

Rapport de physiologie végétale : Dommmages photochimiques et séparation de pigments par HPLC

Table des matières

1.	Introduction :	2
2.	Matériel et méthodes :	3

3.	Résultats et discussion :	4
A.	Dommages photochimiques	4
B.	Séparation des pigments par HPLC	5

1. Introduction :

Le processus physique de la photosynthèse correspond à l'absorption de l'énergie solaire par des pigments afin de la convertir en énergie chimique. La lumière solaire visible est absorbée par des molécules colorées : principalement des chlorophylles, le pigment universel de la

photosynthèse et diverses molécules qui diffèrent selon les végétaux (caroténoïdes, phycobilines, phycocyanine, xanthophylles, ...). Ces pigments photorécepteurs sont fixés sur des protéines incluses pour la plupart dans la membrane des thylakoides. Au sein des thylakoides des chloroplastes, les pigments sont organisés en réseau collecteur de photons aboutissant aux photosystèmes. Toutes les réactions photochimiques importantes prennent place dans ces photosystèmes dans lesquels se trouvent les chlorophylles spécialisées et les pigments nécessaires à la photosynthèse.

Le but de cette manipulation est d'identifier et de quantifier ces différents pigments présents dans différents tissus végétaux par la technique de chromatographie liquide haute performance (HPLC). Dans la nature, ces pigments, frappés par la lumière, subissent des dommages photochimiques, c'est-à-dire qu'ils perdent leurs propriétés optiques. Cette manipulation a aussi pour objectif la mise en évidence de ces dommages par l'analyse du spectre d'absorption des chlorophylles.

2. Matériel et méthodes :

Afin d'évaluer les dommages photochimiques subis par une plante soumise à une lumière froide, nous allons analyser, grâce au spectrophotomètre et sur un même graphique, le spectre d'absorption entre 350 et 700 nm des pigments extraits d'une feuille d'épinard. Cette expérience se déroule en deux parties :

1) Extraction des pigments végétaux :

- Broyer à l'ultra-turrax l'échantillon de feuille d'épinard dans de l'acétone.
- Centrifuger et placer dans une cuvette en verre la suspension d'épinard.

2) Mesure des dommages photochimiques au spectromètre :

- Régler le spectrophotomètre (réglage du scan d'absorption entre 350 et 700 nm, préparation du « zéro » au moyen d'une solution d'acétone,...).
- Enregistrer le spectre d'absorption de la suspension d'épinard une première fois.
- Placer l'échantillon d'épinard sous une source de lumière froide.
- Enregistrer le spectre d'absorption de la suspension d'épinard toutes les 10 minutes pendant 40 minutes.

Le spectrophotomètre mesure les proportions de lumière de différentes longueurs d'ondes qu'une solution de pigments absorbe et transmet. Un prisme logé à l'intérieur de l'instrument décompose la lumière blanche en couleurs (longueurs d'ondes). Une par une, on dirige les différentes couleurs de la lumière à travers la solution de pigments. La lumière transmise par la solution frappe un tube photoélectrique, qui convertit l'énergie lumineuse en électricité. Enfin un ampèremètre mesure l'intensité du courant électrique. Chaque fois que la longueur d'onde de la lumière change, l'ampèremètre indique la proportion de lumière transmise à travers la solution ou, au contraire, la proportion de lumière absorbée. Le graphique qui représente l'absorption en fonction des longueurs d'onde s'appelle spectre d'absorption.

Dans la deuxième partie de ce laboratoire, nous allons séparer, identifier et quantifier des pigments végétaux extraits de différents tissus (feuille d'épinard, racine de carotte et chair du fruit de la tomate) en utilisant la technique HPLC. Cette partie se déroule, elle aussi, en deux parties :

1) Extraction de pigments végétaux :

- Broyer à l'ultra-turrax les 3 échantillons (épinard, carotte, tomate) dans de l'acétone.
- Centrifuger les échantillons et prélever les surnageants (2X).

2) Séparation des pigments végétaux par HPLC :

- Placer les tubes d'échantillons dans l'injecteur automatique de l'HPLC.

Le dispositif d'HPLC comprend les éléments de base suivants :

- une pompe qui pousse le solvant dans un injecteur. La pression est essentielle pour éviter un phénomène de diffusion en délivrant les solvants à débit constant et pour augmenter la résolution.
- un système d'injection comportant une boucle d'échantillonnage calibrée. Cette boucle calibrée, remplie de l'échantillon à étudier, peut être introduite, sans variation importante de la pression, dans le circuit allant des pompes vers l'entrée de la colonne.
- une colonne dans laquelle les pigments vont être séparés. Elle est remplie d'une phase stationnaire non polaire : une résine très hydrophobe (formée de longues chaînes de 18 carbones greffées sur des billes de silice).
- un détecteur permettant à la fois de mettre en évidence la sortie des pigments de la colonne et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun de ces pigments.

Au départ, le solvant utilisé est hydrophile. L'hydrophobicité de la résine permet aux pigments hydrophobes d'être retenus par la colonne (grâce aux interactions hydrophobes), tandis que les pigments les plus hydrophiles seront élués en premier. L'hydrophobicité du solvant va être ensuite augmentée progressivement ce qui va permettre au solvant d'entraîner avec lui les pigments plus hydrophobes qui seront élués par après.

3. Résultats et discussion :

A. Dommages photochimiques

Sur notre graphe (voir en annexe : « Overlay Spectrum Graph Report »), la courbe bleue correspond au stade initial, c'est-à-dire 0 minute. La courbe rouge est réalisée après 10 minutes, la violette après 20 minutes, la verte après 30 minutes et pour finir la noire après 40 minutes d'exposition à la lumière froide. On peut observer 5 pics d'absorption à 432, 534, 581, 616 et 662 nm. Ces pics d'absorptions se retrouvent sur chacune des courbes mais on note cependant une diminution de l'intensité de ceux-ci au fur et à mesure que le temps d'exposition à la lumière augmente. Grâce aux standards fournis (voir en annexe), nous pouvons identifier les différents pigments présents dans notre solution.

Le pic à 432 nm est caractéristique de la chlorophylle a mais il est renforcé par la présence de la chlorophylle b qui absorbe à 456,9 mais son absorption n'est pas suffisante pour créer un 2eme pic, elle renforce donc celui de la chlorophylle a. Les pics à 534, 581 et 616 nm sont typiques de la chlorophylle a. Celui à 662 nm l'est aussi mais nous avons noté une asymétrie du côté gauche qui est due au pic à 645,5 de la chlorophylle b. Nous n'observons pas de pics caractéristiques des caroténoïdes ce qui ne signifie pas qu'ils sont absents dans les feuilles d'épinard mais nous ne pouvons les mettre en évidence car leurs spectres d'absorption se superposent à ceux des chlorophylles. Cependant nous savons que théoriquement nous avons un peu de ces pigments dans la feuille d'épinard. Les phycoérythrine et phycocyanine étant liées de façon covalente aux protéines, elles vont donc se retrouver dans le culot, contrairement aux chlorophylles et caroténoïdes qui sont liées par

des interactions faibles avec la protéine, et donc nous ne pouvons les mettre en évidence car elles ne se trouvent pas dans la solution analysée.

Comme dit ci-dessus, les différents pics subissent une diminution d'intensité au cours de l'expérience. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le fait que l'intensité d'absorbance diminue au fil de l'exposition à la lumière froide :

- Nous n'avons pu mettre en évidence la présence des pigments caroténoïdes dans notre échantillon de feuilles d'épinard or nous savons que ceux ci jouent un rôle important dans la protection des dommages photochimiques . En effet, une molécule de chlorophylle peut se trouver à l'état triplet excité lorsqu'elle est intensivement éclairée et réagir avec l'oxygène de l'air se trouvant à l'état triplet fondamental. La chlorophylle retombe alors à son niveau fondamental tandis que l'oxygène passe à un état singulet excité. Il constitue alors un danger. En effet, l'oxygène singulet dégrade les chlorophylles ce qui permet d'expliquer cette diminution d'absorption suite à un éclairage intensif. Les caroténoïdes constituent un système pour éviter ce phénomène car ils interviennent dans la détoxification de l'oxygène singulet. Les caroténoïdes, même s'ils sont présents dans notre solution, ne sont plus liés aux protéines et perdent leur fonction. Dès lors, ils ne peuvent contrer les dommages photochimiques induits par la lumière froide .

- Les pigments n'étant plus présents dans les membranes des thylakoides (suite au broyage et à la centrifugation des feuilles d'épinard), ils peuvent se trouver dans des conditions de pH ou de potentiel inhabituelles entraînant une réduction de leur activité ou un changement dans leur conformation. De plus, ils perdent leur organisation en photosystèmes et leur stabilisation par les protéines, ce qui les rend moins performants.

- Les accepteurs d'électrons ne sont plus présents, la chlorophylle excitée ne parvient plus à retomber dans son état fondamental et ne peut donc plus absorber la lumière.

Nous pouvons aussi constater une variation de couleur entre l'échantillon d'épinard qui est resté à l'obscurité (vert foncé) et celui qui a subi les dommages photochimiques (vert clair). Cela peut être expliqué par le fait que l'absorbance de la chlorophylle diminue dans le rouge, ce qui entraîne une ré-émission moins forte de la couleur verte.

B. Séparation des pigments par HPLC

Grâce aux chromatogrammes fournis, nous pouvons identifier les différents pics :

Feuille d'épinard :

Pic	Nom du pic
1	Néoxanthine
2	Violaxanthine
4	Lutéine
5	Chlorophylle b
7	Chlorophylle a
11	β,β -Carotène

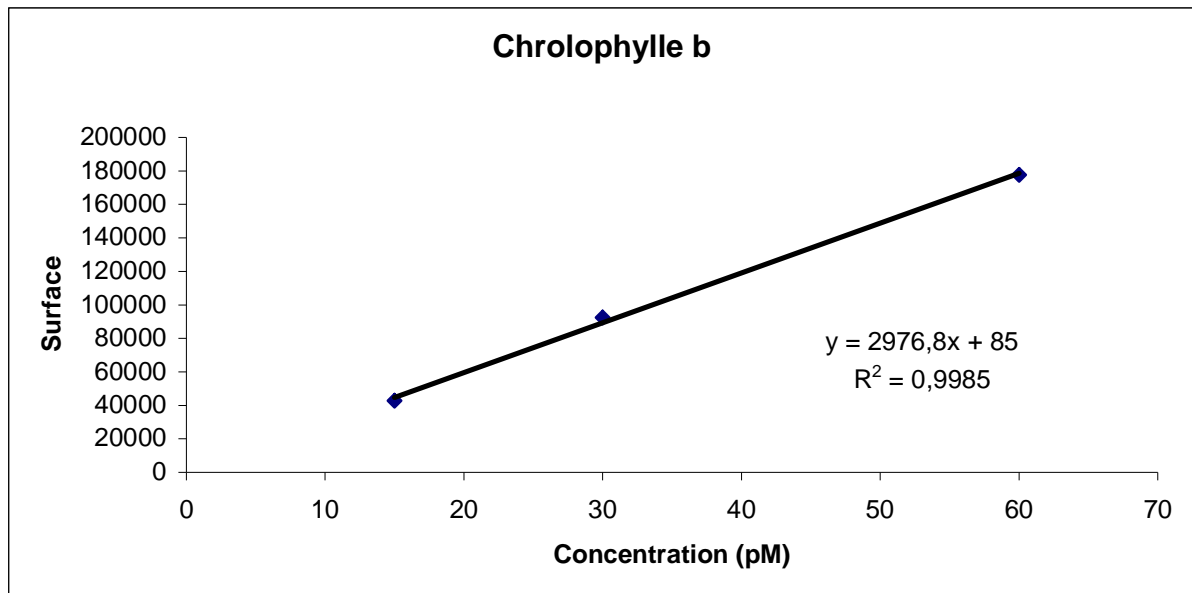
Chair de tomate :

Pic	Nom du pic
3	Néoxanthine
4	Violaxanthine
6	Lutéine
7	Chlorophylle b
9	Chlorophylle a
12	β,β -Carotène

Racine de carotte :

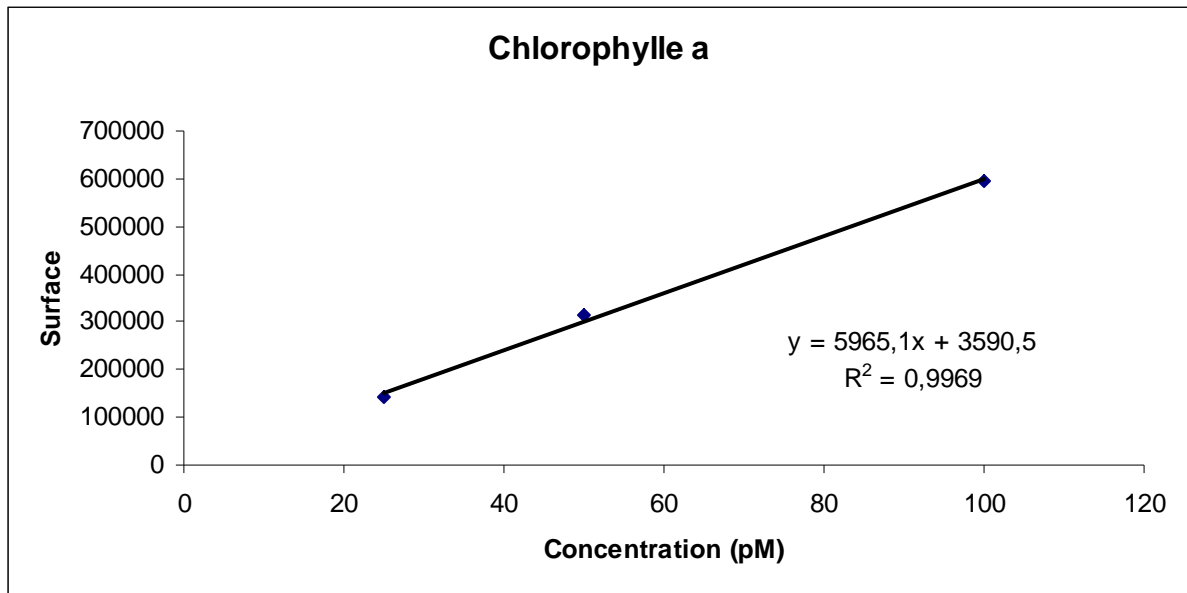
Pic	Nom du pic
1	Néoxanthine
2	Violaxanthine
6	Lutéine
8	Chlorophylle b
10	Chlorophylle a
17	β,β -Carotène

A l'aide des standards fournis, nous pouvons établir une droite d'étalonnage et à l'aide de celle-ci quantifier les différents pigments présents dans les échantillons étudiés.



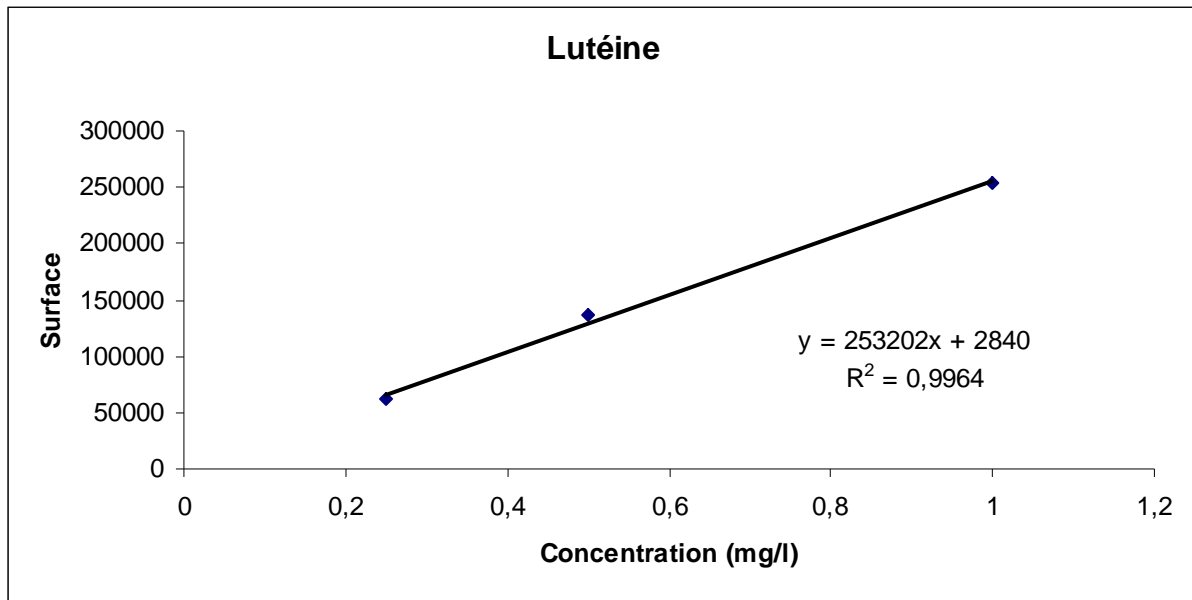
La concentration de chlorophylle b présente dans les différents échantillons peut être calculée à partir de l'équation de la droite : « $y = 2976,8x + 85$ ». La variable x représente la concentration que l'on cherche et la variable y représente l'aire sous le pic de la chlorophylle b de nos résultats expérimentaux. Il ne faut pas oublier de tenir compte de la dilution ($\times 1,1$ pour la carotte et la tomate et $\times 10 \times 10$ pour l'épinard qui est dilué deux fois) et de l'acétone ($\times 3 \cdot 10^{-3}$) ; ce qui donne :

- Pour l'épinard : $(225941-85) / 2976,8 = 75,87$ pM de chlorophylle b
 En g/l : $75,87 \cdot 10^{-12} \text{ mol/l} \times 907,49 \text{ g/mol} = 6,89 \cdot 10^{-8} \text{ g/l}$
 En mg : $6,89 \cdot 10^{-8} \times 3 \cdot 10^{-3} \times 20 = 4,134 \cdot 10^{-9} \text{ g} = 4,134 \cdot 10^{-6} \text{ mg}$ de chlorophylle b / g de feuille d'épinard.
- Pour la tomate : $(9260-85) / 2976,8 = 3,08$ pM de chlorophylle b
 En g/l : $3,08 \cdot 10^{-12} \times 907,49 = 2,79 \cdot 10^{-9} \text{ g/l}$
 En mg : $2,79 \cdot 10^{-9} \times 1,1 \times 3 \cdot 10^{-3} = 9,207 \cdot 10^{-12} \text{ g} = 9,207 \cdot 10^{-9} \text{ mg}$ de chlorophylle b / g de chair de tomate.
- Pour la carotte : $(18192-85) / 2976,8 = 6,08$ pM de chlorophylle b
 En g/l : $6,08 \cdot 10^{-12} \times 907,49 = 5,52 \cdot 10^{-9} \text{ g/l}$
 En mg : $5,52 \cdot 10^{-9} \times 1,1 \times 3 \cdot 10^{-3} = 1,82 \cdot 10^{-11} \text{ g} = 1,82 \cdot 10^{-8} \text{ mg}$ de chlorophylle b / g de racine de carotte.



Un raisonnement similaire à la chlorophylle b peut être appliqué pour la chlorophylle a :

- Pour l'épinard : $(632130-3590,5) / 5965,1 = 105,37$ pM de chlorophylle a.
 En g/l : $105,37 \cdot 10^{-12} \times 893,5 = 9,41 \cdot 10^{-8}$ g/l
 En mg : $9,41 \cdot 10^{-8} \times 20 \times 3 \cdot 10^{-3} = 5,65 \cdot 10^{-9}$ g = $5,65 \cdot 10^{-6}$ mg de chlorophylle a / g de feuille d'épinard.
- Pour la tomate : $(22400-3590,5) / 5965,1 = 3,15$ pM de chlorophylle a
 En g/l : $3,15 \cdot 10^{-12} \times 893,5 = 2,81 \cdot 10^{-9}$ g/l.
 En mg : $2,81 \cdot 10^{-9} \times 1,1 \times 3 \cdot 10^{-3} = 9,273 \cdot 10^{-12}$ g = $9,273 \cdot 10^{-9}$ mg de chlorophylle a / g de chair de tomate.
- Pour la carotte : $(47193-3590,5) / 5965,1 = 7,31$ pM de chlorophylle a
 En g/l : $7,31 \cdot 10^{-12} \times 893,5 = 6,53 \cdot 10^{-9}$ g/l
 En mg : $6,53 \cdot 10^{-9} \times 1,1 \times 3 \cdot 10^{-3} = 2,15 \cdot 10^{-11}$ g = $2,15 \cdot 10^{-8}$ mg de chlorophylle a / g de racine de carotte.



Un raisonnement similaire à la chlorophylle b et a peut être appliqué pour la lutéine:

- Pour l'épinard : $(156473-2840) \times 20 \times 3 \cdot 10^{-3} / 253202 = 3,64 \cdot 10^{-2}$ mg de lutéine / g de feuille d'épinard.
- Pour la tomate : $(48113-2840) \times 1,1 \times 3 \cdot 10^{-3} / 253202 = 5,90 \cdot 10^{-4}$ mg de lutéine / g de chair de tomate.
- Pour la carotte : $(289771-2840) \times 1,1 \times 3 \cdot 10^{-3} / 253202 = 3,74 \cdot 10^{-3}$ mg de lutéine / g de racine de carotte.

Grâce aux valeurs obtenues, nous pouvons établir un tableau comparatif

	Feuille d'épinard	Chair de tomate	Racine de carotte
Chlorophylle b	$4,134 \cdot 10^{-6}$ mg	$9,207 \cdot 10^{-9}$ mg	$1,82 \cdot 10^{-8}$ mg
Chlorophylle a	$5,65 \cdot 10^{-6}$ mg	$9,273 \cdot 10^{-9}$ mg	$2,15 \cdot 10^{-8}$ mg
Lutéine	$3,64 \cdot 10^{-2}$ mg	$5,90 \cdot 10^{-4}$ mg	$3,74 \cdot 10^{-3}$ mg

Comparé à la chair de tomate et à la racine de carotte, la feuille d'épinard contient plus de chlorophylle ce qui peut expliquer sa couleur verte. Ceci est tout à fait logique car les feuilles sont le principal lieu de la photosynthèse de la plante. Inversement, la chair de tomate et la racine de carotte, contiennent peu de pigments chlorophylliens. Ceci est aussi logique car la racine et le fruit sont deux organes peu photosynthétiques. La lutéine (pigment caroténoïde) étant prédominante dans ces deux organes, cela explique la couleur rouge-orange de la racine de carotte et de la chair de tomate.

Afin de détecter les pigments dans nos différentes solutions, nous utilisons deux détecteurs :

- Fluorimètre :

Quelques pigments seulement sont capables d'émettre une fluorescence. C'est le cas des chlorophylles. Un électron dans un état excité peut retomber en une fois au niveau fondamental lors d'intensités lumineuses saturantes. Il le fait en émettant un photon dont la longueur d'onde est inférieure à celle du photon absorbé préalablement, c'est de la

fluorescence. Le principe de fluorimètre est de détecter les pigments pouvant émettre une fluorescence. Cet appareil couvre la gamme des longueurs d'ondes allant de 440 à 655 nm correspondant à l'absorption des chlorophylles.

- Spectrophotomètre :

Cet appareil est moins spécifique car il couvre toute la gamme des longueurs d'ondes (UV/vis) et donc il détecte tous les pigments.

ANNEXES