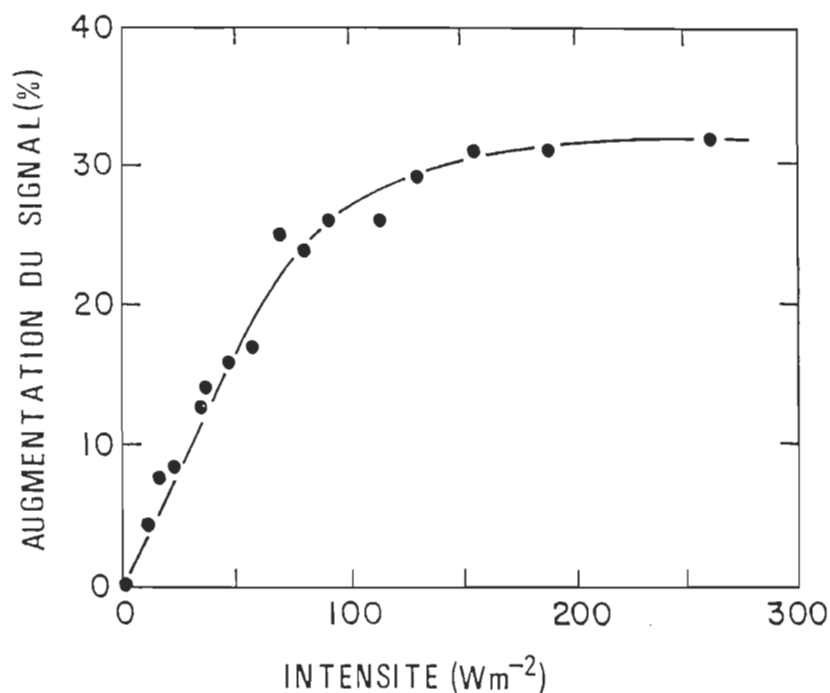


Figure 38 Effet de l'intensité de la lumière actinique sur l'augmentation du signal photothermique d'une feuille de pois ($\lambda = 680 \text{ nm}$, $I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $f = 18 \text{ Hz}$).

Non seulement l'intensité de la lumière actinique fait varier l'EEP apparent, mais l'intensité du faisceau modulé l'influence également. A la figure 39, nous voyons l'effet marqué de l'intensité de la lumière modulée sur l'EEP, qui varie de 0.42 à 0.11, pour une feuille de pois. Nous mesurons, en EM, l'EEP à des intensités très faibles de la lumière modulée (1 à 2 W m^{-2}). En PA, nous ne pouvons travailler dans ces conditions, car le rapport S/B est trop faible. Une saturation partielle de la photosynthèse par la lumière

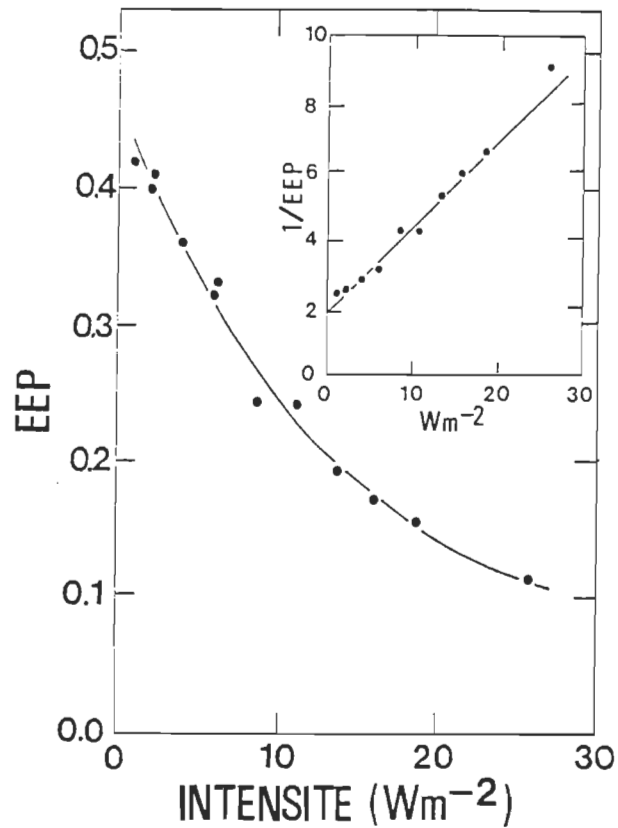


Figure 39 Effet de l'intensité de la lumière modulée sur l'emmagasinement d'énergie photochimique (EEP) d'une feuille de pois ($\lambda = 680 \text{ nm}$, $I_a = 160 \text{ W m}^{-2}$, $f = 18 \text{ Hz}$). Vignette: l'inverse de l'emmagasinement d'énergie photochimique en fonction de l'intensité de la lumière modulée.

modulée cause la dépendance que nous observons. Si nous traçons l'inverse de l'EEP en fonction de l'intensité, nous obtenons une relation linéaire (vignette de la figure 39), que nous pouvons extrapoler pour une inten-

sité nulle, ce qui nous donne l'EEP maximal de la plante. Dans le cas d'une jeune feuille de pois, nous obtenons une valeur extrapolée de l'EEP de l'ordre de 55 %. La valeur extrapolée de l'EEP va dépendre de l'âge de la feuille. Nous obtenons des valeurs maximales pour des feuilles qui viennent d'ouvrir, "fully expand" (p. ex. figure 39). Si nous attendons quelques jours, les valeurs seront inférieurs, de l'ordre de 20 à 30 %. Comme si les jeunes feuilles avaient un plus grand besoin énergétique.

Nous mesurons l'EEP en EM et en PA, pour comparer les deux techniques. Au tableau 6, nous présentons nos résultats pour différentes fréquences de modulation. Avec la spectroscopie PA, nous devons mesurer l'EEP à haute fréquence de modulation, si nous ne voulons pas que l'oxygène contribue au signal. Les valeurs de l'EEP mesuré avec les deux méthodes se comparent fort bien. Le fait que l'EEP soit similaire à basse et haute fréquence de modulation supporte l'hypothèse de base de la méthode de calcul vectorielle en PA (Poulet *et al.*, 1983). Le calcul permet d'estimer la composante liée au dégagement d'oxygène à basse fréquence de modulation.

Fréquence de modulation (Hz)	EEP	
	EM	PA
25	0.28±0.08	-----
403	-----	0.32±0.04
513	-----	0.33±0.02
603	-----	0.33±0.02

Tableau 6 Comparaison de l'emmagasinement d'énergie photochimique (EEP) d'une feuille de pois mesuré à basse fréquence de modulation en effet mirage (EM) et à haute fréquence en photoacoustique (PA) ($\lambda = 680 \text{ nm}$, $I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$; $I_a = 160 \text{ W m}^{-2}$).

Le fait que l'EEP soit identique à basse et haute fréquence nous suggère que l'emmagasinement d'énergie au niveau des intermédiaires de la chaîne de transport d'électrons est identique. A 25 Hz, l'emmagasinement d'énergie se produit au niveau d'un accepteur d'électrons qui a un temps de vie de 6 ms (réciproque de la fréquence angulaire) alors qu'à 600 Hz, nous travaillons avec des intermédiaires d'une durée de vie de 0.25 ms.

Ces résultats nous montrent que peu d'énergie est perdue dans les réactions photochimiques qui se produisent entre 0.25 et 6 ms.

Dans le cadre de notre étude, nous avons mesuré l'EEP de chloroplastes (≈ 0.1) d'algues (0.1 à 0.2) et de plusieurs espèces de plantes (0.1 à 0.5). Chez les plantes, l'EEP varie en fonction des conditions de culture, de l'âge, de la variété, de l'espèce ainsi que de la face de la feuille où s'effectue la mesure. Par exemple, pour une feuille de maïs, l'EEP est plus grand sur la face supérieure (≈ 0.35). Mais le rapport S/B est très faible à cause de la présence de nombreux poils, sur cette face, qui augmente le bruit. Par contre la face inférieure présente un bon rapport S/B, mais l'EEP est plus faible (≈ 0.15). C'est l'alignement laser-échantillon qui limite le champ d'application du système. En effet, il est très difficile de travailler avec des échantillons pubescents (maïs) ou non plats avec des nervures importantes (haricot).

Jusqu'à présent, nous soutenons que nous mesurons l'EEP de la photosynthèse. Nous n'avons cependant aucune preuve de ce que nous suggérons. Nous avons donc vérifié l'effet d'un inhibiteur de la photosynthèse.

2) EFFET DU DCMU

Le DCMU est un inhibiteur connu de la photosynthèse, qui bloque la chaîne de transport d'électrons entre Q_A et Q_B (Krause and Weis, 1984). Pour étudier l'effet du DCMU en PA (Popovic *et al.*, 1987; Carpentier *et al.*, 1989), nous devons incuber l'échantillon puis mesurer l'EEP et le comparer avec l'EEP d'un témoin. Un des plus grands avantages de la technique d'EM, est la possibilité de travailler en milieu aqueux. Ceci permet de suivre une cinétique dans le temps de l'effet d'un inhibiteur. Il suffit de mesurer l'EEP de l'échantillon, puis d'ajouter dans la cellule le produit à étudier.

A la figure 40, nous voyons l'effet du DCMU sur une feuille de pois, à une concentration de 10^{-4} M. Après une période d'attente d'environ 25 minutes, nous notons une diminution importante de l'EEP. Le délai de 25 minutes représente le temps de pénétration du DCMU dans la feuille. Après une période de 100 minutes, l'échantillon est totalement inactif. Comme le DCMU inhibe l'EEP, ceci confirme l'hypothèse que l'EEP est relié à l'activité photosynthétique de la plante.

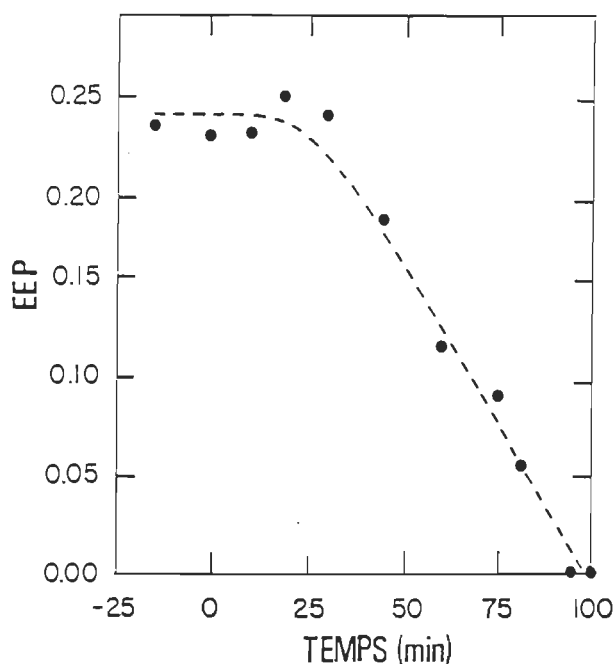


Figure 40 Effet du DCMU sur l'emmagasinement d'énergie photochimique d'une feuille de pois. A 0 minute, nous injectons le DCMU dans la cellule d'effet mirage à une concentration finale de 10^{-4} M (dans 2 % d'alcool) ($\lambda = 480$ nm, $I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $I_a = 160 \text{ W m}^{-2}$, $f = 35$ Hz).

Suite à un problème avec le fournisseur, nous changeons de variété de pois. Nous travaillons maintenant avec "little marvel", plutôt que "homesteader". Les plantes de pois "little marvel" sont grimpantes avec des feuilles plus minces. Avec cette variété, nous effectuons une étude sur l'effet de la concentration du DCMU. Nous présentons nos résultats à la figure 41.

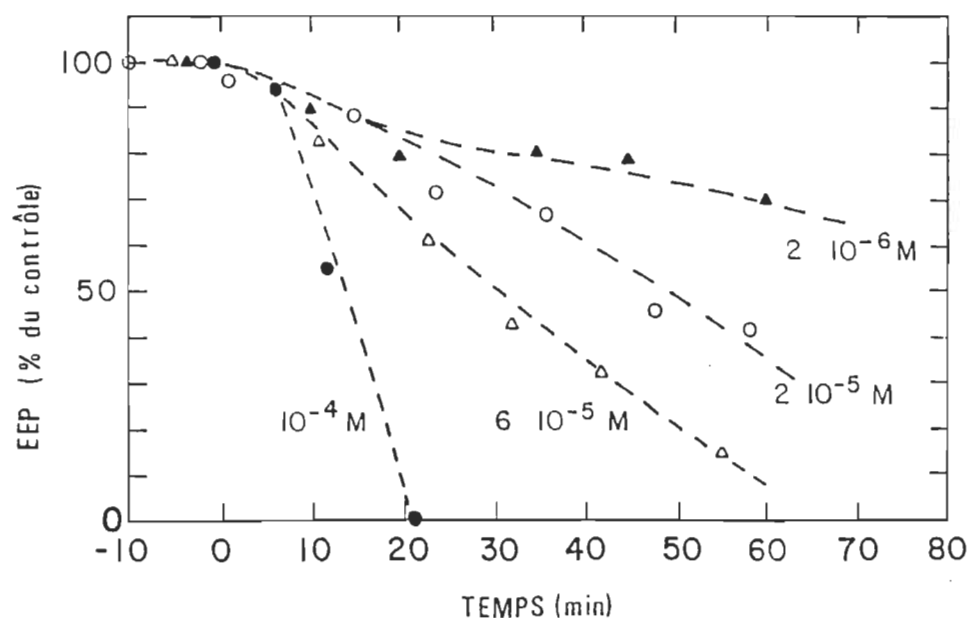


Figure 41 Effet du DCMU, à différentes concentrations, sur l'emmagasinement d'énergie photochimique d'une feuille de pois. A 0 minute, nous injectons le DCMU dans la cellule d'effet mirage à des concentrations finales de $2 \times 10^{-6} M$, $2 \times 10^{-5} M$, $6 \times 10^{-5} M$ et $10^{-4} M$ (dans moins de 2 % d'alcool) ($\lambda = 680 \text{ nm}$, $I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $I_a = 160 \text{ W m}^{-2}$, $f = 35 \text{ Hz}$).

Nous notons que le délai d'action est maintenant d'environ dix minutes. Après un séjour de 20 minutes à une concentration de $10^{-4} M$, l'échantillon ne présente plus d'activité. Ces différences fondamentales dans l'action du DCMU seraient causées par des différences morpholo-

giques entre les feuilles des deux variétés. Comme le délai d'attente est uniquement de dix minutes, ceci nous montre que le DCMU peut s'infiltrer beaucoup plus facilement dans ce type de feuille. En effet, même avec une concentration de 2×10^{-6} M, nous notons une inhibition de l'EEP par le DCMU.

Dans la littérature, nous retrouvons plusieurs produits qui inhibent la photosynthèse. Nous pouvons avec l'EM étudier directement leur action à condition qu'ils soient solubles dans l'eau. Il existe d'autres types de traitement qui agissent sur l'activité d'une feuille. Nous allons maintenant voir l'action d'un stress thermique sur les mesures de l'EEP.

3) EFFET D'UN STRESS THERMIQUE

L'application d'un stress thermique à une feuille inhibe le transport d'électrons du PS II (Quinn and Williams, 1985). Nous mesurons en EM l'EEP d'un échantillon. Ensuite, nous le plaçons dans un bain thermostaté pour une période de 15 minutes à différentes températures (36 et 47 °C). Suite à ce traitement, nous prenons de nouveau l'EEP. Nous exprimons les résultats

de l'EEP en pourcentage du contrôle, en fonction de la température (figure 42). Il existe une dépendance marquée de l'EEP en fonction de la température. A 41.5°C , nous observons 50 % d'inhibition de l'activité. Alors que pour les températures supérieures à 45°C , l'inhibition est totale.

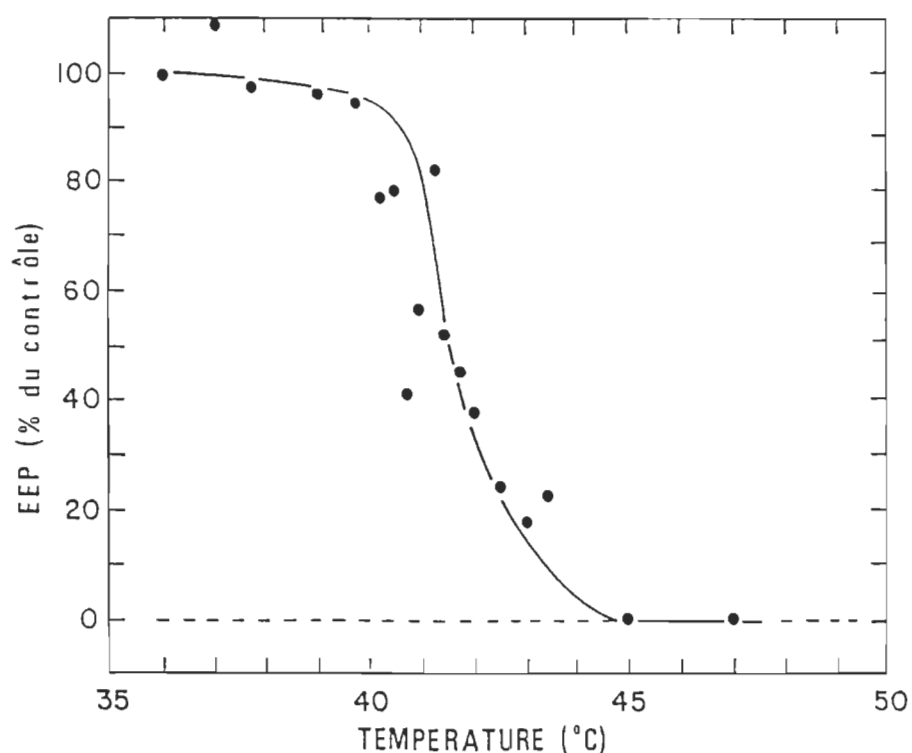


Figure 42 Effet de la température, suite à un stress de 15 minutes, sur l'emmagasinement d'énergie photochimique (EEP) d'une feuille de pois. L'EEP s'exprime en pourcentage du contrôle ($\lambda = 680 \text{ nm}$, $I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $I_a = 160 \text{ W m}^{-2}$, $f = 28 \text{ Hz}$).

Nous avons également vérifié l'effet de la durée du stress thermique (figure 43). Nous obtenons une diminution rapide et linéaire de l'EEP avec l'augmentation de la durée du traitement.

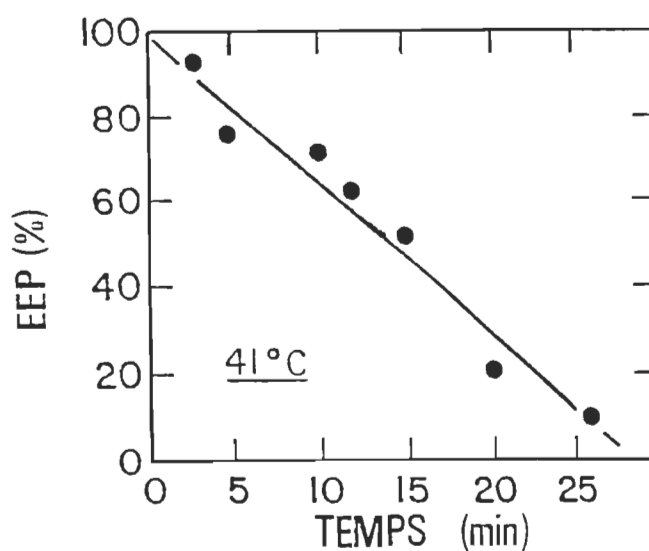


Figure 43 Effet de la durée d'un stress thermique sur l'emmagasinement d'énergie photochimique (EEP) d'une feuille de pois. L'EEP s'exprime en pourcentage du contrôle ($\lambda = 680 \text{ nm}$, $I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $I_a = 160 \text{ W m}^{-2}$, $f = 28 \text{ Hz}$).

Nous avons vu, que si nous traçons un graphique de l'inverse de l'EEP en fonction de l'intensité de la lumière modulée, nous obtenons la valeur de l'EEP maximal extrapolée pour une intensité nulle. Nous vérifions

l'effet de la durée du stress thermique sur cette relation, pour une feuille de pois. Nous présentons les résultats à la figure 44. Nous pouvons voir que les échantillons réagissent différemment en fonction de la

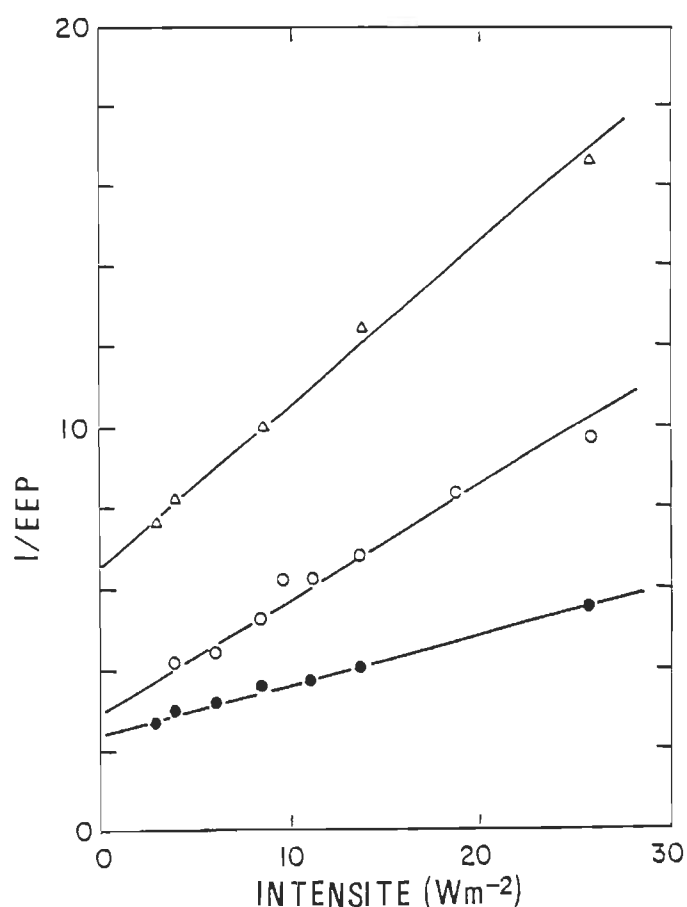


Figure 44 Valeurs de l'inverse de l'emmagasinement d'énergie photochimique en fonction de l'intensité de la lumière modulée, chez des feuilles de pois; pour des incubations à 41.5 °C d'une durée de 0 (●), 8 (○) et 15 minutes (Δ) ($\lambda = 680 \text{ nm}$, $I_0 = 160 \text{ W m}^{-2}$, $f = 28 \text{ Hz}$).

durée du traitement. Après huit minutes d'exposition à 41.5°C , la valeur extrapolée pour une intensité nulle a été réduite d'environ 20 %, comparée au témoin. Par contre, si nous utilisons une intensité de 20 W m^{-2} , l'inhibition apparente est de 45 %. Pour un stress d'une durée plus grande, 15 minutes, nous notons une diminution de l'EEP, qui représente une inhibition d'environ 60 % pour toutes les intensités de la lumière modulée. Ces résultats nous portent à croire que le stress thermique agit au moins à deux niveaux, causant une diminution de l'efficacité photochimique et une modification des caractéristiques de la saturation par la lumière.

La température de l'inhibition complète de l'activité photochimique est reliée au degré de résistance thermique de la plante. Nous travaillons avec deux variétés de blé, connues pour être sensible (Durelle) et résistante (Mohamed Ben Bachir) à la chaleur, pour vérifier si nous pouvons reconnaître avec l'EM le degré de résistance. Nous soumettons chaque variété à un stress de 15 minutes à 40.5°C , puis nous regardons le pourcentage d'inhibition (tableau 7). La variété résistante présente toujours 55 % de l'EEP initial, alors que la variété sensible est totalement inhibée. À partir de ces résultats, nous croyons que la technique

d'EM peut servir de méthode pour le dépistage des plantes tolérantes à la chaleur. En plus d'être utile pour l'étude de la résistance à un stress thermique, l'EM pourrait s'avérer fort utile lors d'études sur les polluants.

	EEP	
	Résistante	Sensible
Contrôle	0.29±0.06	0.15±0.07
Après le stress	0.16±0.09	0.00±0.00
% d'inhibition	45	100

Tableau 7 Effet d'un stress thermique, de 15 minutes à 40.5 °C, sur l'emmagasinement d'énergie photochimique (EEP) de deux variétés de blé; une sensible (Durelle) et une résistante (Mohamed Ben Bachir) à la chaleur ($\lambda = 680 \text{ nm}$, $I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $I_a = 160 \text{ W m}^{-2}$, $f = 18 \text{ Hz}$).

4) EFFET DU PHENOL

Nous étudions l'effet du phénol, puisque c'est un polluant que nous retrouvons en grande quantité dans les cours d'eau où se fait le flottage de bois. Nous avons voulu vérifier l'effet du phénol sur l'activité photosynthétique. A la figure 45, nous présentons nos résultats. Nous plaçons l'échantillon, une feuille de pois, dans la cellule, et nous calculons l'EEP. Par la suite, nous ajoutons le phénol directement dans la cellule pour obtenir une concentration finale de 40 ppm. Nous suivons alors dans le temps l'action du phénol sur l'activité photochimique de la plante. Après une période d'environ cinq minutes, nous notons une diminution de l'EEP. Puis très rapidement, après 15 minutes, nous avons une inhibition complète de l'activité. La lumière actinique n'a plus d'effet sur le signal photothermique. L'action du phénol produit une diminution progressive de l'emmagasinement de l'énergie dans la photosynthèse. Nous notons qu'après un certain temps le signal de l'échantillon ne retourne plus à son niveau initial, à l'extinction de la lumière actinique, ce qui provoque une diminution de l'EEP.

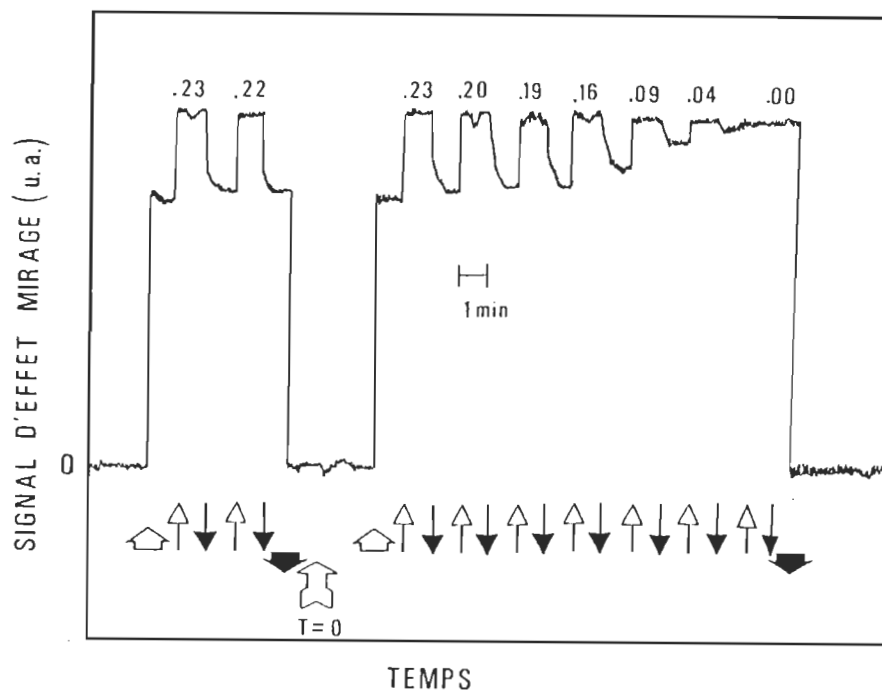






Figure 45 Effet du phénol sur le signal photothermique d'une feuille de pois. Les valeurs au-dessus du signal représentent l'emmagasinement d'énergie photochimique. Lumière modulée allumée () et éteinte (); lumière actinique allumée () et éteinte (); à T = 0 addition du phénol pour obtenir une concentration finale de 40 ppm ($\lambda = 680 \text{ nm}$, $I_0 = 14 \text{ W m}^{-2}$, $I_a = 160 \text{ W m}^{-2}$, $f = 35 \text{ Hz}$).

Nous avons étudié un seul agent polluant. Par contre, nous croyons que grâce à la spectroscopie par EM,

nous pourrons étudier toute une gamme de polluants des milieux aqueux sur différents végétaux. Nous pourrons probablement, tout comme pour le stress thermique, déterminer les plantes résistantes et sensibles aux polluants.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Le but de notre travail consiste en la mise au point d'un spectrophotomètre par EM qui permet de mesurer l'EEP de différents échantillons photosynthétiques. Il existe présentement trois méthodes photothermiques qui permettent ce type de mesure, soit la radiométrie photothermique (Kanstad *et al.*, 1983), la cellule piézoélectrique ouverte (De Paula *et al.*, 1987) et la spectroscopie photoacoustique (Bults *et al.*, 1981; Carpentier *et al.*, 1985 et 1986). Les appareils de radiométrie et de piézoélectrique offrent certains avantages sur la PA, mais leur rapport S/B est très faible. Jusqu'à maintenant, la PA est la technique photothermique la plus utilisée pour l'étude de la photosynthèse, mais elle comporte certains inconvénients que nous voulons pallier avec l'EM.

Le rapport S/B du spectrophotomètre par EM, pour un échantillon dans l'eau à basse fréquence de modulation, se compare aux valeurs obtenues en PA. Cependant, pour mesurer l'EEP en PA, nous devons travailler à haute fréquence de mo-

dulation où le rapport S/B est inférieur. Par contre en EM, l'EEP s'obtient à toutes les fréquences de modulation, en particulier dans l'intervalle de 15 à 150 Hz qui présente un bon rapport S/B. L'EEP mesuré en EM à basse fréquence et en PA à haute fréquence est similaire. Ce fait expérimental supporte l'hypothèse de base de Poulet *et al.* (1983) à l'effet que l'estimation du dégagement d'oxygène peut être déduite par le calcul vectoriel en spectroscopie PA. Ces valeurs d'EEP identiques à basse et haute fréquence de modulation nous suggèrent un emmagasinage d'énergie du même ordre de grandeur dans un intervalle compris entre 6 et 25 ms pour les accepteurs d'électrons.

Pour un échantillon dans l'air, la sensibilité de l'EM est limitée, c'est pourquoi nous devons prendre les mesures à une fréquence d'environ 30 Hz. Cependant, comme le volume de la cellule est plus grand que celui d'une cellule utilisée en spectroscopie PA, nous pourrions tirer avantage de cette méthode pour étudier l'effet de mélanges gazeux, sans nous retrouver au point de compensation du CO₂ de la feuille sous étude.

Avec l'appareil d'EM, nous mesurons des spectres de systèmes modèles, comme des films de L-B et amorphes de chl *a*. Nous obtenons également des spectres avec des échantillons comme des algues, des chloroplastes et des feuilles.

Les spectres des films, des algues et des chloroplastes ressemblent à ce que nous mesurons en PA. Par contre, les spectres de feuilles présentent une résolution spectrale supérieure. En EM, nous observons sept pics distincts qui peuvent être attribués aux bandes d'absorption des pigments suivants: la chl *a* (434, 588, 613 et 673 nm), la chl *b* (464 et 646 nm) et les caroténoïdes (468 nm). Nous différencions également les feuilles immatures et matures d'érable par la présence d'une bande additionnelle à 550 nm, reliée aux anthocyanines qui se retrouvent dans les jeunes feuilles (Harborne, 1976).

Avec les algues, les chloroplastes et les feuilles, nous mesurons aussi l'EEP. Cependant, nous sommes limités par le mode de détection de la technique spectroscopique. En effet, nous devons garder un alignement constant entre le laser et l'échantillon. Par conséquent, il est très difficile de travailler avec des feuilles pubescentes (maïs) et avec beaucoup de nervures (haricot), car elles produisent un fort bruit de fond. Nous sommes donc dans l'obligation de choisir les espèces de plantes en nous basant sur la morphologie des feuilles.

La présence de nervures sur un échantillon peut changer la longueur d'interaction, entre le faisceau laser et le gradient thermique de l'échantillon dont dépend le signal.

Ainsi, pour une feuille de pois à différentes positions, l'amplitude du signal change alors que l'EEP reste identique. L'amplitude du signal photothermique sera toujours arbitraire pour des échantillons de feuilles car l'irrégularité de la surface de l'échantillon fait varier l'amplitude du signal.

Par contre, l'EEP reste constant pour un même échantillon et représente une indication de l'utilisation de la lumière modulée absorbée par la plante. L'EEP va varier en fonction des conditions de culture, de l'âge de la plante, de la variété et de l'espèce. Il faut donc accorder beaucoup d'attention aux conditions expérimentales.

Nous avons vu également que l'EEP varie en fonction de l'intensité des lumières actinique et modulée. Nous devons toujours travailler dans des conditions de saturation avec la lumière actinique pour avoir une interprétation valable de l'utilisation de la lumière absorbée. La relation linéaire qui existe entre l'inverse de l'EEP et l'intensité de la lumière modulée nous montre qu'il existe une saturation partielle de la photosynthèse. Pour avoir un ordre de grandeur de l'emmagasinement maximum d'énergie dans les réactions photochimiques, nous pouvons employer la valeur extrapolée de l'EEP pour une intensité nulle. Si nous étudions l'EEP suite à un stress, nous pouvons obtenir des pourcentages d'inhibi-

tion différents pour une intensité fixe et pour la valeur extrapolée. C'est ce que nous montre l'expérience avec le stress thermique, où nous observons une action de la chaleur au niveau d'au moins deux mécanismes; ceci cause une diminution de l'efficacité photochimique et change les caractéristiques de la saturation à la lumière.

Cependant, le plus grand avantage qu'offre la spectroscopie par EM, est la possibilité de travailler en milieu aqueux. Nous pouvons ainsi observer directement l'action d'un inhibiteur (p. ex. DCMU) ou d'un polluant (p. ex. phénol) sur l'EEP. Nous savons que le DCMU bloque le transport d'électrons. Par son inhibition de l'EEP, nous avons un indice de la mesure de l'emmagasinement de l'énergie dans les réactions photochimiques. L'expérience avec le phénol et celle sur les espèces sensibles et résistantes à la chaleur, nous porte à croire que l'EM pourra s'avérer très utile dans les études sur l'effet des polluants sur les végétaux en milieu aqueux.

Le spectrophotomètre par effet mirage que nous avons construit offre beaucoup de possibilités pour l'étude d'échantillons photosynthétiques, autant pour l'obtention de spectres que pour l'étude de l'EEP. Cette nouvelle technique devrait permettre d'augmenter nos connaissances sur la photosynthèse.

REFERENCES

- Amer, N. M. and M. A. Olmstead, 1983. A novel method for the study of optical properties of surfaces. *Surf. Sci.*, 132, 68-72.
- Asano, A., T. Ichimura, H. Sakai and Y. Uchida, 1986. Subgap absorption of boron-doped and undoped a-SiC:H detected by photothermal deflection spectroscopy. *Jap. J. Appl. Phys.*, 25, L388-L390.
- Badoz, J., A. C. Boccara et D. Fournier, 1983. La photoacoustique une résurrection réussie. *Act. Chim.*, Oct., 20-28.
- Boccara, A. C., D. Fournier and J. Badoz, 1980 a. Thermo-optical spectroscopy: Detection by the "mirage effect". *Appl. Phys. Lett.*, 36, 130-132.
- Boccara, A. C., D. Fournier, W. Jackson and N. M. Amer, 1980 b. Sensitive photothermal deflection technique for measuring absorption in optically thin media. *Opt. Lett.*, 5, 377-379.

- Boucher, F. and R. M. Leblanc, 1981. Simple device to measure photoacoustic spectra from 77 to 300 K. *Can. J. Spectrosc.*, 26, 190-193.
- Boucher, F., R. M. Leblanc, S. Savage and B. Beaulieu, 1986. Depth-resolved chromophore analysis of bovine retina and pigment epithelium by photoacoustic spectroscopy. *Appl. Opt.*, 25, 515-520.
- Braslavsky, S. E., 1986. Photoacoustic and photothermal methods applied to the study of radiationless deactivation process in biological systems and in substances of biological interest. *Photochem. Photobiol.*, 43, 667-675.
- Bults, G., B. A. Horwitz, S. Malkin and D. Cahen, 1981. Frequency-dependent photoacoustic signals from leaves and their relation to photosynthesis. *FEBS Lett.*, 129, 44-46.
- Bults, G., B. A. Horwitz, S. Malkin and D. Cahen, 1982. Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in whole leaves. Photochemistry and gas exchange. *Biochim. Biophys. Acta*, 679, 452-465.

- Buschmann, C., 1989. Photoacoustic measurements: Application in plant science. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B 323, 423-434.
- Camm, E. L., R. Popovic, L. Lorrain, R. M. Leblanc and M. Fragata, 1988. Photoacoustic characterization of energy storage of photosystem 2 core-enriched particles from barley isolated with the octyl- β -D-glucopyranoside detergent. *Photosynthetica*, 22, 27-32.
- Canaani, O., D. Cahen and S. Malkin, 1982. Photosynthetic chromatic transition and Emerson enhancement effects in intact leaves studied by photoacoustics. *FEBS Lett.*, 150, 142-146.
- Canaani, O. and S. Malkin, 1984. Distribution of light excitation in an intact leaf between the two photosystems of photosynthesis. Changes in absorption cross-section following state 1 - state 2 transitions. *Biochim. Biophys. Acta*, 766, 513-524.
- Carpentier, R., B. Larue and R. M. Leblanc, 1983. Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans*. II. Characterization of pigment holochroms and thermal deactivation spectrum. *Arch. Biochem. Biophys.*, 222, 411-415.

- Carpentier, R., B. Larue and R. M. Leblanc, 1984. Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans*. III. Detection of photosynthetic activities. *Arch. Biochem. Biophys.*, 228, 534-543.
- Carpentier, R., R. M. Leblanc and M. Mimeault, 1989. Photoacoustic energy storage in photosystem II submembrane fractions. *Biochim. Biophys. Acta*, 975, 370-376.
- Carpentier, R., H. C. P. Matthijs, R. M. Leblanc and G. Hind, 1986. Monitoring energy conversion in photosystem I of cyanobacterial heterocysts by photoacoustic spectroscopy. *J. Can. Phys.*, 64, 1136-1138.
- Carpentier, R., H. Y. Nakatani and R. M. Leblanc, 1985. Photoacoustic detection of energy conversion in a Photosystem II submembrane preparation from spinach. *Biochim. Biophys. Acta*, 808, 470-473.
- Cerovic, Z. G. and M. Plesnicar, 1984. An improved procedure for the isolation of intact chloroplasts of high photosynthetic capacity. *Biochem. J.*, 223, 543-545.
- Cielo, P., G. Rousset and L. Bertrand, 1986. Photoacoustic and photothermal evaluation of stratified materials. *Appl. Opt.*, 25, 1327-1334.

- Coufal, H., 1984 a. Photothermal spectroscopy using a pyroelectric thin-film detector. *Appl. Phys. Lett.*, 44, 59-61.
- Coufal, H., 1984 b. Photothermal spectroscopy of weakly absorbing samples using a thermal wave phase shifter. *Appl. Phys. Lett.*, 45, 516-518.
- Coufal, H., 1986 a. Photothermal spectroscopy: Applications in surface sciences and in chemical analysis. *Fres. Z. Anal. Chem.*, 324, 456-462.
- Coufal, H., 1986 b. Pyroelectric detection of radiation-induced thermal wave phenomena. *IEEE*, UFFFC-33, 507-512.
- Coufal, H. and J. F. McClelland, 1988. Photothermal and photoacoustic spectroscopy. *J. Mol. Struct.*, 173, 129-140.
- Decker, F., R. T. Neuenschwander, C. L. Cesar and A. F. S. Penna, 1987. The mirage effect in electrochemistry. *J. Electroanal. Chem.*, 228, 481-486.
- Delieu, T. and D. A. Walker, 1981. Polographic measurement of photosynthetic oxygen evolution by leaf discs. *New Phytol.*, 89, 165-178.

- Désormeaux, A. and R. M. Leblanc, 1985. Electronic and photoacoustic spectroscopies of chlorophyll *a* in monolayer and multilayer arrays. *Thin Solid Films*, 132, 91-99.
- De Paula, M. H. and M. A. Aegerter, 1986. Photothermal deflection spectroscopy for ultra trace analysis of cobalt and copper ions. *Anal. Lett.*, 19, 251-265.
- De Paula, M. H., M. A. Carvalho, L. M. Alves and M. A. Aegerter, 1987. An open-ended photothermal cell for *in vivo* measurements. *J. Appl. Phys.*, 61, 2617-2620.
- Dioszeghy, T. and A. Mandelis, 1986. Studies of defect structure effects on the transport properties of pure crystalline *n*-CdS *via* the temperature dependence of photoacoustic and photocurrent spectra. *J. Phys. Chem. Solids*, 47, 1115-1128.
- Ducharme, D., A. Tessier and R. M. Leblanc, 1979. Design and characteristics of a cell for photoacoustic spectroscopy of condensed matter. *Rev. Sci. Instrum.*, 50, 1461-1462.
- Field, R. S., D. E. Leyden, T. Masujima and E. M. Eyring, 1985. Quantitative applications of photothermal beam

- deflection photoacoustic spectrometry. *Appl. Spectrosc.*, 39, 753-755.
- Fotiou, F. K. and M. D. Morris, 1986. Photothermal deflection densitometer with pulsed-UV laser excitation. *Appl. Spectrosc.*, 40, 700-704.
- Fournier, D. and A. C. Boccara, 1987. Photothermal deflection spectroscopy of semiconductors. In A. Mandelis (Ed.), *Photoacoustic and thermal wave phenomena in semiconductors*. North-Holland, New York, 237-255.
- Fournier, D., C. Boccara, A. Skumanich and N. M. Amer, 1986. Photothermal investigation of transport in semiconductors: Theory and experiment. *J. Appl. Phys.*, 59, 787-795.
- Frackowiak, D., L. G. Erokhina, A. Balter, L. Lorrain, J. Szurkowski and B. Szych, 1986. Polarized absorption and photoacoustic spectra of phycobilisomes embedded in poly(vinyl alcohol) films. *Biochim. Biophys. Acta*, 851, 173-180.
- Frackowiak, D., L. Lorrain, D. Wrobel and R. M. Leblanc, 1985. Polarized photoacoustic, absorption and fluorescence spectra of chloroplasts and thylakoids oriented

in polyvinyl alcohol films. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126, 254-261.

Frosio, G., N. Wyrsch, H. Curtins and A. Shah, 1986. Photo-thermal deflection spectroscopy: System design and some measurement results for α -Si:H. *Helv. Phys. Acta*, 59, 1114-1117.

Gendre, D., 1987. Mesure par effet mirage de la diffusivité thermique jusqu'à 500 K de matériaux opaques. *Rev. Gén. Therm.*, 301, 54-58.

Harborne, J. B., 1976. Functions of flavonoids in plants. In T. W. Goodwin (Ed.), *Chemistry and biochemistry of plant pigments, vol. 1*. Academic Press, London, 736-778.

Havaux, M., L. Lorrain and R. M. Leblanc, 1989. *In vivo* measurement of spectroscopic and photochemical properties of intact leaves using the "mirage effect". *FEBS Lett.*, 250, 395-399.

Havaux, M., L. Lorrain and R. M. Leblanc, 1990. A new method for *in vivo* measurements of thermal energy dissipation and photochemical energy conversion in intact leaves. *Photosynthes. Res.*, sous presse.

- Ikari, T., S. Shigetomi, Y. Koga and S. Shigetomi, 1984. Low-temperature photoacoustic spectra of *n*-InSe. *J. Phys. C*, 17, L969-L972.
- Jackson, W. B. and N. M. Amer, 1982. Direct measurement of gap-state absorption in hydrogenated amorphous silicon by photothermal deflection spectroscopy. *Phys. Rev. B*, 25, 5559-5562.
- Jackson, W. B., N. M. Amer, A. C. Boccara and D. Fournier, 1981. Photothermal deflection spectroscopy and detection. *Appl. Opt.*, 20, 1333-1344.
- Jolliffe, P. A. and J. Hoddinott, 1988. The assessment of net dry matter partitioning by stepwise multivariate analysis of variance. *Can. J. Bot.*, 66, 805-808.
- Kanstad, S. V., D. Cahen and S. Malkin, 1983. Simultaneous detection of photosynthetic energy storage and oxygen evolution in leaves by photothermal radiometry and photoacoustic. *Biochim. Biophys. Acta*, 722, 182-189.
- Kirkbright, G. F., R. M. Miller and D. E. M. Spillane, 1984. Depth resolved spectroscopic analysis of solid samples using photoacoustic spectroscopy. *Anal. Chem.*, 56, 2043-2048.

- Krause, G. H. and E. Weis, 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthes. Res.*, 5, 139-157.
- Kuo, P. K., M. J. Lin, C. B. Reyes, L. D. Favro, R. L. Thomas, S.-Y. Zhang, L. J. Inglehart, D. Fournier, A. C. Boccara and N. Yacoubi, 1985. Mirage effect measurement of thermal diffusivity. *Proceedings of the Fourth international topical meeting on photoacoustic, thermal and related sciences*. Ville d'Estérel, Québec, Canada, Ecole Polytechnique de Montréal, WB3.1-WB3.3.
- Lange, O. L., P. C. Harley, W. Beyschlag and J. D. Tenhunen, 1987. Gas exchange methods for characterizing the impact of stress on leaves. In J. D. Tenhunen, F. M. Catarino, O. L. Lange and W. C. Oechel (Ed.), *Plant response to stress. Functional analysis in mediterranean ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 3-25.
- Larue, B., R. M. Leblanc and A. Désormeaux, 1985. The origin of the photoacoustic effect in leaves from *Impatiens petersiana*. *Proceedings of the Fourth international topical meeting on photoacoustic, thermal and related sciences*. Ville d'Estérel, Québec, Canada, Ecole Polytechnique de Montréal, ThA8.1-ThA8.4.

- Lasser-Ross, N., S. Malkin and D. Cahen, 1980. Photoacoustic detection of photosynthetic activities in isolated broken chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 593, 330-341.
- Leblanc, R. M. and C. Chapados, 1976. Aggregation of chlorophylls in monolayers. *Biophys. Chem.*, 6, 77-85.
- Lepoutre, F., 1987. Mesures thermiques par les méthodes photothermiques. *Rev. Gén. Therm. Fr.*, 301, 8-14.
- Lepoutre, F. et J.-P. Roger, 1987. Mesures thermiques par effet mirage. *Rev. Gén. Therm. Fr.*, 301, 15-21.
- Lorrain, L., D. Frackowiak, M. Romanowski and R. M. Leblanc, 1987. Effect of stretching of chloroplasts and thylakoids embedded in polymer films. *Photosynthetica*, 21, 43-50.
- Lorrain, L., M. Havaux, A. Tessier and R. M. Leblanc, 1990. Photothermal spectroscopy of photosynthetic pigments *in vivo* and *in vitro*. *Photochem. Photobiol.*, 51, 491-496.
- Louis, G., P. Peretti, B. Mangeot and J. Billard, 1985. Photoacoustic detection of phase transitions in 4-Octyl-4'-Cyanobiphenyl. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 122, 261-267.

- Low, M. J. D. and C. Morterra, 1985. Infrared surface studies of opaque or scattering materials using photothermal beam deflection spectroscopy. *Adsorp. Sci. Tech.*, 2, 131-150.
- Low, M. J. D. and A. G. Severdia, 1983. Infrared spectra of a single human hair. *Spectrosc. Lett.*, 16, 871-877.
- Malkin, S. and D. Cahen, 1979. Photoacoustic spectroscopy and radiant energy conversion: Theory of the effect with special emphasis on photosynthesis. *Photochem. Photobiol.*, 29, 803-813.
- McDonald, F. A. and G. C. Wetsel, 1988. Theory of photothermal and photoacoustic effects in condensed matter. In W. P. Mason and R. N. Thurston (Eds.), *Physical acoustics, vol. XVIII*, Academic Press, Inc., New York, 167-277.
- Merle, A. M., A. Cherqaoui and C. Giannotti, 1983. Electron exchanges at the interface, porphyrin/semiconductor or insulator oxides, studied by PAS and "Mirage effect" detection. *J. Phys.*, 44 (coll. C6), C6-291 - C6-296.
- Melles Griot Optics, 1988. *Guide 4*, Nepean, ON.

- Munger, G., L. Lorrain, G. Gagné and R. M. Leblanc, 1987. Adjustable speed and vibration-free hydraulic system for Langmuir-Blodgett films deposition. *Rev. Sci. Instrum.*, 58, 285-288.
- Murphy, J. C. and L. C. Aamodt, 1980. Photothermal spectroscopy using optical beam probing: Mirage effect. *J. Appl. Phys.*, 51, 4580-4588.
- Nakamura, H., K. Tsubouchi, N. Mikoshiba and T. Fukuda, 1985. Nondestructive and noncontact observation of microdefects in GaAs wafers with a new photo-thermal-radiation microscope. *Jap. J. Appl. Phys.*, 24, L876-L879.
- O'Hara, E. P., R. D. Tom and T. A. Moore, 1983. Determination of the *in vivo* absorption and photosynthetic properties of the lichen *Acarospora schleicheri* using photoacoustic spectroscopy. *Photochem. Photobiol.*, 38, 709-715.
- Olmstead, M. A. and N. M. Amer, 1984. Polarization dependence of Ge (111)2x1 surface-state absorption using photothermal displacement spectroscopy: A test of surface reconstruction models. *Phys. Rev. B*, 29, 7048-7050.

- Omata, T. and N. Murata, 1983. Preparation of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and bacteriochlorophyll *a* by column chromatography with DEAE-Sepharose CL-6B and Sepharose CL-6B. *Plant Cell. Physiol.*, 24, 1093-1100.
- Papageorgiou, G., 1975. Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. In Govindjee (Ed.), *Bioenergetics of photosynthesis*. Academic Press, New York, 319-371.
- Pawliszyn, J., M. F. Weber, M. J. Dignam, A. Mandelis, R. D. Venter and S.-M. Park, 1986. Selective observation of concentration gradients by the laser beam deflection sensor applied to *in situ* electrochemical studies. A novel approach. *Anal. Chem.*, 58, 239-242.
- Petke, J. D., G. M. Maggiora, L. Shipman and R. E. Christoffersen, 1979. Stereoelectronic properties of photosynthetic and related systems. V- *Ab initio* configuration interaction calculation on the ground and lower excited singlet and triplet states of ethyl chlorophyllide *a* and ethyl pheophorbide *a*. *Photochem. Photobiol.*, 30, 203-223.
- Popovic, R., M. Beauregard and R. M. Leblanc, 1987. Photosynthetic action spectra of the energy storage in bun-

dle sheat cells of zea mays. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 144, 198-202.

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

Quinn, P. J. and W. P. Williams, 1985. Environmentally induced changes in chloroplast membranes and their effects on photosynthetic function. In J. Barber and N. R. Baker (Eds.), *Photosynthetic mechanisms and the environment*. Elsevier, Amsterdam, 1-47.

Roger, J. P., D. Fournier and A. C. Boccara, 1983. Studies of electrode-electrolyte interfaces *in situ* by mirage detection with polarization modulation. *J. Phys.*, 44 (coll. C6), C6-313 - C6-316.

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

Rousset, G. et F. Lepoutre, 1982. Mesures de diffusivités thermiques par la méthode photoacoustique et par l'effet mirage. *Rev. Phys. Appl.*, 17, 201-207.

- Royce, B. S. H., D. Voss and A. Bocarsly, 1983. Mirage effect studies of electrochemical processes. *J. Phys.*, 44 (coll. C6), C6-325 - C6-329.
- Salisbury, F. B. and C. W. Ross, 1978. *Plant Physiology*. (2nd ed.). Wadsworth Publishing Company Inc, Belmont, CA.
- Samson, G., J.-C. Morissette and R. Popovic, 1988. Copper quenching of variable fluorescence in *Dunaliella tertiolecta*. New evidence for a copper inhibition effect on PS II photochemistry. *Photochem. Photobiol.*, 48, 329-332.
- Schreiber, U., U. Schliwa and W. Bilger, 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.*, 10, 51-62.
- Staehelin, L. A. and C. J. Arntzen, 1983. Regulation of chloroplast membrane function: Protein phosphorylation changes the spatial organization of membrane components. *J. Cell. Biol.*, 97, 1327-1337.
- Tam, A. C., 1986. Applications of photoacoustic sensing techniques. *Rev. Mod. Phys.*, 58, 381-431.

- Tam, A. C. and C. K. N. Patel, 1979. Optical absorptions of light and heavy water by laser optoacoustic spectroscopy. *Appl. Opt.*, 18, 3348-3358.
- Tam, A. C. and Sontag, H., 1986. Measurement of air gap thickness underneath an opaque film by pulsed photothermal radiometry. *Appl. Phys. Lett.*, 49, 1761-1763.
- Tamor, M. A. and R. E. Hetrick, 1985. Photothermal deflection spectroscopy of a powder-layer photoelectrochemical structure. *Appl. Phys. Lett.*, 46, 460-462.
- Tanaka, K., 1987. Photothermal spectroscopies of amorphous semiconductor films. In A. Mandelis (Ed.), *Photoacoustic and thermal wave phenomena in semiconductors*. North-Holland, New York, 441-468.
- Tanaka, K., K. Sindoh and A. Odajima, 1986. Photo-thermal spectroscopy by using pyroelectric PVDF films. *Reports on Progress in Polymer Physics in Japan*, XXIX, 367-370.
- Thomasset, B., T. Thomasset, J.-N. Barbotin and A. Vejux, 1982. Photoacoustic spectroscopy of active immobilized chloroplast membranes. *Appl. Opt.*, 21, 124-126.

- Touloukian, Y. S., R. W. Powell, C. Y. Ho and M. C. Nicolaou, 1973. *Thermophysical properties of matter, vol 10*, IFI/Plenum, New York.
- Uejima, A., M. Habiro, F. Itoga, Y. Sugitani and K. Kato, 1986. Quantitative analysis of iron (II) solution by photothermal deflection spectrometry. *Anal. Sci.*, 2, 389-390.
- Varlashkin, P. G., M. J. D. Low, G. A. Parodi and C. Morterra, 1986 a. A comparison of FT-IR/PA and FT-IR/PBD spectra of powders. *Appl. Spec.*, 40, 636-641.
- Varlashkin, P. G., C. Morterra and M. J. D. Low, 1986 b. Infrared spectroscopic study of natural materials. *Nat. Chem. Phys.*, 14, 289-298.
- Wetsel, G. C. Jr, J. B. Spicer, J. W. MacLachlan and J. C. Murphy, 1985. Comparison of photoacoustic and photothermal-optical-beam-deflection imaging of subsurface structure in solids. *IEEE Ultras. Symp.*, 443-446.
- Yamagishi, A. and S. Katoh, 1984. Photoacoustic measurements of the energy-conversion efficiency of photosynthesis in thalli of the green alga *Briopsis maxima*. *Biochim. Biophys. Acta*, 766, 215-221.

Yariv, A., 1975. *Quantum electronics*. (2nd ed.). Willey, New York.