

TP No 03. Extraction et dosage des différents pigments photosynthétiques

Introduction

La photosynthèse est un mécanisme biochimique permettant aux végétaux supérieurs de fabriquer eux même des hydrates de carbone (sucres et amidon) à partir d'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 : Chlorophylle a et b ainsi que les caroténoïdes. Ce sont les molécules lipophiles qui absorbent spécifiquement la lumière à certaines longueurs d'onde.

Le but de cette expérience est de quantifier par une méthode spectrophotométrique les pigments photosynthétiques de la feuille d'épinard.

1. Matériels et réactifs

- Spectrophotomètre ;
- Deux (02) mortiers et pilons ;
- Une éprouvette (25, 50, 100mL);
- Un papier filtre ;
- Trois (03) béchers (25 et 50 mL) ;
- Deux (02) erlenmeyers (25 et 50 mL) ;
- Deux (02) petits entonnoirs ;
- Dix (10) pipettes Pasteur ;
- Cinq (05) pipettes (1, 5 et 10ml) ;
- Une poire ;
- Acétone (250ml) ;
- Un agitateur magnétique, une tige et un barreau (aimant)

2. Extraction des différents 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 1.5g de feuille d'épinard;
- Couper le matériel végétal en petits fragments;

- Ajouter 4ml d'acétone (*pour obtenir un mélange acétone/eau de concentration final 80% si l'on tient compte de l'eau présente dans les feuilles*)et broyer jusqu'à obtenir un mélange homogène ;
- Ajouter 6mL d'acétone à 80% et broyer de nouveau soigneusement ;
- Laisser décanter quelques minutes (10min);
- Récupérer le surnageant dans un erlen 10mL (*de préférence, filtrer sur papier filtre et recueillir la solution acétonique de chlorophylles*) et compléter à 10mL avec de l'acétone à 80%;
- Fermer avec du parafilm et agiter.

3. Dosage des pigments totaux

3.1 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.

3.2 Protocole

- introduction 2mL d'extrait pigmentaire dans une fiole jaugée de 20mL et compléter avec de l'acétone à 80%;
- 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 460nm.
- remplacer cette cuve par une autre qui est emplie au 2/3 par l'extrait pigmentaire dilué et lire l'absorbance (A);
- recommencer les opérations successivement à 645 et 663nm (régler le zéro de l'appareil pour chaque longueur d'onde utilisée).

3.3 Interprétations des résultats

L'objectif est de doser par spectrophotomètre d'absorption, les chlorophylles a et b ainsi que les caroténoïdes présents dans l'extrait. Les formules ci-dessous établies à partir de loi de BEER-LAMBERT permettent de calculer les concentrations en pigments :

$$Ca = 12.7 A_{663} - 2.63 A_{645}$$

$$Cb = 22.9 A_{645} - 4.68 A_{663} \text{ en mg.L}^{-1}$$

$$C_{car} = 5 A_{460} - (3.19Ca + 130.3 Cb)/200$$