

## ExAO

## La réaction de Hill

En première S, l'étude de la réaction de Hill peut-être faite avec du matériel ExAO. La spectrophotométrie est une méthode qu'il est possible d'utiliser au cours d'une séance de travaux pratiques, pour réaliser cette étude.

## PRINCIPE

La photosynthèse chez les végétaux chlorophylliens comprend deux phases :

– l'une claire où l'énergie lumineuse est captée par la chlorophylle et permet la réalisation d'une série de réactions d'oxydo-réduction dont le donneur initial d'électrons (= le réducteur) est l'eau et l'accepteur terminal d'électrons (= l'oxydant), le NADP<sup>+</sup>.

Cette phase peut se résumer par l'équation bilan suivante :

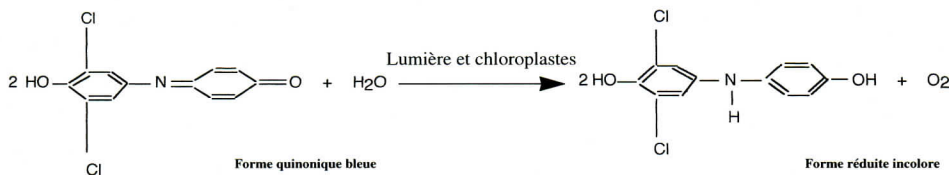


Ces réactions rédox s'accompagnent de la phosphorylation d'ADP en ATP.

– l'autre obscure où l'énergie chimique (ATP) et le NADPH, H<sup>+</sup> produits de la précédente phase sont utilisés pour permettre la synthèse de molécules organiques à partir du dioxyde de carbone.

La réaction de Hill (découverte en 1939) consiste en une réduction *in vitro* d'un accepteur artificiel d'électrons en présence de chloroplastes entiers ou fragmentés avec une émission simultanée de dioxygène provenant de l'oxydation de l'eau (= «photolyse de l'eau»). *In vitro*, lorsque les feuilles ont été broyées, le NADP<sup>+</sup> naturel se trouve en quantité insuffisante dans les chloroplastes pour entrer en compétition avec l'oxydant artificiel.

Nous prendrons comme oxydant artificiel le 2,6 DCPIP (2,6 dichlorophénol indophénol) bleu sous forme oxydée et incolore sous forme réduite.



La réduction du 2,6 DCPIP par les chloroplastes exposés à la lumière s'accompagne d'un changement de couleur mesuré par un spectrophotomètre à 615 nm. Les valeurs obtenues correspondent à des variations de densité optique (DO).

## MATÉRIEL

- spectrophotomètre (Pierron par exemple) ;
- cuves à spectrophotomètre ;
- feuilles d'épinard ;
- mortier ;
- gaze ;
- centrifugeuse et ses tubes ;
- pipette graduée de 5 mL ;
- petit pinceau ;
- une balance ;
- bêcher de 50 mL ;
- une micropipette de 40 - 200  $\mu\text{L}$  + embouts ;
- solution de 2,6 DCPIP à 1  $\text{g L}^{-1}$  (en vente chez Jeulin) ;
- tampon phosphate pH 6,5 avec 0,5  $\text{mol.L}^{-1}$  de saccharose, soit :
  - 7,16 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 12  $\text{H}_2\text{O}$
  - 6,34 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
  - 171 g de saccharose,
  - 1000 mL d'eau distillée.

## RÉALISATION

### Préparation de la suspension de chloroplastes

Réaliser avant la séance de travaux pratiques.

- Mettre au préalable à 4°C la verrerie (mortier, pipette, bêcher, tubes de la centrifugeuse), le tampon phosphate pH 6,5 saccharosé afin de freiner les réactions chimiques pouvant avoir lieu lors de l'extraction.
- Peser 5 g de feuilles fraîches, non humides d'épinard (ne prendre que le limbe).
- Broyer ces 5 g dans le mortier maintenu à 4°C avec 10 mL de tampon phosphate pH 6,5 saccharosé froid (4°C).
- Filtrer sur gaze, recueillir le filtrat dans un bêcher (à 4°C).
- Centrifuger le filtrat (dans des tubes froids) pendant 10 min à 3000 g.
- Éliminer le surnageant.
- Verser 10 mL de tampon phosphate pH 6,5 saccharosé (froid) sur le culot de chloroplastes.
- Décoller le culot délicatement avec un pinceau. Ainsi est obtenue la suspension de chloroplastes.
- Boucher le tube et le mettre à l'obscurité, **si possible à 4°C**.

### Suivi spectrophotométrique de la réaction de Hill

- Dans une cuve à spectrophotomètre, verser dans cet ordre :
  - 2,8 mL de tampon phosphate pH 6,5 saccharosé ;
  - 0,1 mL (= 100  $\mu\text{L}$ ) de 2,6 DCPIP ;
  - 0,1 mL de suspension de chloroplastes.

mesurés à la  
micropipette