

TP n° 3

Caractérisation des substances bioactives d'origine microbienne

1. Introduction

Dans un contexte où la demande en antioxydants naturels ne cesse de croître, notamment pour remplacer les antioxydants de synthèse dans les industries pharmaceutique et agroalimentaire, l'exploration du potentiel bioactif des microorganismes devient une priorité de recherche. Cependant, la production de ces métabolites varie considérablement selon les souches microbiennes, leur physiologie et les conditions de culture, nécessitant le développement de méthodes de criblage efficaces et reproductibles.

Ce travail pratique vise à comparer systématiquement le potentiel bioactif de deux modèles bactériens aux métabolismes distincts: *Bacillus*, connu pour sa production de peptides antimicrobiens et d'enzymes, et *Pseudomonas*, reconnu pour sa capacité à synthétiser des pigments et sidérophores.

2. Objectif

Objectif principal :

- Comparer le potentiel bioactif de deux genres bactériens (*Bacillus* et *Pseudomonas*) par l'extraction et la caractérisation de leurs métabolites secondaires.

Objectifs spécifiques :

- Maîtriser les techniques d'extraction de métabolites bactériens.
- Dosage des composés phénoliques totaux par la méthode Folin-Ciocalteu.
- Évaluer l'activité antioxydante par le test DPPH.
- Interpréter les résultats en lien avec le métabolisme microbien.

3. Matériel et méthodes

3.1. Equipements et produits

Equipements	Consommables	Solutions préparées
- Centrifugeuse - Spectrophotomètre - Bain-marie 60 °C - Vortex - Chronomètre - Pipettes automatiques (10-100 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml)	- Tubes à centrifuger - Tubes à hémolyse - Cuvettes spectrophotométriques - Gants nitrile - Pipettes stériles	- Éthanol 70% - Solution de DPPH - Réactif de Folin-Ciocalteu - Carbonate de sodium - Acide gallique - Acide ascorbique

3.2. Protocole expérimentale

Partie 1: Extraction des métabolites

Étape 1: Centrifugation

1. Prendre 10 ml de culture bactérienne (Bacillus et Pseudomonas).
2. Répartir en 2 tubes de 15 ml (5 ml par tube).
3. Centrifuger: 4000 rpm × 10 min.
4. Éliminer soigneusement le surnageant.

Étape 2: Extraction

5. Ajouter 5 ml d'éthanol 70 % dans chaque tube.
6. Agiter vigoureusement au vortex 1 min.
7. Incuber au bain-marie 60 °C × 15 min.
8. Agiter doucement à mi-temps.

Étape 3: Récupération

9. Centrifuger : 4000 rpm × 10 min.
10. Récupérer le surnageant (= extrait brut).
11. Étiqueter : "**Extrait Bacillus**" et "**Extrait Pseudomonas**".
12. Conserver sur glace.

Partie 2: Dosage des composés phénoliques

Principe: Les composés phénoliques réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu, produisant une coloration bleue mesurable à 765 nm.

P.S: Reportez-vous à votre fiche TP 02.

Partie 3: Test antioxydant DPPH

Principe: Les antioxydants réduisent le radical libre DPPH•, provoquant une décoloration de la solution violette.

P.S: Reportez-vous à votre fiche TP 02.

COMPTE-RENDU

1. Comparez quantitativement la production de composés phénoliques entre les deux souches. En vous appuyant sur la littérature, reliez ces différences aux voies métaboliques spécifiques de chaque genre bactérien et à leur écologie.
2. Analysez la corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante mesurée. Discutez des facteurs qui pourraient expliquer une éventuelle absence de corrélation, en considérant la spécificité structurale des métabolites.
3. Pourquoi utilise-t-on l'acide gallique comme étalon et l'acide ascorbique comme témoin positif ?

4. Identifiez les principales limitations des méthodes colorimétriques utilisées et proposez pour chacune une approche alternative permettant de les contourner.
5. La méthode de Folin-Ciocalteu est-elle spécifique aux seuls composés phénoliques? Discutez des interférences potentielles avec d'autres métabolites bactériens et proposez une méthode complémentaire pour confirmer la nature phénolique des composés détectés.
6. En vous appuyant sur les différences observées entre *Bacillus* et *Pseudomonas*, discutez le lien possible entre la structure chimique des métabolites produits et leur activité antioxydante. Quels facteurs physiologiques pourraient expliquer les variations inter-espèces ?
7. Le test DPPH mesure-t-il fidèlement le potentiel antioxydant en conditions biologiques ? Comparez les limites de cette méthode in vitro avec les mécanismes antioxydants in vivo et proposez un protocole pour évaluer l'activité biologique réelle.
8. En considérant vos résultats, évaluez le potentiel d'application industrielle des extraits bactériens étudiés. Quels défis techniques devraient être relevés pour passer d'une détection en laboratoire à une production à grande échelle ?
9. Comment pourriez-vous intégrer ces résultats dans une étude métabolomique plus globale ? Proposez une stratégie multi-omique pour identifier précisément les métabolites responsables de l'activité observée et comprendre leur régulation.
10. Synthétisez l'ensemble de vos résultats en proposant une hypothèse intégrée sur le potentiel bioactif des deux souches étudiées.