

TP n°3: Les deux phases de la photosynthèse

Le processus de la photosynthèse est constitué de deux phases. La première phase appelée « phase photochimique » se déroule au niveau des thylakoïdes chloroplastiques et assure la conversion de l'énergie lumineuse, absorbée par les pigments chlorophylliens, en énergie chimique. La deuxième phase, appelée « phase chimique » se déroule dans le stroma et permet ainsi la synthèse de molécules organiques pouvant être stockées temporairement sous forme d'amidon ou exportées vers des organes non photosynthétiques.

Problème posé : Comment se déroulent et sont associées les deux phases de la photosynthèse ?

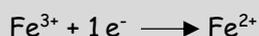
Compétences :

- Pratiquer une démarche scientifique.
- Mettre en œuvre un protocole en respectant rigoureusement les étapes.
- Respecter les règles de sécurité.
- Utiliser une chaîne ExAO.
- Présenter les résultats pour les communiquer et les exploiter pour répondre au problème.
- Communiquer dans un langage scientifiquement approprié : schéma fonctionnel.
- Savoir la phase photochimique et la phase chimique, les composés produits et utilisés.

Ressources : <ul style="list-style-type: none"> - Documents. - http://svt.ac-rouen.fr/tice/animations/animations.htm: photosynthèse. - Vidéo : Mc Graw Hill photosynthesis 	Matériel : <ul style="list-style-type: none"> - Extraction des chloroplastes : feuilles vertes (épinard...), sable, pilon et mortier, ciseaux, pipette et poire, filtre, solution tampon, entonnoir, gaze, coton, bécher. <hr/> ExAO : matériel informatique, réactif de Hill (ferrocyanure de potassium). <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">  </div>
--	---

Activité 1 : La phase photochimique de la photosynthèse soit conversion de l'énergie lumineuse des photons absorbée par les pigments chlorophylliens en énergie chimique.

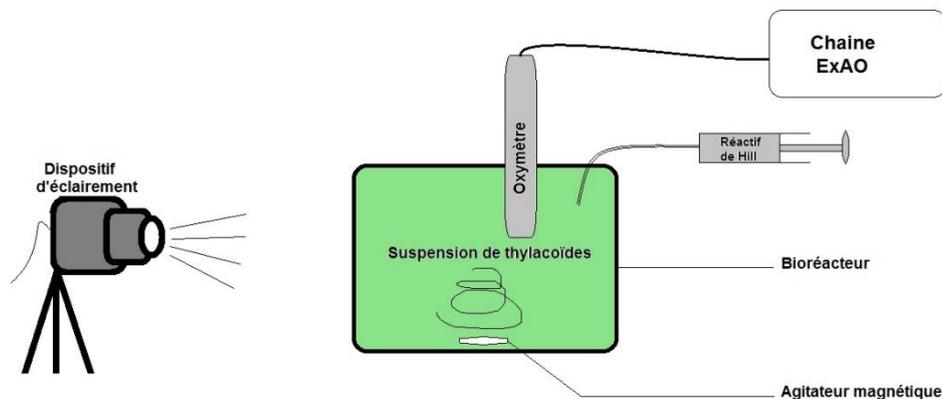
Dans la réaction de la photosynthèse, l'eau apparaît comme un donneur de protons et d'électrons alors que le dioxyde de carbone apparaît comme un accepteur de protons et d'électrons. En 1937, Hill envisagea l'existence d'un intermédiaire qui accepterait les électrons provenant de l'eau pour les transférer au dioxyde de carbone. Il entreprit de vérifier cette idée en remplaçant cet intermédiaire inconnu par un oxydant artificiel (réactif de Hill, ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$, oxydant puissant qui peut pénétrer dans le chloroplaste dont les enveloppes sont altérées) qui serait réduit à la lumière par les électrons provenant de l'eau.



1. Suivre le protocole d'extraction des chloroplastes des feuilles.
 - Dans un mortier refroidi au réfrigérateur, couper finement 20g de feuilles d'épinard dénervées.
 - Ajouter 3 ml de tampon tri-saccharose de pH= 10.5 et une grosse pincée de sable fin.
 - Commencer à broyer au pilon puis ajouter progressivement 20 ml de solution tampon phosphate-saccharose de pH=6.5. Broyer intensément pendant 2 minutes.
 - Filtrer le broyat, en utilisant un entonnoir garni de gaze (3 ou 4 épaisseurs) et de coton hydrophile, au-dessus d'un bécher maintenu au froid (cristalliseur rempli de glace).
 - Presser fortement le filtre pour récupérer le maximum de filtrat.
 - Conserver la suspension de chloroplastes (de thylakoïdes) ainsi obtenue à l'obscurité (erlenmeyer enveloppé de papier aluminium) et au froid jusqu'au moment de la mesure.

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.

2. Suivre le protocole de mesure de l'évolution de la concentration en dioxygène de la suspension de thylakoïdes.
 - Remplir l'enceinte avec la suspension de thylakoïdes, selon sa capacité, sans oublier d'ajouter l'agitateur magnétique.
 - Installer la sonde oxymétrique.
 - Fermer l'enceinte, vérifier l'absence de bulle d'air et la bonne position des sondes.
 - Agiter à vitesse modérée.
 - Préparer une seringue avec 0.2 ml de réactif de Hill.
 - Paramétrer la mesure (en s'aidant de la fiche technique) : durée de la mesure = 10 min. *Il est possible que la teneur en oxygène du milieu diminue fortement au début de l'expérience, et ainsi il faut attendre la stabilisation avant de commencer les mesures.*
 - Commencer l'enregistrement par 4 minutes à la lumière puis ajouter 0,2 ml de réactif de Hill et poursuivre l'enregistrement pendant 4 minutes. Puis placer 2 minutes à l'obscurité.
 - Enregistrer votre travail. Présenter les résultats pour les communiquer.



3. Exploiter les résultats et écrire l'équation bilan de la réaction observée lors de l'ajout du réactif de Hill. Depuis l'expérience de Hill, on a isolé les substances qui naturellement, jouent le même rôle au sein de chloroplastes que le réactif de Hill. On les nomme transporteurs ou coenzymes (légendés R à l'état oxydé et RH₂ à l'état réduit). Voir **documents 1**.

4. Ecrire alors l'équation bilan de l'oxydation (photo- oxydation) de l'eau lors de la photosynthèse.

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

A partir des **documents 2**, expliquez comment un différentiel de pH peut s'établir de part et d'autre de la membrane des thylakoïdes et une synthèse d'ATP s'effectuer, lorsque les chloroplastes sont éclairés.

Activité 3 : La phase chimique soit la synthèse de molécules organiques.

Après avoir montré que la synthèse proprement dite de matière organique ne dépend pas directement de la lumière lors de la photosynthèse, indiquez les conditions de cette synthèse et le rôle des thylakoïdes (tâche complexe livre p 16 et 17).

Expliquez comment la phase photochimique et la phase chimique sont associées et réalisez un schéma fonctionnel global des réactions qui se déroulent au cours de la photosynthèse.

Documents 1

1A La membrane des thylakoïdes contient des photosystèmes, assemblages de pigments et de protéines. Dans un photosystème, les pigments sont groupés en antennes collectrices d'énergie lumineuse : l'absorption d'un photon par une molécule de pigment entraîne une modification de sa configuration électronique : le pigment passe d'un état dit fondamental à un état excité. Le retour à l'état fondamental est couplé à l'excitation d'un pigment voisin. Ainsi, l'énergie est transférée de pigment en pigment jusqu'à un centre réactionnel. Ce dernier contient de la chlorophylle a dite « piège ». Lorsqu'elle est excitée, la chlorophylle piège perd un électron au profit d'**accepteurs R** qui s'en trouvent réduits. Un électron est restitué à la chlorophylle piège par un système d'oxydation de l'eau, d'où la production de O₂. Les photosystèmes convertissent donc l'énergie lumineuse en énergie chimique sous forme de composés réduits. On note **RH2** les composés réduits obtenus à l'issue de la phase photochimique. **BELIN**

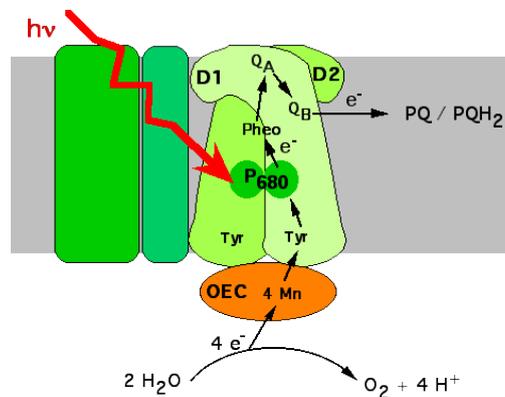
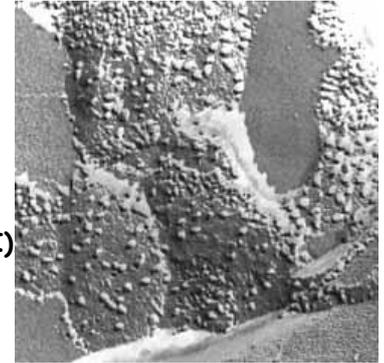
1B Microscopie à transmission (cryofracture)

La cellule chlorophyllienne est gelée (azote liquide)

puis cassée sous vide. La fracture est recouverte de carbone.

Le tissu vivant est détruit. C'est la réplique de carbone qui est

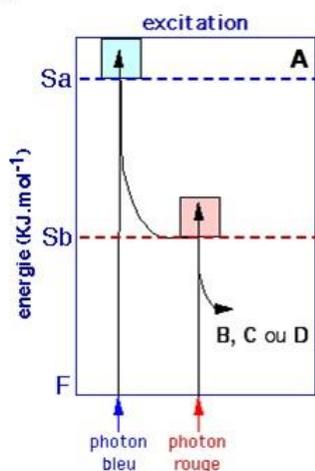
observée. Les particules observées sur les membranes sont les **photosystèmes (II)**



1C Schéma photosystème II

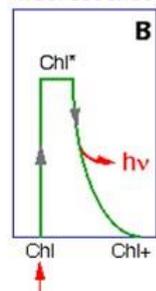
1D

Il existe 2 états excités (graphique A) de la chlorophylle correspondant à des transitions électroniques provoquées par l'absorption d'un photon qui fait passer un électron de l'état fondamental soit à l'état excité supérieur « Sa », soit à l'état inférieur « Sb » selon l'énergie du photon. « Sa » correspond à l'absorption de photons bleus et « Sb » à l'absorption de photons rouges.

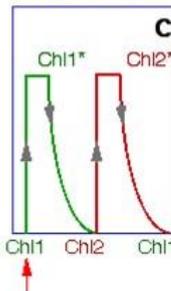


Il existe plusieurs façons B, C ou D pour la molécule de chlorophylle de revenir à l'état fondamental. De l'état « Sa » à « Sb » en émettant de la chaleur, de l'état « Sb » à « F » en:

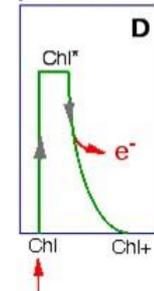
fluorescence



résonance



photochimie

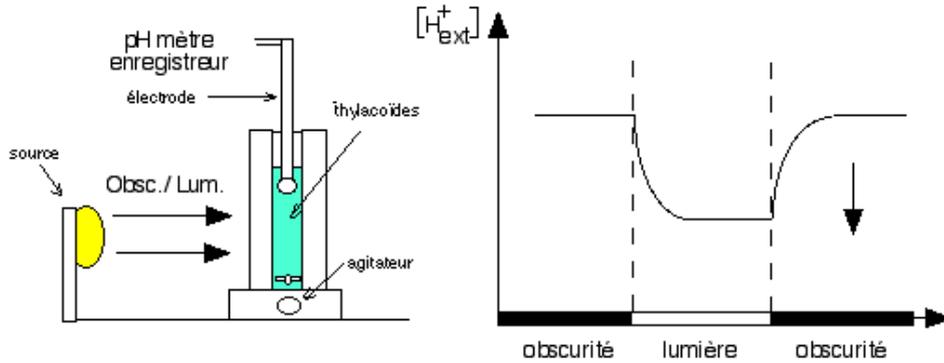


- En émettant de la lumière (fluorescence, graphique B)
- En transférant son énergie à une molécule très proche (résonance, graphique C)
- En perdant un électron (photochimie, graphique D)



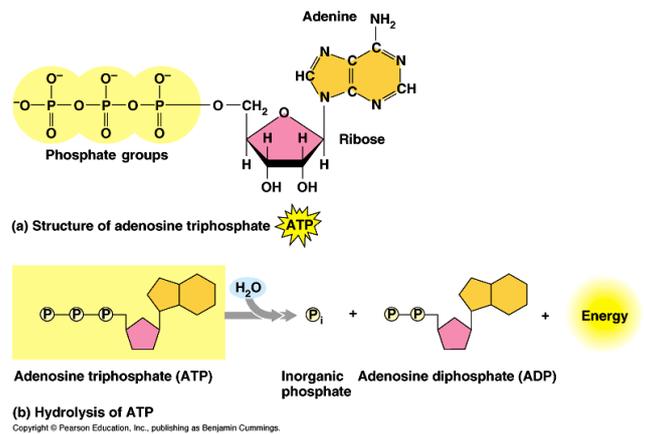
Documents 2

2A Des thylakoïdes en suspension dans un milieu faiblement tamponné sont placés dans une cuve thermostatée. Une électrode de pH reliée à un enregistreur est placée dans la suspension qui est agitée continuellement. Une source de lumière blanche permet de faire des transitions obscurité/lumière. Remarque : dans cette expérience il n'y a ni ADP ni Pi donc aucune synthèse d'ATP possible.

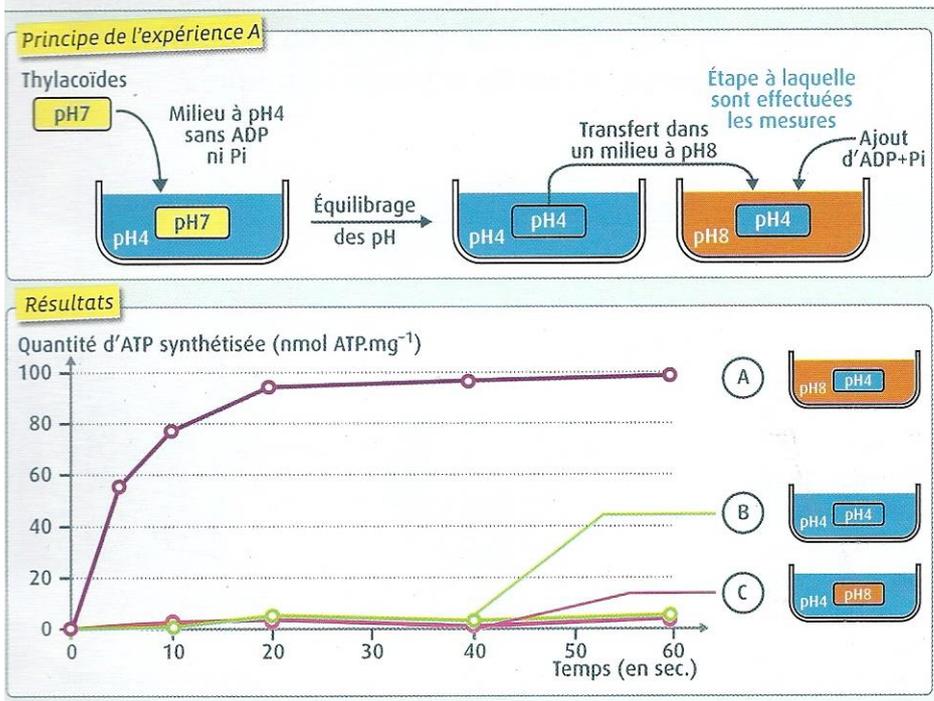


Mouvements des protons à travers la membrane des thylakoïdes. Dispositif pour mesurer les mouvements de protons à travers les thylakoïdes à la lumière (à gauche) et enregistrement des variations de concentrations de protons du milieu de suspension lors de transitions obscurité / lumière (à droite). La molécule d'ATP ou adénosine triphosphate.

2 B L'ATP est synthétisé à partir d'ADP (adénosine diphosphate) et de phosphate inorganique Pi. Cette synthèse nécessite un apport d'énergie pour l'établissement d'une liaison entre deux groupements phosphate : c'est la phosphorylation. Si la source d'énergie est la lumière, on parle de photophosphorylation. La liaison formée peut ultérieurement être hydrolysée, ce qui libère de l'énergie. **L'ATP est une molécule essentielle pour les transferts d'énergie dans la cellule.**



2 C Expériences historiques de Jagendorf



4 Les conditions de la synthèse d'ATP. Vers 1965, Jagendorf et ses collaborateurs isolent des thylakoïdes par centrifugation de chloroplastes dont l'enveloppe a été lésée. Ils réalisent différentes expériences à l'obscurité. Dans une expérience A, les thylakoïdes sont placés dans un milieu à pH 4, jusqu'à ce que le pH du lumen s'équilibre avec le pH du milieu. Ils sont ensuite transférés dans un milieu tamponné à pH 8 contenant de l'ADP et du phosphate inorganique (Pi). On mesure alors la synthèse d'ATP en fonction du temps. Dans d'autres expériences (B et C), on adapte le protocole afin d'imposer d'autres valeurs de pH pour le lumen et le milieu.

2D Microscope à transmission : un chloroplaste éclaté est disposé sur la grille d'observation puis recouvert d'un contrastant négatif. On observe le bord d'un granum et les particules en relief sont les ATPsynthases.

