

## L'EXPERIENCE DE HILL

réaliser un protocole expérimental dans le respect des consignes de sécurité	
--	--

Maîtriser des outils : logiciel	
---------------------------------	--

### Mise en situation et recherche à mener

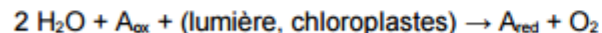
La synthèse de composés organique nécessite des composés apportant de l'Hydrogène, du Carbone, de l'énergie. Le processus de la photosynthèse est constitué de deux phases. La première phase est la phase photochimique. Elle se déroule dans les thylakoïdes chloroplastiques où l'énergie lumineuse est absorbée par les pigments chlorophylliens pour être convertie en énergie chimique. En 1939, le biochimiste anglais Robert Hill a expliqué l'origine du dégagement d'O<sub>2</sub> lors de la photosynthèse.

***On cherche à reproduire l'expérience de Hill de façon à comprendre son interprétation.***

### Ressources

#### Document : L'expérience de Robert Hill et son interprétation

Entre 1937 et 1939, Robert Hill montre expérimentalement que le dégagement d'O<sub>2</sub>, en présence de lumière lors de la photosynthèse, est la conséquence d'une réaction d'oxydoréduction\*. La réaction de Hill peut être résumée par l'équation-bilan suivante :



Où A est un accepteur d'électrons :

A<sub>ox</sub> = Accepteur oxydé

A<sub>red</sub> = Accepteur réduit

Robert Hill réalise son expérience sur une suspension de chloroplastes et utilise, en absence de CO<sub>2</sub>, un accepteur d'électrons : le ferricyanure de potassium (Fe<sup>3+</sup>).

*\*Une réaction d'oxydoréduction est caractérisée par un transfert d'électrons entre deux réactifs : un oxydant et un réducteur. Le premier subit alors une réduction (gain d'électrons) et le second une oxydation (perte d'électrons).*

#### Matériel disponible

##### Matériel biologique

- Feuilles d'épinard.

##### Matériel de laboratoire

- Mortier, ciseaux, entonnoir, bécher, erlenmeyer, pipettes...

##### Produits chimiques

- Tampon P-saccharose pour l'extraction des chloroplastes  
- Ferricyanure de potassium (réactif de Hill)

##### Matériel pour l'acquisition

- Chaîne ExAO  
- Capteurs : sonde oxymétrique (mesure de la concentration en O<sub>2</sub>), capteur de lumière  
- Lampe, cache noir.

### Etape 1 : Concevoir une stratégie pour résoudre une situation problème (durée maximale : 10 minutes)

**Proposez une stratégie de résolution qui permettrait de montrer la réaction de hill et l'origine du dégagement de O<sub>2</sub>**

**Etape 2 : Mettre en œuvre un protocole de résolution pour obtenir des résultats exploitables**

**PREPARATION DU LOGICIEL**

- vérifier que la tablette soit bien allumée
- cliquer sur milab
- sélectionner le capteur O<sub>2</sub>
- choisir la durée d'échantillonnage
- étalonner la sonde

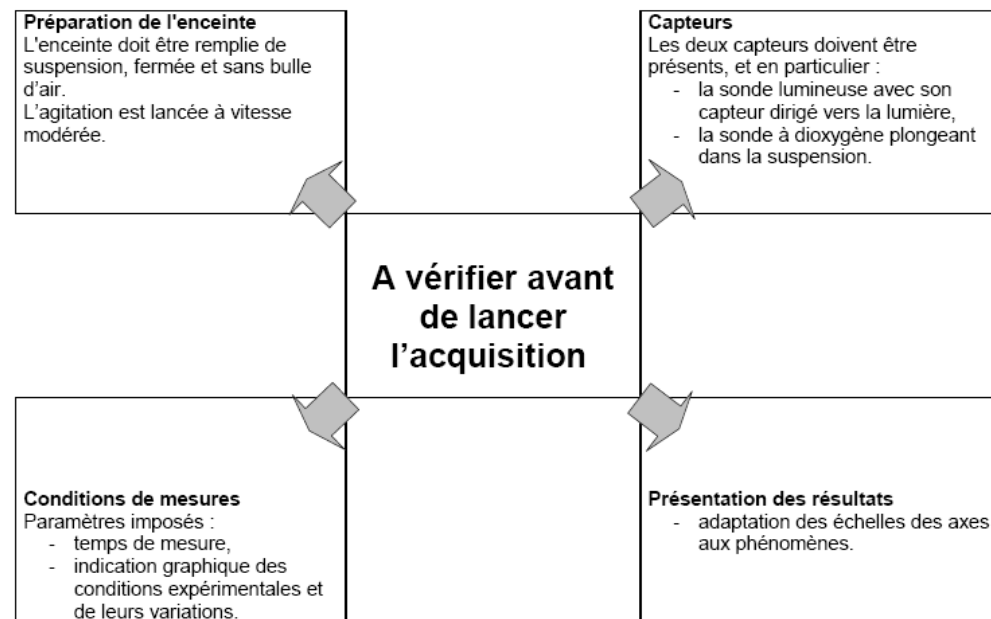
Extraction des chloroplastes		
<p><b>Matériel</b></p> <p><i>Matériel biologique</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Feuilles d'épinard</li> </ul> <p><i>Produit chimique</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tampon P-saccharose</li> </ul> <p><i>Matériel de laboratoire</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gaze, coton, papier aluminium</li> <li>- Entonnoir, papier filtre, mortier, ciseaux</li> <li>- Pipettes, erlenmeyer, bécher</li> <li>- Balance</li> </ul>	<p><b>Dispositif pour la filtration</b></p>	<p><b>Protocole</b></p> <p><b>NB.</b> L'extraction des chloroplastes doit s'effectuer au froid, <b>le plus rapidement possible.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Préparer dans un bécher 40 mL de tampon P-saccharose.</li> <li>- Découper en <b>très fines</b> lamelles 20 g de feuilles d'épinard bien vertes dans le mortier sortant du congélateur. <b>Ne pas utiliser les tiges.</b></li> <li>- Broyer énergiquement en ajoutant progressivement le tampon.</li> <li>- Filtrer dans un entonnoir garni de gaze (3 ou 4 épaisseurs) et de coton hydrophile.</li> </ul> <p>La suspension de chloroplastes doit être conservée à l'obscurité et au froid.</p>

Mesure de l'évolution de la concentration en dioxygène de la suspension		
<p><b>Matériel</b></p> <p><i>Dispositif ExAO</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Chaîne ExAO</li> <li>- Sonde oxymétrique</li> <li>- Capteur de lumière</li> <li>- Lampe, cache</li> <li>- Logiciel DataStudio et sa fiche technique</li> </ul> <p><i>Produit chimique</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ferricyanure de potassium = réactif de Hill</li> </ul> <p><b>A manipuler avec gants et lunettes</b></p> <p><i>Matériel de laboratoire</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Petite seringue</li> <li>- Pipette</li> </ul> <p><i>Matériel biologique</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Suspension de chloroplastes</li> </ul>	<p><b>Dispositif ExAO</b></p>	<p><b>Montage</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Remplissage du bioréacteur : 19 mL du filtrat obtenu.</li> <li>- Nettoyer éventuellement le vase thermostatique de toutes traces de suspension puis le remplir avec de l'eau froide.</li> <li>- Capteurs utilisés : sonde oxymétrique et capteur de lumière</li> </ul> <p><b>NB.</b> Vérifier l'absence de bulle d'air sous le capteur d'O<sub>2</sub> qui doit être immergé dans la solution.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Agitateur : position moyenne.</li> </ul> <p>Avant de démarrer la mesure :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Préparer la seringue contenant 0,2 mL de réactif de Hill sans l'introduire dans le bioréacteur..</li> <li>- Régler la position de la lampe.</li> <li>- Ajuster les deux moitiés du cache.</li> <li>- Attendre quelques minutes la stabilisation du taux d'O<sub>2</sub>.</li> </ul> <p><b>Acquisition</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3 minutes à l'obscurité (cache)</li> <li>- 6 minutes à la lumière et injection du réactif de Hill après 3 minutes d'éclairement.</li> <li>- 3 minutes à l'obscurité.</li> </ul> <p>Présenter la courbe obtenue à l'écran. Appeler pour vérification.</p>

Ranger le poste de travail en fin de manipulation.

### MISE EN ROUTE DE L'EXPERIENCE

- Verser du filtrat dans l'enceinte selon sa capacité.
- Fermer l'enceinte, vérifier l'absence de bulle d'air et la bonne position des capteurs.
- Mettre en fonction l'agitateur.
- Attendre la stabilisation des mesures puis lancer l'enregistrement.



### REMETTRE LE POSTE DE TRAVAIL A L'ETAT INITIAL

- Rincer la cuve sous le robinet : attention de ne pas faire tomber l'agitateur dans l'évier : utiliser la passoire.
- Rincer la tête de sonde à l'aide de la pissette.
- Ranger et nettoyer le poste de travail.

### ***Etape 3 : Présenter les résultats pour les communiquer***

Sous la forme de votre choix revoir, traiter les données obtenues pour les communiquer (Analyser le graphique obtenu et déterminer, dans le cas des chloroplastes isolés, les conditions nécessaires au déroulement de la phase photochimique de la photosynthèse)

### ***Etape 4 : Exploiter les résultats obtenus pour répondre au problème***

Ecrire les deux réactions (oxydation et réduction) correspondant à l'équation-bilan mentionnée dans le document et en déduire l'origine chimique de l'O<sub>2</sub> dégagé. Analyser les résultats obtenus de façon à montrer en quoi ils sont conformes à l'interprétation de Robert Hill.

## CORRIGÉ

1.

Pour reproduire l'expérience de Hill, d'après le document, il faut :

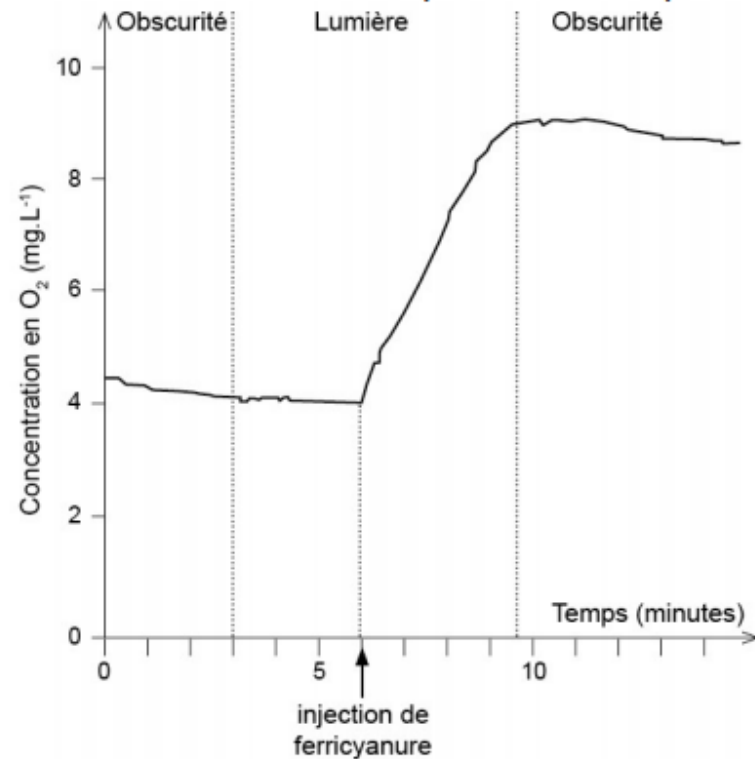
- extraire les chloroplastes des cellules des feuilles de façon à en obtenir une suspension : broyer les feuilles avec le tampon.
- placer la suspension dans le bioréacteur, sans  $\text{CO}_2$ , de façon à mesurer, avec la sonde, la variation de la concentration en  $\text{O}_2$  du milieu
- montrer que la lumière est indispensable donc prévoir une phase sans et avec lumière
- montrer qu'il faut un accepteur d'électrons, le ferricyanure, donc prévoir une phase avec et sans ferricyanure.

Le protocole peut être :

- lumière sans ferricyanure : normalement il ne doit pas y avoir dégagement d' $\text{O}_2$
- injection de ferricyanure : on doit observer un dégagement d' $\text{O}_2$  puisque toutes les conditions sont remplies
- obscurité : bien que le ferricyanure est présent, il ne devrait pas y avoir de dégagement d' $\text{O}_2$

3.

**Evolution de la concentration d' $\text{O}_2$  d'une suspension de chloroplastes en fonction de la lumière et de la présence d'un accepteur d'électrons**



4.

On observe que le dégagement d' $\text{O}_2$  n'a lieu qu'à la lumière, en présence d'un accepteur d'électrons, le ferricyanure.

Donc la lumière et un accepteur d'électrons sont indispensables pour obtenir un dégagement d' $\text{O}_2$ .

Le rejet d' $\text{O}_2$  est donc bien la conséquence d'une oxydoréduction.

En présence de lumière, on a donc une oxydation de l'eau :  $2 \text{H}_2\text{O} = 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^- + \text{O}_2$

Le ferricyanure est réduit :  $2 \text{Fe}^{3+} + 4 \text{e}^- = 2 \text{Fe}^{2+}$

L' $\text{O}_2$  vient donc de la molécule d'eau qui s'oxyde en présence de lumière dans les chloroplastes.

