

TP n°3. Dosage des pigments photosynthétiques

1. Introduction

La photosynthèse est un mécanisme biochimique permettant aux végétaux supérieurs de fabriquer eux même des hydrates de carbone (sucres et amidon) à partir de l'eau et de CO₂. Cette réaction nécessite un apport externe d'énergie sous forme de lumière. Cette réaction siège dans des organites propres à la cellule chlorophyllienne : les chloroplastes. De nombreuses protéines et autres molécules contribuent au mécanisme, parmi eux les pigments photosynthétiques. Les végétaux possèdent trois types de pigments photosynthétiques, les chlorophylles (a et b) et les caroténoïdes présents chez tous les végétaux autotrophes au carbone, et les phycobilines présentes exclusivement chez les algues et les cyanobactéries. Ce sont les molécules lipophiles qui absorbent spécifiquement la lumière à certaines longueurs d'onde.

2. Objectif du TP

Extraction et dosage des chlorophylles a, b et les caroténoïdes présents dans la feuille d'épinard, par la technique de spectrophotométrie d'absorption.

3. Matériels et réactifs utilisés

- Mortier et pilon ;
- Eprouvettes (25, 50, 100mL);
- Papier filtre ;
- Béchers (25 et 50 mL) ;
- Erlenmeyers (25 et 50 mL) ;
- Petits entonnoirs ;
- Pipettes Pasteur ;
- Pipettes (1, 5 et 10ml) ;
- Poire ;
- Acétone à 80% (250 ml) ;
- Un agitateur magnétique, une tige et un barreau (aimant) ;
- Spectrophotomètre ;

4. Méthode de travail

a. Extraction des pigments photosynthétiques

Mener l'extraction rapidement et conserver les extraits au froid et à l'abri de la lumière (papier aluminium) afin de minimiser les risques de dégradation des pigments.

- Laver, sécher puis peser précisément 1,5 g de feuille d'épinard ;
- Couper le matériel végétal en petits fragments ;
- Ajouter 4 ml d'acétone et broyer jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène ;
- Ajouter 6 ml d'acétone et broyer de nouveau soigneusement ;
- Laisser décanter quelques minutes (10 min) ;
- Récupérer le surnageant dans un erlenmeyer de 10 ml (filtrer sur papier filtre et recueillir la solution acétonique de chlorophylles) et compléter à 10 ml avec de l'acétone ;
- Fermer avec du parafilm et agiter.

b. Dosage des pigments totaux

- Introduire 2 ml d'extrait pigmentaire dans une fiole jaugée de 20 ml et compléter avec de l'acétone ;
- Fermer la fiole avec du parafilm et agiter ;
- Placer une cuve en verre, qui contient le solvant d'extraction, dans le faisceau et régler le zéro de l'appareil à 460 nm.
- Remplacer cette cuve par une autre qui contient le 2/3 de l'extrait pigmentaire dilué et lire l'**absorbance (A)** ;
- Recommencer les opérations successivement à 645 et 663 nm (régler le zéro de l'appareil pour chaque longueur d'onde utilisée).

Rappel. La lumière blanche est composée de différentes radiations visibles dont la longueur d'onde varie de 400 nm (violet) à 750-800 nm (rouge foncé). Une substance colorée absorbe préférentiellement certaines radiations de la lumière blanche. Cette propriété lui donne sa couleur. Si cette substance est un photorécepteur, les radiations absorbées peuvent être celles qui agissent sur lui et entraînent une photo-réaction.

5. Résultats

Les formules ci-dessous établies à partir de loi de BEER-LAMBERT permettent de calculer les concentrations en pigments :

$$\mathbf{Ca} = 12.7 \mathbf{A}_{663} - 2.63 \mathbf{A}_{645}$$

$$\mathbf{Cb} = 22.9 \mathbf{A}_{645} - 4.68 \mathbf{A}_{663} \text{ en mg/l}$$

$$\mathbf{Ccar} = 5 \mathbf{A}_{460} - (3.19\mathbf{Ca} + 130.3\mathbf{Cb})/200$$

6. Bibliographie. TP de physiologie Végétale L2 - KEHAL *et al.* 2020.