

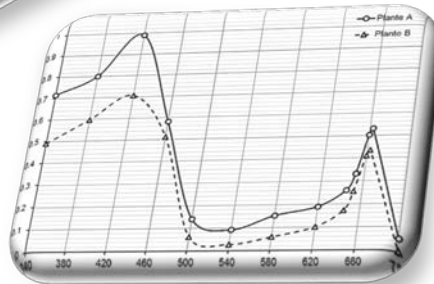


UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE POLYDISCIPLINAIRE DE TAZA
Département : Biologie-Chimie-Géologie
Filière : Sciences de la Vie



PHYSIOLOGIE VEGETALE
(SVI/S4)

POLYCOPIE DES TRAVAUX PRATIQUES



ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2016-2017

Pr. RHARRABTI

ÉTUDE DES PIGMENTS PHOTOSYNTHÉTIQUES DES VÉGÉTAUX

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

1. Extraction des pigments photosynthétiques

Les pigments des végétaux sont en association étroite avec les complexes lipoprotéiques des membranes chloroplastiques (thylakoides). 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.

2. 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*)

3. 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 40 nm. Pour chaque longueur d'onde utilisée, régler le zéro d'absorbance avec de l'acétone à 80%.

- Tracer les spectres des différents extraits, interpréter et comparer.

4. 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.

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

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

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

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

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).**
- **Analyser et comparer.**

5. Compte-rendu :

Le compte-rendu doit contenir les parties suivantes :

- Introduction sur les pigments chlorophylliens
- Mode opératoire soutenu par des schémas ou photos.
- Résultats et interprétations
 - ✓ Dessin des spectres d'absorption sur papier millimétré.
 - ✓ Analyse et interprétations des spectres.
 - ✓ Calculs des teneurs en pigments en mg/g.
 - ✓ Analyse et comparaison.

N.B. Les compte-rendus doivent parvenir à l'enseignant des travaux pratiques avant les examens de la session de printemps.