

Lors de la photosynthèse on observe une oxydation de l'eau et une réduction du CO_2 , en présence d'énergie lumineuse captée par les pigments photosynthétiques chloroplastiques.

Expliquer en quoi les résultats expérimentaux présentés sont en accord avec l'existence de deux phases lors de la photosynthèse dans la cellule : une première phase, au cours de laquelle la lumière est indispensable, et dont les produits sont utilisés au cours de la seconde phase pour aboutir à la synthèse de molécules organiques. Localiser ces deux phases dans le chloroplaste.

Travail de réflexion :

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

En 1937, Hill envisagea l'existence d'un intermédiaire qui accepterait les électrons provenant de l'eau pour les transférer au dioxyde de carbone (ce qui revient à dire que le CO_2 n'est pas l'accepteur direct des électrons provenant de l' H_2O).

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

On vous demande ici d'exploiter une expérience prouvant cette hypothèse.

Matériel à votre disposition :

- Épinards froids ;
- PC, interface, sonde à O_2 , bioréacteur avec agitateur magnétique, cache noir, lampe à LED ;
- Seringue, 2 pipettes de 10 mL et propipettes ;
- Mortier et pilon froids, entonnoir froid.
- Ciseaux fins, petit erlenmeyer enveloppé de papier aluminium et placé dans un cristalliseur rempli de glaçons.
- Support et entonnoir, de la gaze, du coton, papier essuie-tout ;
- 10 mL de tampon phosphate tri-saccharose pH 10,5, 25 mL de tampon P-saccharose pH 6,5 (sortis du réfrigérateur et conservés dans un récipient rempli de glace pilée)
- Réactif de Hill (2 mL)
- (Microscope, lame et lamelles).

Expériences réalisables (1h maximum, y compris le rangement) :

Nous allons tester cette hypothèse par ExAO.

- L'interface est reliée au port USB du PC, la sonde à O_2 est déjà branchée.
- Ouvrir le logiciel *Pasco Capstone*.
- Cliquer sur l'icône graphique (à droite de l'écran).
- Sur l'axe des Y, « sélectionner une mesure » → Concentration en O_2 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) = $[\text{O}_2]$
- Sur l'axe des X, cliquer sur l'unité pour la prévoir en minutes.

Toutes les opérations seront réalisées dans des récipients refroidis (par de la glace pilée ou placés au réfrigérateur).

- Couper en fines lamelles quelques feuilles d'épinards froides (sans les nervures).
- Broyer fermement pendant au moins 2 min tout en ajoutant progressivement 2 à 5 mL de solution tampon phosphate- tri-saccharose pH 10,5 (pour neutraliser les acides qui peuvent attaquer les enzymes).
- Puis ajouter progressivement en cours de broyage 10 à 25 mL de tampon P-saccharose pH 6,5 ;
- Broyer fermement encore 1 min.
- Filtrer, dans l'erlenmeyer enveloppé de papier aluminium, avec un entonnoir garni de gaze (3 ou 4 épaisseurs) et de coton hydrophile. La gaze étant à l'extérieur, cela permettra de presser pour extraire le maximum de filtrat. Diluer éventuellement au tampon P-saccharose (pour obtenir une suspension vert-clair).
- Conserver la solution de chloroplastes ainsi obtenue à l'obscurité et au froid (dans le cristalliseur rempli de glaçons) jusqu'au moment de la mesure.

(Contrôler éventuellement au microscope l'obtention de chloroplastes isolés. Pour cela, prélever une goutte de suspension et la monter entre lame et lamelle pour observer des chloroplastes isolés.)

- Introduire de la solution dans le bioréacteur pour arriver jusqu'à 0,5 cm du bord supérieur (lui-même étant entouré d'eau avec glace pilée).
- Mettre en route l'agitation (faire tourner l'agitateur à la vitesse minimale une fois qu'il se déplace).
- Introduire la sonde à O_2 dans le couvercle (la tête de la sonde doit baigner dans la solution). Placer le couvercle au-dessus de la solution. Laisser alors la sonde s'adapter au milieu quelques minutes avant de débiter, le tout à l'obscurité.
- Lancer les mesures (bouton « enregistrer »). Conditions de l'expérience : obscurité (5 min), puis lumière (5 min), ajouter 0,5 mL d'accepteur d'électrons après 1 min d'éclairement. Les 10 dernières min à l'obscurité.
- Mettre une note sur le graphique à chaque changement de condition (icône texte).

Production :

- Graphique légendé et titré (si expérience réussie).
- Analyse graphique complète et réponse à la problématique (« travail de réflexion »).

Analyses documentaires :

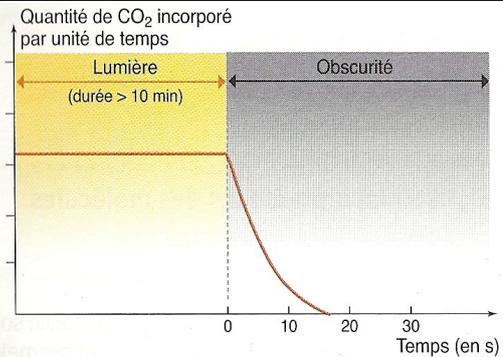
Depuis, on a isolé les substances qui, naturellement, jouent le même rôle au sein des chloroplastes. On les nomme **transporteurs** (légendés **R** sous leur forme **oxydée**, **RH₂** sous leur forme **réduite**).

À la suite de l'expérience de Hill, on a supposé que la photosynthèse comprendrait **deux phases** couplées :

- la première, initiée par l'**absorption de photons** par les **pigments chlorophylliens** situés dans les membranes des **thylakoïdes** consisterait en l'**oxydation de l'eau** et la **formation de transporteurs réduits RH₂** ;
- la deuxième dont le siège est dans le **stroma**, assurerait la **réduction du CO₂ en molécules organiques** grâce aux transporteurs réduits fabriqués lors de la première phase.

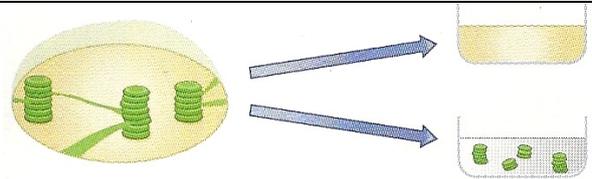
Débouchés des travaux de Hill.

Gaffron et ses collaborateurs, en 1951, éclairent pendant une heure, par un faisceau lumineux de forte intensité, une suspension d'algues vertes unicellulaires (*Scenedesmus*), dans laquelle barbote du dioxyde de carbone radioactif (¹⁴CO₂). Au bout d'une heure, la suspension est placée dans l'obscurité. Le graphique ci-contre indique la quantité de CO₂ marqué, fixée au cours de l'expérience par les algues vertes.



L'expérience de Gaffron. © Spécialité SVT Bordas 2012

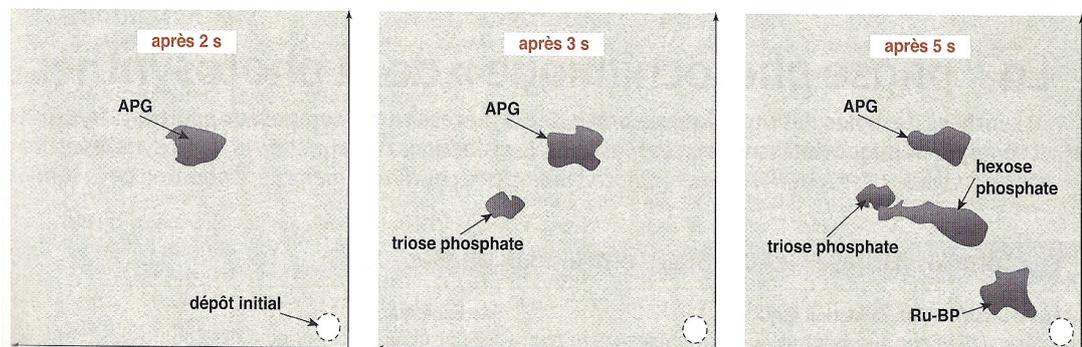
Arnon réalise une expérience en préparant, à partir de chloroplastes, une fraction contenant uniquement les thylakoïdes et une fraction correspondant au stroma. Les résultats sont exposés ci-dessous.



Expériences	Radioactivité des molécules organiques, déterminée en fin d'expérience (en coups. mn ⁻¹).
Chloroplastes + obscurité + fragmentation. Puis isolement du stroma + obscurité + approvisionnement en ¹⁴ CO ₂ pendant 30 min.	4 000
Chloroplastes + fort éclairement dans un milieu sans CO ₂ + fragmentation. Puis isolement du stroma + obscurité + approvisionnement en ¹⁴ CO ₂ pendant 30 min.	96 000
Stroma isolé + obscurité + approvisionnement en ATP et en transporteurs réduits RH ₂ et en ¹⁴ CO ₂ pendant 30 min.	97 000

L'expérience d'Arnon (1958) de séparation du stroma et des thylakoïdes. © Spécialité SVT Bordas 2012 (schéma)

Vers 1950, Melvin Calvin et Andrew Benson mettent au point une technique leur permettant de suivre le devenir du CO₂ fixé par les végétaux chlorophylliens. Une suspension d'algues vertes unicellulaires est placée pendant une heure à la lumière dans un milieu alimenté en CO₂ non radioactif. On fournit alors à la culture du CO₂ marqué au ¹⁴C. Les algues sont ensuite tuées dans l'alcool bouillant soit 2 secondes, soit 3 secondes soit 5 secondes après la fourniture du CO₂ marqué, ce qui bloque toutes les réactions chimiques. Des extraits d'algues sont traités par chromatographie bidimensionnelle puis révélés par autoradiographie.



Ru-BP : ribulose 1-5 bisphosphate (glucide à 5 atomes de carbone).

APG : acide phosphoglycérique (3 atomes de carbone).

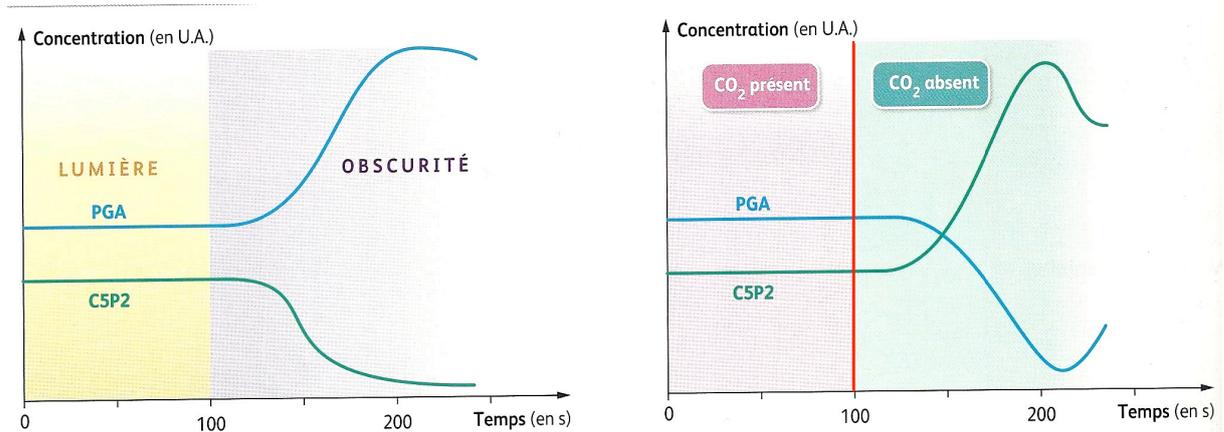
Triose : glucide à 3 atomes de carbone.

Hexose : glucide à 6 atomes de carbone (glucose par exemple)

Les résultats de l'expérience. © Spécialité SVT Bordas 2012

Melvin Calvin et James Bassham fournissent en continu du CO_2 marqué ($^{14}\text{CO}_3\text{H}$) à une culture d'algues vertes : des chlorelles. Ils mesurent au cours du temps la concentration (mesurée par leur radioactivité) de l'acide phosphoglycérique (APG = PGA) et du ribulose 1-5 bis phosphate (C_5P_2) formés dans différentes conditions en particulier :

- quand la culture cesse d'être éclairée, tout en étant toujours en présence de CO_2 ;
- quand la culture cesse d'être approvisionnée en CO_2 , tout en étant toujours à la lumière



3. Expérience de Bassham et Calvin. © Spécialité SVT Nathan 2012

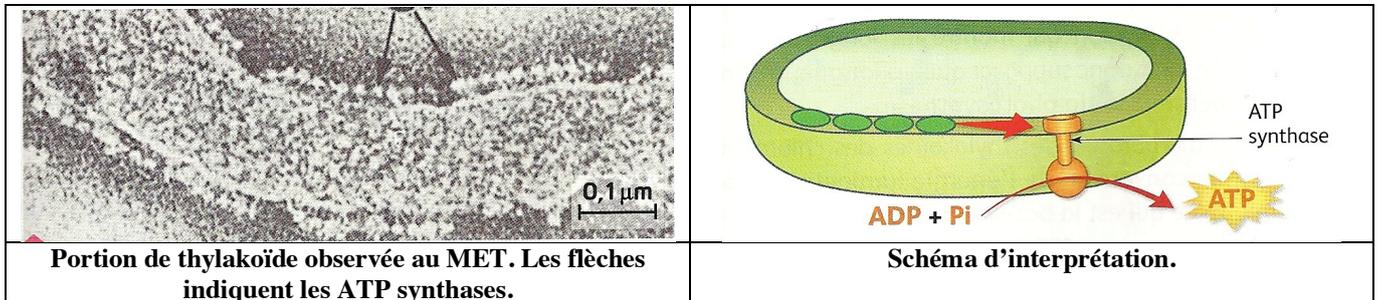
Protocole expérimental et résultats. Dans chaque expérience, la courbe en plateau de la radioactivité de l'APG ou du C_5P_2 résulte d'un état dynamique où la quantité de produit utilisée est égale à celle synthétisée.

- [Bilan partiel \(à ce stade de l'étude\) et transition vers le document final :](#)

...

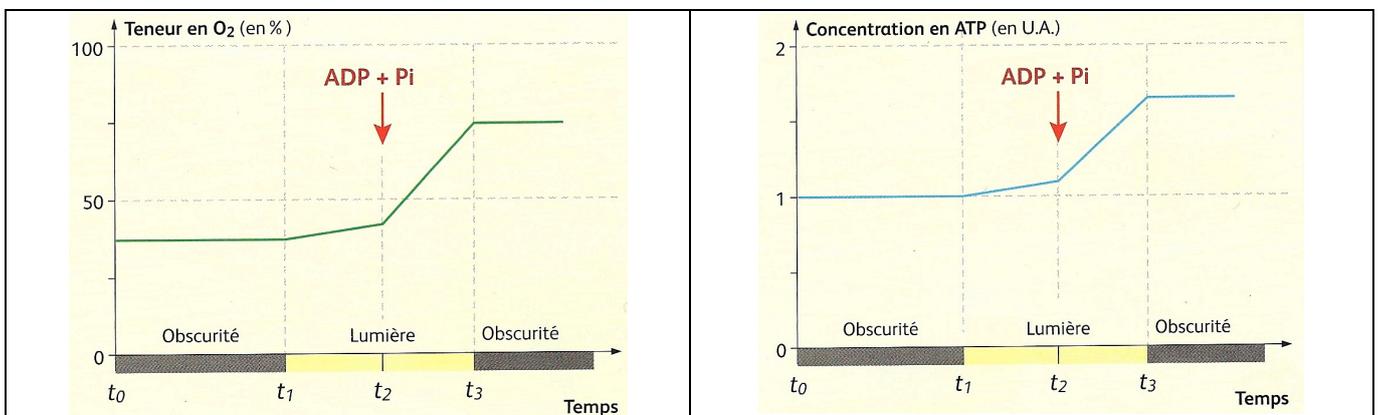
La synthèse d'ATP, à partir d'ADP et de Pi, nécessite un apport important d'énergie. On cherche à comprendre comment est régénéré l'ATP dans le chloroplaste. Des thylakoïdes isolés sont maintenus dans un bioréacteur à pH constant. On mesure la concentration en dioxygène et ATP au cours du temps dans différentes conditions.

Les membranes des thylakoïdes portent des enzymes de synthèse de l'ATP, appelées ATP synthases.



Portion de thylakoïde observée au MET. Les flèches indiquent les ATP synthases.

Schéma d'interprétation.

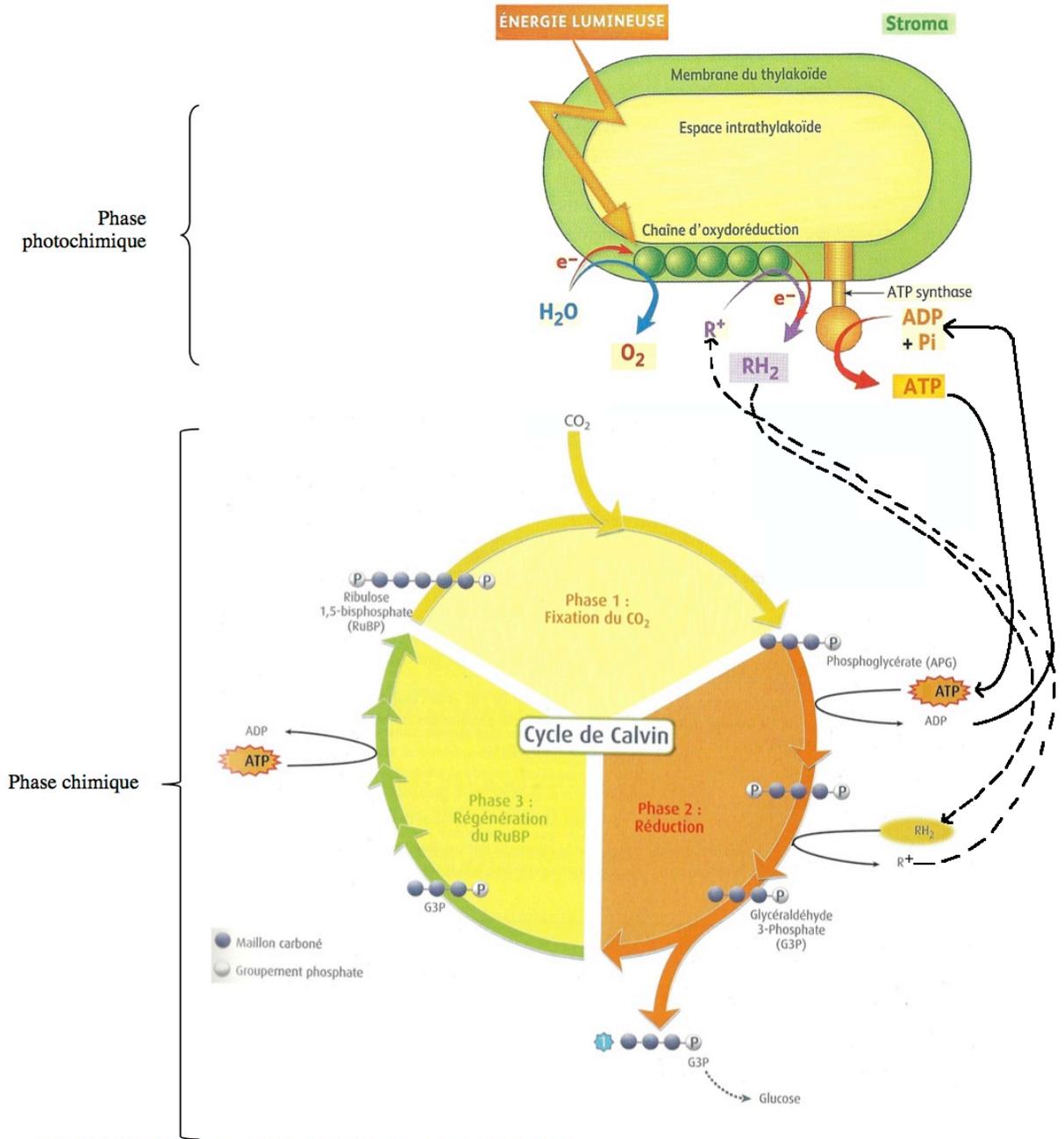


Résultat des expériences : variations de la concentration en O₂ et ATP au cours du temps.

Documents © Spécialité SVT Nathan 2012

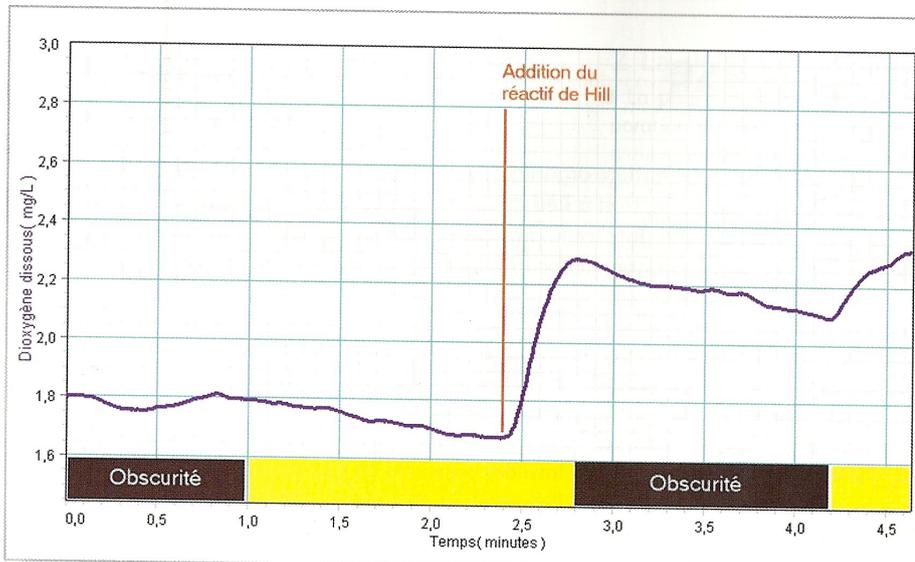
Bilan sur la photosynthèse : échanges de matière et d'énergie – couplages énergétiques.

*Melvin Calvin a reçu le prix Nobel en 1961 pour ses travaux sur la photosynthèse.



Modèle des réactions se déroulant dans le stroma : cycle de Calvin*–Benson-Bassham.

D'après Spécialité SVT Belin 2012, modifié 2012



Influence de la présence d'un accepteur d'électrons sur l'activité photosynthétique.
Le broyat contient de nombreux organites dont les mitochondries qui assurent la respiration cellulaire et consomment du dioxygène à l'obscurité comme à la lumière.

Les résultats de l'expérience de Hill. © Spécialité SVT Nathan 2012