



Travaux Pratiques Physiologie Végétale (S4)

Filière : SVI

Séance 2 : Etude des pigments végétaux

Pr. Mohammed L'bachir EL KBIACH
Département de Biologie, Faculté des Sciences, Tétouan

- Faculté des Sciences Tétouan
- Université Abdelmalek Essaâdi

2019 -2020

T.P. 2

Etude des pigments végétaux

I- Introduction

On appelle Pigment toute substance responsable de la coloration naturelle d'un tissu végétal.

Parmi les principaux pigments tirés des végétaux, on distingue :

1) Les caroténoïdes

Pigments non azotés, considérés comme des polymères de l'isoprène.

Généralement on trouve 8 unités d'isoprène pour une molécule de caroténoïde. Ce sont des pigments très répandus chez les végétaux.

Pigments facilement solubles dans le benzène, le chloroforme, l'acétone et le sulfure de carbone.

On peut les classer en 2 groupes selon que leurs molécules comportent ou non de l'oxygène :

- les carotènes (non oxygénés)
- les xanthophylles (oxygénés)

1.1) Les carotènes

Sont des hydrocarbures de formule générale $C_{40}H_{56}$, facilement solubles dans l'éther de pétrole mais presque insolubles dans le méthanol et l'éthanol.

Il en existe un grand nombre qui diffère entre eux par isomérisation.

- carotènes (de couleur orange)
- lycopènes (de couleur rouge-orangée)

Les plus répandus chez les végétaux sont les carotènes que l'on peut voir dans tous les organes. Le lycopène existe surtout dans les fruits.

1.2) Les xanthophylles

Sont des dérivés hydroxylés des caroténoïdes : $(C_{40}H_{56}O)_n$. Ce sont des pigments d'autant plus solubles dans l'éthanol et le méthanol et d'autant moins dans l'éther de pétrole que leur formule comporte davantage d'atomes d'oxygène.

Il existe un très grand nombre de xanthophylles ; citons parmi elles :

- Zéaxanthine (3,3' hydroxy- β -carotène)
- Lutéine (3,3' hydroxy- α -carotène)
- Violaxanthine (5,6,5',6' diepoxyzéaxanthine)
- Néoxanthine.

Ces pigments peuvent être combinés avec des acides gras (esters de xanthophylles).

2) Les porphyrines

Ce sont des dérivés de substitution de la porphine dont la structure chimique particulière est faite de 4 noyaux pyrrol unis entre eux par 4 radicaux méthéniques.

Il existe un très grand nombre de porphyrines dont les plus importantes chez les végétaux supérieurs sont les chlorophylles (chlorophylles a, b, c et d).

Ces pigments sont responsables de la nutrition carbonée. Grâce à l'énergie photonique reçue, ces pigments sont donc chargés de transformer l'énergie lumineuse incidente en énergie chimique nécessaire à l'incorporation et à la réduction du CO_2 pour créer enfin de compte de nouvelles molécules organiques telles que les glucides.

2.1) Les chlorophylles a et b

Ce sont des porphyrines magnésiennes possédant deux groupements carboxyliques dont l'un est estérifié par le méthanol et l'autre par le phytol.

Ce sont des pigments solubles dans l'éthanol, l'éther, le benzène, le sulfure de carbone, l'acétone et le chloroforme.

Elles sont peu solubles dans l'éther de pétrole (la chlorophylle a plus que la chlorophylle b).

Ces pigments présentant d'autre part en solution, une fluorescence rouge (réémission de lumière).

En conclusion, les molécules de chlorophylle comportent un noyau porphyrine constitué par 4 pyrroles (noyau tétrapyrrolique) unies entre eux et combiné à un atome de magnésium.

Ce noyau tétrapyrrolique porte deux groupements carboxyliques estérifiés l'un par le méthanol, l'autre par le phytol (alcool à longue chaîne $C_{20}H_{39}OH$) et un isocycle cétonique. C'est le diester d'un acide appelé chlorophylline.

Les chlorophylles absorbent essentiellement la lumière rouge et la lumière bleue. Les caroténoïdes absorbent les radiations bleues. Ces pigments sont solubles dans les solvants et les lipides ; ce sont des pigments liposolubles.

3- Bref rappel des lois de l'absorption spectrale

Soit I_0 l'intensité d'un faisceau lumineux tombant sur cuve contenant une solution d'un corps absorbant et I l'intensité de ce même faisceau après la traversée de la cuve, la loi de BEER-LAMBERT permet d'écrire :

$$I = I_0 \times 10^{-\Sigma C L}$$

* Σ = coefficient d'extinction spécifique qui dépend du corps en solution (en L/g.cm). Σ est la probabilité d'extinction d'un photon frappant une molécule de la substance considérée. Σ varie avec la longueur d'onde du photon.

* C = concentration de la solution en g/litre

* L = trajet du faisceau optique à travers la cuve en centimètre.

La densité optique (DO) est alors définie comme suit :

$$DO = \log \frac{I_0}{I} = \Sigma.C.L$$

Le coefficient se détermine en prenant:

C = 1 g/litre

L = 1 cm donc $\log \frac{I_0}{I} = \Sigma$

On pourra donc déterminer la concentration d'un corps en solution par mesure de la densité optique de cette dernière :

$C \text{ (g/l)} = \frac{DO}{\Sigma \cdot L} = \frac{DO}{\Sigma} \quad \begin{array}{l} \Sigma \text{ en L/g.cm} \\ L = 1 \text{ cm} \end{array}$

Si plusieurs constituants coexistent dans une solution, les valeurs des densités optiques de chaque constituant sont additives: additives: Exemple : si l'on considère une solution des deux chlorophylles a et b, dans une cuve de 1 cm d'épaisseur, on peut écrire pour une longueur d'onde donnée :

$$D.O = \Sigma_a \cdot C_a + \Sigma_b \cdot C_b$$

On fait deux mesures de densités optiques à 2 longueurs d'onde différentes correspondant aux pics d'absorption des chlorophylles a et b prises séparément, ce qui permet d'écrire les 2 équations suivantes :

$DO_{645} = (\Sigma_a \cdot C_a) + (\Sigma_b \cdot C_b)$ $DO_{663} = (\Sigma_a \cdot C_a) + (\Sigma_b \cdot C_b)$

Les coefficients d'extinction spécifique en litre/g ce sont :

<p>à 663 nm : chlorophylle a : 82,04 Chlorophylle b : 9,27</p> <p>à 645 nm : chlorophylle a : 16,75 Chlorophylle b : 45,6</p>

Lorsqu'on emploie comme solvant des chlorophylles de l'acétone à 80 % les formules établies à partir des 2 équations précédentes, par MAC KINNEY et complétées par BRUNSMAN permet de connaître les quantités de chlorophylles contenues dans une solution en faisant des mesures de densités optiques à différentes longueurs d'onde :

$C_a = 12,7 \cdot DO_{663} - 2,69 \cdot DO_{645}$ $C_b = 22,9 \cdot DO_{645} - 2,68 \cdot DO_{663}$ $C_{a+b} = 27,8 DO_{652}$

Coefficients ont été déterminés pour des concentrations exprimées en mg/l.

4- Protocole expérimental

Séparation chimique :

Pour le spectre d'absorption et teneur des chlorophylles, on utilise les feuilles de persil (*Petroselinum hortense* Hoffm.).

On utilise les feuilles de persil qui sont broyées dans un mixeur à couteaux de type Moulinex avec de l'acétone 80 %, on additionne une pincée de carbonate de magnésium qui neutralise l'acidité des tissus et 2 g de sulfate de sodium anhydre pour fixer l'eau du matériel végétal. Le filtrat est recueilli dans un Erlen après filtration sur toile Bluter 75 µm.

25 ml de filtrat est versé pour chaque paillasse dans une fiole jaugée.

Le protocole expérimental est le suivant :

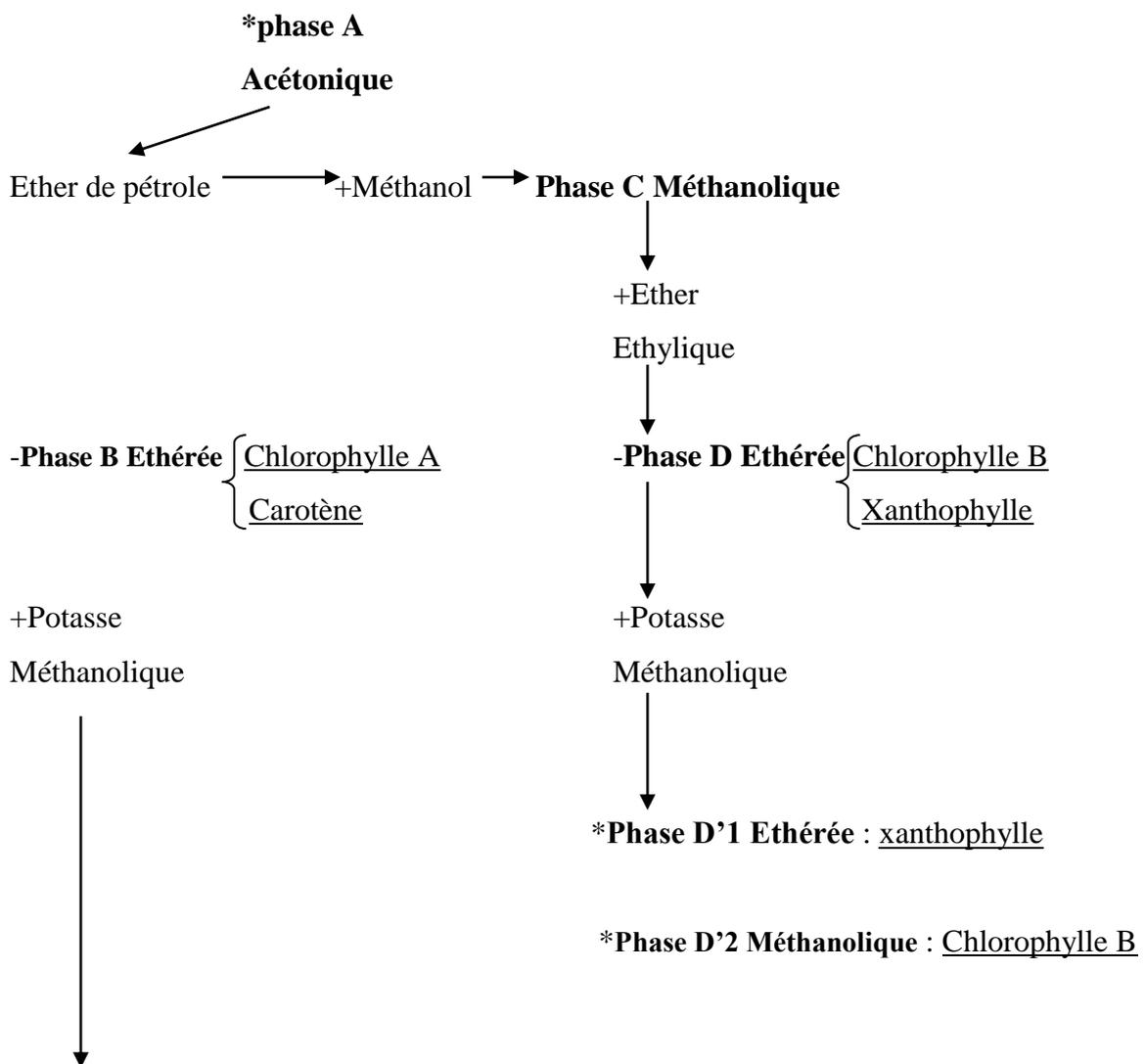
- Extrait brut + 20 ml d'éther de pétrole+ agitation+ 35 ml de l'eau+agitation et laisser reposer.
- On obtient 2 phases : Epiphase (phase supérieure) verte foncée contient des pigments en solution dans l'Ether de pétrole et Hypophase (phase inférieure) plus claire (eau + acétone)
- Eliminer la phase inférieure puis ajouter 25 ml d'eau. Agiter et laisser reposer. Il se forme 2 phases comme précédemment. Eliminer de nouveau la phase inférieure et recommencer deux fois ce lavage. S'il reste une interphase nettement visible, il convient de l'éliminer totalement avant l'opération suivante
- Extrait Ethéré + 20 ml de méthanol à 92% + agitation et laisser reposer
- On obtient 2 phases : la phase supérieure Ethérée (B) et la phase inférieure méthanolique (C) qu'on va garder dans le pot (C)
- La solution B sera lavée 2 fois par 15 ml de méthanol à 92 %
- Les phases inférieures sont systématiquement éliminées. La solution (B) se trouve alors purifiée et elle sera conservée dans le pot B.
- Introduire la solution © dans l'ampoule à décanter et y ajouter 20 ml d'éther éthylique + agitation tout en introduisant par fraction de 5 ml, de l'eau distillée, jusqu'à l'obtention de deux phases nettement séparables (20 ml d'eau)
- Eliminer la phase hydroalcoolique inférieure. La phase supérieure est maintenue dans le pot D.
- Donc on a 2 pots B et D. On prend 2 tubes à essai :

- Tube B : contenant 2 à 5 ml de la solution B + 3 ml d'une solution méthanolique de potasse (méthanol avec 20% de potasse KOH). Fermer le tub avec le doigt + forte agitation.
- On va faire la même chose pour le tube D : contenant 2 à 5 ml de la solution D + 3 ml d'une solution méthanolique de potasse (méthanol avec 20% de potasse KOH). Fermer le tub avec le doigt + forte agitation.

On obtient pour la solution B : 2 phases phase supérieure qui contient la chlorophylle a (vert foncé) et la phase inférieure qui contient la chlorophylle b (vert clair)

Pour la solution D on obtient 2 phases : phase supérieure qui contient α et β -carotène (jaune foncé) et la phase inférieure qui contient Xanthophylle (jaune clair).

En résumé :



- *-Phase B'1 Ethérée Carotène
- *-Phase B'2 Méthanolique Chlorophylle A

Obtention des différentes phases après séparation par non-miscibilité des solvants

Note : Les phases précédées d'une étoile (*) devront être chromatographiées. Le contenu de chacune des phases devra être déterminé comparativement à celui de la solution A.

En déduire la solubilité des pigments dans les solvants utilisés.

Ces nouvelles solutions de pigments séparés sont étudiées au spectrophotomètre et on mesure les absorptions tous les 10 minutes entre 380 nm et 700 nm.

Il est alors aisé de tracer les courbes globales d'absorption de ces pigments. On préparera comme témoin une cuve contenant de l'acétone 80 %.

5- Identité des pigments par chromatographie ascendante sur papier

La chromatographie est faite dans un tube vertical entouré de papier noir pour éviter l'altération des pigments à la lumière. Il faut verser d'avance le solvant dans le tube afin de saturer son atmosphère. Le solvant se compose de :

- $$\left\{ \begin{array}{l} -85 \text{ ml d'éther de pétrole (85 \%)} \\ -10 \text{ ml d'acétone (10 \%)} \\ -5 \text{ ml de benzène (5 \%)} \end{array} \right.$$

Le tube est fermé par un bouchon muni d'un crochet permettant de suspendre la bandelette de papier whatman n°1 servant de chromatogramme. Celui-ci mesure 2 cm de large et 26 cm de long (voir la figure ci-dessous) :

Préparation, mise en place et lecture du chromatogramme

On écrase sur la ligne de départ quelques rondelles de limbe des feuilles de persil. La séparation sera arrêtée lorsque le solvant atteindra le trait situé à 18 cm de la base de départ, ce qui dure 45 à 60 minutes selon la température ambiante.

Le critère qui permet d'analyser les résultats et de comparer des mélanges complexes de différentes origines s'appelle le RF et il se définit :

$$RF = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

Le RF varie de 0 à 1 (substance migrant à la même vitesse que le solvant).

Les tâches colorées correspondant aux divers pigments séparés pourraient être comparées aux quelques valeurs moyennes de RF suivante :

β-carotène :	0,98 (jaune-orangée)
Lutéine :	0,80 (jaune)
Néoxanthine :	0,60
Chlorophylle a :	0,40 (vert foncé)
Chlorophylle b :	0,30 (vert-jaune)

6- Dégradation des chlorophylles :

On va voir la dégradation de la chlorophylle a. On a choisi la chlorophylle a car le changement de la coloration sera bien clair que pour la chlorophylle b.

Donc on prend 2 tubes à essai contenant chacun 1 ml de la chlorophylle a.

- Dans le tube 1 on ajoute 1 ml de HCL 1N + agitation
- Dans le tube 2 on ajoute 1 ml NaOH 1N + agitation

HCL se prépare dans l'eau.

On observe alors le changement de teinte.

*En présence d'HCL : HCL va se retrouver dans la phase inférieure du tube ($\text{pH} < 7$) et avec coloration marron jaunâtre.

Donc la chlorophylle a perdu sa coloration car HCL décroche le magnésium et il reste les phéophytines (chl a perdu le Mg^{++}) ou on dit aussi la libération de l'atome de Mg.

Ces phéophytines antioxydants sont commercialisés.

*En présence de NaOH : NaOH va se retrouver en bas du tube et avec coloration verte foncée.

Donc nous n'avons pas de changement de coloration mais on a une dégradation et une libération du phytol. Il reste une chlorophylline.

L'atome de Mg participe à la coloration de la chlorophylle. Le phytol ne participe pas à la coloration de la chlorophylle.

Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

