

## TP 3 : Les deux phases de la photosynthèse

*Situation initiale* : La photosynthèse se caractérise par un rejet de dioxygène et une absorption de dioxyde de carbone. Elle nécessite l'intervention de la lumière captée par les pigments photosynthétiques.

*Question* : Comment l'énergie lumineuse des photons est-elle convertie en énergie chimique nécessaire à la synthèse de matière organique ?

Matériel : Interface ExAO, capteur oxymétrique, bioréacteur, solution de Ferricyanure de potassium à 0,2 M, tampon phosphate-saccharose (pH 6,5), mortier, pilon, feuilles d'épinard, entonnoir, filtre, bécher, cristalliseur, glace, bécher plastique.

### I – Réaction de Hill et la phase photochimique de la photosynthèse

#### 1 – Historique

Dans la réaction de photosynthèse, l'eau apparaît comme un donneur d'hydrogène et d'électrons alors que le dioxyde de carbone apparaît comme un accepteur d'hydrogène et d'électrons.

En 1937, Hill envisagea, l'existence d'un intermédiaire qui accepterait les électrons provenant de l'eau pour les transférer au dioxyde de carbone.

Il entreprit de vérifier cette idée en remplaçant cet intermédiaire inconnu par un oxydant artificiel (le réactif de Hill) qui serait réduit à la lumière par les électrons provenant de l'eau.

#### 2 – Protocole

- Préparer le dispositif Exao
- Dans un mortier refroidi au réfrigérateur, couper finement et broyer pendant quelques minutes au pilon 20 g de feuilles d'épinard dénervées, dans 5 ml de tampon phosphate-saccharose et grosse pincée de sable de Fontainebleau.
- Filtrer le broyat en utilisant un entonnoir avec un filtre au dessus d'un bécher maintenu au froid (cristalliseur rempli de glace par exemple). Presser fortement le filtre pour récupérer le maximum de liquide.

*Note* : On obtient ainsi une suspension de chloroplastes. Cette extraction entraîne une altération de l'enveloppe des chloroplastes de telle sorte que les thylakoïdes restent intacts mais que les constituants du stroma se trouvent largement dilués dans le milieu ayant servi à l'extraction.

- Placer la solution obtenue dans le bioréacteur. La sonde doit être dans la solution.
- Commencer l'enregistrement par 2 minutes d'obscurité puis 2 minutes de lumière. Ajouter ensuite 0,2 ml de Ferricyanure de potassium (réactif de Hill), poursuivre l'enregistrement pendant 2 minutes. Placer ensuite 2 minutes à l'obscurité puis de nouveau 2 minutes à la lumière (durée totale d'acquisition : 10 minutes)
- Enregistrer puis imprimer en deux exemplaires la courbe obtenue.

*Notes* : Tout le matériel utilisé doit être froid. Il est possible que la teneur en oxygène du milieu diminue fortement au début de l'expérience, il faut attendre la stabilisation avant de commencer les mesures.

### 3 – Observations et interprétations

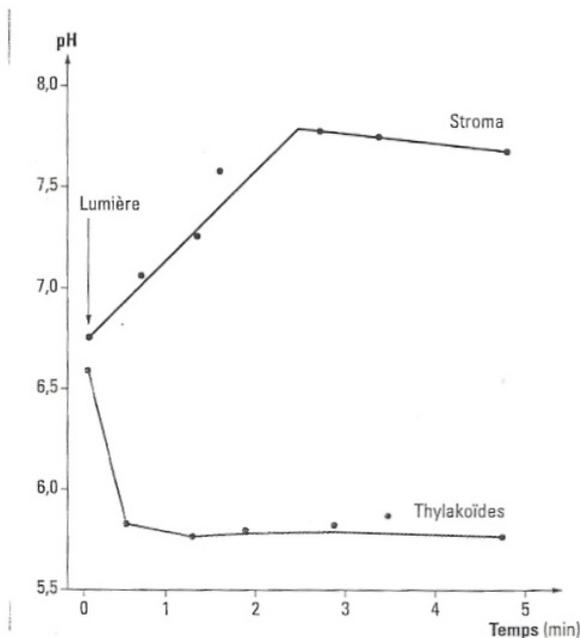
- Décrire les variations de la courbe obtenue.
- Quelles sont les structures présentes dans le milieu ?
- Nommer la réaction mise en évidence après l'adjonction du réactif de Hill. Justifier.
- Formuler une hypothèse quant à la variation de la concentration en  $O_2$  dans le milieu qui est éclairé entre les temps 2 et 4 minutes, c'est-à-dire avant l'ajout d'oxydant.
- Expliquer l'évolution de la concentration en  $O_2$  pendant la seconde période d'éclairement (entre 8 et 10 minutes) alors qu'il n'y a pas eu ajout de ferricyanure de potassium.
- Ecrire l'équation bilan de la réaction observée lors de l'ajout du réactif de Hill.

Note : Le réactif de Hill contient du fer à l'état oxydé (Fer ferrique  $Fe^{3+}$ )

- Depuis l'expérience de Hill, on a isolé les substances qui naturellement, jouent le même rôle au sein de chloroplaste que le ferricyanure de potassium. On les nomme transporteurs ou coenzymes (légendés R à l'état oxydé et  $RH_2$  à l'état réduit)
- Ecrire alors l'équation bilan de l'oxydation de l'eau lors de la photosynthèse.
- Dans quel compartiment du chloroplaste se déroule cette phase photochimique de la photosynthèse ?

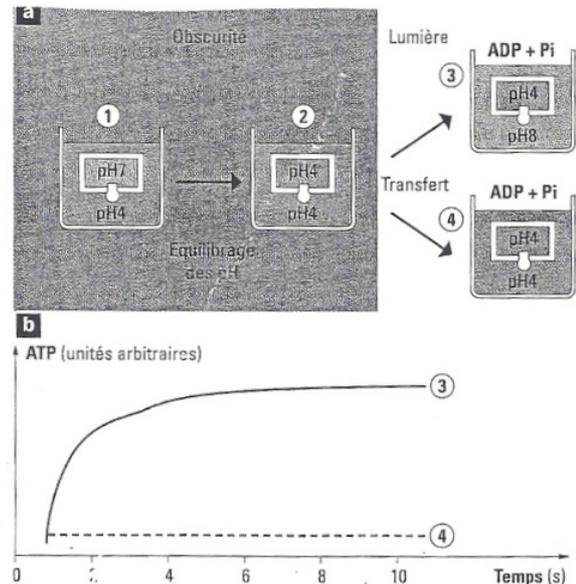
### 4 – La production d'ATP au cours de la phase photochimique.

#### Document 1a



**Variations de pH liées à l'éclairement, en fonction du temps.** L'oxydation de l'eau par la lumière s'accompagne d'une libération de protons  $H^+$ . On suit les variations de la concentration de protons par des mesures de pH, dans le stroma et à l'intérieur des thylakoïdes de chloroplastes isolés et éclairés fortement, pendant quelques minutes.

#### Document 1b



#### Conversion du gradient de pH en ATP.

- a.** Des thylakoïdes isolés, dont l'intérieur est à pH 7, sont placés à l'obscurité dans un tampon à pH 4 (1) pendant quelques minutes. Lorsque le pH est équilibré à 4 (2), ils sont replacés dans un milieu tamponné à pH 8 (3), en présence d'ADP et de Pi. D'autres thylakoïdes laissés dans le milieu à pH 4 (4) forment le témoin.
- b.** Évolution de la production d'ATP en fonction du temps.

Doc 1a : Commenter les deux courbes. Comment interprétez-vous les variations ?

Doc 2b : Commenter les expériences. Quel est le rôle du gradient de pH ?

## II – La phase non photochimique de la photosynthèse

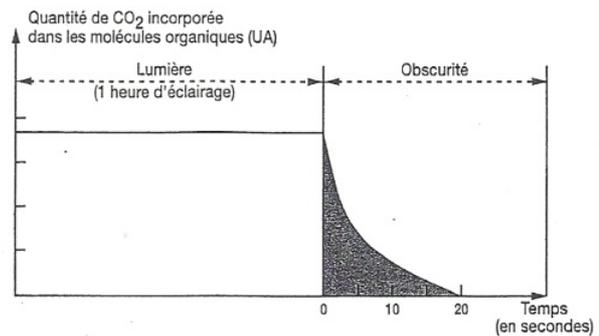
### 1 – L'expérience de Gaffron (1951)

Gaffron éclaire pendant une heure, par un faisceau lumineux de forte intensité, une suspension d'algues vertes unicellulaires, dans laquelle barbote du dioxyde de carbone radioactif ( $^{14}\text{CO}_2$ ). Au bout d'une heure, la suspension est placée dans l'obscurité.

Le graphe ci-contre indique la quantité de  $\text{CO}_2$  marqué, fixée au cours de l'expérience par les algues vertes.

- Interpréter cette expérience.

Document 2



### 2 – Les expériences de Arnon (1958)

Arnon effectue une expérience sur des chloroplastes isolés qu'il fragmente afin de séparer le stroma et les thylakoïdes. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-contre.

- Les résultats de cette expérience confirment-ils les interprétations précédentes ?
- Où se déroule cette phase obscure de la photosynthèse ?

	Radioactivité des molécules organiques, déterminée en fin d'expérience au compteur Geiger en coups.min <sup>-1</sup>
Chloroplastes maintenus à l'obscurité puis fragmentés. Isolement du stroma maintenu ensuite à l'obscurité et approvisionné en $^{14}\text{CO}_2$ pendant 30 minutes.	4 000
Chloroplastes maintenus en fort éclairage dans un milieu sans $\text{CO}_2$ . Fragmentation des chloroplastes. Isolement du stroma maintenu ensuite à l'obscurité et approvisionné en $^{14}\text{CO}_2$ pendant 30 mn.	96 000

Arnon réalise une expérience complémentaire dont les résultats sont présentés ci-contre.

- Quelles sont alors les conditions et les éléments indispensables pour que la phase non photochimique de la photosynthèse puisse s'effectuer ?

	Quantité de $^{14}\text{CO}_2$ fixé dans le stroma (coups.mn <sup>-1</sup> )
Stroma isolé, maintenu à l'obscurité approvisionné en ATP et en coenzymes réduits $\text{RH}_2$ et en $^{14}\text{CO}_2$ pendant 30 minutes.	97 000

### 3 – Conclusion

- Indiquer les événements moléculaires qui se déroulent au cours de la phase non photochimique de la photosynthèse.

#### **Conclusion générale**

A partir de toutes les informations de ce TP, faire un schéma de synthèse des réactions qui se déroulent au cours de la photosynthèse.

*Compétence testée : Construire un raisonnement afin de répondre à une problématique*