

## TPn°2. Identification des pigments photosynthétiques

### 1. Introduction

Les végétaux sont des organismes vivants autotrophes c'est-à-dire qu'ils peuvent synthétiser leurs propres molécules organiques en utilisant la lumière comme facteur important.

La lumière, qui est une source d'énergie, est indispensable dans le processus de la photosynthèse. Cette énergie lumineuse est rendue possible grâce à la présence de pigments. Les pigments ont la propriété d'absorber certaines longueurs d'onde qui leur donne une couleur déterminée.

Les chlorophylles sont les pigments majeurs impliqués dans la capture des photons. La chlorophylle est synthétisée et dégradée dans l'enveloppe du chloroplaste, mais elle n'est présente et active comme pigment que dans les thylacoïdes.

Les caroténoïdes accompagnent toujours les chlorophylles dans les membranes thylacoïdales où ils jouent apparemment le double rôle de pigments accessoires pour la capture de l'énergie lumineuse et de photoprotecteurs contre les intensités lumineuses élevées. Ils sont répandus dans de nombreux tissus végétaux comme ; le parenchyme de la tomate, les racines de la carottes, les pétales, l'écorce d'orange, ect).

### 2. Objectif du TP

Extraction et séparation des différents pigments photosynthétiques

### 3. Matériels et réactifs utilisés

Matériels	Réactifs
- Un mortier et pilon ;	- Sable de mer ;
- Une éprouvette (25, 50, 100mL);	- Ether de pétrole ;
- Papier filtre ;	- Acétone (80%);
- Feuilles d'épinard ;	- Dichloroéthane ;
- Un bécher (10 et 50 mL) ;	- CaCO <sub>3</sub>
- Erlenmeyer (10 et 50 mL) ;	- CaCl <sub>2</sub>
- Un entonnoir,	
- Une pipette Pasteur ;	
- Un agitateur magnétique,	
- Une tige et un barreau ;	
- Une bande de papier chromatographie de 2 cm de large ;	
- Papier aluminium.	
- Parafilm	

#### 4. Méthode de travail

##### a. Extraction des différents pigments photosynthétiques

- Laver, sécher et peser 1,5 g de feuilles d'épinard ;
- Couper les feuilles en petits fragments ;
- Ajouter 4 ml d'acétone et broyer jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène (en présence de CaCO<sub>3</sub> et CaCl<sub>2</sub>) ;
- Ajouter 6 ml d'acétone et broyer de nouveau ;
- Laisser décanter durant 10 min ;
- Récupérer le surnageant dans un erlenmeyer (*filtration sur papier filtre et recueil de la solution de chlorophylles*) et compléter à 10mL avec de l'acétone ;
- Fermer avec du parafilm et agiter.

##### b. Séparation des différents pigments photosynthétiques par chromatographie sur papier

Les pigments sont séparés par chromatographie sur papier à l'aide d'un solvant apolaire: la séparation s'effectue selon l'affinité des pigments vis-à-vis du solvant c'est-à-dire selon le degré d'apolarité des pigments.

- Introduire dans le tube de chromatographie 10 ml de solvant de migration (éther de pétrole/acétone/dichloroéthane : 8,5/1/0,5 v/v/v) ;
- Fermer hermétiquement le tube ;
- Tracer à l'aide d'un crayon un trait à 2 cm du bord inférieur d'une bande de papier chromatographie ;
- Déposer en bande fine avec une pipette pasteur une partie de l'extrait pigmentaire non dilué sur le trait et sécher (recommencer plusieurs fois le dépôt et le séchage jusqu'à l'obtention d'une tache très foncée) ;
- Introduire le chromatogramme dans le tube entouré de papier noir puis fermer le tube ;
- Arrêter la migration quand le front du solvant aura atteint 20 cm.
- Sécher la chromatographie.

#### 5. Travail à faire

- Dessiner le papier de chromatographie, après la fin de l'expérience, en précisant les distances parcourues par les pigments et le solvant.
- identifier les pigments en vous aidant de formules, justifier leurs ordres de migration. (Voir Tableau ci-dessous)

**Tableau.** Information aidant à identifier les pigments

Pigment	Rf value range	Colour	Relative position
Carotene	0.89-0.98	Yellow	Very close to the solvent front
Pheophytin a	0.42-0.49	Grey	Below the top yellow, above the greens
Pheophytin b	0.33-0.40	Brown	Below the top yellow, above the greens
Chlorophyll a	0.24-0.30	Blue green	Above the other green, below the grey
Chlorophyll b	0.20-0.26	Green	Below the other green
Xanthophylls	0.04-0.28	Yellow	Below, or almost at the same level of, the highest green