

TP N° 02. Extraction et séparation des différents pigments photosynthétiques

Introduction :

Les organismes chlorophylliens sont capables de synthétiser des molécules organiques simples sous l'action de la lumière visible. Cette synthèse nécessitant la lumière comme source d'énergie s'appelle la photosynthèse. L'utilisation de l'énergie lumineuse est rendue possible grâce à l'existence de pigments : molécules capables d'absorber certaines longueurs d'onde lorsqu'elles sont éclairées par de la lumière blanche. Cette propriété 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.

On les trouve également associés à l'enveloppe du chloroplaste. Ils sont aussi très répandus dans de nombreux tissus végétaux (parenchyme de Tomate, racines de Carottes, pétales, écorce d'Orange, etc...).

1. Matériels et réactifs

–Un mortier et pilon; –sable de mer; –une éprouvette(25, 50, 100mL); –un papier filtre; –feuilles d'épinard; –un bécher (10 et 50 mL); –erlenmeyer (10 et 50 mL); –un entonnoir, –une pipette Pasteur; –Ether de pétrole; –Acétone; –Dichloroéthane; –un agitateur magnétique, une tige et un barreau (aimant); –une bande de papier chromatographie de 2 cm de large; –papier aluminium.

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.

- 1) Laver, sécher puis peser précisément 1.5g de feuille d'épinard;
- 2) Couper le matériel végétal en petits fragments;
- 3) 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 ;
- 4) Ajouter 6mL d'acétone à 80% et broyer de nouveau soigneusement ;
- 5) Laisser décanter quelques minutes (10min);

6) 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%;

7) Fermer avec du parafilm et agiter.

Remarque:

-Broyer le matériel végétal dans l'acétone en présence de sable de mer fin, éventuellement en tamponnant le milieu avec la craie (CaCO₃);

-Ajouter de Chlorure de Calcium (CaCl₂) permet en outre favoriser l'extraction en perméabilisant la membrane chloroplastique

3. 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.

1) Introduire dans le tube de chromatographie 10mL de solvant de migration (éther de pétrole/acétone/dichloroéthane: 8.5/1/0.5 v/v/v) -éluant-(à l'aide du distributeur);

2) Fermer hermétiquement le tube;

3) Tracer à l'aide d'un crayon un trait à 2cm du bord inférieur d'une bande de papier chromatographie (afin que le dépôt ne soit pas en contact avec le solvant);

4) 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*);

5) Introduire le chromatogramme dans le tube entouré de papier noir puis fermer le tube;

6) Arrêter la migration quand le front du solvant aura atteint 20cm.

7) Sécher la chromatographie

2.3 Analyse des résultats

Dessiner le chromatogramme, identifier les pigments en vous aidant des formules, justifier leurs ordres de migration.

a) β -Carotène (C₄₀H₅₆) : de couleur orangé;

b) Chlorophylle a (C₅₅H₇₂O₅N₄Mg): de couleur vert bleuté;

c) Chlorophylle b (C₅₅H₇₀O₆N₄Mg): de couleur vert jaune;

d) Xanthophylle (C₄₀H₅₆O₂) : de couleur jaune.