

La phase photochimique de la photosynthèse (TP en 2 parties)

Nous allons argumenter à l'aide d'expériences et d'observations certains aspects de la phase photochimique de la photosynthèse

Production attendue :

Un compte rendu dans lequel :

- vous montrerez que les pigments chlorophylliens sont capables d'absorber certaines longueurs d'ondes de la lumière et qu'il existe 4 types de pigments chlorophylliens, de couleurs différentes.
- vous montrerez que le dégagement de dioxygène nécessite la présence de lumière et d'un accepteur d'électrons

Critères de réussite		Indicateurs de réussite
Le compte rendu	est pertinent	- Il présente les pigments chlorophylliens et montre leur rôle dans la photosynthèse - Il montre, au travers de l'exploitation de l'expérimentation assistée par ordinateur que l'énergie lumineuse absorbée permet la réalisation de réactions d'oxydoréduction
	est complet	- Les 4 pigments sont nommés, localisés et leur rôle dans la photosynthèse est précisé - La réaction de Hill est exploitée pour montrer ce qu'elle apporte à la compréhension des mécanismes de la photosynthèse - Le compte rendu est illustré à l'aide de documents issus des manipulations réalisées (résultats de la chromatographie, spectres d'absorption, graphique EXAO, ...)
	est cohérent	- Les informations sont en accord avec les documents de la fiche d'activité - Les paragraphes s'enchaînent de manière logique
	est correctement mis en forme	- Le compte rendu est structuré en paragraphes - Le compte rendu est aéré - Les règles de grammaire et d'orthographe sont respectées - Toutes les illustrations sont titrées et légendées - Les illustrations sont intégrées au texte

Partie I : Le rôle des pigments chlorophylliens

Montrer que les pigments chlorophylliens sont capables d'absorber certaines longueurs d'ondes de la lumière et qu'il existe 4 types de pigments chlorophylliens, de couleurs différentes.

Pour ceci nous allons :

I-1. **Extraire des pigments chlorophylliens** de feuilles d'épinards, on obtiendra une **solution de chlorophylle brute**.

I-2. **Utiliser un spectroscope** pour mettre en évidence les radiations lumineuses absorbées par cette solution de chlorophylle brute

I-3. **Réaliser une chromatographie** à partir de cette même solution de chlorophylle brute afin de mettre en évidence les 4 types de pigments présents chez les végétaux

Protocole I-1 : Extraction des pigments chlorophylliens

Matériel disponible et protocole pour extraire les pigments chlorophylliens de feuilles d'épinard :	
Matériel : Pour l'extraction : - feuilles d'épinard - mortier et pilon + sable - ciseaux fins - éprouvette pour alcool - papier filtre - entonnoir - bécher - alcool à 90° = éthanol	<u>Protocole :</u> Extraction des pigments - découper en morceau 20g de feuilles bien vertes (épinard, lierre, mâche...) SANS LES GROSSES NERVURES - ajouter 5mL d'alcool puis broyer (au moins 2 min) ces morceaux dans un mortier avec un peu de sable afin de bien écraser les cellules. - ajouter progressivement 5 ml d'alcool supplémentaires, ce qui solubilise les pigments chlorophylliens. - filtrer à l'aide d'un papier filtre posé sur l'entonnoir le contenu du mortier sur le bécher; on obtient une solution alcoolique des différents pigments photosynthétiques appelée "chlorophylle brute".
Sécurité : 	Précautions de la manipulation 

Protocole I-2 : Spectroscopie d'une solution de pigments foliaires

Utiliser les spectrosopes à main pour comparer le spectre total de la lumière solaire au spectre d'absorption de votre solution de chlorophylle.

Protocole d'utilisation du spectroscope :

Un spectroscope contient un prisme qui décompose la lumière blanche en un spectre de radiations colorées que l'on observe par l'oculaire de cet appareil.

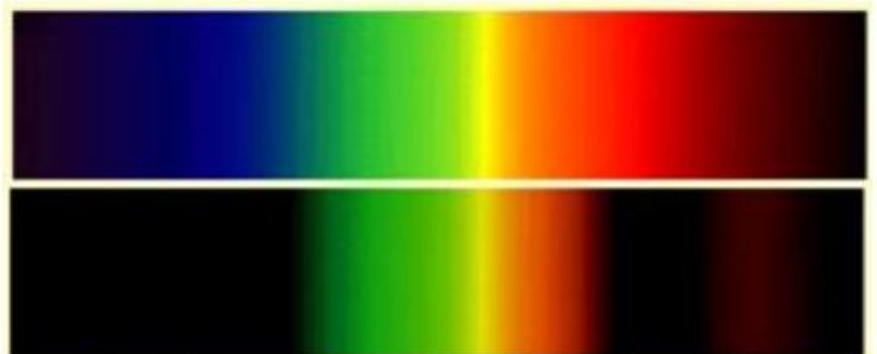
1. Remplir délicatement, avec une pipette pasteurette, le tube à spectroscopie de solution de chlorophylle brute et reboucher le tube.
2. Observer les radiations lumineuses du spectre complet à travers l'oculaire en dirigeant le spectroscope vers une source lumineuse
3. Insérer le tube contenant la solution de chlorophylle brute devant le prisme dans le support prévu à cette effet. Comparer au spectre total pour mettre en évidence les radiations absorbées.



Exemple de résultats obtenus

Spectre de la lumière blanche

Spectre obtenu après passage de la lumière au travers d'une solution de pigments chlorophylliens



Protocole I-3 : Séparation des pigments chlorophylliens par chromatographie

Matériel disponible et protocole pour séparer les pigments chlorophylliens de feuilles d'épinard :

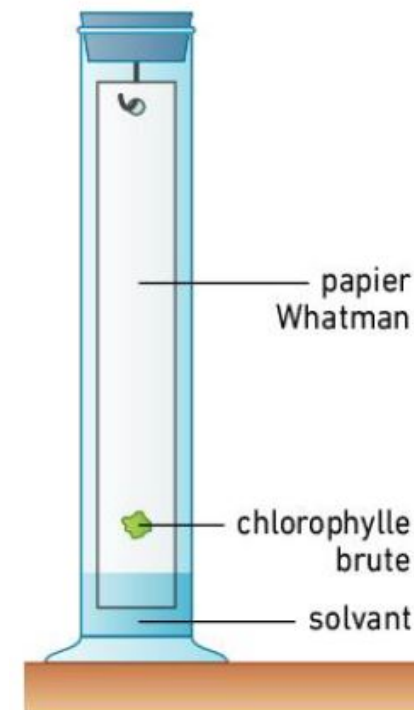
Matériel :

Pour la chromatographie (permet de séparer les différents pigments)

- éprouvette (250 mL) avec bouchon et dispositif d'accroche du papier Whatman, remplie de solvant pour chromatographie
- feutre
- pipette pasteur
- papier Whatman n° 1
- sèche-cheveux
- boîtes en bois

Protocole :

- Sur une bande de papier à chromatographie, **tracer un trait** au crayon à papier à 2cm du bas de la feuille **Ajouter les initiales de votre groupe** en haut de la bande de papier du côté de l'encoche qui permettra de suspendre la bande.
- **Déposer** à l'aide d'une pipette pasteur sur le trait une goutte de la solution de chlorophylle brute, sécher au sèche cheveux.
- **Superposer de la même façon** jusqu'à 10 gouttes.
- **Suspendre** le papier à chromatographie dans l'éprouvette contenant le solvant.
Attention à la position du papier : le dépôt devra se situer au dessus du niveau du solvant.
- **Déplacer délicatement l'éprouvette dans la boîte en bois fermée** et laisser l'éprouvette dans l'obscurité pendant 15 à 30 minutes
- Le solvant va imbiber le papier et migrer vers le haut, en emportant avec lui les pigments. Les pigments iront plus ou moins loin en fonction de leur vitesse de migration qui dépend de leur **solubilité différentielle dans le solvant** et de leur **affinité pour le support de chromatographie**. Ainsi les pigments seront séparés.



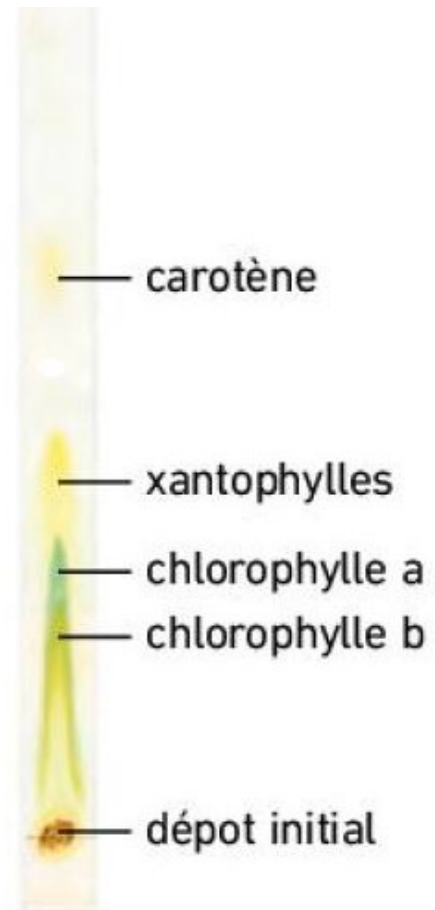
Sécurité :



Précautions de la manipulation



Résultat de la chromatographie après 30 min de migration



Partie II : L'expérience de Hill

Montrer que le dégagement de dioxygène nécessite la présence de lumière et d'un accepteur d'électrons.

Pour ceci nous allons :

II. **Extraire des chloroplastes**, à partir d'épinard et suivre dans la solution de chloroplastes la teneur en dioxygène au cours du temps, dans différentes conditions, à l'aide de matériel ExAO.

Document initial : L'hypothèse de Hill

Les scientifiques ont longtemps pensé que le dioxygène produit lors de la photosynthèse provenait de l'oxygène présent dans la molécule de CO_2 .

Entre 1937 et 1939, Robert Hill remet en cause cette conception en émettant l'hypothèse que le dégagement de dioxygène, en présence de lumière, lors de la photosynthèse est la conséquence de l'oxydation de la molécule d'eau.

Cette oxydation serait couplée à la réduction d'une molécule, naturellement présente dans le chloroplaste, qui ne serait pas la CO_2 (on sait aujourd'hui que ce sont les coenzymes oxydées, notées R).

Les réactions d'oxydation et de réduction peuvent s'écrire de la manière suivante :

Réaction d'oxydation : $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$

Réaction de réduction : $2\text{R} + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{RH}_2$

Hill valide son hypothèse en montrant que des **chloroplastes isolés**, en suspension dans un milieu **dépourvu de CO_2** sont capables de **libérer du dioxygène**, à condition d'être exposés à la lumière et mis en présence d'un accepteur d'électrons : le ferricyanure de potassium connu depuis sous le nom de "**réactif de Hill**".

Ce **réactif de Hill** vient s'ajouter aux **coenzymes oxydées**. En effet au cours de cette expérience, les coenzymes naturellement présentes dans les chloroplastes sont en quantité limitante et le dégagement de dioxygène serait trop faible pour être mesurable. En ajoutant le réactif de Hill, on augmente le nombre d'oxydoréductions réalisés, donc de photolyses de l'eau donc le dégagement de dioxygène.

Nous allons reproduire l'expérience de Hill, sauf que notre milieu ne sera pas dépourvu de CO_2 .

Protocole II : Expérience de Hill

On souhaite vérifier que l'énergie lumineuse permet la photolyse de l'eau en présence d'un accepteur d'électrons.
Pour cela, on se propose de réaliser l'expérience historique de Hill :

Matériel disponible et protocole pour reproduire l'expérience historique de Hill :	
Matériel : Pour la préparation d'une suspension de chloroplastes : - feuilles d'épinard - balance - ciseaux fins - mortier et pilon + sable - éprouvette graduée - pipette + propipette - coton hydrophile - entonnoir - erlenmeyer entouré de papier aluminium - solution de tampon phosphate saccharose - solution de tampon tris-saccharose Pour l'expérience de Hill - dispositif EXAO (bioréacteur, sonde O₂, lampe, seringue, agitateur) - suspension de chloroplastes - réactif de Hill (ferricyanure de potassium) - seringue - pipette 10mL + propipette	Protocole : 1. <u>Extraction des chloroplastes des feuilles</u> - Peser 10 g de feuilles d'épinard, les découper en fines lamelles dans le mortier ATTENTION : Ne pas confondre les 2 tampons à utiliser dans les deux prochaines étapes - Ajouter 3 ml de tampon tris saccharose et un peu de sable - Commencer à broyer puis ajouter progressivement en cours de broyage 30 mL de solution tampon phosphate saccharose. - Broyer fermement pendant au moins 2 minutes. - Filtrer dans un entonnoir garni de coton hydrophile au dessus de l'erenmeyer entouré de papier aluminium. - Presser avec le pilon pour obtenir le maximum de filtrat. - Conserver la suspension de chloroplastes à l'obscurité (erlenmeyer enveloppé de papier aluminium) jusqu'au moment de la mesure. 2. <u>Expérience similaire à Hill Utilisation du dispositif ExAO:</u> a) Montage (avant de réaliser la mesure) : - Prélever 10mL de suspension de chloroplaste à l'aide de la pipette équipée d'une propipette - Verser les 10 mL de suspension de chloroplastes dans le bioréacteur du dispositif EXAO - Vérifier que l'agitateur est bien présent dans le réacteur. - Fermer le bioréacteur - Insérer délicatement la sonde oxymétrique dans le couvercle du bioréacteur ATTENTION à ce que l'agitateur ne tape pas dans la tête de sonde - Lancer l'agitation (agitation moyenne) - Préparer la seringue contenant 0.3 mL de réactif de Hill sans l'introduire dans le bioréacteur - Régler la position de la lampe - Ajuster le volet du bioréacteur (ouvert ou fermé en fonction du moment de l'acquisition : voir ci-dessous)

	<u>b) Paramétrer le logiciel ExAO :</u> - Démarrer le logiciel Atelier scientifique (icône AS sur le bureau) - Choisir le module "Généraliste" = la grenouille - Positionner l'oxymètre sur l'axe des ordonnées et choisir "liquide" - Positionner le chronomètre sur l'axe des abscisses, paramétrer 12 min de durée d'acquisition - Quand vous serez prêts cliquer sur le feu vert pour démarrer l'acquisition Acquisition : - 3 min à l'obscurité - 3 min à la lumière - injection du réactif de Hill - 3 min à la lumière - 3 min à l'obscurité
Sécurité 	Précautions de la manipulation 

Imprimer le graphique obtenu et l'intégrer au compte rendu