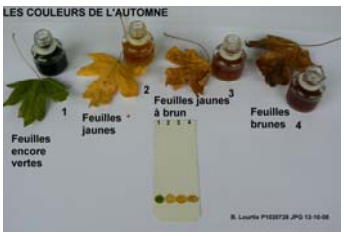
BIOCHIMIE

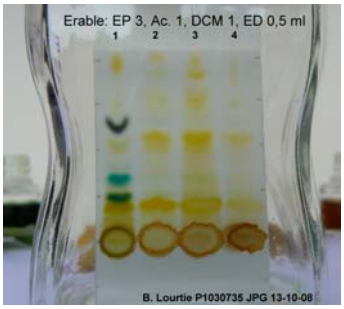
Oser des expériences nouvelles (BIOCH. I. 2, b)

Les couleurs des feuilles en automne

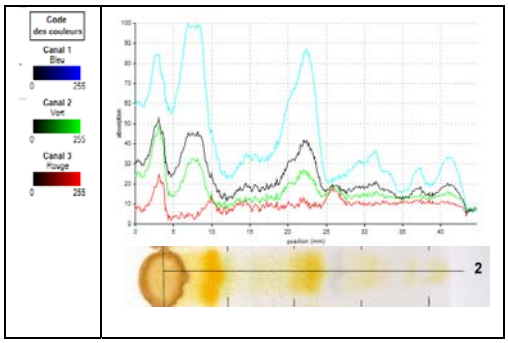
- CCM d'extraits de pigments végétaux de feuilles de couleurs différentes prélevées sur un même arbre.



- Dégradation in vivo des chlorophylles.



- Expérience assistée par ordinateur.



Expériences réalisables en T.P. de Biologie avec des élèves du 3ème degré.

Avertissement

L'activité que l'on propose ici n'a pas la prétention d'un travail hautement scientifique de recherche. Les produits chimiques utilisés proviennent du commerce (grande surface de bricolage, droguerie et pharmacie).
Il s'agit tout au plus de montrer qu'à partir d'un phénomène naturel qui nous paraît banal (la coloration des feuilles en automne) et avec un équipement assez simple on peut réaliser une expérience assistée par ordinateur avec des élèves de l'enseignement secondaire.
Les 2 premières activités (BIOCH I, 1, a et BIOCH I, 2, a) proposées sont des activités préliminaires à celle-ci.

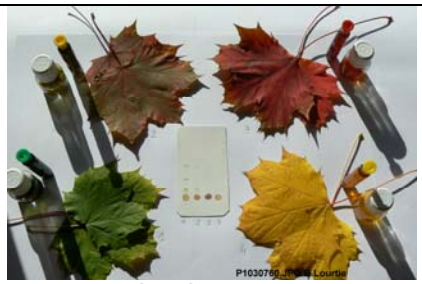
L'idée d'entreprendre la chromatographie des feuilles en automne, assistée par ordinateur, nous est venue d'une part à la lecture de quelques ouvrages scientifiques de base concernant la Biologie végétale et d'autre part à la lecture de la Thèse n° 1287 présentée par Patrick Folly (FR) à **l'Institut de Chimie organique de la Faculté des Sciences de l'Université de Fribourg (Suisse)** pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences naturelles (18-02-**2000**). La thèse, effectuée sous la direction du Dr N. Engel, s'intitule : **« Catabolisme de la chlorophylle *b* : structures, mécanismes et synthèses ».**

Nous sommes reconnaissants à l'auteur d'avoir publié son travail sur le WEB (**http://ethesis.unifr.ch/theses/downloads.php?file=FollyP.pdf**) et nous espérons qu'il ne nous tiendra pas rigueur de nous être inspirés de la partie théorique de son travail et d'en avoir parfois extrait des passages.
A la page 23, l'auteur écrit : « *Il fut spéculé que la chlorophylle était réutilisée lors d'un processus endogène pour la biogenèse des caroténoïdes secondaires dans les cellules de certaines algues vertes* [Czygan, F.C., *Archiv. Mikrobiol.* **1968,** 62, 209-236]. *La présence de ces caroténoïdes secondaires dans les cellules des plantes avant la perte de la chlorophylle exclut cette spéculation ».*

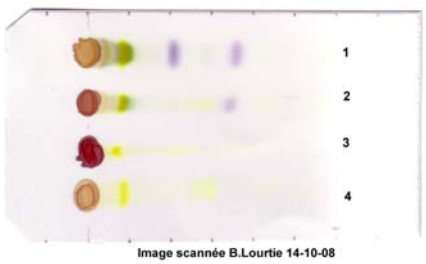
Les questions que l'on se pose sont les suivantes :

1. La couleur des feuilles, en automne, est-elle due au seul démasquage des caroténoïdes et des flavonoïdes déjà présents dans les cellules foliaires?
2. Serait-il possible qu'il y ait une biosynthèse secondaire de pigment de couleur jaune (caroténoïdes) en automne ?
3. Si c'est le cas, les produits de dégradation de la chlorophylle comme les « radicaux phytyls » pourraient-ils participer à cette biosynthèse ?
4. Existe-t-il une biosynthèse secondaire d'anthocyanidines en automne, quels seraient les facteurs déclenchant (lumière, t°, pH vacuolaire,….) ?

Malgré le fait que nous ne soyons pas arrivés à apporter de réponses à toutes ces questions, il reste que l'exercice nous est apparu fort intéressant.



Feuilles prélevées sur le même arbre (27-09-08)



Chromatogramme :
Ligne 1 : extrait total de feuilles vertes
Ligne 2 : extrait total de feuilles vertes qui commencent à rougir.
Ligne 3 : extrait de feuilles rouges
Ligne 4 : extrait total de feuilles jaunes

Illustration : chromatographie d'extraits de feuilles prélevées sur un même arbre en automne.

BIOCHIMIE

- **CCM d'extraits de pigments de feuilles de couleurs différentes prélevées sur le même arbre en automne.**
- **Dégradation « in vivo » de la chlorophylle.**
- **EXAO**
- **Une biosynthèse secondaire de pigments est-elle possible ?**

AVERTISSEMENT

La chromatographie des pigments végétaux nécessite impérativement d'être réalisée sous hotte aspirante vu la toxicité des solvants organiques

Sécurité

Les consignes de sécurité d'usage en laboratoire de chimie doivent être appliquées à la lettre.

Protection de l'environnement :
Les solvants organiques doivent impérativement être jetés avec les déchets de laboratoire et déposés dans une collecte de produits chimiques.

Connaissances

BIOLOGIE : La structure chimique des pigments végétaux. La photosynthèse. La biosynthèse et le catabolisme des chlorophylles. La biosynthèse des caroténoïdes et des anthocyanidines.
CHIMIE : techniques de chromatographie en phase liquide.

Matériel

Pour l'extraction des pigments :
√ Du matériel biologique : *feuilles d'automne de différentes couleurs prélevées sur le même arbre.*
√ Mortier + pilon (4 si possible)
√ Un peu de sable fin propre

PRODUITS CHIMIQUES :

√ **Ethanol dénaturé à 95° (C_2H_6O)** **R 11 et S 7-16**	

Pour la filtration simple (lent):
√ 4 petites passoires
√ 4 cristallisoirs
√ 4 erlenmeyers
√ 4 entonnoirs + filtres en papier
√ 4 cuillères en plastique

Pour la filtration sous vide (rapide) :
√ Büchner et fiole à vide reliée à une trompe à eau

Pour la chromatographie d'adsorption :

√ 1 cuve de développement avec couvercle (un bocal en verre à fond plat et son couvercle convient)
√ Plaques CCM 40 x 80 mm sur feuille d'aluminium avec indicateur UV (254 nm) incorporé.
√ 4 petites éprouvette gradué
√ 4 pipettes graduées 10 ml
√ 1 pipette graduée 1 ml
√ 1 Poire pro pipettes
√ 4 petits capillaires pour effectuer les dépôts
√ 1 règle en plastique transparent
√ 1 crayon à papier ou 1 porte-mine
√ Papier absorbant

PRODUITS CHIMIQUES :

√ **Ether de pétrole** (essence G) R: 11-45-65 S: 9-16- 29-53-45		
√ **Acétone** (Propanone) **(C_3H_6O)** R: 11-36-66-67 S: 9-16-26		
√ **Dichlorométhane pur (CH_2Cl_2)** R: 40 S: 23c-24/25-36/37		
√ **Ether éthylique** (diéthyle oxyde pur) **($C_4H_{10}O$)** R: 12-19-22-66-67 S: 9-16-29-33		
√ **Chloroforme pur** (trichlorométhane) **($CH Cl_3$)** R : 22-38-40-48/20/22 S: 36/37		

Protocole

A. Prélèvement

En automne (septembre – octobre), prélever sur un arbre, dont les feuilles passent de la couleur verte aux couleurs jaune et brune, les feuilles de couleurs suivantes :

1. Des feuilles encore bien **vertes**.
2. Des feuilles fraîchement jaunies et d'un **jaune vif**.
3. Des feuilles d'un **jaune plus sombre** tirant légèrement vers le brun.
4. Des feuilles **brunes**.

Photo 1. Erable en automne (13-10-08)

B. Extraction des pigments de feuilles d'érable de couleurs différentes.

1. **Voir la technique d'extraction des pigments : BIOCH I, 1, a et BIOCH I, 2, a**

2. **Effectuer l'extraction des pigments de ces feuilles** en ayant soin de ne pas mélanger les pigments des 4 types de prélèvement. Au besoin laver le matériel entre chaque extraction.

Photo 2. Extraits totaux de feuilles vertes et jaune vif

Photo 3. Extraits totaux de feuilles jaune foncé et brunes

C. Préparation de la plaque CCM

1. **Préparer la plaque CCM (Figure 1)** selon les explications que l'on trouve dans le « protocole de la chromatographie d'adsorption des pigments végétaux » (BIOCH. I, 2, a).

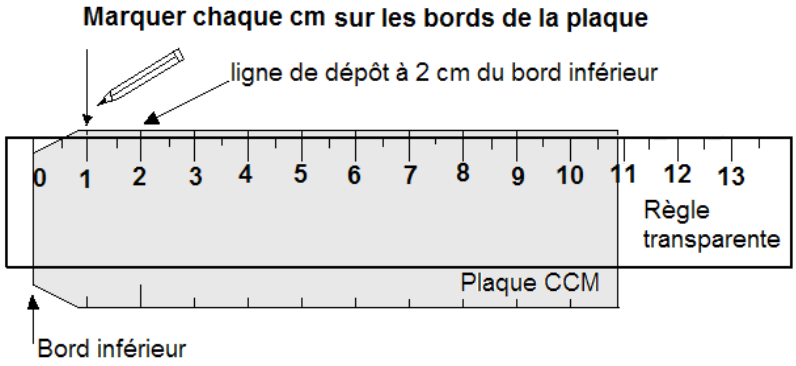


Figure 1 : Préparation de la plaque CCM

2. **Sur la ligne de dépôt,** effectuer les dépôts successifs des 4 extraits en veillant à déposer le même volume total pour chaque extrait. Utiliser une micropipette de précision ou une micropipette capillaire étalonnée différente pour chaque extrait. Il ne faut en aucun cas mélanger les extraits.

3. **Identifier la tache de dépôt de chaque extrait** en notant son numéro au niveau du bord supérieur de la plaque **(photo 5)**

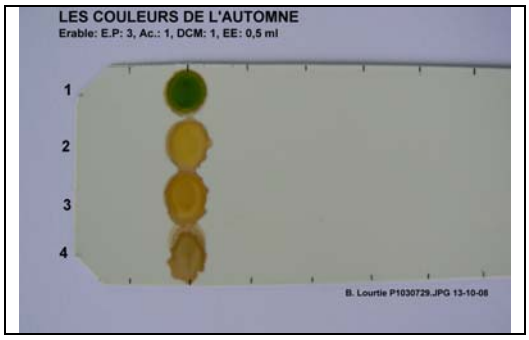


Photo 4 : Plaque CCM avec les dépôts

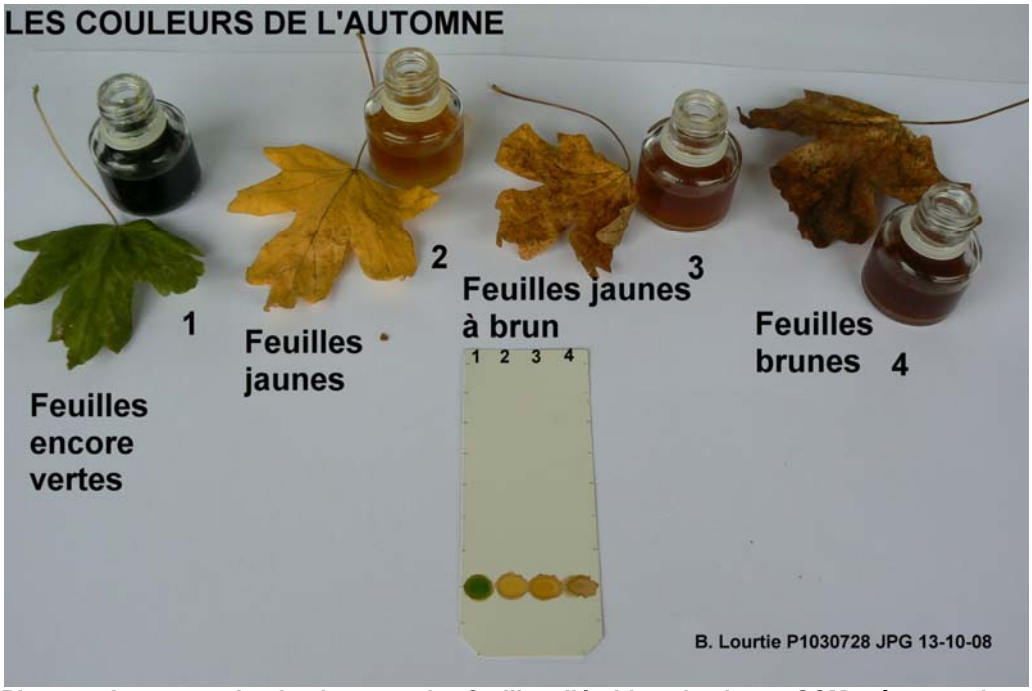


Photo 5 : Les 4 extraits de pigments des feuilles d'érable et la plaque CCM prête pour la chromatographie

D. Chromatographie

1. **Préparer l'éluant selon les indications** du « protocole de la chromatographie d'adsorption des pigments végétaux » (BIOCH. I, 2, a). **Composition de l'éluant :** éther de pétrole (3 vol.), acétone (1 vol.), dichlorométhane (1 vol.), éther éthylique (0,5 ml).
   Les solvants utilisés par l'auteur de ce document ne sont pas des produits de laboratoire et le dichlorométhane utilisé n'est sans doute pas pur (voir BIOCH I, 2, a, page 17).

2. **Effectuer la chromatographie** en laissant monter l'éluant à environ 4 cm au dessus de la ligne de dépôt. Filmer la chromatographie ou chronométrer le temps nécessaire à l'éluant pour monter d'un cm jusqu'à 4 cm au dessus de la ligne de dépôt.

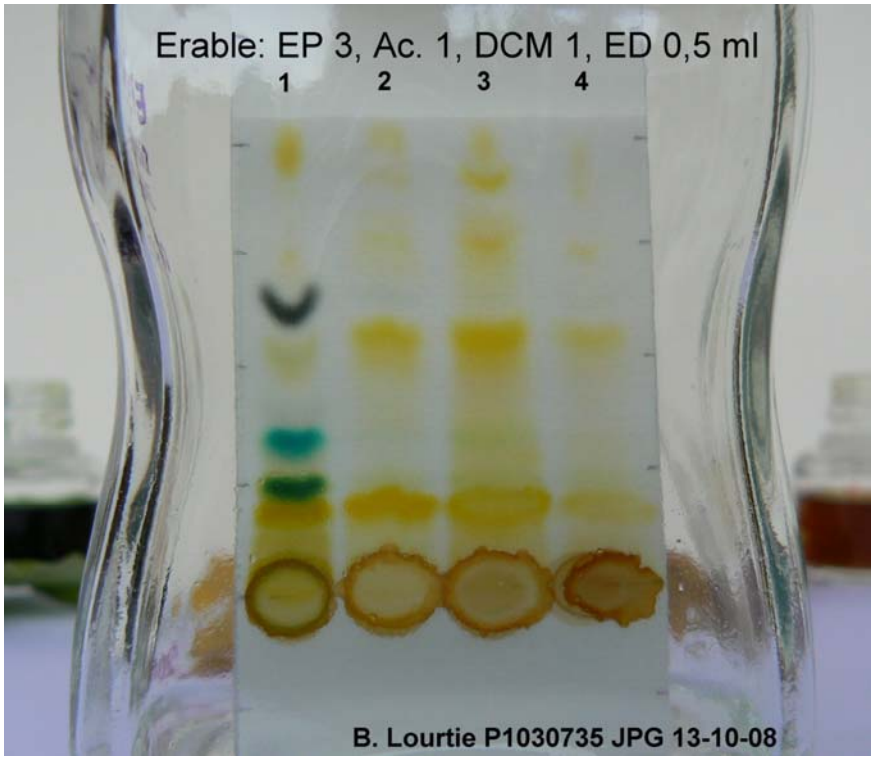


Photo 6. Chromatographie de 4 extraits de feuille d'automne

3. **Lorsque la chromatographie est terminée,** photographier et scanner la plaque immédiatement après l'avoir sortie de la cuve de développement.

Photo 7. Chromatogramme photographié

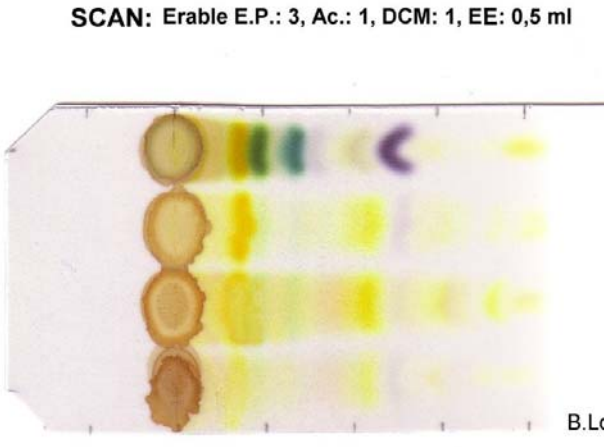


Image 1. Image acquise avec un scanner CIS à plat.

Des données théoriques utiles :

LES PIGMENTS VEGETAUX

A. LES PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS

LES CHLOROPHYLLES ET LEURS PRODUITS DE DEGRADATION.

A. 1. Les pigments chlorophylliens sont des chromoprotéines.

Les pigments chlorophylliens sont des chromoprotéines et, plus précisément, des métalloprotéines (C, H, O, N, Mg). La chlorophylle en est le groupement prosthétique*.

STRUCTURE 2D : PROTEIN DATA BANK (RCSB – PDB) www.rcsb.org/pdb

RCSB PDB PROTEIN DATA BANK

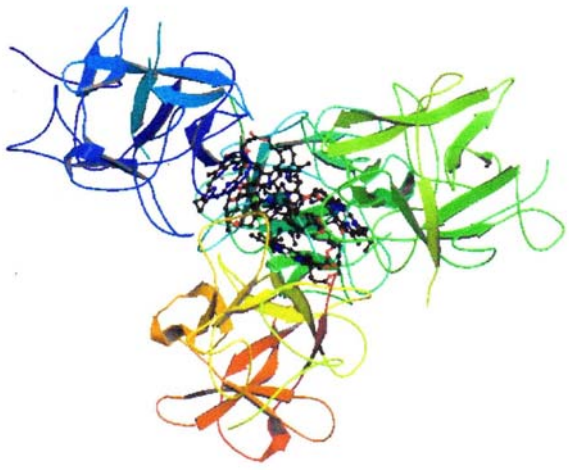
CONTACT US | HELP | PRINT PAGE

A MEMBER OF THE PDB

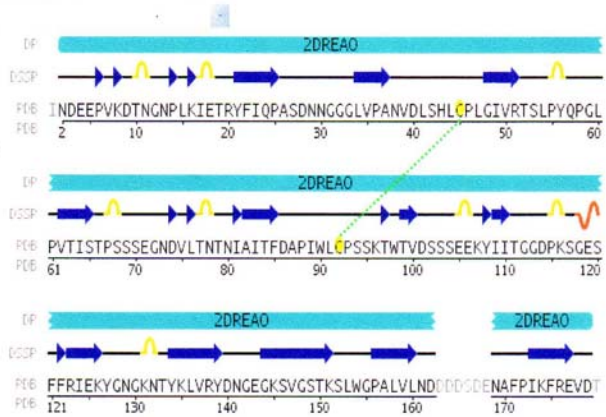
An Information Portal to Biological Macromolecular Structures

As of Tuesday Oct 28, 2008 there are 53917 Structures | PDB Statistics

PDB ID or keyword Author Site Search | Advanced Search



Biological Unit 1 (500 pixels)



Polymeric Molecules

Chain A,B,C,D

Description	Water-soluble chlorophyll protein
Fragment	RESIDUES 1-180
Nonstandard Linkage	no
Nonstandard Monomers	no
Polymer Type	polypeptide(L)
Formula Weight	19591.7
Source Method	nat

Ligands and Prosthetic Groups

ID	Name	Chemical Formula	Weight	Ligand Structure
CLA	Chlorophyll A	$C_{55}H_{72}MgN_4O_5$	893.49	View

Chain A (polymer 1)

Description	Water-soluble chlorophyll protein
Identical chains [show all chains]	B C D
Chain Type	polypeptide(L)
UniProt reference	O04797 [show this sequence below]
Length	180 residues
DP domain assignment [hide] [reference]	2DREA0 172 residues
DSSP secondary structure [hide] [reference]	1% helical (1 helices; 3 residues) 35% beta sheet (22 strands; 63 residues)
More annotations	

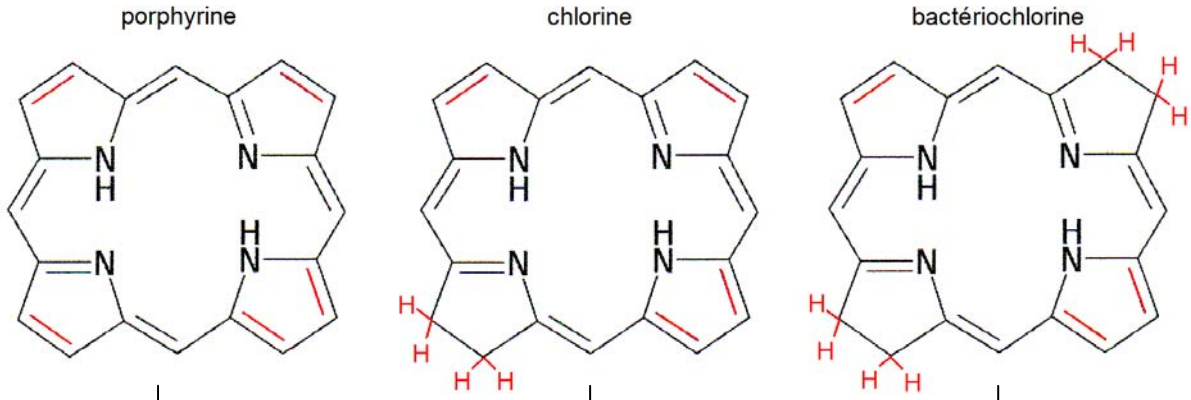
A. 2 Structure chimique des pigments tétrapyrroliques : nomenclature et numérotation.

(Extrait de : Catabolisme de la chlorophylle *b*, structures, mécanismes et synthèse, auteur : P. Folly http://ethesis.unifr.ch/theses/downloads.php?file=FollyP.pdf)

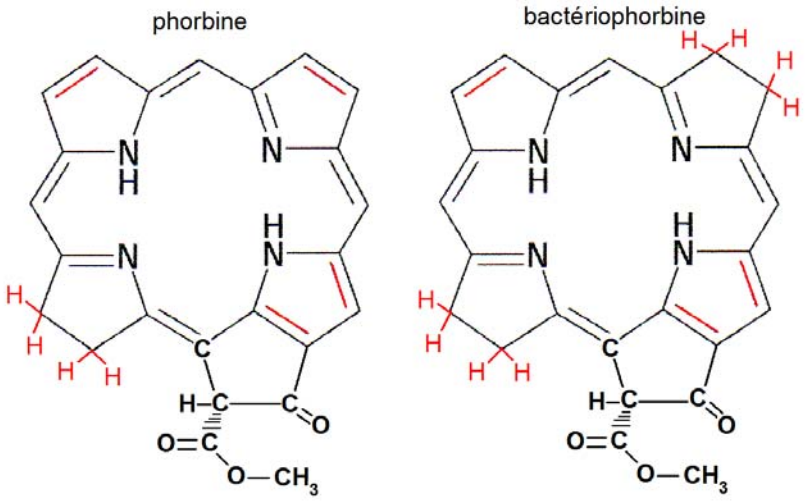
Comme l'hème des globines et des cytochromes, les chlorophylles sont des pigments tétrapyrroliques cycliques.

Il existe 3 types de tétrapyrroles cycliques : la porphyrine, la chlorine (dihydroporphyrine) et la bactériochlorine (tétrahydroporphyrine).

NB ! Certains auteurs nomment « porphine » le composé cyclique tétrapyrrolique non substitué et porphyrine ce même composé lorsqu'il est substitué sur les atomes de carbones des noyaux pyrroles.



La présence d'un anneau cyclopentanoïque sur le noyau d'une chlorine ou d'une bactériochlorine leurs confère respectivement les noms de **phorbine et bactériophorbine**.



- **Hème**
- **Chlorophylle c**

Chlorophylles a, b, d

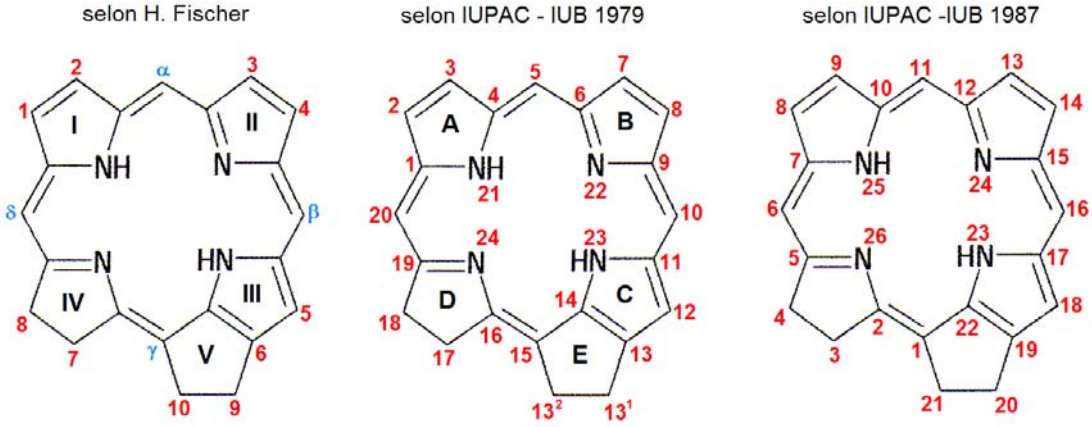
Bactériochlorophylles a, b

En 1910, R. Willstäter et A. Stoll propose la formule brute de la **chlorophylle a**.

La numérotation la plus ancienne du squelette de base des phorbines est celle de **H. Fischer (1940),** pionnier de la chimie des porphyrines.
On trouve encore cette numérotation dans des ouvrages édités en 2002 et réédités en 2004 chez De Boeck.

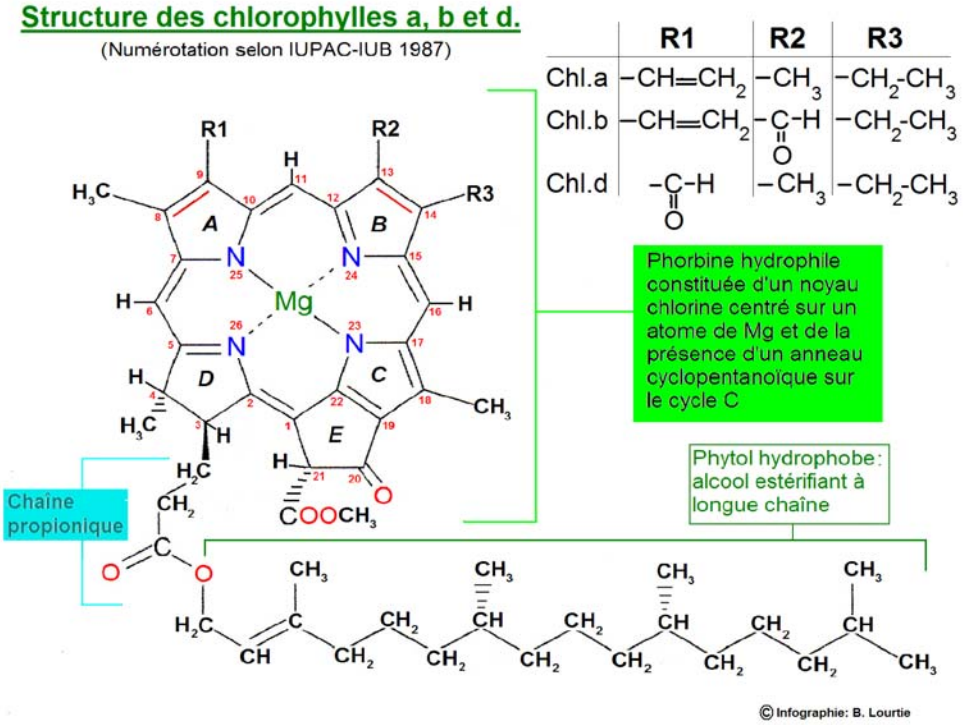
R.B. Woodward effectue, en **1960,** la première synthèse totale de la **chlorophylle a** tandis que **I. Flemming et jr Brockmann** établissent sa configuration absolue en **1968.**

Une numérotation officielle du squelette de base des phorbines est proposée en **1979 (IUPAC-IUB)** et la dernière version date de **1987 (IUPAC-IUB).**

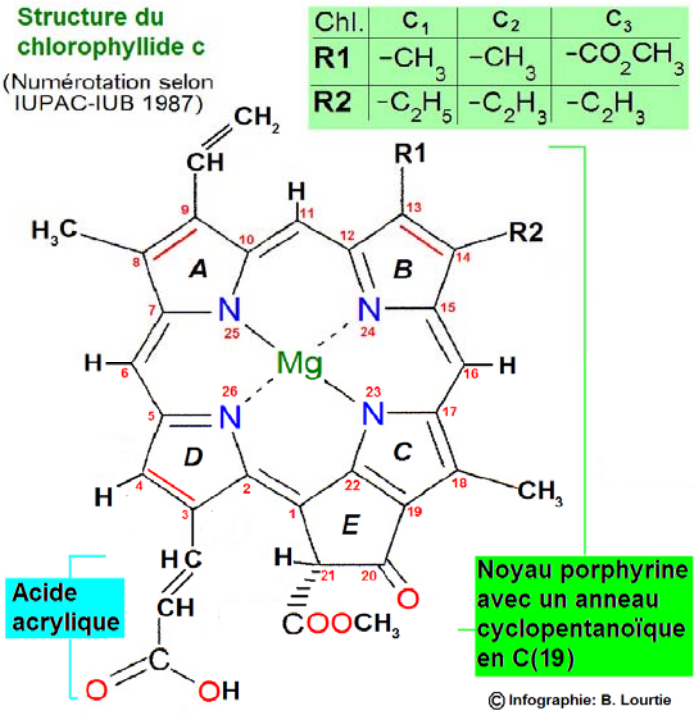


Bien que les deux premières numérotations soient encore couramment utilisées, on se forcera ici à adopter la numérotation la plus récente (IUPAC-IUB 1987).
Les 4 ponts méthines, représentés par les 4 premières lettres de l'alphabet grec dans la numérotation de Fischer, sont indiqués par les valeurs 1, 6, 11 et 16 dans la numérotation IUPAC-IUB 1987.

A. 3 Structure chimique des chlorophylles a, b, d et c.



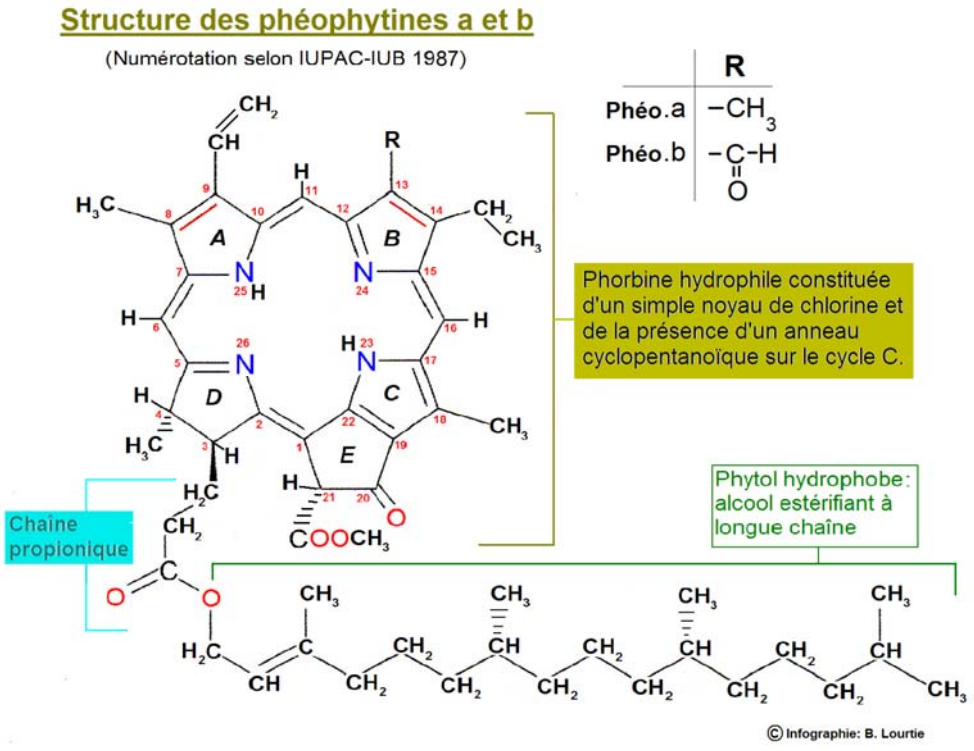
Chlorophylle a : $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ (PM : 893,49) ; chlorophylle b : $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ (PM : 906) ; chlorophylle d : $C_{54}H_{70}O_6N_4Mg$ (PM : 894)



A. 4 Les phéophytines (voir BIOCH I, 2, a)

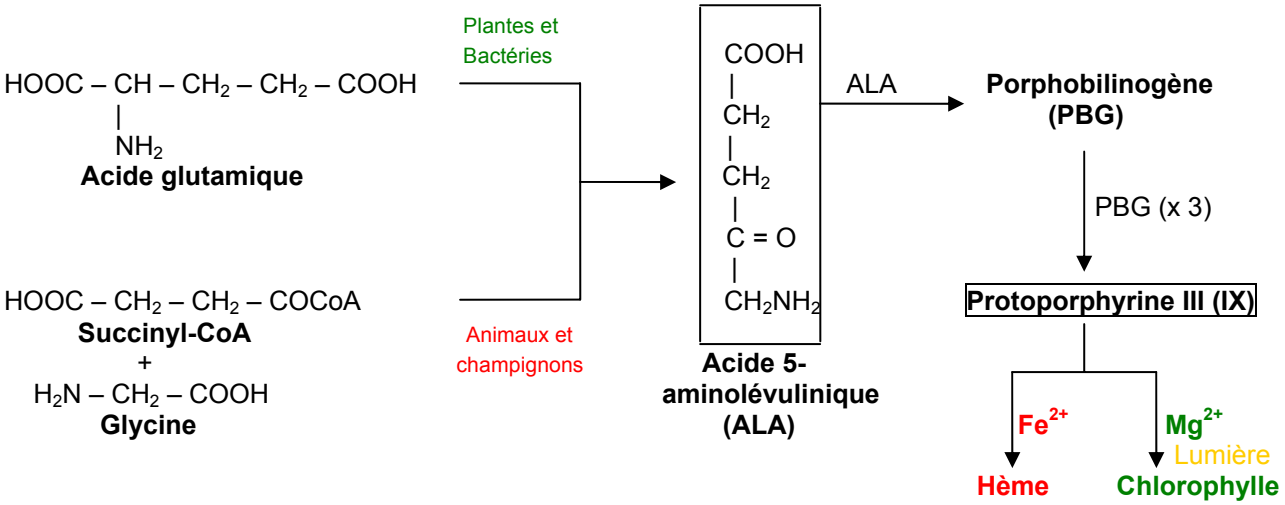
Lorsque la chlorophylle perd son ion magnésium (Mg^{++}) au profit de 2 protons (H^+), il en résulte la formation d'un pigment vert olive jaunâtre appelé **phéophytine.**
Les phéophytines a et b existent naturellement dans les chloroplastes **en faible quantité**.
Ce sont des accepteurs précoces d'électrons du photosystème II.

A. 5 Structure chimique des phéophytines



A. 6 La biosynthèse des chlorophylles

La chlorophylle et l'hème proviennent d'un même précurseur **la protoporphyrine III** (encore souvent appelée **protoporphyrine IX** dans la classification de Fisher) dont la synthèse comporte une série de réactions communes à partir de **l'acide 5-aminolévulinique (ALA).**
Cependant, pour la synthèse de **l'ALA,** les bactéries photosynthétiques et les plantes utilisent la **voie de l'acide glutamique encore appelée « C-5 pathway »** alors que les champignons et les animaux utilisent la voie de la **succinyl-CoA et de la glycine.**



A. 7 Les causes de la dégradation de la chlorophylle : (voir BIOCH I, 2, a)

A. 8 Les réactions de dégradation de type I et de type II : (voir BIOCH I, 2, a)

A. 9 Modification chimique IN VITRO sans ouverture du noyau tétrapyrrolique.

(Extrait de : Catabolisme de la chlorophylle *b*, structures, mécanismes et synthèse, auteur : P. Folly http://ethesis.unifr.ch/theses/downloads.php?file=FollyP.pdf)

- **Extrusion du magnésium**

Au laboratoire, les phéophytines *a* et *b* sont considérées comme des produits dégradés des chlorophylles *a* et *b* car elles se forment rapidement lorsque les chlorophylles sont extraites en milieu acide (cas de végétaux contenant certains acides dans les vacuoles).
L'action d'acide minéral dilué ou d'acides organiques sur la chlorophylle provoque une extrusion rapide du Mg.

En solution eau-acétone acidifiée la transformation des chlorophylles *a* et *b* en **phéophytines *a* et *b*** obéit à une loi cinétique du premier ordre.
La transformation de la chlorophylle *a* en **phéophytine *a*** est 20 à 30 fois plus rapide que la transformation de la chlorophylle *b* en **phéophytine *b*.**

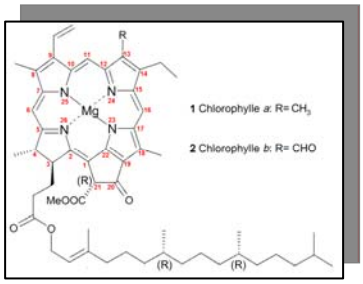
- **Hydrolyse de l'ester phytilique**

La chlorophyllide peut être obtenue à partir de la **chlorophylle** par l'hydrolyse de l'ester phytilique en solution basique diluée.
La phéophorbide s'obtient par l'emploi simultané de solutions acide et basique diluées.

- **Réaction d'allomérisation**

Lorsque les solutions de chlorophylles sont **extraites dans le méthanol ou l'éthanol** et **exposées à l'air**, **l'oxydation de la position C 21** forme des **dérivés hydroxy et méthoxy de la chlorophylle** *a* ainsi que des purpurines.

A. 10 Les réactions de dégradation in vitro (réactions de type I).



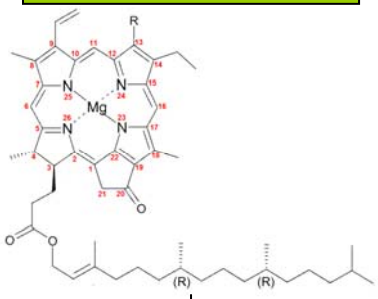
Chlorophylle

- COOMe : ***Oxydation**, enzyme, **fermentation***

- Mg^{2+} : ***Milieu acide, chaleur (in vitro)***

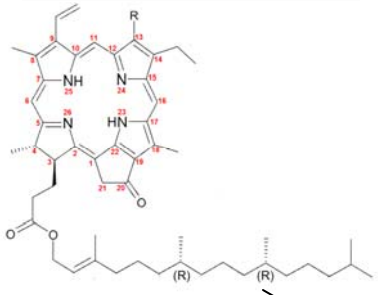
- phytol : ***Hydrolyse de la fonction ester** : enzyme endogène chlorophyllase (in vivo) **milieu basique (in vitro)***

Pyrochlorophylle



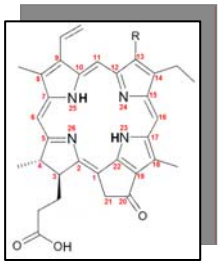
- Mg^{2+} : ***Milieu acide, chaleur (in vitro)***

Pyrophéophytine

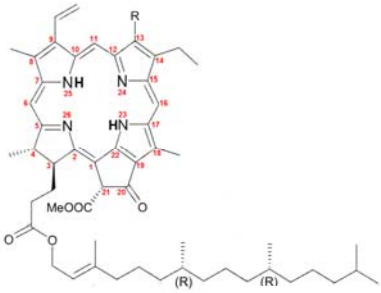


- phytol : *Chlorophyllase (in vivo), **milieu basique (in vitro)***

Pyrophéophorbide

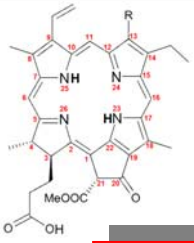


Phéophytine



- phytol : *Chlorophyllase (in vivo), **milieu basique (in vitro)***

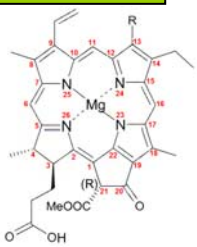
Phéophorbide



- COOMe : ***Oxydation**, enzyme, **fermentation,***

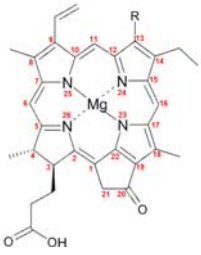
Pyrophéophorbide

Chlorophyllide



- COOMe : ***Oxydation**, enzyme, **fermentation***

Pyrochlorophyllide



- Mg^{2+} : ***Milieu acide, chaleur (in vitro)***

A. 11 Modification enzymatique IN VIVO sans ouverture du noyau tétrapyrrolique.

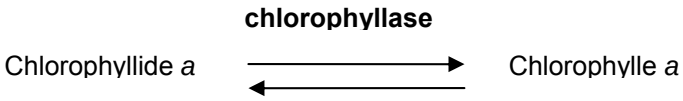
(Extrait de : http://ethesis.unifr.ch/theses/downloads.php?file=FollyP.pdf)

- **Extrusion du Mg**

La perte du magnésium chez la chlorophylle **est à ce point facile** qu'il n'et pas aisé de savoir si elle nécessite l'intervention d'une enzyme. Certains auteurs décrivent l'activité de l'enzyme **Mg-chélatase** par contre d'autres auteurs décrivent **l'action d'une substance non protéique** dont l'activité n'est pas altérée après chauffage (**pH ?).**

- **Hydrolyse de l'ester phytilique**

L'enzyme chlorophyllase intervient dans le biosynthèse de la **chlorophylle *a*** mais également dans sa dégradation.



- **Oxydation de la position C 21**

La 21-hydroxy-chlorophylle *a* ou pyrochlorophylle est le premier produit isolé qui est formé par une enzyme de la famille des catalases : **une peroxydase**

- **Perte du groupe carbométhoxy (- COOMe)**

La perte de – COOMe en position C 21 **catalysée par la décarbométhoxylase** transforme **la phéophorbide *a*** en **pyrophéophorbide *a*.**

Le cycle d'évolution des plastes.

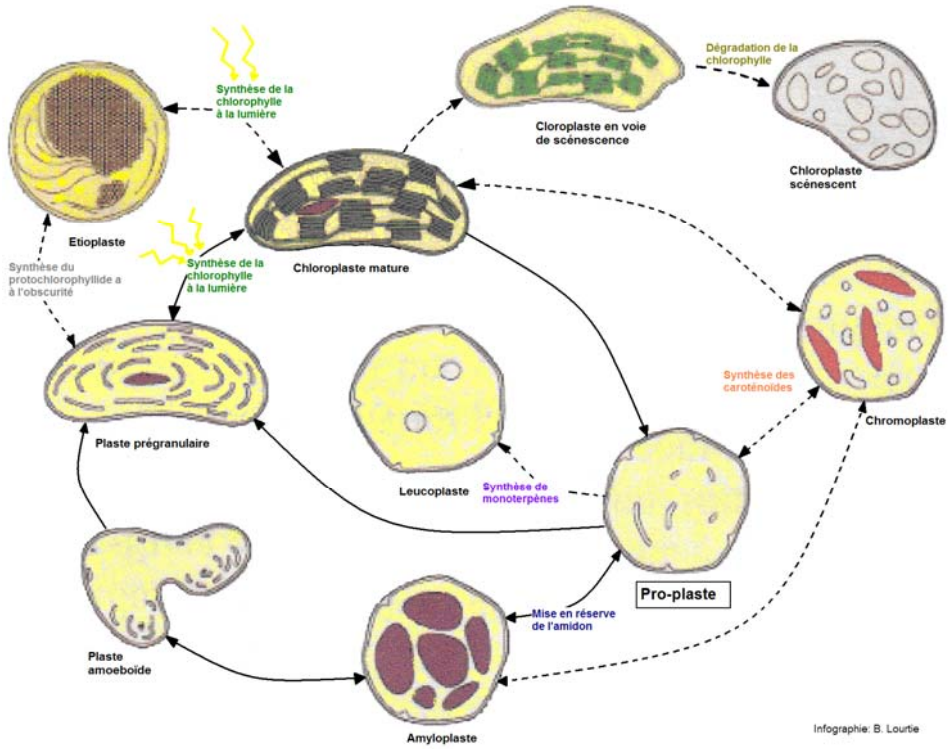


Figure 2. Tous les types de plastes dérivent des proplastes

A. 12 Les réactions de dégradation de Type II.

La compréhension des mécanismes des réactions de dégradation de type II constitue **un sujet de recherche toujours d'actualité.**
Il semble certain qu'elles nécessitent la présence **d'O_2 moléculaire** et qu'elles consistent en **l'ouverture oxydative du noyau tétrapyrrolique.**

Proposition d'un mécanisme de dégradation de la chlorophylle *a* chez les plantes. (Extrait de : http://ethesis.unifr.ch/theses/downloads.php?file=FollyP.pdf)

- **Hydrolyse enzymatique de l'ester phytilique**

chlorophyllase

Chlorophylle *a* (1) ⟶ **chlorophyllide *a* (2)**

- **Extrusion enzymatique du Mg :**

Mg-déchélatase

Chlorophyllide *a* (2) ⟶ **phéophorbide *a* (3)**

- **Ouverture oxydative du noyau tétrapyrrolique**

Phéophorbide a oxydase

Phéophorbide *a* (3) ⟶ **Catabolite rouge (4) hydrosoluble (RCC)**

- **Réduction**

réductase

Catabolite rouge (4) hydrosoluble (RCC) ⟶ **Catabolite fluorescent incolore (5) hydrosoluble (FCC)**

- **Tautomérisation et oxydations des chaînes secondaires**

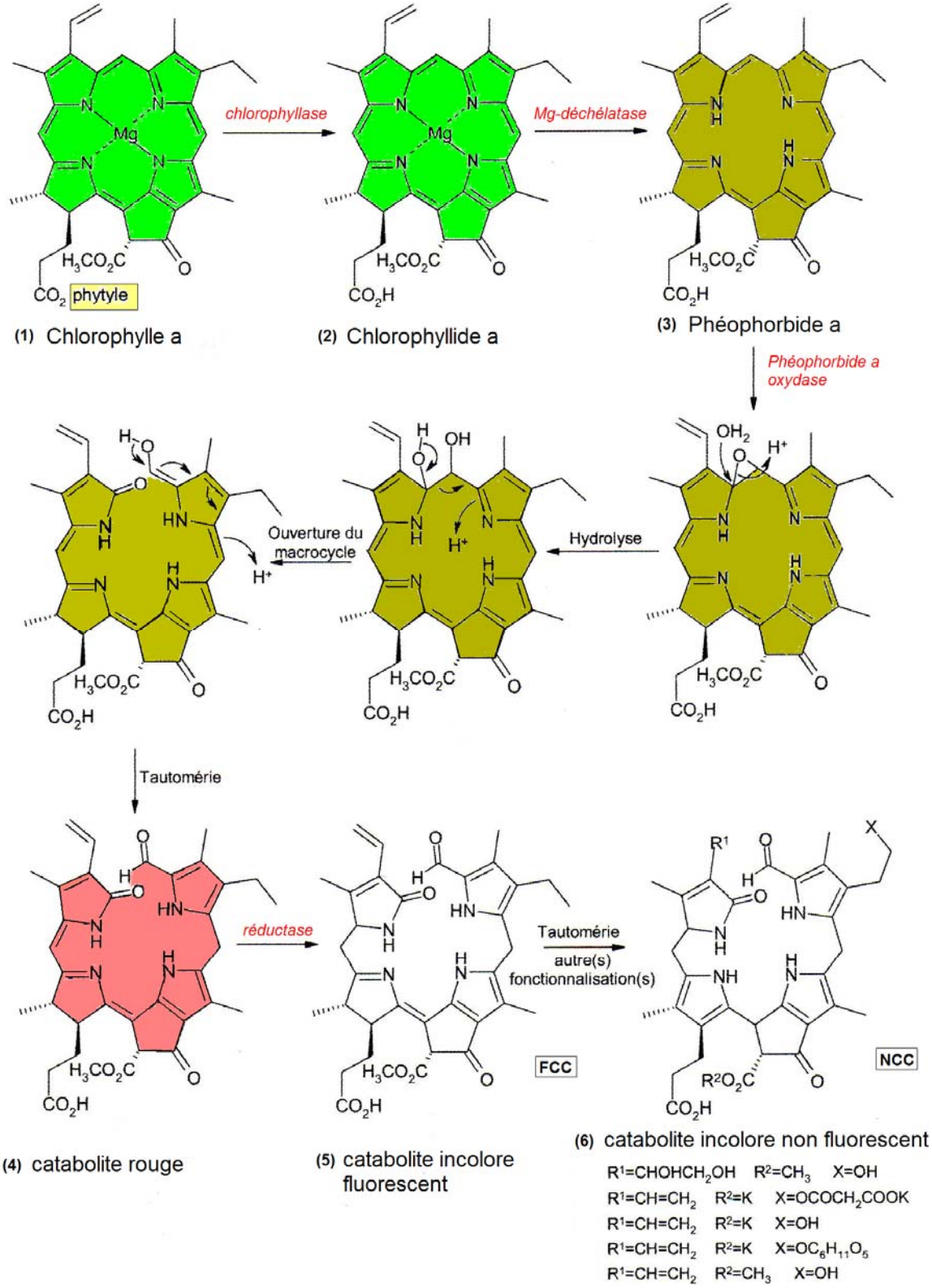
Catabolite fluorescent incolore (5) hydrosoluble (FCC) —*tautomérie*, *oxydations*→ **Catabolite incolore non fluorescent (6) hydrosoluble (NCC)**

Découverte récente d'un catabolite de couleur jaune (Extrait de : S. Moser & col., Chlorophyll catabolites, Eur. J. Org. Chem. **2009,** 21-31, DOI : 10.1002/ejoc.200800804. www.eurjoc.org)

Catabolite incolore non fluorescent (6) hydrosoluble (NCC) —*oxydation*→ **Catabolite jaune (7) hydrosoluble (YCC)**

PLANCHE I. **Schéma de la proposition d'un mécanisme de dégradation de la chlorophylle *a* chez les plantes.**

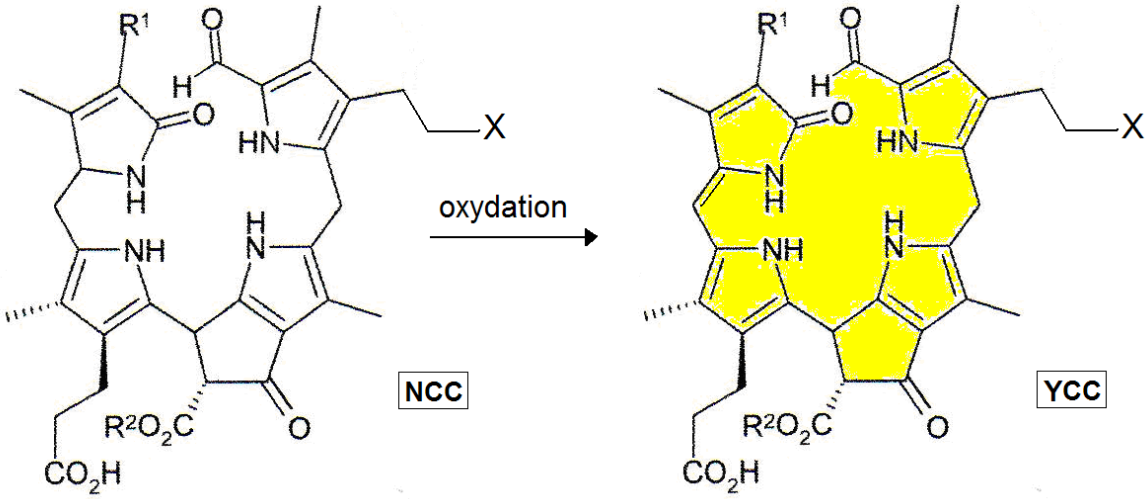
(**Inspiré de : Catabolisme de la chlorophylle *b*, structures, mécanismes et synthèse, auteur : P. Folly http://ethesis.unifr.ch/theses/downloads.php?file=FollyP.pdf**)



DECOUVERTE RECENTE : *Eur. J. Org. Chem.* 2009, 21-31

(Extrait de : S. Moser & col., Chlorophyll catabolites – Chemical and Structural Footprints of a Fascinating Biological Phenomenon, Eur. J. Org. Chem. **2009,** 21-31, DOI :10.1002/ejoc.200800804. www.eurjoc.org)

UN CATABOLITE JAUNE DE LA CHLOROPHYLLE !



(6) catabolite incolore non fluorescent

(7) catabolite jaune

(Extrait de : S. Moser & col., Chlorophyll catabolites catabolites – Chemical and Structural Footprints of a Fascinating Biological Phenomenon Eur. J. Org. Chem. **2009,** 21-31, DOI :10.1002/ejoc.200800804. www.eurjoc.org)

….”*Chlorophyll Breakdown and Autumn Colours*”

Traduction française

L’apparition des couleurs de l’automne est communément associée à la disparition de la chlorophylle. Dans la foulée de nos recherches intensives des catabolites colorés de la chlorophylle dans les feuilles sénescentes des plantes supérieures, de tels composés sont restés insaisissables, et les NCCs, tétrapyrroles linéaires incolores et non fluorescents ont été typiquement considérés comme étant les produits tétrapyrroliques finaux du catabolisme de la chlorophylle rapidement formés chez les plantes supérieures [4].

Les études menées par Losey et Engel ont révélé l’existence de catabolites « urobilinogénoidiques » incolores de la chlorophylle dans les feuilles d’orge [51] et dont l’origine provient d’une déformylation oxydative (non-enzymatique ?) de Hv-NCC-1, le principal NCC des feuilles déverdies d’orge [3].

Très récemment, nous avons identifié un catabolite jaune de la chlorophylle (YCC) dans les feuilles sénescentes fraîches de Cercidiphyllum japonicum [52].

Ce Cj-YCC naturel est caractérisé par comparaison avec un produit d’oxydation du Cj-NCC-1, le NCC abondant chez C. japonicum.

La structure du Cj-YCC montre la position méso “ouest” insaturée, l’ouverture conjuguée vers le haut des deux anneaux pyrroles « ouest » conduisant à un chromophore apparenté au premier trouvé dans la bilirubine.

Ces constatations représentent un modèle structurel de la façon dont les NCCs peuvent être oxydés chimiquement.

L’isolation d’un catabolite jaune de la chlorophylle des feuilles sénescentes suggère, peut être, que la chlorophylle contribue également aux couleurs de l’automne [52].En effet, le rôle des NCCs comme antioxydants dans les tissus sénescents pourrait être envisagé.

Tout ceci fournit des preuves supplémentaires de transformations endogènes des catabolites de la chlorophylle dans les feuilles sénescentes, au-delà du stade des NCCs.

Conclusions

La dégradation de la chlorophylle chez les plantes sénescentes et dans les fruits matures fournit une piste naturelle vers un nouveau groupe de tétrapyrroles linéaires ubiquistes qui ont été relatés dans les bilines dérivées d’hème.

L’exploration de la structure et des propriétés chimiques des catabolites de la chlorophylle présente un intérêt et fait l’objet de recherches pour les effets physiologiques possibles chez les plantes et chez les organismes qui se nourrissent de produits dérivés des plantes.

B. LES PIGMENTS AUXILIAIRES

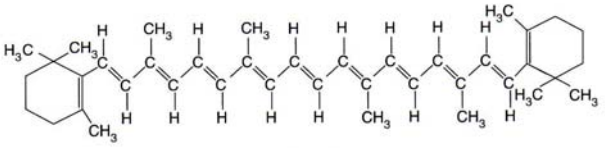
LA FAMILLE DES CAROTENOIDES

B. 1 Les caroténoïdes sont des hydrocarbures

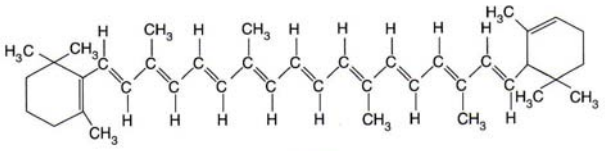
Les carotènes sont des **hydrocarbures** appartenant à la famille des **terpénoïdes en C40 avec 11 à 13 doubles liaisons C = C, et une géométrie de configuration « trans » (isomère E, les 2 H sont de part et d'autre du plan de liaison), la plupart conjuguées (séparées par une seule simple liaison sans C intermédiaire).**
Totalement **apolaires** et donc **hydrophobes**, ils sont solubles dans les lipides (et les solvants organiques).

Les xantophylles sont des **dérivés oxygénés des carotènes, molécules en C_{40} avec des fonctions alcool, cétone, époxyde et des hétérocycles oxygénés.**
Leur polarité relative se justifie par la présence de groupement hydroxyle (- OH).

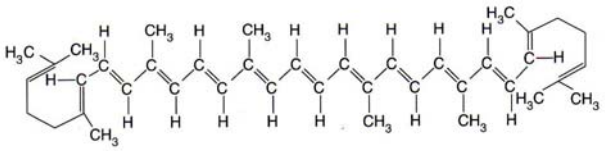
CAROTÈNES



β-Carotène



α-Carotène



Lycopène

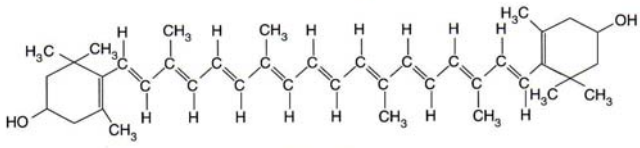
Les caroténoïdes sont très répandus, on les trouve pratiquement dans tous les **fruits** (tomates, oranges, citrons) et **légumes**, dans les fleurs (renoncules, marguerite) et dans **certaines racines** (carottes).

Les caroténoïdes sont localisés dans des plastes appelés **chromoplastes** où ils ont une fonction uniquement vexillaire et sont organisés en **cristalloïdes** dont la forme est contrôlée par des protéines en faible quantité.

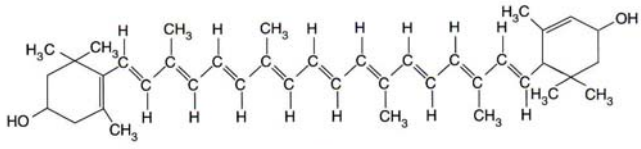
Les caroténoïdes sont également présents dans les **chloroplastes au niveau des complexes antennaires** où ils jouent un rôle de **pigments auxiliaires** pour la photosynthèse. **La forte absorption** des caroténoïdes de la **lumière bleue** leur permet de transférer de l'énergie à la chlorophylle et de protéger celle-ci de la photooxydation.

Dans les chloroplastes, les **caroténoïdes** sont liés chacun à un site spécifique des protéines **LHC (complexe collecteur de lumière).**

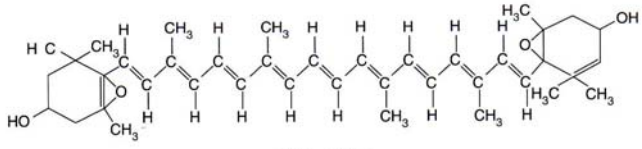
XANTHOPHYLLES



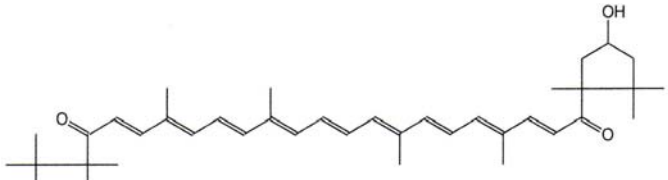
Zeaxanthine



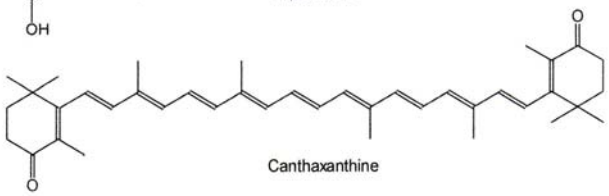
Lutéine



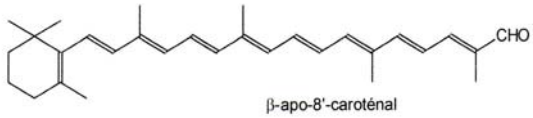
Violaxanthine



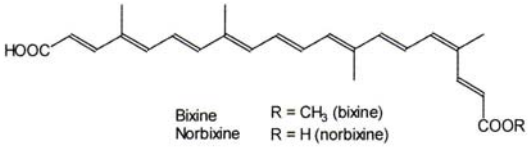
Capsantéine



Canthaxanthine

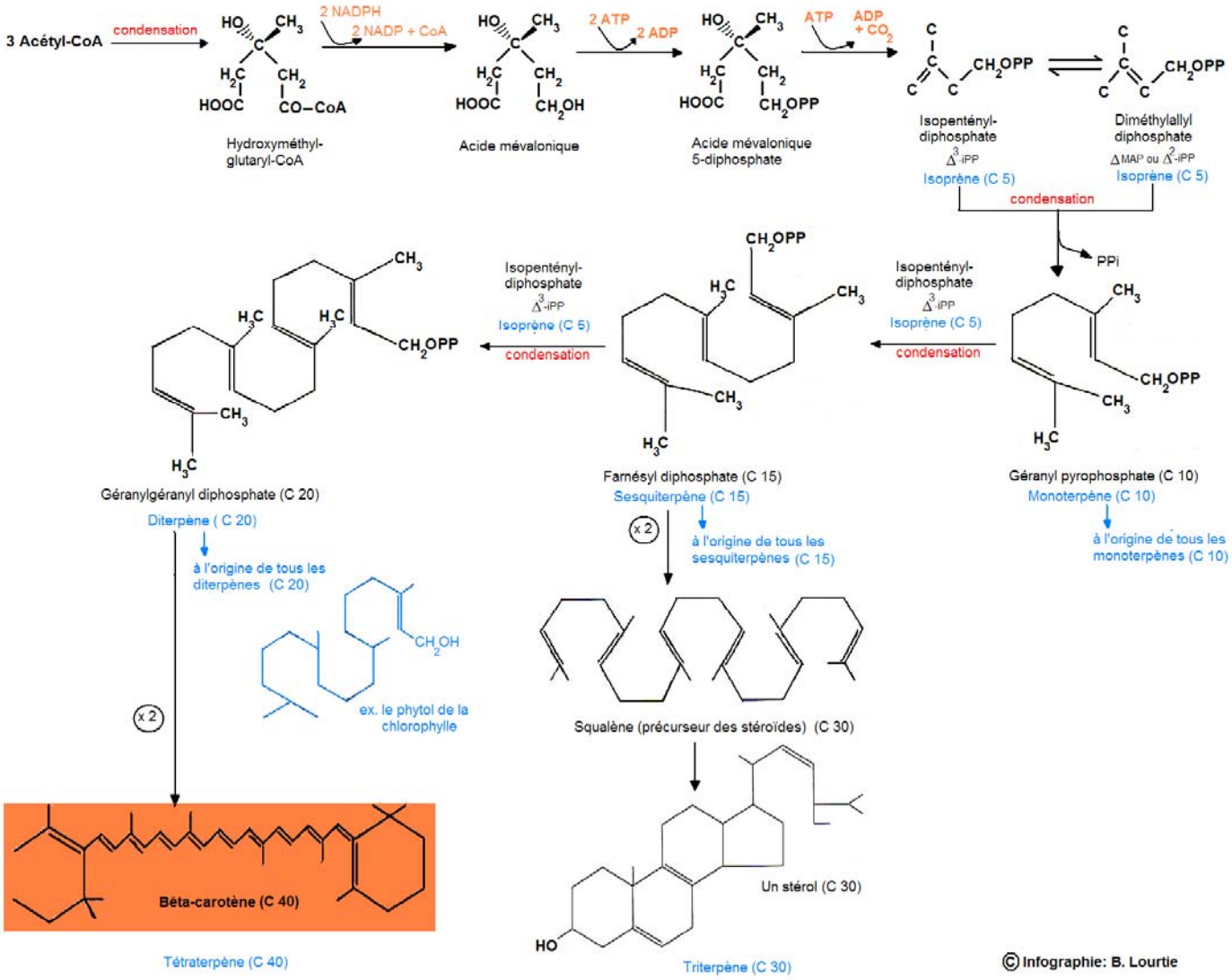


β-apo-8'-caroténal



Bixine R = CH_3 (bixine)
Norbixine R = H (norbixine)

PLANCHE 2. **LA BIOSYNTHESE DES CAROTENOIDES**



B. 2 Les terpènes

Les terpènes dérivent d'une molécule simple à 5 carbones et on peut les considérer comme des **polymères** de cette entité appelée **isoprène.**

La famille des terpènes comprend des **pigments** (carotènes et xanthophylles), **des hormones** (gibbérellines, acide abscissique), **des phytostérols** (utilisés par l'industrie alimentaire pour diminuer le taux de cholestérol) ainsi que leurs dérivés, de nombreuses **huiles essentielles** (menthol, géraniol, …) et des **polyterpènes** (latex).

De nombreux terpènes et leurs dérivés sont considérés comme métabolites primaires. Cependant, la grande majorité des composés terpéniques sont **des métabolites secondaires.**

Les caroténoïdes sont synthétisés massivement lors de la différentiation des proplastes en chromoplastes.
La forme inactive des enzymes de la biosynthèse se trouve dans le **stroma** du futur chromoplaste tandis que la forme active de ces enzymes et les précurseurs hydrophobes des caroténoïdes se trouvent dans les **membranes de l'enveloppe.**

C. LES PIGMENTS VACUOLAIRES

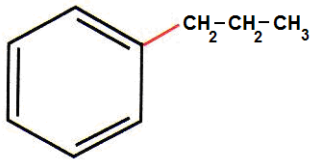
LES FLAVONOIDES

Les flavonoïdes appartiennent à la FAMILLE des composés phénoliques.

Ils forment un ensemble de pigments comprenant les grands groupes **des flavones, des flavonols et des anthocyanidines.**

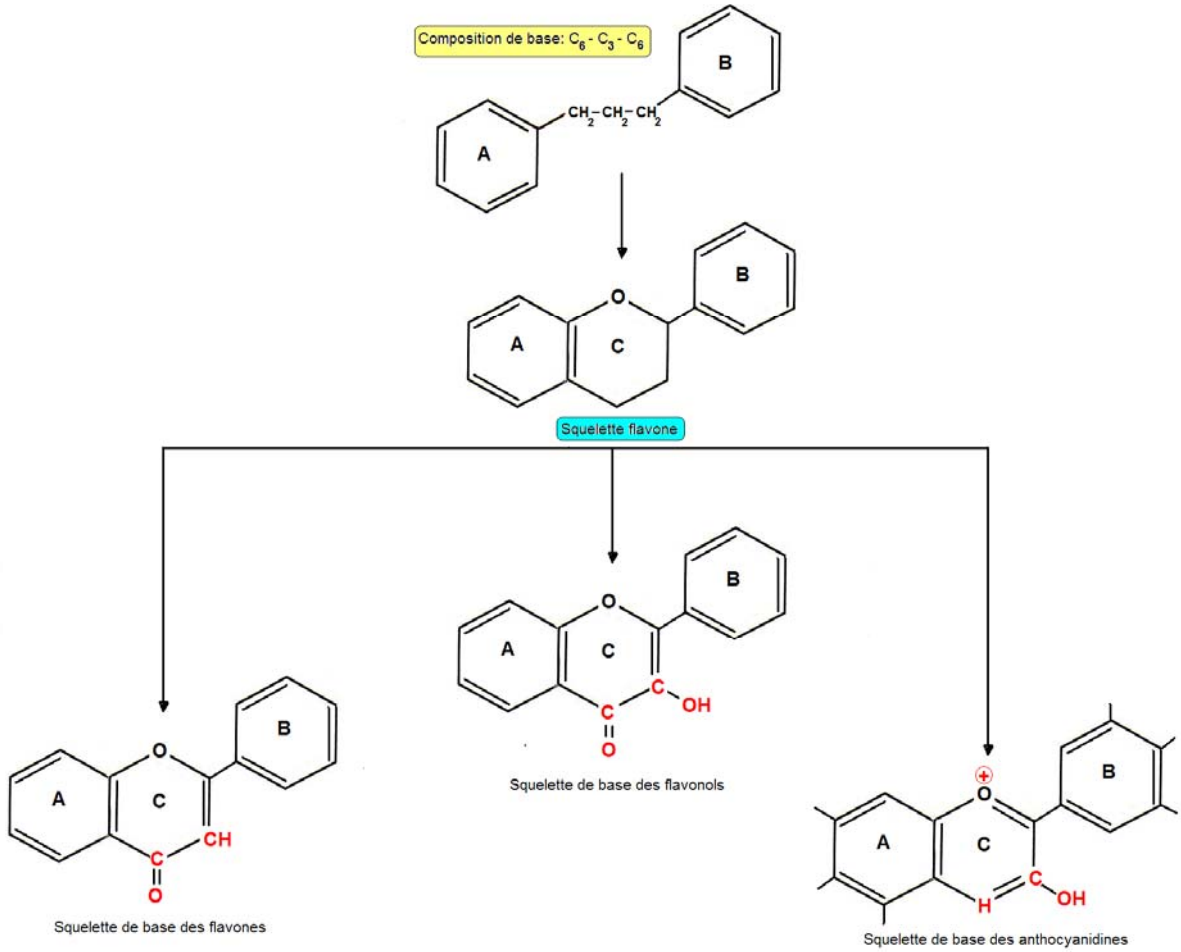
C. 1 Structure de base des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont des dérivés du phénylpropane



Phénylpropane

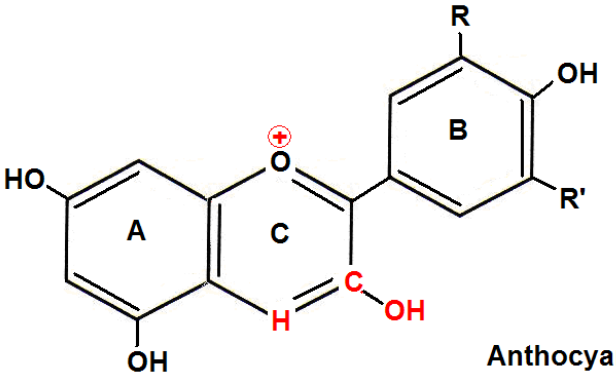
A la base, **les flavonoïdes** sont des composés en $C_6 – C_3 – C_6$ avec un squelette de flavone où la liaison C3 a formé un hétérocycle pyranne



C. 2 Structure chimique de quelques flavonoïdes

- **Les anthocyanidines :** pigments rouges, roses, bleus et violets.

Ce sont des pigments hydrosolubles contenus dans les vacuoles et qui ne jouent aucun rôle photosynthétique.

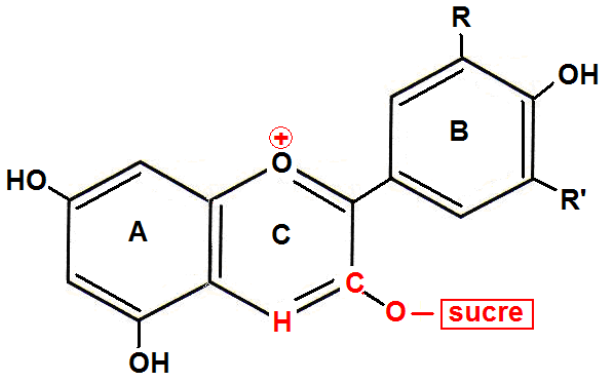


Anthocyanidines

pelargonidine	R = R' = H
cyanidine	R = OH, R' = H
péonidine	R = OCH_3 , R' = H
delphinidine	R = R' = OH
pétunidine	R = OCH_3 , R' = OH
malvidine	R = R' = OCH_3

La couleur des anthocyanidines varie en fonction de la nature des groupements **R et R' sur le noyau B :** pélargonidine (orange rouge), cyanidine (rouge violet), delphinidine (bleu violet), péonidine (rouge), pétunidine (violet) et malvidine (violet foncé).

- **Les anthocyanes** sont des **glycosides** formés par l'addition d'un sucre sur le groupement OH du C3 d'une anthocyanidine (aglycone).



Anthocyanes

On trouve des **anthocyanes** dans les fruits mûrs (fraise, framboise, cassis, myrtille, sureau, raisin, mûre).
Ce sont les anthocyanes qui colorent les pétales des fleurs ainsi que les feuilles, les pétioles et les bractées lorsqu'ils ne sont pas verts.

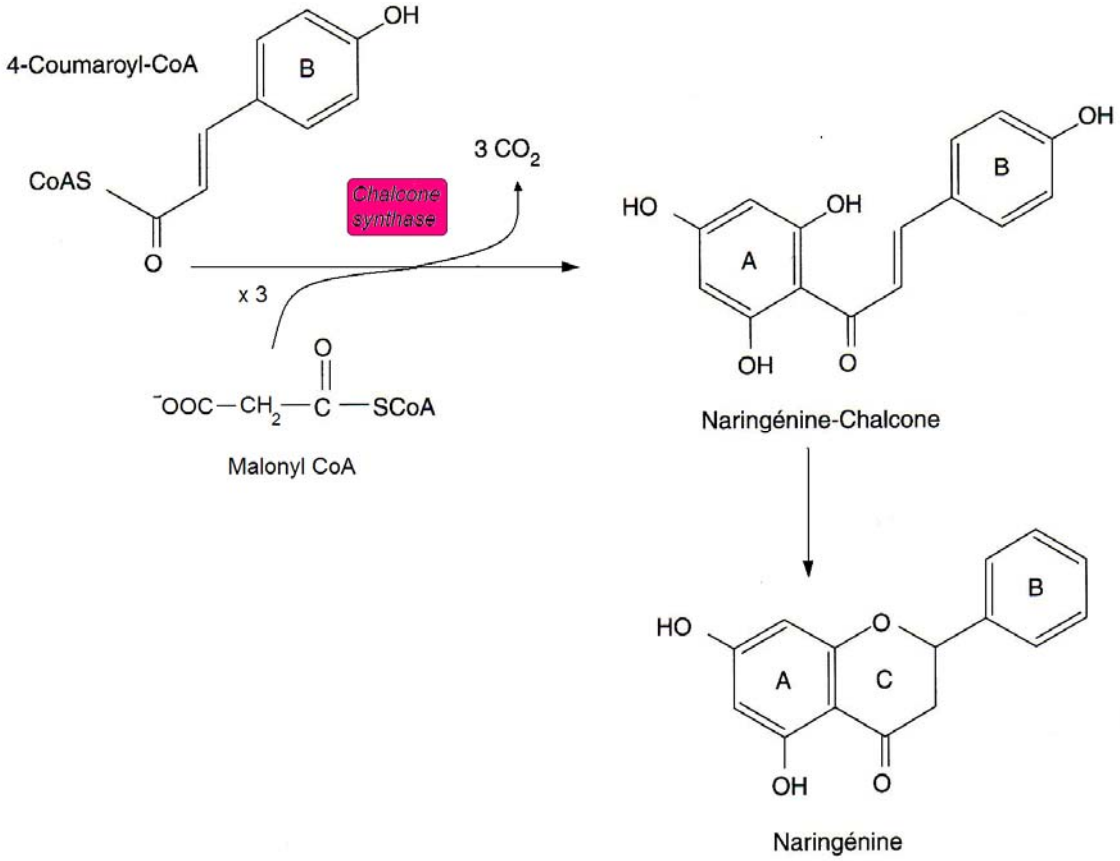
La couleur des anthocyanidines et des anthocyanes est sensible au pH, ce sont donc des indicateurs naturels :

- **en milieu acide :** rose à rouge
- **en milieu neutre :** violet
- **en milieu basique :** bleu à vert et jaune

Les anthocyanes sont d'excellents antioxydants.

Les anthocyanes absorbent principalement dans les longueurs d'ondes comprises entre 475 et 560 nm c'est-à-dire dans le vert**.**
Les flavonoïdes, en général**,** absorbent fortement dans **l'UV-B** ce qui leur confère un rôle protecteur des tissus contre la photo-oxydation surtout au niveau des feuilles, où ils sont souvent présents dans les cellules épidermiques.

PLANCHE 3. **LA BIOSYNTHESE DES FLAVONOIDES**



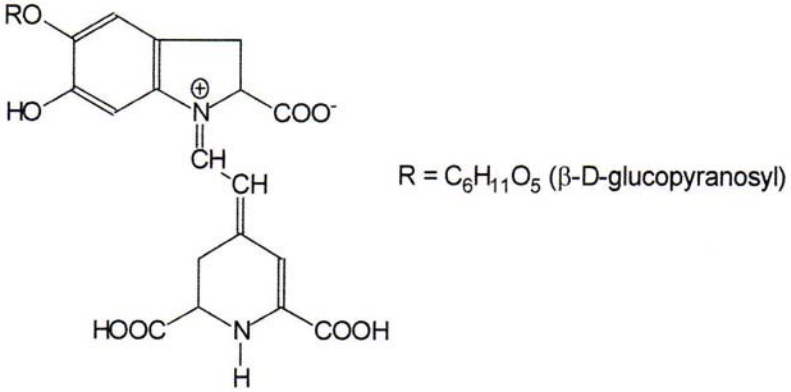
La condensation de 3 molécules de **malonyl CoA,** dérivés de l'acide malonique, avec le **4- coumaroyl- CoA** conduit à la formation de la **Naringénine - Chalcone** en présence de la ***chalcone synthase.***

Les cycles B et C proviennent de la voie de l'acide shikimique (via l'acide *p*-coumarique), tandis que le cycle A est formé par les 3 molécules de malonyl – CoA.

La synthèse des anthocyanes est stimulée par la lumière visible et les UV, par les basses températures ou encore par les stress et carences en azote et en phosphore.

C. 3 LES BETACYANINES

Bétanidine : pigment hydrosoluble de la betterave rouge. Ce glycoside formé du glucose et d'un aglycone n'est pas un flavonoïde mais appartient à la FAMILLE des **bétalaïnes.**
Ces pigments ne sont pas des indicateurs de pH comme le sont les anthocyanidines



EXAO : utiliser un logiciel de mesure sur l'image

Les outils de mesure sur l'image du logiciel MESURIM PRO (auteur : J-F. Madre, Académie d'Amiens, France) permettent d'aborder des mesures de photométrie classique à partir d'objets photographiés ou scannés.
Ces outils travaillent sur les images telles qu'elles sont représentées dans la mémoire de l'ordinateur, les résultats dépendent de la qualité de la numérisation et d'indications correctes d'échelle. **Ces outils demandent d'être utilisés avec circonspection (voir avertissement de l'auteur concernant l'interprétation des résultats).**

Annuaire des logiciels de SVT gratuits et disponibles sur internet en téléchargement.

- SVT-Edu.net (http://perso.wanadoo.fr/joudan.eric/logiciel.htm)
- Académie Nantes (http://www.ac.nantes.fr:8080/peda/disc/svt/tice.htm)

Après téléchargement du logiciel, on peut utilement se constituer un mode d'emploi à partir des explications proposées dans le « Sommaire » et les exemples d'utilisation.

Exemple : mesure d'intensité de lumière avec le logiciel MESURIM PRO.

On peut mesurer la variation d'intensité de couleur dans un canal de couleur ou dans l'ensemble des canaux, le long d'un segment, suivant une bande plus ou moins large. Les résultats sont donnés sous la forme d'une courbe qui peut être donnée « en émission » (intensité), « en absorption » (opposé de l'intensité si la mesure est linéaire) ou « en D.O. estimée » (si la mesure est logarithmique).

Voir les applications en chromatographie de partage et d'adsorption (BIOCH I, 1, a et BIOCH I, 2, a)

Application

I. MESURES EFFECTUEES SUR LA LIGNE 1 du chromatogramme: extrait total des pigments de feuilles vertes de l'érable.

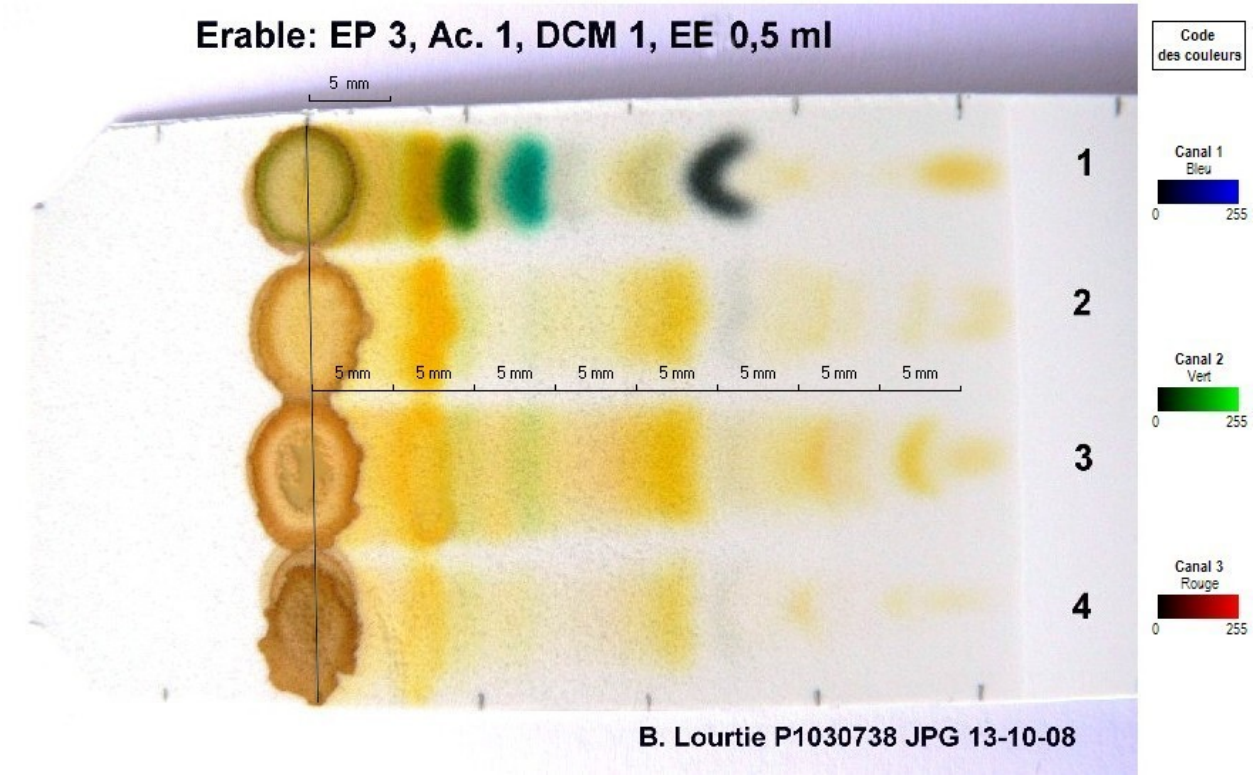
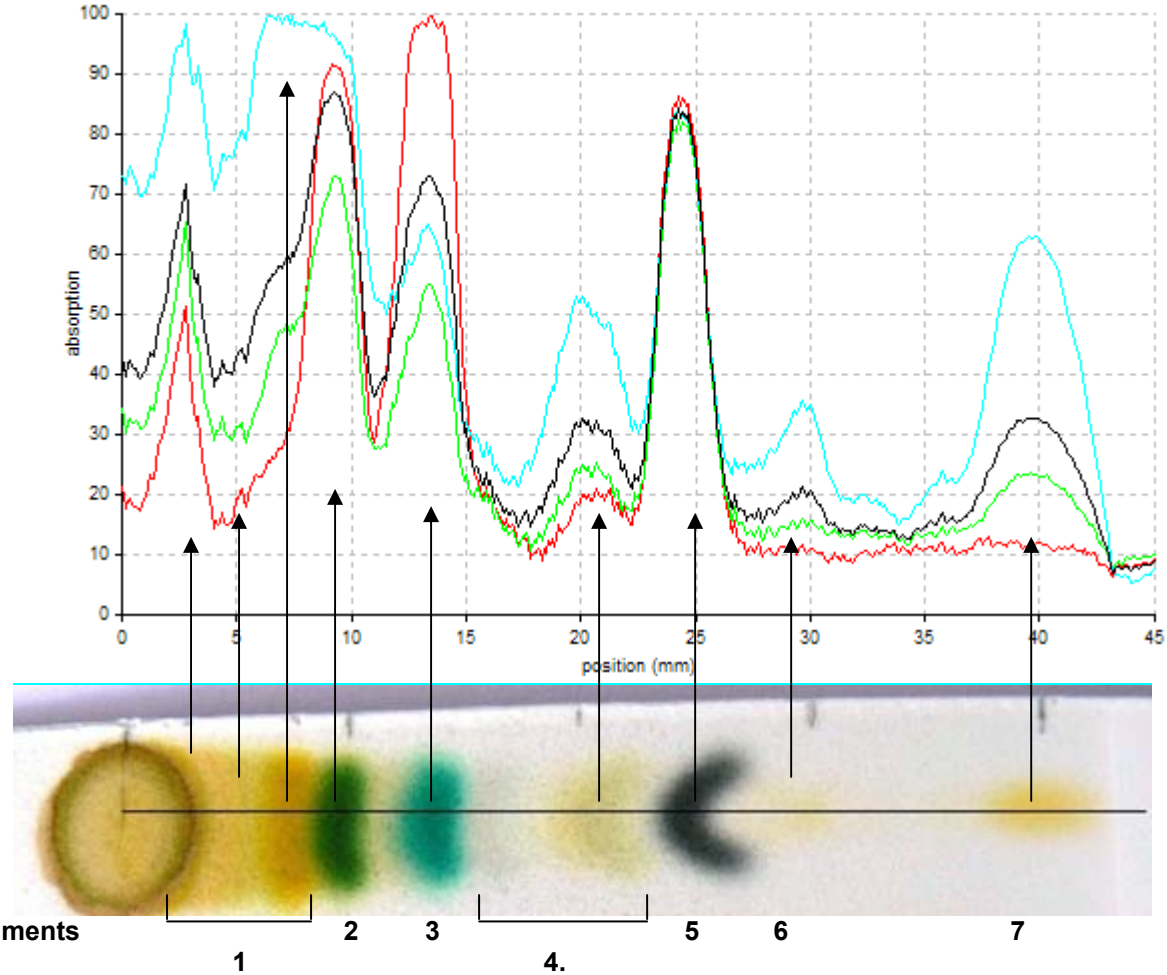


Image 3. Image obtenue avec le logiciel mesurim après avoir fait le blanc, établi l'échelle et le code des couleurs

1. **Mesure d'intensité de couleur sur une ligne : mesure linéaire en absorbance (%)**
   Courbe noire : moyenne dans l'ensemble des 3 canaux ; courbe rouge : dans le canal rouge ; courbe bleue : dans le canal bleu ; courbe verte : dans le canal vert.



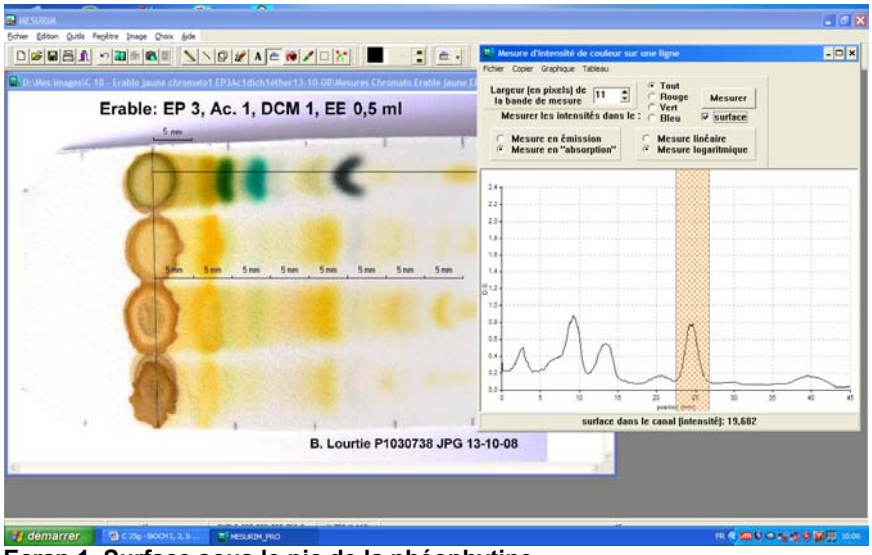
GRAPHIQUE 1 : 1 : chlorophyllide probable, xanthophylles ; **2 :** chlorophylle *b* ; **3 :** chlorophylle *a* ; **4 :** produits dégradés de la chlorophylle ; **5 :** phéophytine ; **6 :** pyrophéophytine ou caroténoïdes ; **7 :** β-carotène

Données « mesurim » pour des valeurs choisies (pics)
Résultats en absorption linéaire

Position mm	(R) %	(V) %	(B) %	Moyenne %
0	21,3	34,2	73	42,8
2,79	51,3	65,2	98,2	71,6
3,32	32,1	45	90,8	56
4,36	17	32,9	76,8	42,2
5,15	20,9	31,9	80,3	44,3
5,24	20,9	31,9	80,5	44,4
6,37	25,7	41,4	99,5	55,5
8,81	89	68,5	98,5	85,3
9,34	91,3	73,2	96	86,8
13,4	99,6	55,1	64,3	73
15,9	21,3	20,8	28,7	23,6
17,7	11,9	12,9	25,6	16,8
20,1	20	24,9	52,9	32,6
24,3	86,4	82,4	84,3	84,3
29,7	11,8	16,1	35,7	21,2
32,2	10,4	14,2	20	14,9
35,8	12	14,7	23,9	16,9
39,5	11,6	23,5	62,9	32,7
43,5	8,48	8,91	6,77	8,06

Position mm	D.O. (R)	D.O. (V)	D.O. (B)	D.O.
0	0,161	0,237	0,731	0,314
0,524	0,0904	0,177	0,596	0,239
2,97	0,309	0,45	1,6	0,537
3,49	0,179	0,262	1,2	0,373
4,54	0,0798	0,174	0,64	0,239
5,41	0,106	0,167	0,708	0,257
6,63	0,13	0,242	2,67	0,358
6,98	0,141	0,272	2,33	0,376
7,33	0,158	0,284	2,6	0,392
7,77	0,193	0,293	1,92	0,411
9,42	1,06	0,579	1,38	0,882
13,4	2,27	0,348	0,455	0,572
14,1	2,22	0,299	0,39	0,515
20,3	0,1	0,125	0,328	0,173
24,4	0,876	0,76	0,79	0,806
29,9	0,05	0,0758	0,195	0,102
36	0,0563	0,0683	0,117	0,0797
39,9	0,0544	0,116	0,438	0,174
43,5	0,033	0,0366	0,0345	0,0347

2. **Mesure d'intensité de couleur sur une ligne : mesure de la surface (intégrale) sous le pic en D.O.**



Ecran 1. Surface sous le pic de la phéophytine

Présentation des résultats pour la ligne 1

Tableau des résultats : Ligne n°1

Position des pics (mm)	Abs. (R) %	Abs. (V) %	Abs. (B) %	Abs. %	Pigments	Rf	I sous le pic (RVB) en absorbance
0	21,3	34,2	73,0	42,8	ligne de dépôt	0	
					(RCC, FCC, NCC) ?		
2,79	51,3	65,2	98,2	71,6	bord de la tache de dépôt		
3,32	32,1	45,0	90,8	56,0	**chlorophyllide**	0,076	606,50
4,36	17,0	32,9	76,8	42,2	jaune pâle	0,100	442,45
5,24	20,9	31,9	80,5	44,4	produit dégradé	0,120	470,77
			(Pyrochlorophyllide ?, Phéophorbide ? Pyrophéophorbide ?)				
6,37	25,7	41,4	99,5	55,5			
8,81	89,0	68,5	98,5	85,3	**xanthophylle**	0,202	1351,20
9,34	91,3	73,2	96,0	86,8	**chlorophylle *b***	0,214	2868,20
13,4	99,6	55,1	64,3	73,0	**chlorophylle *a***	0,308	2674,60
15,9	21,3	20,8	28,7	23,6			
17,7	11,9	12,9	25,6	16,8	tache vert clair		479,75
20,1	20,0	24,9	52,9	32,6	pyrochlorophylle **(?)** (tache verte)	0,462	1371,10
24,3	86,4	82,4	84,3	84,3	**phéophytine**	0,558	2573,00
29,7	11,8	16,1	35,7	21,2	pyrophéophytine (?)	0,682	700,63
32,2	10,4	14,2	20,0	14,9	pigment jaune pâle (?)	0,740	336,17
35,8	12,0	14,7	23,9	16,9	pigment jaune pâle (?)	0,823	442,65
39,5	11,6	23,5	62,9	32,7	**β-carotène**	0,908	1894,50
43,5	8,48	8,91	6,77	8,06	Front de l'éluant	1	

NB ! (?) signifie que l'identification formelle nécessite des analyses plus performantes.

INTERPRETATION DES RESULTATS POUR LA LIGNE 1.

1. **La répartition des pigments**, depuis la ligne de dépôt jusqu'au front du solvant, s'explique par leur structure chimique.
   - **les carotènes** sont des hydrocarbures (tétraterpènes) totalement apolaires (lipophiles)
   - **les chlorophylles** sont des molécules amphiphiles composée d'un noyau tétrapyrrolique hydrophile et d'un radical phytyl hydrophobe
   - **les xanthophylles** sont des carotènes oxydés présentant des groupes hydroxyl (- OH), ce sont les pigments les plus polaires
   - **les produits de dégradation « in vitro » de la chlorophylle,** sont plus ou moins polaires en fonction du niveau de dégradation de la molécule de départ (voir « Les produits de dégradation de la chlorophylle » BIOCH. I, 2, a)).
   - Pour l'identification des produits de dégradation, on ne peut se baser que sur la polarité des molécules. Des analyses plus performantes sont nécessaires pour l'identification formelle.

2. **La présence de produits de dégradation de la chlorophylle (phéophytine, pyrophéophytine, chlorophyllide)** est en grande partie due à une dégradation **in vitro** (extraction des pigments dans l'éthanol, présence d'éther dans l'éluant). Ces réactions in vitro sont bien connues sous le nom de dégradation de type I.
   Cependant, on ne peut pas exclure totalement que des catabolites naturels de la chlorophylle puissent être présents (par exemple : chlorophyllide, phéophorbide).

3. **Les pics en absorbance linéaire et en absorbance et en D.O.** (densité optique) en fonction des différents canaux coïncident parfaitement avec la nature des pigments :
   - **chlorophyllide**, produit dégradé de la chlorophylle de couleur verte
   - **xanthophylles,** pigments jaunes, absorbent fortement dans le canal bleu
   - **chlorophylle *a*,** pigment vert bleu, absorbe fortement dans le canal rouge
   - **chlorophylle *b*,** pigment vert jaune, absorbe dans canal rouge et fortement dans le canal bleu
   - **β-carotène,** pigment jaune orange, absorbe dans le canal bleu
   - **phéophytine,** de couleur généralement vert olive, absorbe de façon similaire dans les 3 canaux et se présente toujours en gris noir dans les chromatogrammes.

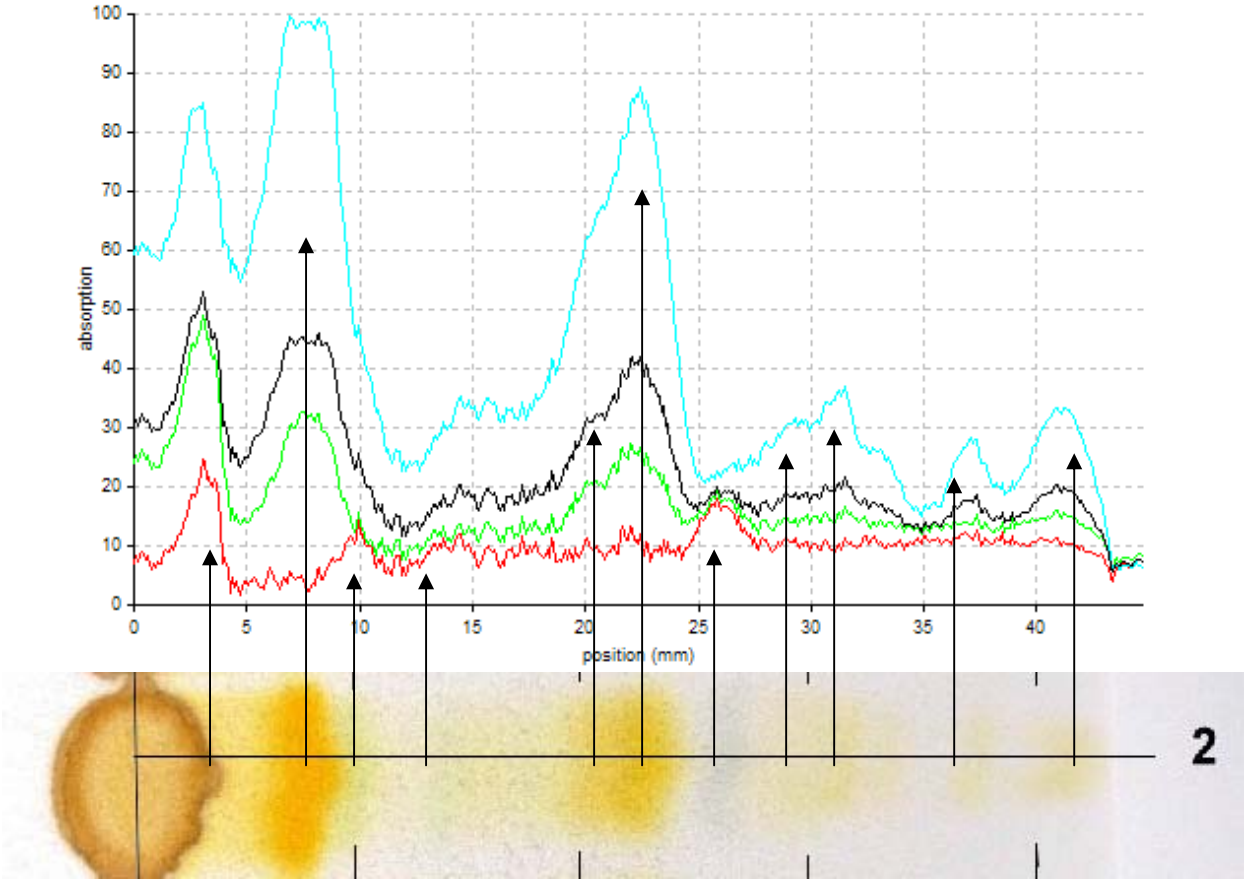
4. **Le rapport frontal pour chaque bande** se calcule, de façon précise, à partir du tableau de résultats :
   Rf = Distance de migration de l'espèce/ distance de migration du front du solvant

5. **La mesure de surface dans le canal en absorbance linéaire ou en DO** est l'intégrale (surface) sous le pic. Cette mesure pourrait servir à une approche quantitative de la méthode (Voir : « la chromatographie d'adsorption » BIOCH I, 2, a).

II. MESURES EFFECTUEES SUR LA LIGNE 2 du chromatogramme: extrait total des pigments de feuilles jaune vif de l'érable.

1 Mesure d'intensité de couleur sur une ligne : mesure linéaire en absorbance (%)

Courbe noire : moyenne dans l'ensemble des 3 canaux ; courbe rouge : dans le canal rouge ; courbe bleue : dans le canal bleu ; courbe verte : dans le canal vert.



Données « mesurim » pour des valeurs choisies
Résultats en absorption linéaire

position mm	(R) %	(V) %	(B) %	Moyenne %
0	6,95	24,1	59,3	30,1
3,05	24,6	48,9	85	52,8
6,89	5,53	30,4	99,6	45,2
8,2	6,17	32,3	99,2	45,9
9,95	14,2	15,7	47,5	25,8
11,7	8,45	11	25,9	15,1
14,5	11,8	13,6	35,2	20,2
15,7	10,1	14,2	35,2	19,8
18,5	11,3	15,4	41,7	22,8
20,1	11,3	21	62,4	31,5
22,4	11,8	26,6	87,7	42,1
25,9	17,2	18,2	22,4	19,3
31,5	11,2	16,5	37,1	21,6
32,7	11,5	14	26,6	17,3
37,1	11,4	13,8	28,2	17,8
40,9	11,5	16	33,4	20,3
43,5	5,49	7,31	6,27	6,36
44,5	7,59	8,77	6,63	7,66

Résultats en D.O.

position mm	(R)	(V)	(B)	D.O.
0	0,104	0,182	0,568	0,243
4,36	0,0809	0,173	0,634	0,238
5,24	0,102	0,167	0,711	0,255
6,37	0,129	0,232	2,33	0,352
6,89	0,141	0,277	2,13	0,377
9,25	1,07	0,569	1,43	0,883
13,4	2,45	0,348	0,447	0,569
16	0,0931	0,0904	0,136	0,106
19,9	0,0883	0,117	0,319	0,164
24,3	0,819	0,717	0,758	0,762
29,7	0,0545	0,0763	0,192	0,103
34,9	0,0496	0,0607	0,0911	0,0668
36,9	0,0502	0,0683	0,129	0,0811
39,6	0,0542	0,117	0,429	0,172
43,5	0,0385	0,0405	0,0305	0,0365

Présentation des résultats pour la ligne 2

Tableau des résultats : Ligne 2

Position des Pics (mm)	Abs. (R)	Abs. (V)	Abs. (B)	Abs.	Pigments	Rf	I sous le pic (RVB) en absorbance
0	6,95	24,1	59,3	30,1	ligne de dépôt 0 (RCC, FCC, NCC, YCC) ?		
3,05	24,6	48,9	85,0	52,8	bord de la tache de dépôt		
6,89	5,53	30,4	99,6	45,2		0,158	
8,2	6,17	32,3	99,2	45,9	**xanthophylle**	0,188	2484,60
9,95	14,2	15,7	47,5	25,8	chlorophylle *b*	0,228	329,25
14,5	11,8	13,6	35,2	20,2	chlorophylle *a*	0,333	276,45
15,7	10,1	14,2	35,2	19,8	jaune pâle (?)	0,360	252,31
18,5	11,3	15,4	41,7	22,8	jaune pâle (?)	0,425	308,97
20,1	11,3	21,0	62,4	31,5	jaune pâle (?)	0,462	233,11
22,4	11,8	26,6	87,7	42,1	**pigment jaune intense (?)**	0,514	2546,70
25,9	17,2	18,2	22,4	19,3	**phéophytine**	0,595	568,91
31,5	11,2	16,5	37,1	21,6	jaune pâle (?)	0,724	481,95
32,7	11,5	14,0	26,6	17,3	jaune pâle (?)	0,751	883,93
37,1	11,4	13,8	28,2	17,8	jaune pâle (?)	0,853	661,14
40,9	11,5	16,0	33,4	20,3	**β-carotène**	0,940	892,01
43,5	7,59	8,77	6,63	7,66	front de l'éluant	1	

Comparaison des valeurs de « I sous le pic » en absorbance entre la ligne 1 et la ligne 2 (en bleu)

		xanthophylles	Chloro *b*	Chloro *a*	Phéophytine	B-carotène
Ligne 1	Rf	0,202	0,214	0,308	0,558	0,908
Ligne 1	I sous le pic	1351,20	2868,20	2674,60	2573,00	1894,50
Ligne 2	Rf	0,188	0,228	0,333	0,595	0,940
Ligne 2	I sous le pic	2484,60	329,25	276,45	568,91	892,01

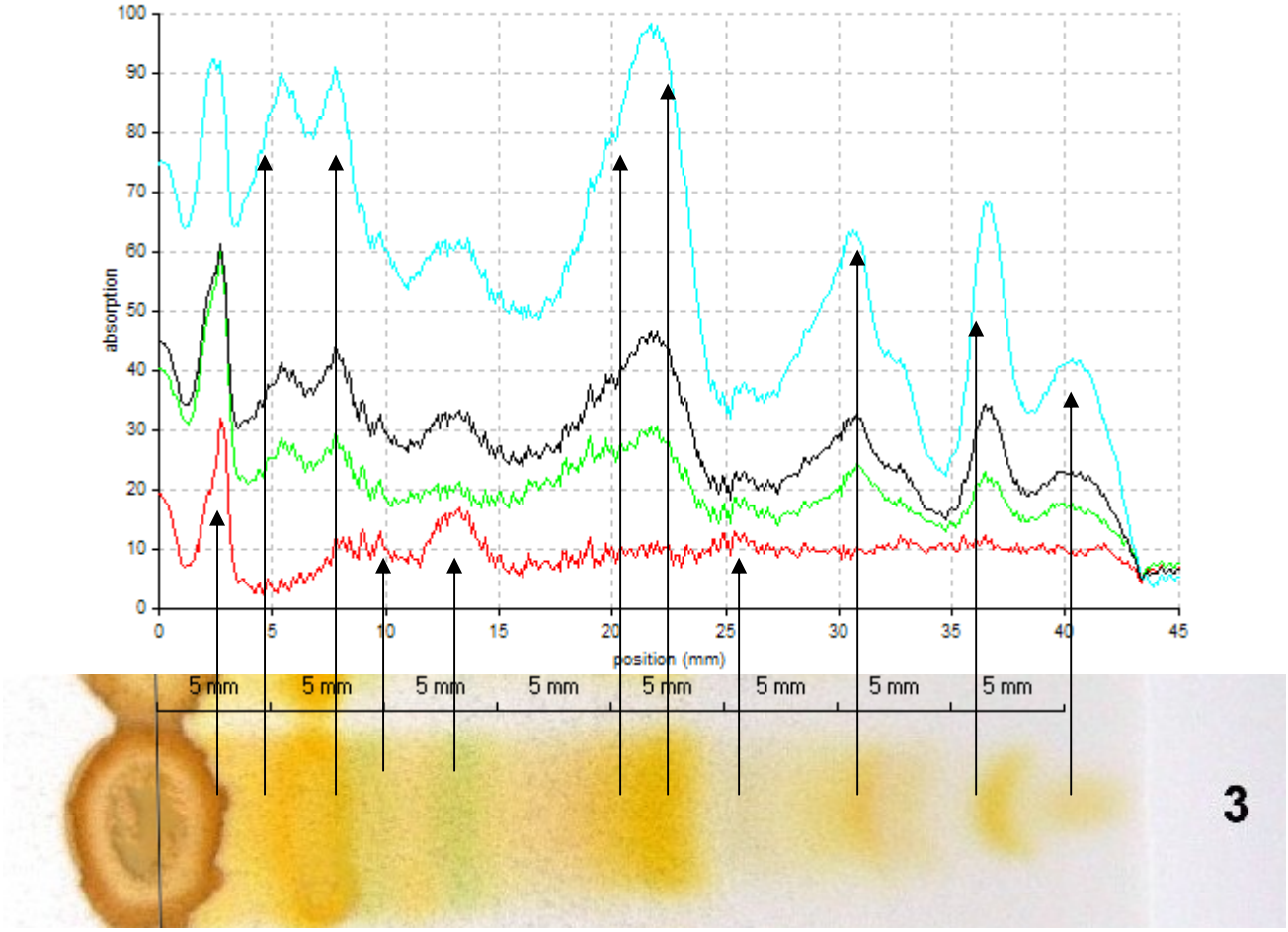
Commentaires :

- Le taux de chlorophylle *a* et *b* dans les feuilles jaune vif est nettement plus faible que dans les feuilles vertes. Ceci est dû à la dégradation des chlorophylles *a* et *b*.
- Le nombre de pics dans le bleu et donc de bandes de couleur jaune est plus élevé pour la ligne 2 que pour la ligne 1. Il faut signaler la bande intensément jaune, en dessous de la phéophytine, à l'endroit où sur la ligne 1 se trouve une bande verte (pyrochlorophylle ?) (voir le tableau 1).
- Il n'est pas possible d'identifier les pigments ou produits de dégradation de façon formelle sans avoir recours à des analyses plus sophistiquées (HPLC, RMN).

III. MESURES EFFECTUEES SUR LA LIGNE 3 du chromatogramme: extrait total des pigments de feuilles jaune terne de l'érable.

Mesure d'intensité de couleur sur une ligne : mesure linéaire en absorbance (%)

Courbe noire : moyenne dans l'ensemble des 3 canaux ; courbe rouge : dans le canal rouge ; courbe bleue : dans le canal bleu ; courbe verte : dans le canal vert.



Données « mesurim » pour des valeurs choisies
En absorption linéaire

Position mm	(R) %	(V) %	(B) %	absorption %
0	19,2	40,2	74,7	44,7
5,41	5,1	28,6	90,1	41,2
7,77	11,7	29,3	90,9	44
8,99	8,06	15,4	61,7	28,4
9,77	6,35	14,1	55,7	25,4
13,3	10,4	15,2	56,8	27,5
19	12	28,9	72,3	37,8
19,7	11	28,6	78,9	39,5
21,7	11	30,6	98,3	46,6
25,8	12,6	18,5	37,9	23
27	10,1	15,8	35,8	20,6
28,5	10,9	17,9	46,9	25,2
30,6	9,38	23,4	63,7	32,1
36,5	12,3	23	68,2	34,5
40,3	9,66	17,6	41,9	23,1
43,5	5,17	5,81	5,03	5,34

Résultats

Position mm	D.O. (R)	D.O. (V)	D.O. (B)	D.O.
0	0,0758	0,205	0,571	0,239
5,41	0,0235	0,148	0,987	0,231
7,77	0,0509	0,147	1,04	0,248
8,99	0,0365	0,0725	0,417	0,145
9,6	0,0285	0,0661	0,354	0,127
13,1	0,0477	0,0717	0,364	0,139
19	0,0472	0,138	0,52	0,192
19,7	0,0472	0,141	0,647	0,211
21,7	0,05	0,157	1,62	0,27
25,8	0,0559	0,0843	0,201	0,109
26,9	0,05	0,0785	0,195	0,104
28,4	0,0488	0,0828	0,264	0,122
30,6	0,0446	0,113	0,42	0,164
36,7	0,0558	0,11	0,483	0,179
40,3	0,0426	0,0798	0,214	0,106
43,5	0,0231	0,0286	0,0227	0,0248

Présentation des résultats pour la ligne 3

Tableau des résultats : Ligne 3

Position des Pics (mm)	Abs. (R) %	Abs. (V) %	Abs. (B) %	Abs. %	Pigments	Rf	I sous le pic (RVB) en absorbance
0	19,2	40,2	74,7	44,7	ligne de dépôt (RCC, FCC, NCC, YCC) ?	0	
5,41	5,1	28,6	90,1	41,2		0,124	
7,77	11,7	29,3	90,9	44,0	xanthophylle	0,178	2098,00
8,99	8,06	15,4	61,7	28,4		0,206	
9,77	6,35	14,1	55,7	25,4	pigment vert pâle (Chlorophyllide ?)	0,220	329,71
13,3	10,4	15,2	56,8	27,5	pigment vert pâle (Phéophorbide ?)	0,301	962,02
19,0	12,0	28,9	72,3	37,8	jaune pâle (?)	0,436	
19,7	11,0	28,6	78,9	39,5	jaune (?)	0,452	1209,50
21,7	11,0	30,6	98,3	46,6	**pigment jaune intense (?)**	0,498	2056,50
25,8	12,6	18,5	37,9	23,0	phéophytine	0,593	390,67
27,0	10,1	15,8	35,8	20,6	jaune pâle (?)	0,618	
28,5	10,9	17,9	46,9	25,2	jaune pâle (?)	0,652	
30,6	9,38	23,4	63,7	32,1	**jaune (?)**	0,703	2034,50
36,5	12,3	23,0	68,2	34,5	**jaune (?)**	0,843	1131,40
40,3	9,66	17,6	41,9	23,1	β-carotène	0,926	960,88
43,5	5,17	5,81	5,03	5,34	front de l'éluant	1	

Commentaires :

- Le nombre de pics dans le bleu et donc de bandes de couleur jaune est nettement plus élevé pour la ligne 3 que pour la ligne 1 et la ligne 2. La densité optique de 2 bandes jaunes situées au dessus de la phéophytine augmente sensiblement (voir pigment en caractères gras dans le tableau de résultats). La localisation de ces bandes, au dessus de la phéophytine, indique qu'il s'agit de pigments relativement apolaires

- la densité optique de la bande jaune située juste en dessous de la phéophytine augmente progressivement : ligne 1 (20,1 mm et 32,6%), ligne 2 (22,4 mm et 42,1%) et ligne 3 (21,7 mm et 46,6%).

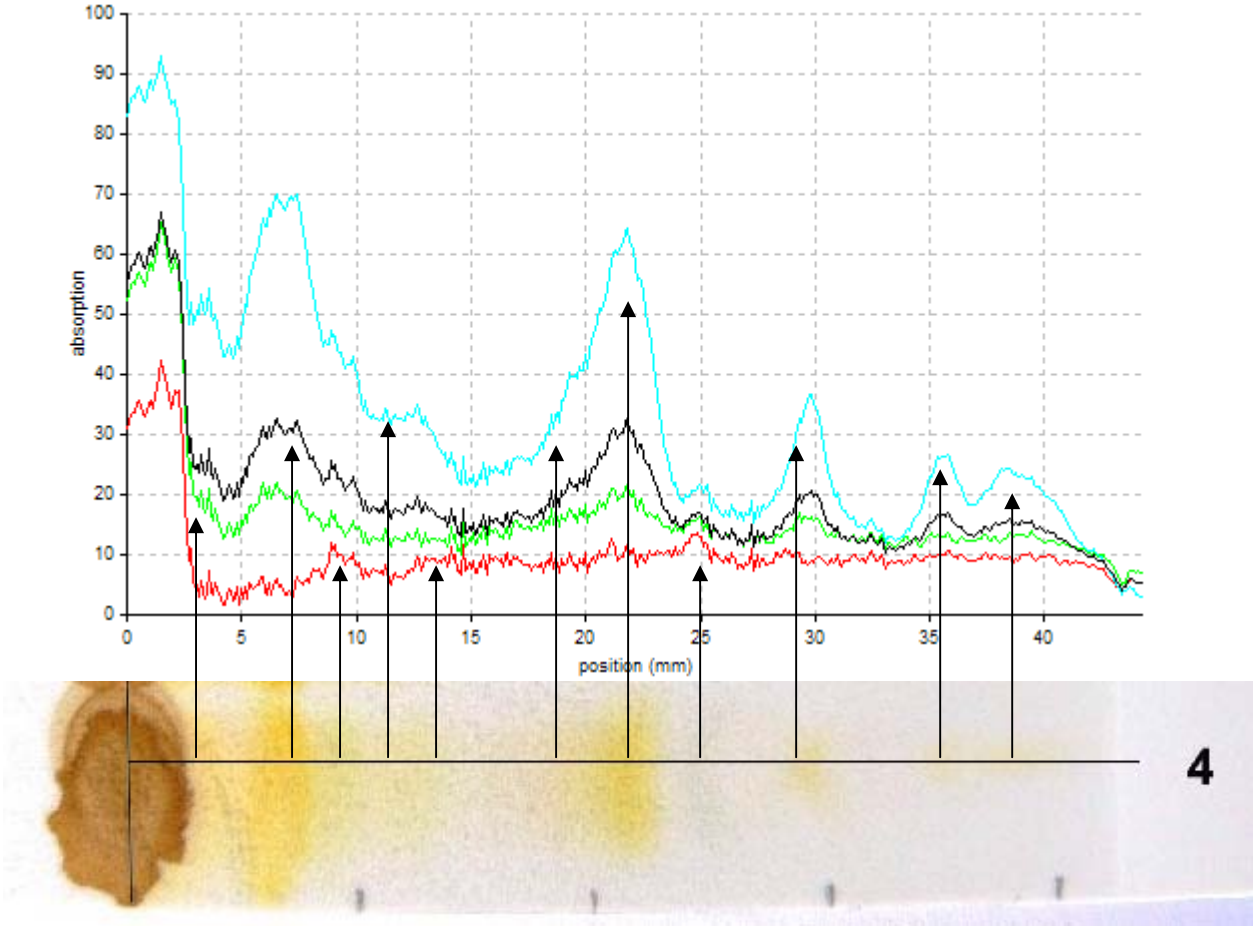
- La photo du chromatogramme pourrait laisser penser que la tache de dépôt de la ligne 3 est endommagée, or ce n'est pas le cas. L'aspect translucide de la tache de dépôt pourrait faire penser à la présence d'un produit incolore hydrosoluble qui n'aurait donc pas migré mais les mesures montrent une augmentation de l'absorption dans le vert (40,2 %) par rapport aux lignes 1 (34,2%) et 2 (24,1%). Il pourrait peut-être s'agir du catabolite rouge (RCC), hydrosoluble, de la chlorophylle.

- L'absorption élevée dans le bleu au niveau de la tache de dépôt (74,7%) pourrait indiquer la présence du catabolite jaune (YCC) hydrosoluble à ce niveau.
- Il n'est pas possible d'identifier de façon formelle les pigments ou produits de dégradation sans avoir recours à des analyses plus sophistiquées (HPLC, RMN).

IV. MESURES EFFECTUEES SUR LA LIGNE 4 du chromatogramme: extrait total des pigments de feuilles jaune brun de l'érable.

Mesure d'intensité de couleur sur une ligne : mesure linéaire en absorbance (%)

Courbe noire : moyenne dans l'ensemble des 3 canaux ; courbe rouge : dans le canal rouge ; courbe bleue : dans le canal bleu ; courbe verte : dans le canal vert.



Données « mesurim pour des valeurs choisies En absorption linéaire position mm	(R) %	(V) %	(B) %	absorption %
0	31,1	52,4	83	55,5
1,48	42,3	65,5	92,9	66,9
3,58	7,45	21	54,3	27,6
6,46	5,45	21,2	69,3	32
8,9	12	17,2	47,4	25,5
9,86	10,5	15,7	42,9	23
12,7	9,66	14,2	34,9	19,6
14,1	11,3	14,8	27,2	17,7
14,7	11,6	15,4	26,2	17,7
15,5	10,2	14,7	25,2	16,7
19,4	9,34	17,2	39,8	22,1
21,2	12	20,9	59,9	30,9
21,8	11,7	21,6	64,2	32,5
24,9	13,7	16	21	16,9
26,4	10,4	14,4	18,3	14,4
27,2	11	14,9	18,9	14,9
29,8	8,59	16	36,7	20,4
32,5	10,5	13,8	15,9	13,4
35,8	10,7	13,6	26,7	17
38,3	9,38	12,5	24,3	15,4
42,1	8,38	10,3	10,8	9,84
43,5	4,78	5,45	4,1	4,78

Position mm	D.O. (R)	D.O. (V)	D.O. (B)	D.O.
0	0,162	0,323	0,769	0,352
1,48	0,239	0,462	1,15	0,48
3,23	0,0255	0,0998	0,331	0,134
3,49	0,0166	0,0847	0,308	0,12
4,36	0,0138	0,0663	0,252	0,0994
6,54	0,0273	0,107	0,525	0,172
8,9	0,0554	0,0821	0,279	0,128
9,86	0,0481	0,0743	0,244	0,114
11,3	0,0385	0,0668	0,183	0,0918
12,7	0,0441	0,0666	0,186	0,0947
14,1	0,0519	0,0695	0,138	0,0848
15,5	0,0465	0,069	0,126	0,0793
19,5	0,0383	0,0769	0,219	0,105
20,7	0,0436	0,0858	0,307	0,131
21,4	0,0417	0,0921	0,398	0,151
21,8	0,054	0,106	0,447	0,171
22,4	0,0465	0,0925	0,355	0,145
25	0,0613	0,0769	0,105	0,0808
29,8	0,039	0,0758	0,198	0,0992
32,5	0,0483	0,0643	0,075	0,0624
35,6	0,0462	0,0609	0,133	0,0784
38,4	0,0428	0,0611	0,122	0,074
43,5	0,0213	0,0244	0,0182	0,0213

Présentation des résultats pour la ligne 4

Tableau des résultats : Ligne 3

Position des Pics (mm)	Abs. (R) %	Abs. (V) %	Abs. (B) %	Abs. %	Pigments	Rf	I sous le pic (RVB) en absorbance
0	31,1	52,4	83,0	55,5	ligne de dépôt (RCC, FCC, NCC, YCC) ?	0	
1,48	42,3	65,5	92,9	66,9			
3,58	7,45	21,0	54,3	27,6	bande jaune pâle	0,082	487,44
6,46	5,4	21,2	69,3	32,0	**bande jaune xanthophylle**	0,148	1269,70
8,9	12,0	17,2	47,4	25,5	bande vert pâle	0,204	297,54
14,1	11,3	14,8	27,2	17,7			
14,7	11,6	15,4	26,2	17,7	bande vert très pâle	0,337	191,98
15,5	10,2	14,7	25,2	16,7			
19,4	9,34	17,2	39,8	22,1			
21,2	12,0	20,9	59,9	30,9	bande jaune pâle	0,487	577,43
21,8	11,7	21,6	64,2	32,5	bande jaune intense	0,501	1755,00
24,9	13,7	16,0	21,0	16,9	**Phéophytine**	0,572	317,81
29,8	8,59	16,0	36,7	20,4	tache jaune	0,685	822,75
32,5	10,5	13,8	15,9	13,4			
35,8	10,7	13,6	26,7	17,0	petite tache jaune	0,823	536,42
38,3	9,38	12,5	24,3	15,4	β-carotène	0,967	946,98
43,5	4,78	5,45	4,1	4,78	front de l'éluant	1	

Commentaires :

- **La bande jaune** identifiée comme celle d'un xanthophylle, bien qu'elle reste un point de repère, perd en intensité (ligne 2 : 2484,6 ; ligne 3 : 2098,0 ; ligne 4 : 1269,7).
- **La bande jaune,** située en dessous de la phéophytine, reste un autre point de repère et perd également en intensité (ligne 2 : 2546,7 ; ligne 3 : 2056,5 ; ligne 4 : 1755,0)
- **La phéophytine** diminue en intensité (ligne 2 : 568,91 ; ligne 3 : 390,67 ; ligne 4 : 317,81).
- **La tache de dépôt** présente un % d'absorption dans le vert qui varie de la façon suivante : ligne 1 : 34,2 % ; ligne 2 : 24,1% ; ligne 3 : 40,2% ; ligne 4 : 52,4%. Ceci indique l'accumulation d'une substance de couleur rouge hydrosoluble dans les feuilles jaunes.
- **L'absorption dans le bleu** au niveau de la tache de dépôt a augmenté (83%) par rapport à la ligne 3 (74,7%) ce qui pourrait correspondre à l'accumulation du produit final de la dégradation in vivo de la chlorophylle à savoir le catabolite jaune (YCC) hydrosoluble.

Conclusions :

1. La méthode.

- **Les mesures.**

Le logiciel prévoit deux types d'acquisition des résultats :

- **Soit on choisit les valeurs qui nous intéressent** et dans ce cas on pointe avec l'index sur un endroit précis (par exemple un pic) sur l'une des 4 courbes (noire, bleue, rouge ou verte) et on clique avec la souris. Le résultat s'affiche, dans le tableau, pour les 4 courbes. La difficulté réside dans le fait de pointer correctement lorsque les courbes sont très hérissées où présentent peu d'amplitude. **C'est la méthode que l'on a adoptée ici**.

- **Soit on demande l'affichage de toutes les valeurs sur les 4 courbes** et l'on obtient une dizaine de pages de résultats pour chaque graphique et pour chaque type de mesure. Il faut alors imprimer les pages de résultats et rechercher les pics pour chaque courbe. **Cette méthode donne des résultats plus fiables mais ne se justifie pas à ce niveau**.

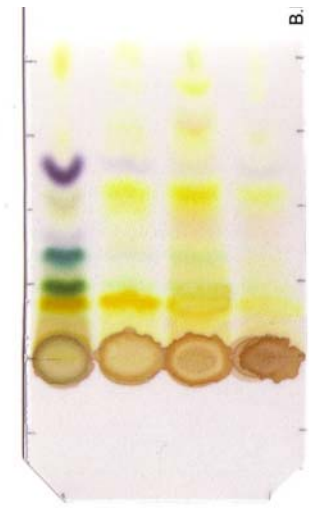
- **L'acquisition de l'image.**

Dans cet exercice, on a travaillé sur une seule photo. Toutes les conditions (luminosité, angle de prise de vue etc…) étant les mêmes pour les 4 lignes analysées. Cependant, il se révèle important que le chromatogramme soit parfaitement horizontal lors de la prise de vue.
On aurait tout aussi bien pu travailler sur l'image scannée.

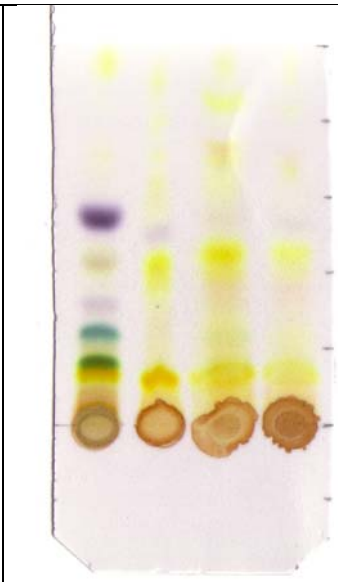
2. Les résultats.

Nous avons réalisé trois fois cette chromatographie, avec les mêmes extraits (conservés au réfrigérateur), mais à des dates différentes.

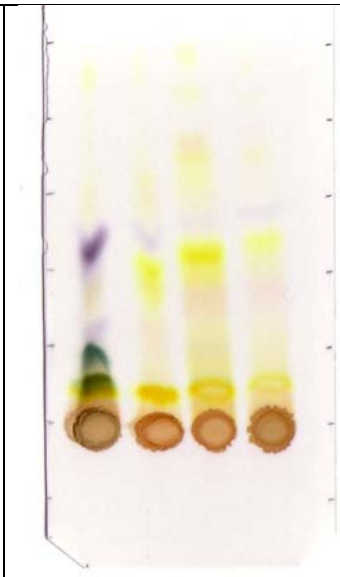
- L'expérience aurait intérêt à être réalisée avec des solvants de laboratoire.
- **Mis à part les pigments connus, il n'est pas possible d'identifier formellement les autres bandes sans faire appel à un spécialiste et à des analyses plus poussées.**



13-10-08
(front de l'éluant : 43,5 cm)



14-10-08
(front de l'éluant : ~ 5 cm)



17-10-08
(front de l'éluant : ~ 5 cm)

Sources :

Bibliographie:

- [1] Raven & col., *Biologie végétale,* traduction de la 7ème édition américaine, De Boeck Université, **2007,** photosynthèse p 124.
- [2] Hopkins, *Physiologie végétale,* traduction de la 2ème édition américaine, De Boeck Université, **2003,** les photorécepteurs, 7, 133 -140
- [3] Hopkins, *Physiologie végétale,* traduction de la 2ème édition américaine, De Boeck Université, **2003,** Bioénergétique et réactions photochimiques de la photosynthèse, 9, 163 -186
- [4] D. Voet, J.G. Voet, *Biochimie,* traduction française de la 3ème édition américaine, De Boeck Université, **2005,** Biosynthèse et dégradation de l'hème, 26, 26-4, 1013-1023.
- [5] C. Moussard, *Biochimie structurale et métabolique,* Médecine, pharmacie, sciences, 2è édition, **2004,** La photosynthèse (phase lumineuse), 21, 228-232
- [6] C. Moussard, *Biochimie structurale et métabolique,* Médecine, pharmacie, sciences, 2è édition, **2004,** Le métabolisme de l'hème, 28, 295-299.
- [7] D. K. Granner, R. K. Murray, V.W. Rodwel, *Biochimie de Harper,* traduction de la 3è édition, De Boeck, **2008,** Porphyrines et pigments biliaires, 34, 360-362.
- [8] J. Farineau, J-F. Morot-Gaudry, J-F. Soussana, *La photosynthèse : processus physiques, moléculaires et physiologiques,* édition Quae, **2006,** Le processus photosynthétique (pages consultées sur books.google.be).
- [9] G.A.F. Hendry, O. T.G. Jones, *Haems and chlorophylls: comparison of function and formation,* Review article, Journal of Medical Genetics, **1980,** 17, 1-4.

Sites Web :

- **Catabolisme de la chlorophylle *b*, structures, mécanismes et synthèse, auteur : P. Folly** http://ethesis.unifr.ch/theses/downloads.php?file=FollyP.pdf
- **Les plastes : illustrations cours BIO14 :** http://biologie.univ-mrs.fr/upload/p210/5_les_plastes_.pdf
- **Cours_Plastes_MJ07 :** http://biologie.univ-mrs.fr/upload/p222/Cours_Plastes_MJ07.pdf
- **Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules :** Techniques chromatographiques : la chromatographie liquide / mécanismes et modalités. http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/A62.html
- **Biologie et Recherche :** les différentes techniques de chromatographie. http://www.123bio.net/cours/chromato/introchromato.html
- **Propriétés sensorielles des denrées alimentaires et leurs modifications :** les chlorophylles et leur produits de dégradation. http://www.epsic.ch/Branches/chimie/denrees/30senso.pdf
- **Les pigments chloroplastiques :** extraction, séparation, purification, détermination des spectres d'absorption http://www.univ-orleans.fr/sciences/BIOLOGIE/ressources/TPPV/TPdoc/Pigments_chloroplastiques.htm