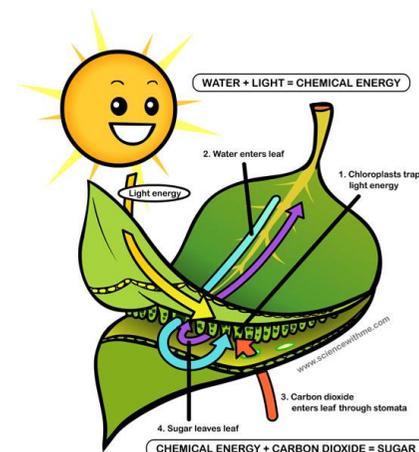


THEME 1 - Energie et cellule vivante

TP3 - La complémentarité des phases de la photosynthèse

La **phase photochimique** de la photosynthèse convertit l'énergie lumineuse en **molécules énergétiques** (ou composés intermédiaires) utilisables par les réactions du métabolisme. A l'inverse, la **phase non photochimique** permet la fixation du CO₂ et sa réduction en glucose. En 1955, le biochimiste anglais Robert Hill a expliqué l'origine du dégagement d'O₂ et la nécessité des composés intermédiaires et les liens nécessaires entre 2 phases.

Problème posé : Quels sont les composés produits par la phase photochimique et leur importance dans la phase non photochimique de la photosynthèse ?



Matériel et données :

- Matériel courant de laboratoire (verrerie, éprouvette, bécher, erlenmeyer, seringue ...)
- Matériel ExAO, sondes à O₂, CO₂, éthanol, luxmètre, thermomètre
- Feuilles d'une plante verte (épinard) , solutions de thylakoïdes

Propositions d'activités	Capacités / Critères de réussite
<p>On cherche à démontrer que la phase photochimique de la photosynthèse correspond à des réactions d'oxydoréduction nécessitant la présence d'un accepteur d'électrons et que cette phase produit des composés intermédiaires utiles à la phase non photochimique.</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ ETAPE 1 : Proposer une démarche de résolution du problème à partir du matériel disponible. ➤ ETAPE 2 : A l'aide de la <u>fiche protocole</u>, réalisez la manipulation proposée afin d'extraire des thylakoïdes et de déterminer les conditions nécessaires au bon déroulement de la phase photochimique. <i>Appeler l'examineur pour vérification du montage puis des résultats</i> ➤ ETAPE 3 : Présentez vos résultats sous une forme adéquate. ➤ ETAPE 4 : A l'aide des <u>expériences</u> et des <u>documents supplémentaires</u>, en déduire quelles sont les conditions nécessaires au bon déroulement des 2 phases de la photosynthèse. Vous proposerez un schéma explicatif. ➤ Nettoyez et rangez le matériel utilisé 	<p>Proposer une démarche de résolution</p> <p>Réaliser une manipulation en suivant un protocole (Préparation de suspension de thylakoïdes, Réaction de Hill avec suivi ExAO)</p> <p>Communiquer à l'écrit (présentation des résultats).</p> <p>Adopter une démarche explicative</p> <p>Communiquer à l'écrit (schématiser).</p> <p>Gérer le poste de travail</p>

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

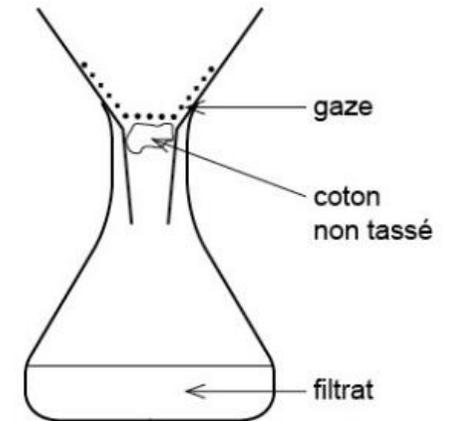
EXTRACTION DES CHLOROPLASTES DES FEUILLES

Remarque : le découpage et le broyage ne doivent pas excéder 10 minutes avec du matériel préalablement refroidi.

- **Découper** en fines lamelles quelques feuilles dans le mortier sortant du réfrigérateur.
- **Ajouter** 3 mL de tampon tris-saccharose pH = 10,5 et un peu de sable.
- **Commencer à broyer** puis **ajouter** progressivement en cours de broyage 25 mL de solution tampon phosphate-saccharose pH = 6,5.
- **Broyer** fermement pendant au moins 2 minutes.
- **Filtrer** dans un entonnoir garni de gaze (3 ou 4 épaisseurs) et de coton hydrophile
- **Presser** pour obtenir le maximum de filtrat
- **Conserv**er la suspension de chloroplastes ainsi obtenue à l'obscurité (erlenmeyer enveloppé de papier aluminium) et au froid (cristallisoir rempli de glaçons) jusqu'au moment de la mesure

Remarque : les membranes des chloroplastes sont lésées de telle sorte que le contenu du stroma est dilué dans la solution mais les thylakoïdes sont intacts.

Dispositif pour la filtration



MESURE DE L'EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN DIOXYGENE DE LA SUSPENSION

- **Verser** votre filtrat dans l'enceinte selon sa capacité (remplir le bioréacteur).
- **Ajouter** l'agitateur magnétique dans le bioréacteur
- **Placez la sonde à O₂** dans le logement approprié au sein du couvercle du bioréacteur
- **Fermer** l'enceinte, **vérifier** l'absence de bulle d'air.
- **Mettre** l'agitateur en fonction.
- **Attendre la stabilisation** des mesures puis lancer l'enregistrement en cliquant sur l'icône en forme de caméra.
- **Enregistrer** pendant 12 minutes et **insérer** un repère sur le graphique à chaque modification des conditions :
 - 3 minutes à l'obscurité (volets du réacteur ou cache),
 - 3 minutes à la lumière
 - **Injecter** 0,2 mL d'accepteur d'électrons et continuer l'éclairage encore pendant 3 minutes
 - 3 minutes à l'obscurité.

FICHE LABO :

<u>Matériel :</u> <ul style="list-style-type: none">- une paire de ciseaux- un mortier préalablement placé au congélateur, du sable- une éprouvette de 25 mL- une pipette de 10 mL graduée, une pro-pipette, un tube à essais, une petite seringue- un support et entonnoir, de la gaze, un cache noir- un petit erlenmeyer enveloppé de papier aluminium et placé dans un cristallisoir rempli de glaçons	<ul style="list-style-type: none">- feuilles de végétaux verts- 20 mL de tampon phosphate saccharose à 0,5 mol.L⁻¹ à pH 6,5 et 5 mL de tampon tris-saccharose pH =10,5- un accepteur d'électrons- une chaîne de mesure ExAO avec sonde oxymétrique, sonde photométrique, enceinte, dispositif d'éclairage- logiciel d'acquisition, dispositif d'impression
---	---

Matériel par poste (cf. fiche sujet - candidat) :

<u>Matériel</u> <ul style="list-style-type: none">- une paire de ciseaux- un mortier préalablement placé au congélateur, du sable- une éprouvette de 25 mL- une pipette de 10 mL graduée, une pro-pipette, un tube à essais, une petite seringue- un support et entonnoir, de la gaze, un cache noir- un petit erlenmeyer enveloppé de papier aluminium et placé dans un cristallisoir rempli de glaçons	<ul style="list-style-type: none">- feuilles de végétaux verts : lis, épinards, persil, buis, troène...- 20mL de tampon phosphate saccharose à 0,5 mol.L⁻¹ à pH 6,5 et 5 mL de tampon tris-saccharose pH=10.5- un accepteur d'électrons (1)- une chaîne de mesure ExAO avec sonde oxymétrique, sonde photométrique, enceinte, dispositif d'éclairage (2)- logiciel d'acquisition, dispositif d'impression (3).
---	---

Précisions :

- (1) un accepteur d'électrons, par exemple du chlorure ferrique à 50 g.L⁻¹ (0.5 mL) ou du DCPIP, ou éventuellement du ferricyanure de potassium à utiliser avec précautions ;
- (2) une chaîne de mesure ExAO ORPHY avec sonde oxymétrique correctement étalonnée, sonde photométrique, réacteur (cf avertissement) ;
- (3) logiciel d'acquisition REGRESSI déjà ouvert sur la page des réglages.

Matériel en réserve au laboratoire :

- « solution » de secours : une suspension de chloroplastes (lis, épinards, buis, persil ou troène) dans un petit erlenmeyer enveloppé de papier aluminium, placé au froid (par exemple dans un cristallisoir rempli de glaçons) à préparer selon la fiche technique - candidat
- Vérification de la qualité de la suspension de chloroplastes isolés :
 - **prélever** une goutte de suspension,
 - la **monter** entre lame et lamelle et observer au microscope.

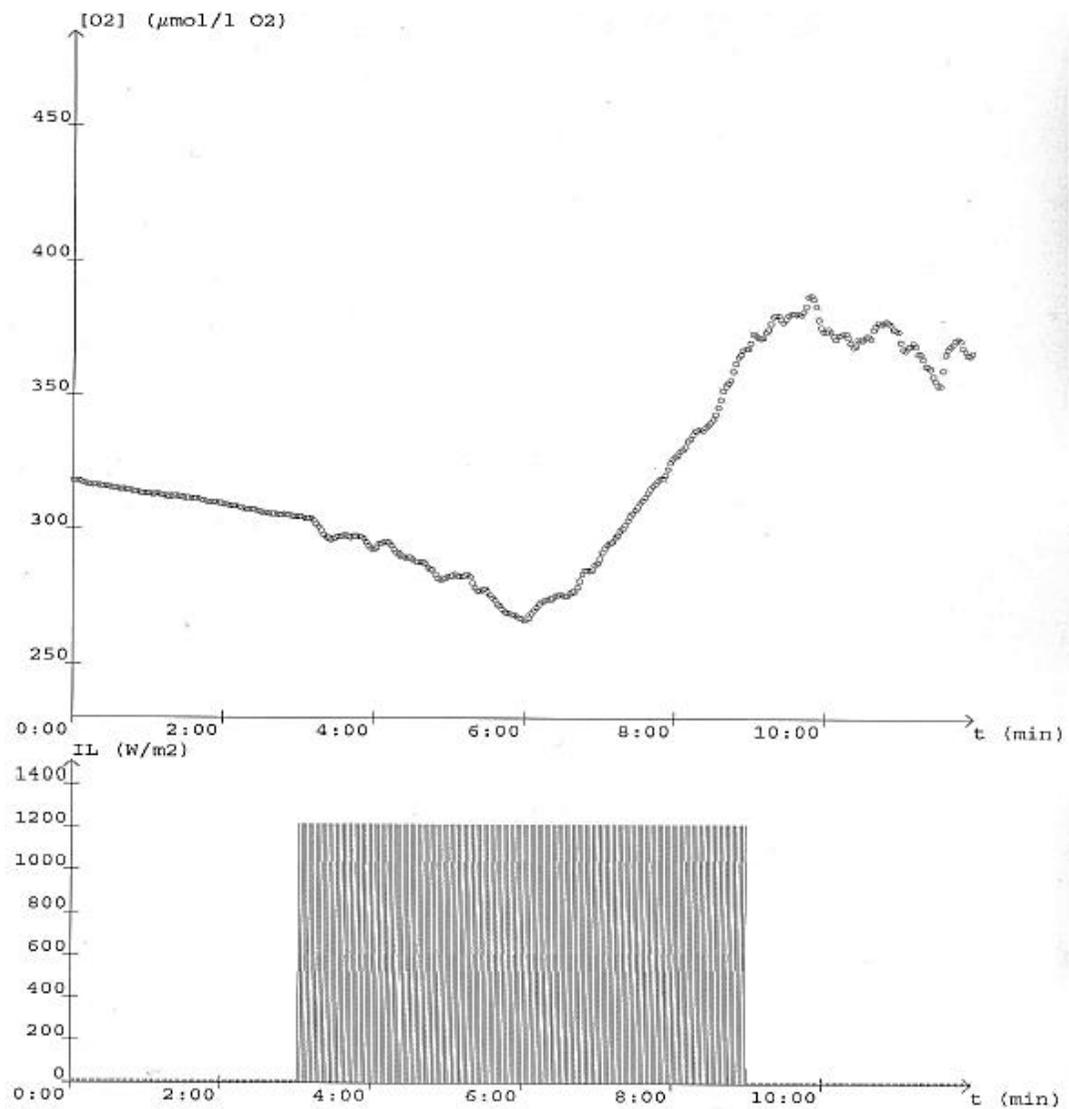
Préparation des solutions tampon

tampon tris-saccharose pH = 10,5	<ul style="list-style-type: none">- Tris : 0,2 M soit 24,23 g.L⁻¹- Saccharose : 0.3 M soit 102.69 g.L⁻¹
tampon phosphate-saccharose pH = 6,5	<ul style="list-style-type: none">- Phosphate disodique : 0,2 M soit 71,628 g.L⁻¹- Phosphate monosodique : 0,1 M soit 13,609 g.L⁻¹- KCl : 0,08 M soit 3,965 g.L⁻¹- Saccharose : 0,5 M soit 171,15 g.L⁻¹

A vérifier : le bon fonctionnement du PC, le réglage (à réaliser par le préparateur) de la sonde oxymétrique, l'état de la paillasse entre chaque candidat.

A préparer : la solution de chlorure ferrique.

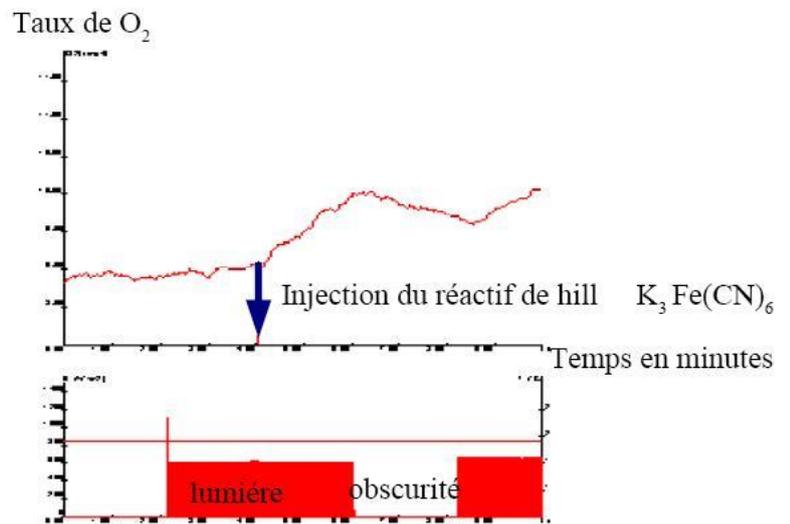
DOCUMENT SECOURS (Résultats)



Document 1 : Expérience de Hill (1955)

En 1955, Hill montre que les **thylakoïdes** chloroplastiques permettent la production d'O₂ uniquement lorsque ceux-ci sont éclairés et en présence d'un accepteur d'électron (réactif de Hill). Le réactif utilisé correspond à du K₃Fe(CN)₆, c'est une molécule fortement oxydée.

Hill réalisera ensuite cette expérience en éliminant totalement le CO₂ de l'enceinte. Cette expérience a montré que le CO₂ n'est pas nécessaire à la production d'O₂.



Document 2 : La production d'ATP au cours de la phase photochimique

Pour déterminer les modalités de la formation de l'ATP au cours de la phase photochimique, on a réalisé une série d'expériences, dont les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous. Des chloroplastes intacts, extraits de cellules, sont placés dans quatre milieux dont les conditions (composition et éclairage) diffèrent d'une expérience à l'autre. On prépare également un milieu sans chloroplastes. Dans chaque milieu, on cherche à mettre en évidence après quelques minutes la formation d'ATP.

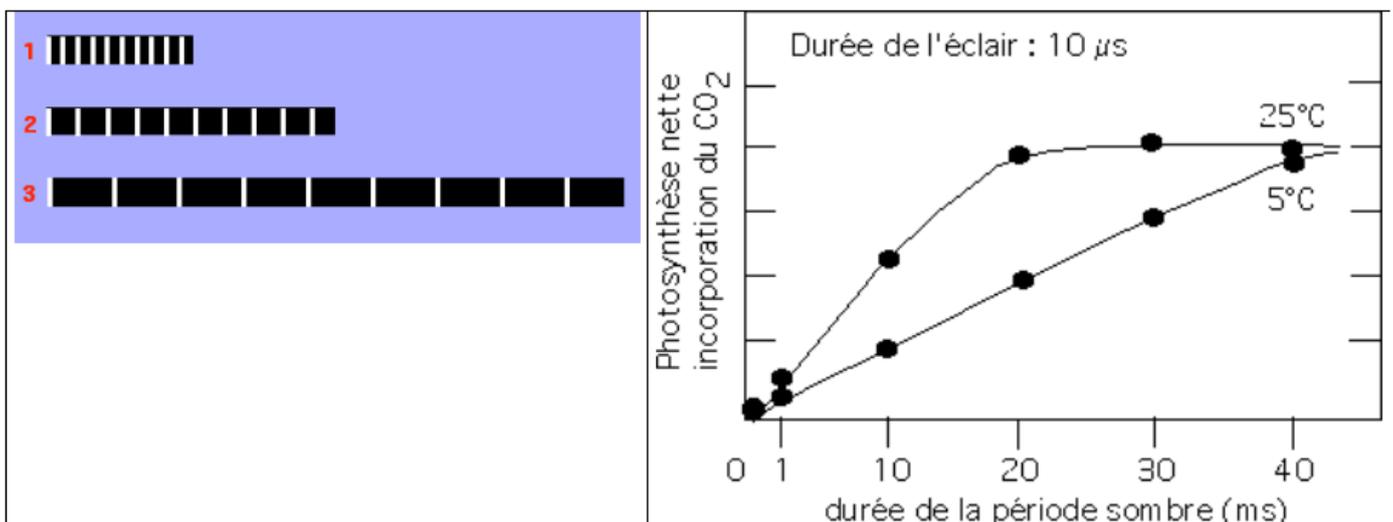
Milieu \ Conditions	Eau	ADP	Pi	Lumière	Oxydant (R)	Formation d'ATP
Milieu 1	+	+	+	+	+	oui
Milieu 2	+	+	+	-	+	non
Milieu 3	+	+	-	+	+	non
Milieu 4	+	-	+	+	+	non
Milieu 5	+	+	+	+	-	non
Milieu sans chloroplastes	+	+	+	+	+	non

Pi : phosphate inorganique

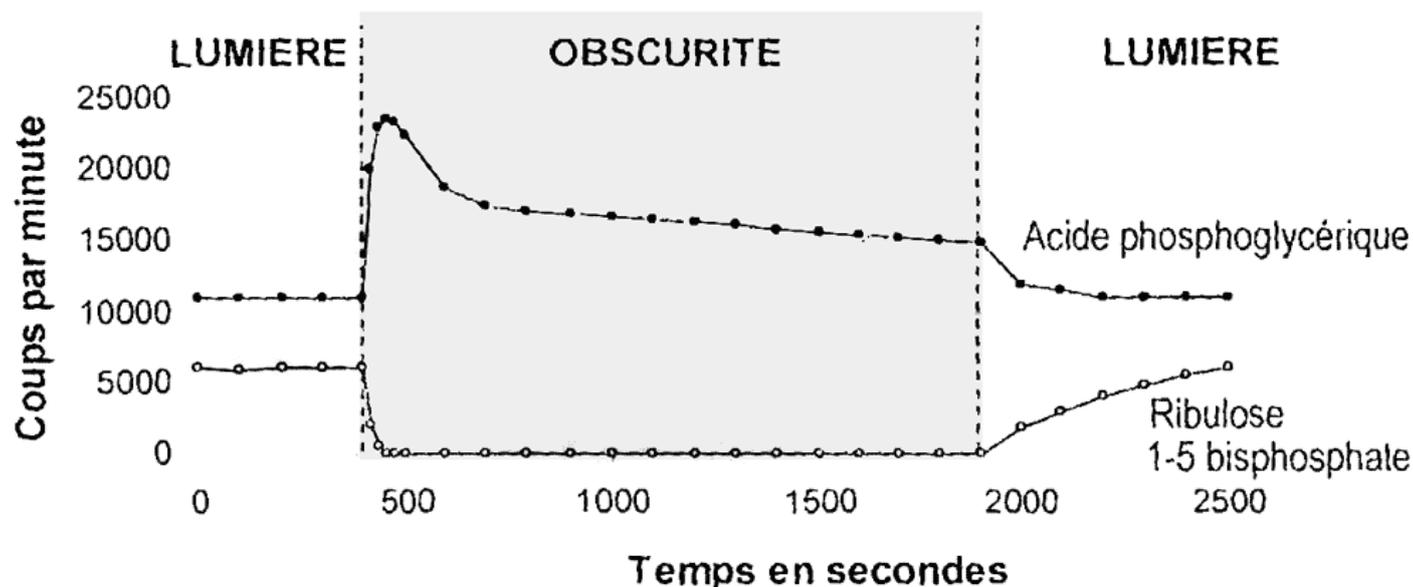
+ signifie présence et - signifie absence.

Document 3 : Expériences d'Emerson et Arnold (1932) :

Ces expériences ont été réalisées sur des algues vertes unicellulaires (Chlorelles) en suspension. L'incorporation du CO₂ est mesurée en lumière intermittente à l'aide d'un tube-néon intense qui produit des éclairs brefs (10 μs) séparés par des intervalles variables d'obscurité (entre 1 et 40 ms). Expérimentalement, chaque mesure est réalisée pour un total de 100 000 éclairs de 10μs (soit un total de 1s de lumière) et des durées de périodes sombres comprises entre 100 s et 4000 s (soit un total d'obscurité compris entre 1,6 à 64 minutes). (Cf. 1, 2 et 3)



Document 4 : Influence de l'éclairement sur l'assimilation du dioxyde de carbone par des cellules chlorophylliennes (Bassham et Calvin, 1959)



D'après Heller R. Esnault R. Lance C.. 1998.

Document 5 : Expériences d'Arnon (1958)

Arnon sépare des chloroplastes en une fraction composée uniquement de thylakoïdes et une fraction liquide correspondant au stroma. Il associe ensuite l'une ou l'autre des fractions à différentes molécules présentes dans le chloroplaste en présence ou en absence de $^{14}\text{CO}_2$. Il mesure l'assimilation du dioxyde de carbone à partir de la radioactivité des molécules organiques produites.

Les conditions expérimentales et les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous.

	Conditions expérimentales	Quantité de $^{14}\text{CO}_2$ fixé dans les molécules organiques (en coups par minute)
1	Stroma et thylakoïdes à la lumière, dans un milieu dépourvu de CO_2 et riche en ADP, phosphate et composés réduits puis le tout à l'obscurité avec apport de $^{14}\text{CO}_2$	96 000
2	Stroma laissé à l'obscurité + $^{14}\text{CO}_2$	4 000
3	Stroma laissé à l'obscurité + ATP + $^{14}\text{CO}_2$	43 000
4	Stroma laissé à l'obscurité + ATP + composés réduits (RH_2) + $^{14}\text{CO}_2$	97 000

D'après 2002. Terminale S spécialité. Hatier