

Royaume du Maroc
Ministère de l'Éducation Nationale,
de la Formation Professionnelle,
de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Sidi Mohamed Ben Abdellah
Faculté Polydisciplinaire
Taza

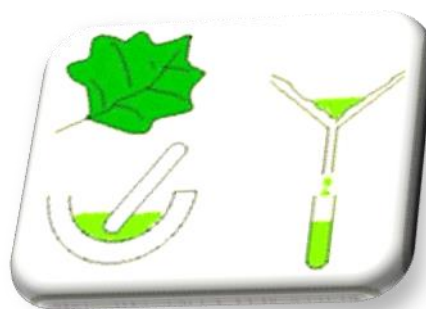
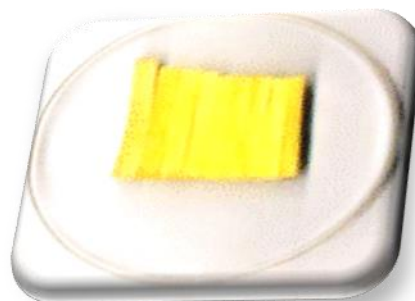


المملكة المغربية
وزارة التربية الوطنية والتكوين المهني
والتعليم العالي والبحث العلمي
جامعة سيدي محمد بن عبد الله
الكلية متعددة التخصصات
تازة

Département : Biologie-Chimie-Géologie
Filière : Sciences de la Vie
Semestre : 4

PHYSIOLOGIE VEGETALE

POLYCOPIE DES TRAVAUX PRATIQUES



Pr. Y. RHARRABTI

Année Universitaire : 2017-2018

TP 1 : ETUDE DES PIGMENTS PHOTOSYNTHETIQUES DES VEGETAUX

INTRODUCTION

Parmi les pigments impliqués dans la photosynthèse se trouvent les porphyrines, dont les plus importantes sont les chlorophylles a et b, ainsi que les caroténoïdes. Ce sont des molécules lipophiles qui absorbent spécifiquement la lumière à certaines longueurs d'onde.

Les porphyrines

Ce sont des dérivés de substitution de la porphyrine dont la structure chimique particulière est faite de 4 noyaux pyrrol unis entre eux par 4 radicaux méthyléniques. Il existe un très grand nombre de porphyrines dont les plus importantes chez les végétaux supérieurs sont les chlorophylles. Nous isolerons les chlorophylles a et b qui sont des porphyrines magnésiens possédant deux groupements carboxyliques estérifiés. Ces pigments sont solubles dans l'éthanol, l'acétone et le benzène mais peu solubles dans l'éther de pétrole.

Les caroténoïdes

Ce sont des pigments non azotés, polymère de l'isoprène, très répandus dans tous les organes des végétaux. On peut les classer en deux groupes selon que leurs molécules comportent ou non de l'oxygène :

- les carotènes (non oxygénés)
- les xanthophylles (oxygénés).

Les carotènes sont des hydrocarbures solubles dans l'éther de pétrole mais insolubles dans le méthanol et l'éthanol. Les xanthophylles, qui sont des dérivés hydroxylés sont d'autant plus solubles dans l'éthanol et le méthanol et d'autant moins solubles dans l'éther de pétrole que leur formule comporte davantage d'atomes d'oxygène.

BUT DE LA MANIPULATION

Il s'agit de comparer les équipements pigmentaires de 2 échantillons végétaux (à préciser en salle de TP). La comparaison sera faite à l'issue d'une analyse quantitative pour déterminer les teneurs des différents pigments.

MANIPULATION

Extraction des pigments photosynthétiques

Les pigments des végétaux sont en association étroite avec les complexes lipoprotéiques des membranes chloroplastiques (thylakoïdes). Afin d'extraire les pigments de ces complexes, il est nécessaire d'utiliser un solvant présentant des caractéristiques amphipolaires de façon à dissocier les

liaisons tant polaires que non polaires existant entre les divers constituants de ces membranes et de libérer ainsi les molécules pigmentaires lipophiles.

Mode opératoire

Réaliser rapidement l'extraction et conserver les extraits **à l'abri de la lumière** (*papier aluminium*) afin de minimiser les risques de dégradation des pigments :

- couper finement dans un mortier 0,25 g de feuilles pesées précisément,
- ajouter du sable fin (*abrasif*) et une pincée de carbonate de calcium (*nécessaire pour neutraliser l'acidité du suc cellulaire libéré lors du broyage du matériel végétal et éviter ainsi la formation de phéophytines qui sont des formes protonnées des chlorophylles : en milieu acide les chlorophylles échangent leur ion Mg^{2+} contre $2H^+$*).
- broyer à sec jusqu'à l'obtention d'une poudre fine,
- ajouter ensuite dans le mortier 1,5 ml d'acétone pure et 10 ml d'acétone à 80% (*solvant d'extraction*),
- broyer à nouveau puis laisser décanter,
- filtrer l'extrait, sous vide,
- reprendre le résidu solide avec 10 ml d'acétone à 80%,
- broyer et filtrer sous vide,
- verser l'ensemble des filtrats successifs dans une fiole jaugée de 25 ml enveloppée de papier aluminium (*obscurité*) puis ajuster au trait de jauge avec de l'acétone à 80%,
- homogénéiser soigneusement.

Cet extrait servira à l'étude quantitative (*réalisation du spectre d'absorption des pigments totaux et détermination des concentrations en chlorophylles a, b et en caroténoïdes*)

Spectre d'absorption de l'extrait pigmentaire

Une substance absorbe la lumière de façon variable suivant la longueur d'onde de la radiation utilisée. Le spectre d'absorption d'une substance est la représentation graphique de son absorption (DO) en fonction de la longueur d'onde (λ).

Remplir au 2/3 une cuve en verre avec l'extrait pigmentaire et déterminer le spectre d'absorption du mélange entre 340 et 720 nm de longueur d'onde, en effectuant des mesures tous les 20 nm. Pour chaque longueur d'onde utilisée, régler le zéro d'absorbance avec de l'acétone à 80%.

- Tracer les spectres des différents extraits et interpréter.

Dosage des teneurs des principaux pigments présents dans l'extrait

D'après la loi de Beer-Lambert, pour une substance donnée en solution dans un solvant particulier, et soumise à une radiation donnée, on peut écrire

$$DO = \epsilon * L * C$$

ϵ est, pour le solvant employé, le coefficient d'extinction molaire de la substance pour une concentration C exprimée en mol/l ; ou encore le coefficient d'absorption spécifique pour une concentration C correspondante alors exprimée en g/l ; L est le trajet optique de la cuve du spectrophotomètre (vous utiliserez en TP des cuves avec $L = 1$ cm).

Les mesures des concentrations sont effectuées à la longueur d'onde du maximum d'absorption de la substance considérée.

Dans un mélange, les absorptions de divers constituants sont additives. Connaissant les coefficients d'absorption spécifique dans l'acétone à 80%, on établit le système d'équations qui donnent les concentrations à partir des mesures d'absorption (DO).

On emploie ici le système d'équation d'Arnon et Mc Kinney.

$$\text{Concentration en chlorophylle a } (C_{\text{chla}}) = 12,7 \times DO_{663} - 2,69 \times DO_{645}$$

$$\text{Concentration en chlorophylle b } (C_{\text{chlb}}) = 22,9 \times DO_{645} - 4,68 \times DO_{663}$$

$$\text{Concentration en caroténoïdes} = 5 \times DO_{460} - \frac{(C_{\text{chla}} \times 3,18) + (C_{\text{chlb}} \times 130,3)}{200}$$

$$\text{Concentration en chlorophylles totales} = \frac{DO_{652} \times 1000}{34,5}$$

La lecture des DO de l'extrait pigmentaire à 460, 645, 652 et 663 nm puis la résolution de ce système d'équations donnera les concentrations en chlorophylle a, en chlorophylle b et en caroténoïdes exprimées en **µg/ml**.

- Donner les résultats finaux des teneurs en pigments en **mg/g** de matière fraîche (feuilles).

TP 2 : RELATIONS HYDRIQUES DANS LA CELLULE VEGETALE

INTRODUCTION

Les échanges d'eau entre deux compartiments séparés par une membrane hémiperméable sont réglés par les lois de l'osmose. Ces dernières s'apparentent à celles des gaz parfaits. La pression osmotique d'un corps non électrolyte en solution dilué dans un volume V, à la température T est donnée par la relation :

$$P.V = n.R.T$$

La pression osmotique (π) du corps dissous est donc donnée par la relation :

$$\pi = n.R.T/V = C.R .T$$

où :

n = nombre de moles du corps non électrolyte,

V = volume de la solution,

R = constante des gaz parfaits = $8,3.10^3 \text{ J.mol}^{-1} .\text{K}^{-1}$,

C = concentration molaire en mol.l^{-1} ,

T = température absolue (en Kelvins)

Au niveau des tissus végétaux, les échanges d'eau se font à travers les parois et les membranes. Le milieu intracellulaire comprend une grande vacuole centrale qui renferme une solution aqueuse complexe : le suc vacuolaire. En première approximation, le suc vacuolaire peut-être considéré comme étant séparé du milieu extracellulaire par une membrane hémiperméable. Dans une cellule turgescente, les solutés contenus dans le suc vacuolaire exercent une force d'attraction sur les molécules d'eau appelée force ou pression osmotique (π). A l'opposé, la paroi squelettique exerce une certaine pression (de sens contraire), appelée pression de paroi ou pression de turgescence (PT) qui s'oppose à l'entrée de l'eau dans la cellule. Le mouvement de l'eau est régi par la résultante des deux forces opposées. Cette résultante est appelée force de succion (S). $S = \pi - PT$.

Dans une cellule en état de plasmolyse commençante ou plasmolyse limite, la pression de turgescence est nulle et $S = \pi$.

MANIPULATION

1- Préparation d'une gamme de concentrations décroissantes de saccharose :

- A partir d'une solution mère molaire, préparer dans 11 tubes à essais numérotés de 1 à 11, des solutions de concentration décroissante : 1M ; 0,9M; 0,8M; etc. (10 ml de chaque),
- Homogénéiser les solutions en agitant au vortex,

2. Réalisation de l'expérience :

- Découper 11 rectangles de papier aluminium et numéroter-les de 1 à 11 (éviter de les mouiller),
- Découper dans le matériel végétal étudié (pomme de terre), des tranches épaisses de 1cm au maximum,
- Découper, à partir de ces tranches, 11 frites parallèles au grand axe. Toutes doivent mesurer entre 5 et 7 cm, et doivent être aussi semblables que possible,
- Sécher les frites légèrement en les passant doucement sur le papier absorbant,
- Envelopper chaque frite d'un morceau de papier aluminium numéroté,
- Peser les frites une à une (poids initial),
- Enlever le papier aluminium puis introduire chaque frite dans la solution de saccharose correspondante, tout en conservant les rectangles de papier aluminium au sec,
- Homogénéiser les essais par agitation des tubes au vortex (refaire la même chose toutes les 20 minutes environ),
- Après 60 minutes, sortir doucement les frites des solutions,
- Sécher rapidement les frites à l'aide du papier absorbant,
- Envelopper à nouveau les frites dans les rectangles de papier aluminium correspondants,
- Peser à nouveau les frites une à une (poids final),
- Calculer, pour chaque essai, la variation de poids des frites (ΔP en %),
- Représenter graphiquement ΔP en fonction de la concentration en saccharose,
- Calculer la succion initiale (S_0) du matériel végétal étudié.
- En déduire le potentiel hydrique du matériel végétal étudié.

Les échanges d'eau entre les tissus et les solutions de saccharose vont se traduire par une variation du poids au niveau des frites et une modification des concentrations initiales en saccharose dans les tubes. A égalité de potentiel hydrique, il n'y a aucun mouvement d'eau et donc aucune variation de poids des frites.