

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA de BEJAIA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie



جامعة بجاية
Tasdawit n'Bgayet
Université de Béjaïa



Mémoire de Fin de Cycle

*En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Microbiologie
Option Microbiologie Alimentaire et Sanitaire*

Thème :

**Optimisation de la production des exopolysaccharides
(EPS) par *Lactococcus lactis ssp.lactis* DZ en fonction
de la source de carbone**

Présenté par:

M^r HENNANE Mustapha

M^r KARI Lyes

Membres de jury:

Président: M^{me} GHAROUT A. MAA

Promotrice: M^{elle} BENDALI F. MCA

Examinatrice: M^{me} BENACHOUR K. MAA

Examineur: M^r BENDJEDDOU K. MCB

Promotion 2012/ 2013

Remerciements

Nous remercions en premier lieu monsieur BOUKHALFA F., de nous avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail et d'en être le président, Madame BENACHOUR K. et Monsieur BENDJEDDOU K., d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de nous avoir accompagné pendant nos études.

Nous tenons à remercier vivement les chefs de services Monsieur BENOMAIR M., Madame BOUKARA K. et Madame BAKHMTI F. pour leur accueil au sein, respectivement, des services de Contrôle et Stérilité microbiologique, Contrôle qualité et inspection et d'analyses physico-chimiques, du laboratoire central du complexe ANTIBIOTICAL de SAIDAL (Médéa, Algérie). Grâce à eux, nous avons pu réaliser ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de nos vifs remerciements.

Nous remercions également notre chère promotrice Melle BENDALI F., maître de conférences A à l'université de Bejaia et vice doyen chargé de la post gradation, de la recherche scientifique et des relations extérieures de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (FSNV) pour avoir accepté de diriger ce travail. Son soutien et ses encouragements ont vu l'accomplissement de ce mémoire.

Un immense merci à une perle pour la microbiologie à l'université de Bejaia le professeur Madame SADOON D., directrice du laboratoire de Microbiologie Appliquée et chef de l'équipe « Microbiologie de lait et des probiotiques » de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (FSNV) pour la formation pédagogique durant notre cursus.

Nous tenons également à adresser nos remerciements à tous nos enseignants qui nous ont accompagné pendant nos études universitaires.

Ce travail à l'interface de plusieurs disciplines nous a amené à rencontrer des gens de tous les horizons et spécialités, chaque rencontre a été extrêmement enrichissante. Un grand merci notamment à Monsieur AIT SIDHOUM D., Maître assistant A au département des Sciences Biologiques de l'Environnements (FSNV, université de Bejaia), pour nos discussions enflammées sur la Bio-statistique.

Nos remerciements vont aussi aux Doctorantes AIT MEDDOUR A. et BELKASMI O. des départements « Microbiologie » et « Sciences alimentaires », respectivement (FSNV, université de Bejaia) pour leur aide.

Nos remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué de près ou du loin à la réalisation de ce mémoire : Messieurs BENZINA M., DERGUA K. et BOUKHAKHAL K. pour leur précieuse aide, leur enthousiasme, leur soutien ainsi que pour leurs efforts.

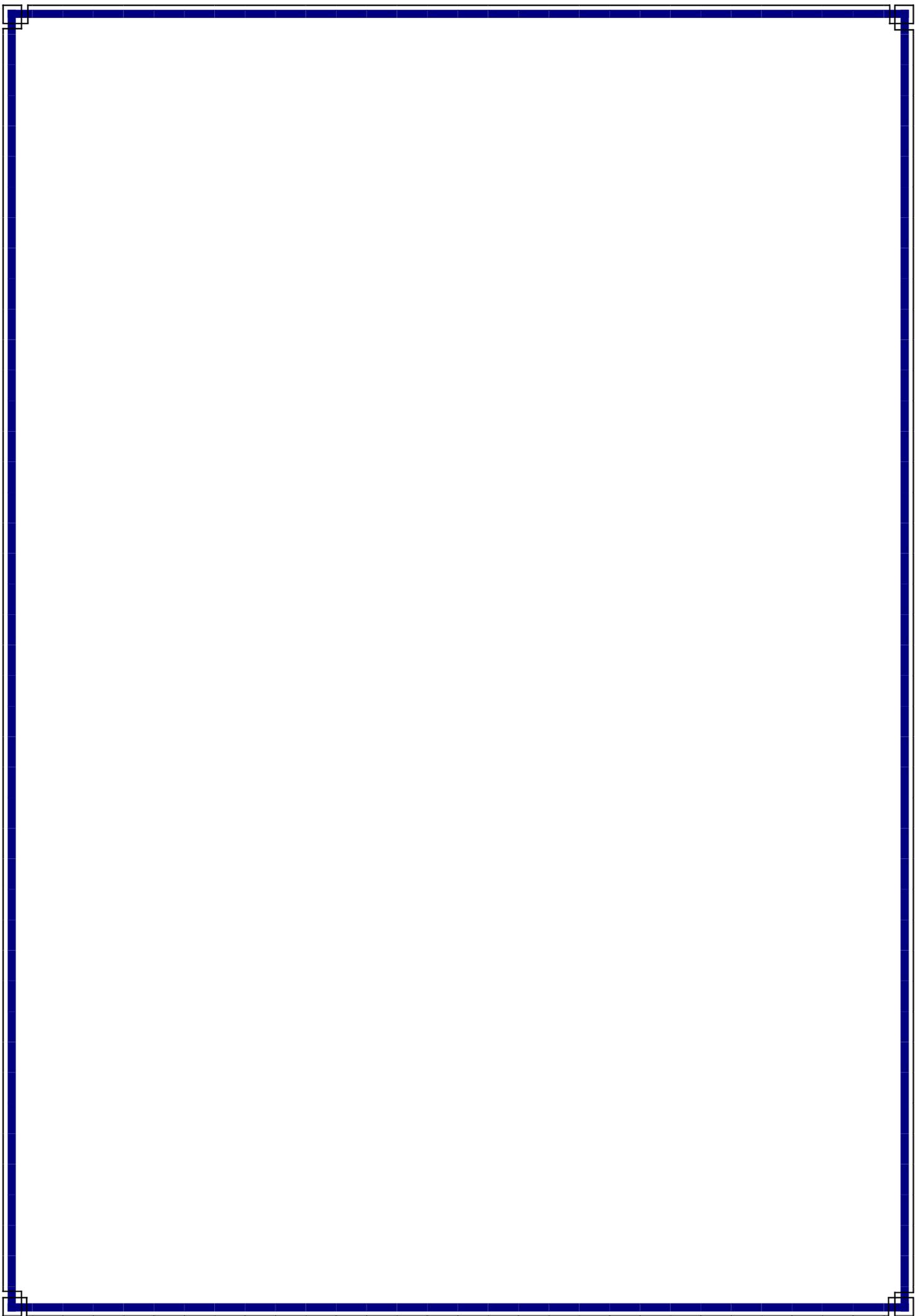
Un grand merci aux messieurs OUARED A. et HANTABLI A. du laboratoire de contrôle microbiologique d'avoir passé vérifier nos échantillons durant tous les weekends et nous avoir remonté le moral dans les périodes de doutes.

Nous remercions également Mr SOUCI A /H du département de physique (Faculté des Sciences exactes, université de Béjaia) pour ses éclaircissements sur l'interprétation des spectres FT-IR.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude aux Ingénieurs de laboratoire : BELLATRACHE S., ZOUAMBIA F., BENIACHE F., Ami CHAABANE, LAISSAOULI L., BENCHANA H., RAHIMI S., Ami TAIB, ABDALLI N., SKENDER A., MEDIADJI O., et ami Mohammed, Khalti Elyamna, respectivement, du laboratoire central et du laboratoire de Microbiologie Industrielle (VRAC) pour leur disponibilité et leur confiance. Nous adressons de vifs remerciements à Monsieur BOUKHATEM R. pour son aide quotidienne notamment à la préparation des réactifs ainsi que pour sa bonne humeur et sa sympathie.

Nous remercions également Mesdames KHELLAF M. et KICHI N., les Ingénieurs du laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'université de Bejaia et tous ceux que nous n'avons pas cité et qui nous ont pourtant aidé.

Merci à tous



Dédicaces

Ce travail est dédié :

A la mémoire de mon père :

A toi qui m'a donné la chance de vivre, qui m'a toujours encouragé et soutenu, toi qui m'a légué la verve de la connaissance, qui m'a guidé et orienté et qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

A ma très chère mère (**Ôuda**)

A mes très chers sœurs et frères

A mes très chers nièces et neveux

A mon camarade et ami Lyes

Mustapha

J'ai le plaisir de dédier ce travail à :

La mémoire de mon oncle, que dieu le reçoit dans son vaste paradis

Ceux qui sont mon exemple de la réussite, que j'aime

Et que je respecte, qui m'ont donné de l'amour ;

de la tendresse, du soutien et de la force :

Mes très chers parents,

que Dieu vous protège et vous prête une longue et heureuse vie.

Mes chères sœurs

Mes tantes et oncles

A mon camarade et ami Mustapha

Lyes

Liste des tableaux dans l'annexe

Tableau I : Milieux utilisés pour la production des exopolysaccharides (EPS) par les bactéries lactiques.

Tableau II : Résultats de la croissance des cultures bactériennes.

Tableau III: Résultats de la production des EPS par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ en fonction de la concentration de glucose.

Tableau IV : Résultats de la production des EPS par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ en fonction de la concentration de saccharose.

Tableau V : Résultats de la production des EPS par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ en fonction de la concentration de lactose.

Tableau VI : Résultats de la production des EPS par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ en fonction de la concentration de fructose.

Tableau VII : Résultats de la croissance et de la production des EPS en variation de la concentration de glucose dans le milieu.

Tableau VIII : Résultats de la croissance et de la production des EPS en variation de la concentration de saccharose dans le milieu.

Tableau IX : Résultats de la croissance et de la production des EPS en variation de la concentration de lactose dans le milieu.

Tableau X: Résultats de la croissance et de la production des EPS en variation de la concentration de fructose dans le milieu.

Liste des figures

Figure01 : Structure de quelques homopolysaccharides produits par des bactéries lactiques.....	4
Figure 02 : Structure d'un hétéropolysaccharide produit par <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> SBT0495.....	5
Figure 03 :Vue globale du métabolisme des sucres et de la biosynthèse des EPS chez les bactéries lactiques.....	7
Figure 04 : Modèle de la biosynthèse d'EPS par <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> NIZOB40	8
Figure 05 : Préparation des pré-cultures bactériennes.....	15
Figure 06 : Préparation des cultures bactériennes	17
Figure 07 : Variation de la Croissance de <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> DZ, dans le bouillon MRS, au bout de 72 h à 25°C, en fonction de concentrations croissantes de glucose.....	21
Figure 08 : Variation de la croissance de <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> DZ, dans le bouillon MRS, au bout de 72 h à 25°C, en fonction de concentrations croissantes de saccharose.....	22
Figure 09 : Variation de la croissance de <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> DZ, dans le bouillon MRS, au bout de 72 h à 25°C, en fonction de concentrations croissantes de lactose.....	23
Figure 10 : Variation de la croissance de <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> DZ, dans le bouillon MRS, au bout de 72 h à 25°C, en fonction de concentrations croissantes de fructose.....	24
Figure 11 : Variation du taux de production des EPS par <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> DZ en fonction de la concentrations croissantes de glucose.....	26
Figure 12 : Variation du taux de production des EPS par <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> DZ en fonction de la concentration de saccharose.....	27
Figure 13 :Variation du taux de production des EPS par <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> DZ en fonction de la concentration de lactose.....	28
Figure 14 : Variation du taux de production des EPS par <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> DZ en fonction de la concentration de fructose.....	29

Figure 15: Variation du taux maximal de production des EPS par <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> DZ en fonction de la concentration des différents sucres (glucose, saccharose, lactose et fructose).....	30
Figure 16: Corrélation entre la croissance maximale et le taux de production des EPS par <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> DZ en fonction de concentrations croissantes de glucose (A), saccharose (B), lactose (C) et fructose (D) dans le milieu.....	33
Figure 17. Spectre FT-IR des EPS produit par <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> DZ.....	37
Figure 18. Profile obtenu après CCM de l'extrait d'EPS produit par <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> DZ.....	38

Liste des figures de l'annexe

Figure 01 : Courbe de croissance de *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ.

Figure 02 : Courbe standard ($A_{492} = f[\text{glucose}]$).

Liste des abréviations

A: Absorbance

ANOVA: Analysis of Variance

ATCC: American Type Culture Collection

a_w: Activity of water

BMM : basal minimal medium

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CPS: Capsular PolySaccharide

DO: Densité Optique

EPS: ExoPolySaccharide

FT-IR: Fourier Transforme InfraRed

GRAS: Generally Recognized As Safe

HePS : Heteropolysaccharides

HoPS : Homopolysaccharides

Lc.: *Lactococcus*

Ln.: *Leuconostoc*

LPS : Lipopolysaccharides

MRS: de Man Rogosa et Sharpe

P/V: Poids/Volume

Sc.: *Streptococcus*

TCA : TriChloroAcétate

UFC : Unité Formant Colonie

V/V: Volume /Volume

WPC: Whey Permeate Concentrate medium

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

Synthèse bibliographique

I. Classification des EPS	3
I.1. Classification selon leur localisation	3
I.2. Classification selon leur composition et structure	3
II. Biosynthèse des EPS	6
III. Production des EPS par les bactéries lactiques	8
III. 1. Température.....	8
III. 2. Milieu de culture et source de carbone.....	9
III. 3. pH	9
IV. Rôle physiologique des EPS	10
V. Applications des EPS	10
V.1. Applications alimentaires	10
V. 2. Applications non alimentaires	12

Partie Pratique

I. Matériel et méthodes

I. 1. Souche utilisée	14
I. 2. Revivification de la souche.....	14
I. 3. Production des exopolysaccharides (EPS).....	14
I. 3.1. Préparation des pré- cultures bactériennes.....	14
I. 3. 2. Réalisation des cultures bactériennes	16
I. 4. Extraction et quantification des EPS.....	16
I. 4. 1. Extraction des EPS	16
4. 2. Dosage des EPS	18
I. 5. Analyse chimique des EPS.....	19
I. 5. 1. Caractérisation spectrale des EPS par FT-IR	19

I. 5.2 .Caractérisation des EPS par chromatographie sur couche mince.....	19
I. 6 .Analyse statistique	20
II. Résultats et discussion	
II. 1. Croissance bactérienne en fonction du type de sucre et de sa concentration	21
II. 1. 1. En présence de glucose.....	21
II. 1. 2. En présence de saccharose.....	22
II. 1. 3. En présence de lactose.....	23
II. 1. 4. En présence de fructose.....	24
II. 2. Taux de production des exopolysaccharides	26
II. 2. 1. En présence de glucose.....	26
II. 2. 2. En présence de saccharose.....	27
II. 2. 3. En présence de lactose.....	28
II. 2. 4. En présence de fructose.....	29
II. 2. 5. Comparaison entre les différents sucres	29
II. 2. 6. Discussion générale des résultats du taux de production.....	30
II. 3. Corrélation entre le taux de croissance et la production des EPS	33
II. 4. Analyse chimique des EPS	35
II. 4.1. Caractérisation spectrale des EPS par FT-IR.....	35
II. 4.2. Analyse chimique des EPS par chromatographie sur couche mince (CCM)	38
Conclusion	40

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Le terme d'exopolysaccharide (EPS) a été proposé comme appellation générale pour les polymères de sucres sécrétés à l'extérieur de la cellule (**Sutherland, 1982**).

Les EPS sont constitués de résidus monosaccharidiques reliés entre eux par des liaisons glycosidiques. Ces liaisons se forment par élimination d'une molécule d'eau entre le groupe hémiacétal hydroxyle de l'extrémité de l'un et le groupe hydroxyle du résidu suivant (**Dupont, 1998**).

Les sources de production des polysaccharides peuvent être d'origine végétale (amidon, pectine, cellulose) ou algale (alginate, agar, carraghénane). Les microorganismes représentent aussi une riche source d'agents épaississants, émulsifiants ou gélifiants, mais selon leur origine, le polymère extrait est utilisé plutôt que la bactérie productrice, lorsqu'elle n'est pas de grade alimentaire (le xanthane produit par *Xanthomonas campestris*, dextrane par *Leuconostoc mesenteroides*, glucane formé par *Streptococcus mutans* et levanes produits par *Streptococcus salivarius*) (**Dridier et Prevost, 2009**).

Les EPS microbiens sont des polymères biosynthétiques ou biopolymères définis par **Geesey (1982)** comme étant des « substances polymériques extracellulaires d'origine biologique qui participent à la formation des agrégats microbiens ». D'autres auteurs tels que **Characklis et Wilderer (1989)** vont plus loin définissant les EPS comme des « polymères organiques qui sont souvent responsables dans les biofilms de la cohésion des cellules et de leur adhésion sur des substrats » (**Garrido et al., 2002**).

La diversité dans la composition chimique des polysaccharides microbiens leur confère une variété de propriétés qui ne peuvent être trouvés dans des polysaccharides végétaux (**Liu et al., 2010**). De nombreux microorganismes en sont producteurs, cependant, depuis quelques années, une attention croissante est portée sur les bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides (**Dupont, 1998**).

Les bactéries lactiques sont reconnues comme GRAS (**Generally Recognized As Safe**) ce qui rend leurs EPS très convoités par l'industrie agroalimentaire (**Pan et al., 2013**). D'un point de vue technologique, la production d'EPS par les bactéries lactiques présente un intérêt industriel car elle confère au produit ses propriétés rhéologiques (texture, épaississement, stabilisation) et permet la production de produits « innovants » (**Doublier et al., 2000**).

C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail qui vise à optimiser la production des exopolysaccharides produits par une souche de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DZ, en jouant sur le type et la concentration de la source de carbone. Les objectifs tracés étant les suivants :

- Mise en évidence de l'influence du type de sucre et de sa concentration sur la croissance et la production des EPS par la souche étudiée.
- Extraction et purification des EPS produits sous les conditions optimisées.
- Quantification et caractérisation chimique des EPS produits.

Pour cela on a posé cette principale question :

Quel est le type et la concentration de la source de carbone assurant une bonne production d'EPS par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DZ?

Dans ce document, après une synthèse bibliographique succincte relative au sujet, la méthodologie adoptée suivie des résultats obtenus et de leur discussion seront présentées.

Synthèse bibliographique

I. Classification des EPS

Plusieurs classifications ont été proposées :

I. 1. Classification selon leur localisation

Les bactéries lactiques, tout comme d'autres micro-organismes, synthétisent plusieurs types de polysaccharides qui peuvent être classés selon leur localisation dans la cellule. Certains se trouvent dans le cytosol et servent de source de carbone et d'énergie, d'autres sont les constituants de la paroi tels que le peptidoglycane et les acides téichoïques et un troisième groupe est élaboré et excrété dans le milieu de culture (**de Roissart, 1994; Douaire, 2010**).

Chez les bactéries à Gram négatif, dont les cyanobactéries, les polysaccharides sont présents au niveau de la paroi cellulaire (les lipopolysaccharides : LPS), à l'extérieur de la cellule mais liés à cette même cellule (polysaccharide capsulaire :CPS) soit encore libres dans le milieu de culture sous forme d'exopolysaccharides (EPS) (**Venzke, 2005**). Certaines bactéries lactiques semblent être pourvues d'une pellicule polysaccharidique (**Chapot-Chartier et al., 2010**).

I. 2. Classification selon leur composition et structure

Devant la grande diversité de composition et de structure des EPS, il est difficile d'en établir une classification. La nature de leurs composants a cependant permis de les diviser en deux classes: les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides. Cette nomenclature proposée par **Sutherland dès 1972**, a été adoptée et reprise par de nombreux auteurs.

I. 2. 1. Homopolysaccharides

Les homopolysaccharides sont composés de monosaccharides identiques, mais peuvent posséder des propriétés physiques très différentes; ils sont classés en quatre groupes :

Les α - glucanes: Principalement constitués de résidus α -D glucose liés en α (1-6) et α (1-3), à savoir les dextrans produits par *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* et les mutanes produits par *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus* (**Cerning, 1990**). *Lactobacillus* spp. G-77 produit un α -glucane composé d'unités trisaccharidiques de α -D glucose liées en α (1-6) et α (1-2) (figure 01)

Les β - glucanes : Produits par *Lactobacillus* spp.G-77 et *Pediococcus damnosus* sont composés d'unités répétitives trisaccharidiques de β -D glucose liées en β (1-3) et β (1-2) (figure 01).

Les galactanes : *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* H414 produit un homopolysaccharide composé d'unités répétitives pentasaccharidiques branchés de α et β -D- galactose liés en β (1-3) et β (1-4) (figure 01).

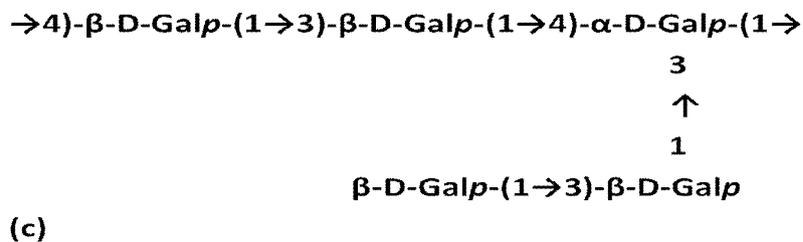
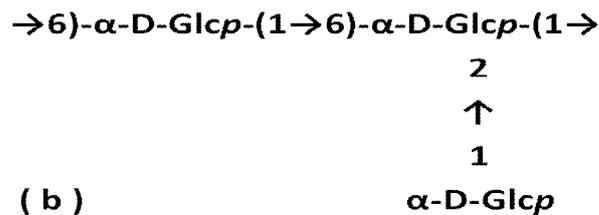
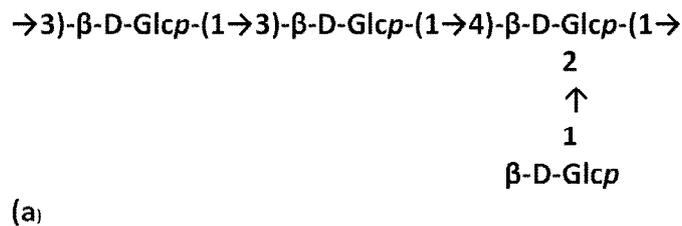


Figure 01: Structure de quelques homopolysaccharides produits par des bactéries lactiques.

(a) *Pediococcus damnosus* (Dueñas et al., 1997). (a,b) *Lactobacillus* spp. G-77

(Dueñas et al., 1998). (c) *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* H414 (Gruter et al., 1992).

Glcp: glucopyrannose ; Galp: galactopyrannose.

Les fructanes : composés principalement de résidus de fructose liés en β (2-6) tel que le levane produit par *Streptococcus salivarius* (Douaire, 2010).

I. 2. 2. Hétéropolysaccharides

Les hétéropolysaccharides contenant plusieurs types d'oses constitutifs, forment un groupe très hétérogène d'exopolysaccharides élaborés par les bactéries lactiques thermophiles et mésophiles (Cerning *et al.*, 1994).

Les unités répétitives des hétéropolysaccharides varient en nombre, soit di ou octasaccharides, constituées de combinaison de D-glucose, D-galactose, L-rhamnose, N-acétylglucosamine et N-acétylgalactosamine ou acide glucuronique; parfois des substituants non organiques sont présents, comme le phosphate et l'acétyle (Sikkema *et al.*, 1999; de Vuyst *et al.*, 2001).

Streptococcus thermophilus STD produit un hétéropolysaccharide composé de galactose, glucose, rhamnose et N-acétylgalactosamine dans une proportion de 3,5: 6,2: 1,2: 1,0 formant une unité répétitive tetrasaccharidique .

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* NCFB2074 produit un hétéropolysaccharide composé de galactose et de glucose dans une proportion de 3:4 formant une unité répétitive heptasaccharidique. Nakajima *et al.* (1992) ont rapporté que *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SBT0495 produit un exopolysaccharide phosphorylé (figure 02).

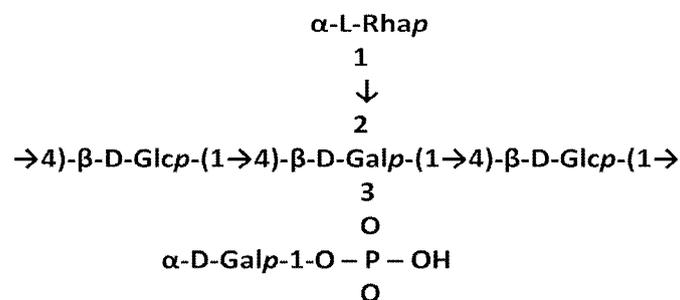


Figure 02: Structure d'un hétéropolysaccharide produit par *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SBT0495 (Nakajima *et al.*, 1992).

Glcp : glucopyrannose ; Galp : galactopyrannose ; Rhap: rhamnopyrannose.

II. Biosynthèse des exopolysaccharides des bactéries lactiques

Les EPS sont synthétisés au cours de différentes phases de la croissance et sous diverses conditions qui dépendent de la souche bactérienne. Le site de synthèse des EPS et la nature des précurseurs permettent de distinguer deux mécanismes principaux de biosynthèse par les bactéries lactiques: la synthèse en dehors de la cellule (homopolysaccharides) ou au niveau de la membrane cellulaire (hétéropolysaccharides).

Les homopolysaccharides (HoPs) sont synthétisés en dehors de la cellule grâce à des enzymes excrétés par la bactérie. Dans la production du dextrane, par exemple, seulement une enzyme est utilisée, la dextrane-sucrase. Cette enzyme est spécifique du saccharose et l'énergie pour la polymérisation vient de son hydrolyse.

La synthèse des hétéropolysaccharides (HePs), par contre, a lieu au niveau de la membrane cytoplasmique. Les EPS résultent de la polymérisation des unités répétitives formées dans le cytoplasme (**Cerning, 1990**).

Les sucres nucléotidiques, dérivés des glucides-1-phosphate, après avoir été transformés par des enzymes de déphosphorylation, d'épimérisation, de décarboxylation et de déshydrogénation sont assemblés par les glycosyl-transférases pour former l'unité répétitive de l'EPS. Ces enzymes spécifiques attachent le premier monomère au transporteur lipidique (alcool isoprénoïde) qui se trouve ancré à la membrane cytoplasmique. Les sous unités répétitives sont assemblées sur le côté interne de la membrane, transportées au travers de la membrane, puis polymérisées et excrétées dans le milieu environnant (**Van Kranenburg et al., 1999**).

Une fois à l'extérieur de la cellule, plusieurs centaines, voire des milliers, d'unités répétitives sont liées ensemble par une polymérase. Après l'excrétion, le polymère est soit libéré soit reste attaché à la surface de la cellule formant la capsule. La synthèse des hétéropolysaccharides implique un grand nombre d'enzymes telles que l'UDP-glucose déshydrogénase, la glucosyl-transférase, la galactosyl-transférase et la phospho-glucomutase (**Dridier et Prevost, 2009**) (figures 03 et 04).

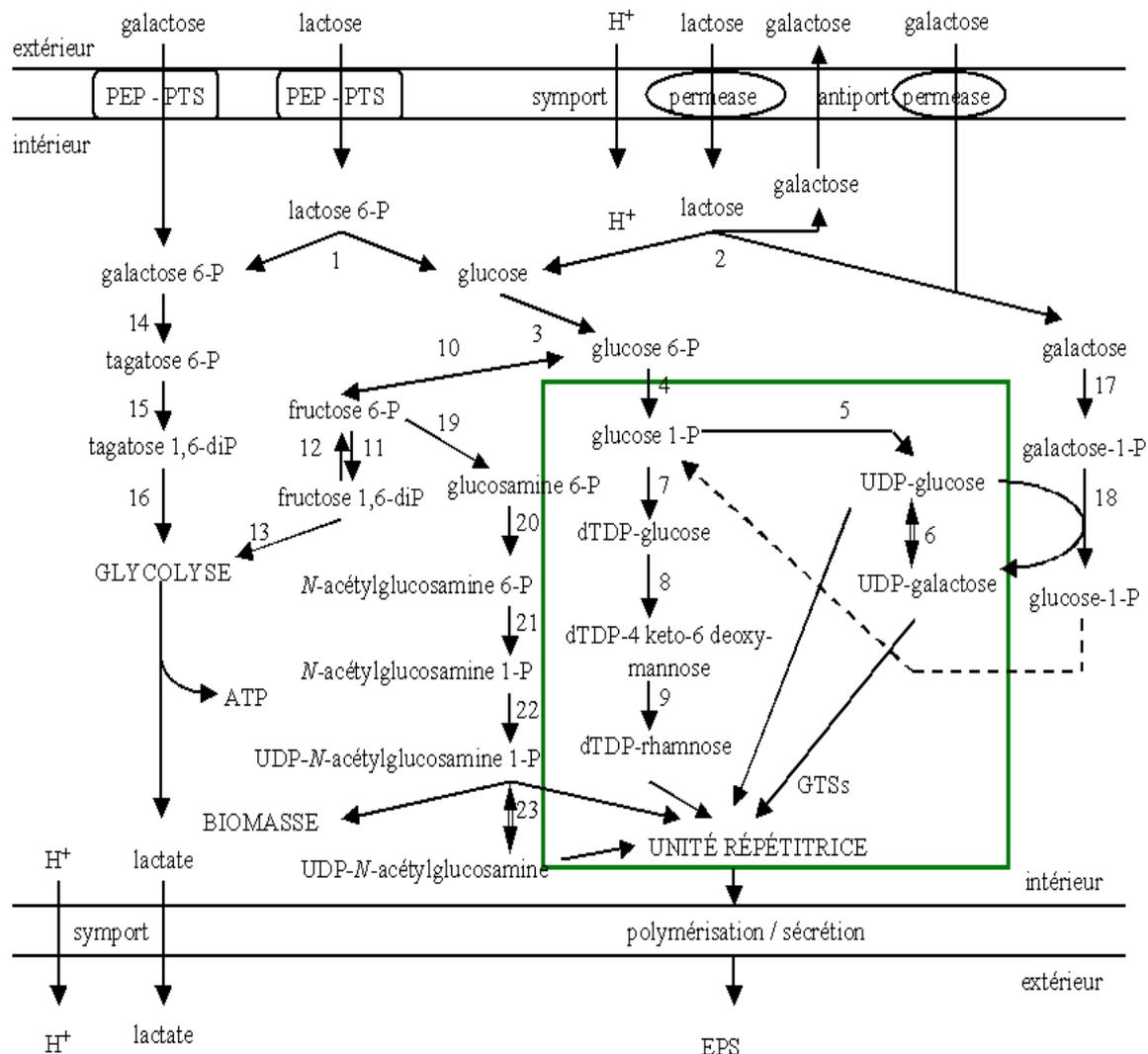


Figure 03 .Vue globale du métabolisme des sucres et de la biosynthèse des EPS chez les bactéries lactiques (**Drider et Prevost, 2009**).

- (1) phospho- β -galactosidase, (2) β -galactosidase, (3) glucokinase, (4) phosphoglucomutase, (5) UDP- glucose pyrophosphorylase, (6) UDP-galactose 4 épimérase, (7) dTDP-glucose pyrophosphorylase,(8) deshydratase, (9) épimérase réductase, (10) phosphoglucose isomérase, (11) 6-phosphofructokinase, (12) fructose-1,6-bisphosphatase, (13) fructose-1,6-di-phosphatealdolase, (14) galactose 6-phosphate isomérase, (15) tagatose 6-phosphate kinase, (16)tagatose-1,6-di-phosphate aldolase, (17) galactokinase, (18) galactose-1-phosphateuridylyltransférase, (19) glutamine-fructose-6-phosphate transaminase, (20) glucosaminephosphateacétyltransférase, (21) acétylglucosaminephosphate mutase, (22) UDPglucosamine pyrophosphorylase, (23) UDP-N-acétylglucosamine 4-épimérase.

PEP-PTS : Phospho Enol Pyruvate-PhosphoTransférase.

cellulaire et, une fois la phase exponentielle de croissance terminée, la production d'EPS cesse (**Dupont, 1998**).

En effet, ces résultats sont en contradiction avec l'hypothèse de **Sutherland (1972)**, stipulant que des conditions de croissance défavorables stimulent la production d'EPS. Du fait que, les conditions de croissance optimales, stimulent la croissance et donc la production de constituants cellulaires, tels que les lipopolysaccharides ou les peptidoglycanes.

III. 2. Milieu de culture et source de carbone

Sc. thermophilus 1275 cultivée dans du lait écrémé reconstitué a permis d'obtenir un rendement de 458 mg/l d'EPS, mais lorsque le milieu est supplémenté avec 0,5% d'un concentré de Protéines de lactosérum (WPC293), la production en EPS a augmenté considérablement (1029 mg/l). Par contre, le nombre de bactéries n'a pas été affecté, car les nutriments apportés par le « WPC293 » ont été utilisés pour la production d'EPS (**Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilan 2005**).

Lb. rhamnosus 9595M a pu produire 2775 mg/l dans un milieu à base de perméat de lactosérum et d'extrait de levure supplémenté avec des acides aminés, sels minéraux et vitamines utilisés dans la formulation du BMM. L'ajout de sels minéraux a eu une influence significative sur la production d'EPS (**Macedo et al., 2002**).

La production d'EPS par *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* était meilleure dans un milieu contenant du glucose ou du lactose que dans un milieu renfermant du fructose, tandis que la supplémentation en mannose réduisant la croissance et la production d'EPS (**Grobber et al., 1996**).

Quelques milieux de culture utilisés dans les travaux réalisés sur la production des EPS par les bactéries lactiques sont présentés dans le **tableau I (Annexe IV)**.

III. 3. pH

La croissance dans un milieu de culture avec un pH contrôlé augmente la production d'EPS comparé à des conditions sans contrôle de pH. En effet, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ1187 produit environ 110 mg/l d'EPS sous contrôle de pH, alors que le rendement en EPS est presque 3 fois moins élevé sous un pH non contrôlé. Se même, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ416 produit environ 175 mg/l d'EPS sous contrôle de pH, alors que le rendement est presque 4 fois moins élevé sous un pH non contrôlé (**Petry et al.,**

2003). **Zisu et Shah (2003)** ont rapportés que le pH optimal pour la production d'EPS (458 mg/l) par *Sc. thermophilus* 1275 est de 5,5.

IV. Rôle physiologique des EPS

Les EPS sont supposés avoir un rôle dans la protection de la cellule bactérienne contre les conditions physiques, chimiques et biologiques de leur environnement. Ils sont impliqués à la fois dans la sensibilité et la résistance aux bactériophages, contre la prédation, ainsi que les limitations de pH et des nutriments et la résistance au stress (acide, thermique, osmotique et oxydatif). Les capsules (CPS) permettent aux bactéries d'éviter la phagocytose, en masquant les composants de surface qui peuvent induire les mécanismes de défense de l'hôte. Les EPS contribuent aussi aux interactions symbiotiques entre les bactéries et les plantes (**Dridier et Prevost, 2009**).

La capacité de s'enrober dans une couche d'EPS avec une forte teneur en eau la rend plus résistante à la dessiccation et à la déprédation des protozoaires. La nature anionique de la couche d'EPS autour de la cellule peut aider à capturer des minéraux essentiels et des nutriments (**Bergmaier, 2002**). De plus, une couche d'EPS autour de la cellule influence significativement la diffusion de différentes molécules aussi bien vers l'extérieur ou vers l'intérieur de la cellule. Ainsi, des agents antimicrobiens peuvent plus difficilement l'atteindre (**Whitfield, 1988**). La production d'EPS a conféré à une souche de *Lactococcus lactis* une tolérance augmentée envers le cuivre, la nisine et le lysozyme (**Looijesteijn et al., 2001**).

En effet, les EPS sont importants dans la colonisation d'une variété d'écosystèmes, souvent accompagnée par la formation de biofilms (**Dridier et Prevost, 2009**).

Finalement, les EPS jouent un rôle majeur dans l'adhésion aux surfaces et l'agrégation des cellules, la résistance aux composés antibactériens, les surfactants, aux métaux et la communication cellulaire (**Causse, 2009**).

V. Applications des EPS

V.1. Applications alimentaires

Les polysaccharides bactériens sont des macromolécules hautement diversifiées dont les propriétés fonctionnelles sont exploitées dans plusieurs domaines industriels.

En raison de leurs propriétés physiques et rhéologiques caractéristiques, les EPS sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire comme stabilisants, gélifiants ou des agents émulsifiants.

Quelques exemples d'EPS sont données ci-dessous ;

Le curdlane est un 1,3- β -glucane d'une taille moléculaire d'environ 74 kDa produit par les bactéries du genre *Agrobacterium* et *Rhizobium*. Il est utilisé au Japon pour améliorer et modifier la texture des aliments comme le tofu, les pâtes de poisson et les gels de fèves **(Sutherland, 1998)**.

Le pullulane est un α -D-glucane avec des liaisons α -1,6 linéaires, incluant des molécules de maltotriose et maltotétraose liées en α -1,4, synthétisé par *Aureobasidium pullulans*, il est utilisé au Japon comme film d'emballage alimentaire. Une solution du polymère peut être appliquée directement sur l'aliment et former une couche sans saveur **(Sutherland, 1998)**.

Le gellane est un polymère linéaire de 500 kDa, produit par *Sphingomonas paucimobilis*. Il est autorisé comme additif alimentaire aux États Unis et en Europe et commercialisé sous le nom de Kelogen[®] et Gelrite[®]. Le gel est caractérisé par une bonne saveur et est stable dans une vaste gamme de valeurs de pH **(Sutherland, 1998)**.

Le xanthane est synthétisé par *Xanthomonas campestris* également autorisé comme additif alimentaire aux États Unis et en Europe depuis longtemps. Il est souvent utilisé en combinaison avec d'autres polysaccharides, comme la gomme de caroube, à cause de l'effet synergique entre ces polymères. Un mélange de deux polymères forme un gel très stable, bien que chaque polymère seul ne gélifie pas.

Le dextrane est synthétisé par *Ln. mesenteroides* dans une solution de saccharose, mais il peut aussi être produit à partir d'un extrait enzymatique extracellulaire, la dextrane-sucrase. Il est utilisé par exemple, comme couche protectrice pour les graines de céréales, stabilisant et l'épaississant des sirops **(Cerning, 1994)**.

Cependant, il est à noter que la présence d'EPS n'est pas souhaitée dans certains procédés de fabrication et dans certains produits. Le dextrane, par exemple, a été découvert par accident : Des mélasses transportées par bateau ont pris une consistance gélifiée et n'ont

pas pu être pompées. La source de ce problème a été une croissance de *Ln. mesenteroides* dans les cales du bateau et la transformation du saccharose en dextrane. De plus, la production d'EPS par certaines souches de *Pediococcus* dans les vins et les bières et par des souches du genre *Lactobacillus* ou *Leuconostoc* sur des produits carnés emballés sous vide est non-souhaitée car elle représente une altération du produit rendant celui-ci impropre à la consommation (**Drider et Prevost, 2009**).

V. 2. Applications non alimentaires

Les EPS ont également été sélectionnés pour leurs applications possibles dans d'autres domaines : cosmétique, médecine et pharmacologique et environnement (**Garrido et al., 2002**).

V. 2. 1. Cosmétique

L'hydrolyse partielle du polysaccharide ainsi que sa mise en solution et en présence de sel forme un gel qui trouve une application dans le domaine de la cosmétique en tant que patchs anticernes. L'hydrolyse poussée du polymère ainsi que sa désacétylation permet d'obtenir un polymère présentant des propriétés filmogènes importantes. Il est alors utilisé dans les crèmes nécessitant un effet de tenseur (**Heyraud et al., 2008**).

V. 2. 2. Préparation de milieux de culture solide à usage microbiologique

Le comportement rhéologique de géllane est à la base de son utilisation en microbiologie. En effet, la substitution de l'agar-agar par le polymère conduit à la création de milieux de culture « gélifiés ». Cette aptitude est mise à profit dans un test développé pour la détection de salmonelles (**Heyraud et al., 2008**).

V.2.3 Domain médical

Les EPS peuvent être exploités en chirurgie comme peau artificielle provisoire pour empêcher la déshydratation des tissus (**Jonas et al., 1998**).

Les propriétés bénéfiques des EPS des bactéries lactiques pour la santé incluent des propriétés anti-ulcère (**Pan et al., 2013**), l'abaissement du cholestérol, (dextrane sulfate).

Les polysaccharides peuvent aussi agir comme fibre alimentaire (prébiotiques) pouvant favoriser la croissance, et la survie des bactéries probiotiques dans le tractus gastro-intestinal (**Notararigo, 2013**). Ils sont également utilisés comme agents d'administration de médicaments (**Liu et al., 2010**).

Par ailleurs, les EPS possèdent des propriétés intéressantes en termes de régénérations osseuses et dermiques (**Quérellou et al., 2010**) et ont un intérêt alternatif comme immunostimulants, antiviraux et anti-inflammatoires (**Paulraj et al., 2011**).

Récemment, ils ont été utilisés en raison de leurs propriétés anti-tumorales (**Gao et al., 2012 ; Donot et al., 2012**).

V.2.4. Environnement

De nouveaux domaines d'application de polysaccharides microbiens comprennent leur utilisation comme bioflocculants, bioabsorbants, agents d'enlèvement des métaux lourds. Une étude a montré que les EPS de *Lc. lactis* ssp. *lactis* ont un potentiel dans la réduction de la pollution environnementale (**Pan et al., 2013**).

Matériel et Méthodes

Ce travail est effectué au niveau du laboratoire central de la filiale Antibiotical SAIDAL (Médéa, Algérie, annexe I), il consiste d'une part à produire et à extraire des exopolysaccharides (EPS) à partir d'une souche de lactocoque, en se basant sur la variation du substrat carboné dans le milieu de culture, et d'autre part à caractériser ces EPS par la technique CCM et spectrale Infrarouge à Transformée de Fourier « FT-IR ».

I. 1. Souche utilisée

La souche bactérienne utilisée est une souche mésophile « *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DZ », isolée de lait cru fermenté et identifiée génotypiquement par séquençage de l'ADNr 16S, par Dr BENDALI F., du laboratoire de Microbiologie Appliquée « équipe Microbiologie de lait et probiotiques » de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (FSNV), Université de Béjaia.

I.2. Revivification de la souche

La souche a été conservée dans de la gélose de de Man Rogosa et Sharpe (**MRS, IPA**) à 4°C. La revivification consiste en un repiquage dans 5 ml de bouillon MRS et incubation à 30°C pendant 24 h.

I. 3. Production des EPS

I. 3. 1. Préparation des pré- cultures bactériennes

Un isolement en stries sur gélose MRS, à partir du milieu de revivification, est effectué suivi d'une incubation à 30°C/48 h. Cinq colonies identiques et bien isolées sont repiquées dans 5 ml de bouillon MRS classique (2% glucose) (**Figure 5**).

Après incubation à 30°C/24 h, des tubes contenant 4 ml de bouillon MRS classique sontensemencés avec 1 ml de la souche sous une hotte à flux laminaire (**Pertusella Varese, Italie**) et incubés à 30°C pendant 24 h.

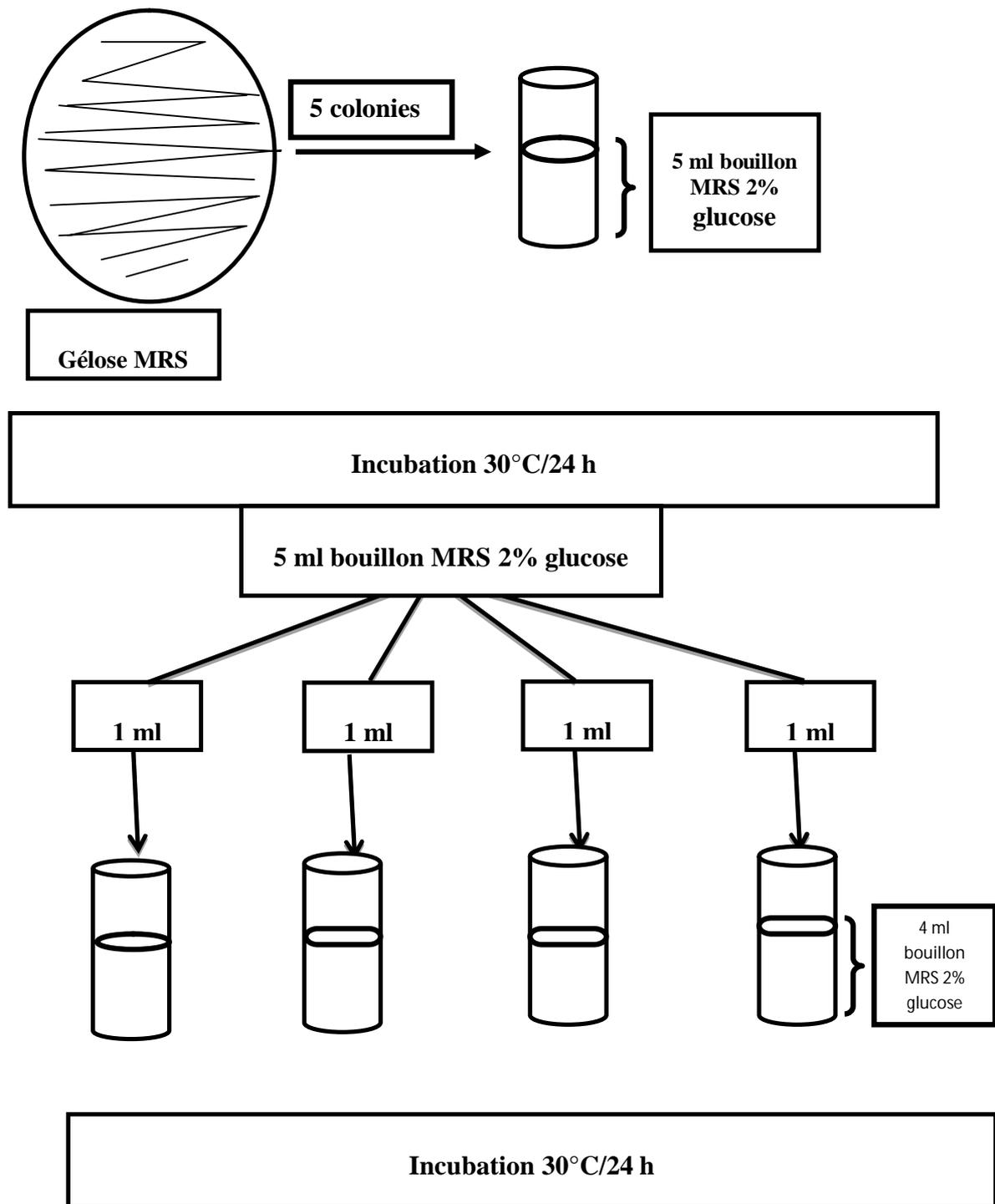


Figure 05. Préparation des pré-cultures bactériennes

Une mesure de la densité optique (DO) des pré-cultures est effectuée à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (**Perkin-Elmer 550A, Italie**).

I.3. 2. Réalisation des cultures bactériennes

Des cultures de *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ sont réalisées dans différents bouillons MRS sans sucre (100 ml) additionnés de glucose (**Fluka Biochimika, Suisse**), de saccharose (**Difco, France**), de lactose (**Fluka Biochimika**) et de fructose (**Sigma, USA**), à raison de 1, 5, 10, 15 et 20% (m/v) et incubées à 25°C/72 h (**Figure 6**). Au terme de la période d'incubations, la DO des cultures bactériennes est mesurée à 620 nm et les EPS sont extraits.

I.4. Extraction et quantification des EPS

I.4. 1. Extraction des EPS

Suivant le protocole de **Vamanu et al. (2010)** modifié, un choc thermique des cultures est réalisé en les mettant dans un bain marie (**Termostabil K, Italie**) à 100°C/10 min puis dans de la glace. 2 ml d'acide Trichloroacétique (TCA) à 15 % (**Merck, Allemagne**) sont ensuite ajoutés dans chaque culture.

Une centrifugation à 5000 rpm/10 min à 4°C (**Centrifuge 4225, Italie**) est réalisée, à la suite de laquelle 2 volumes d'éthanol absolu (**Sigma, Allemagne**) sont ajoutés dans chaque surnageant de culture récupéré pour précipiter les EPS synthétisés. Les mélanges sont ensuite maintenus durant toute la nuit à 4°C (**Armoire frigorifique angelatoni, Italie**).

Après précipitation à l'éthanol, une deuxième centrifugation à 7000 rpm /30 min à 4°C (**Rotina 380 Hettich, Allemagne**) est effectuée.

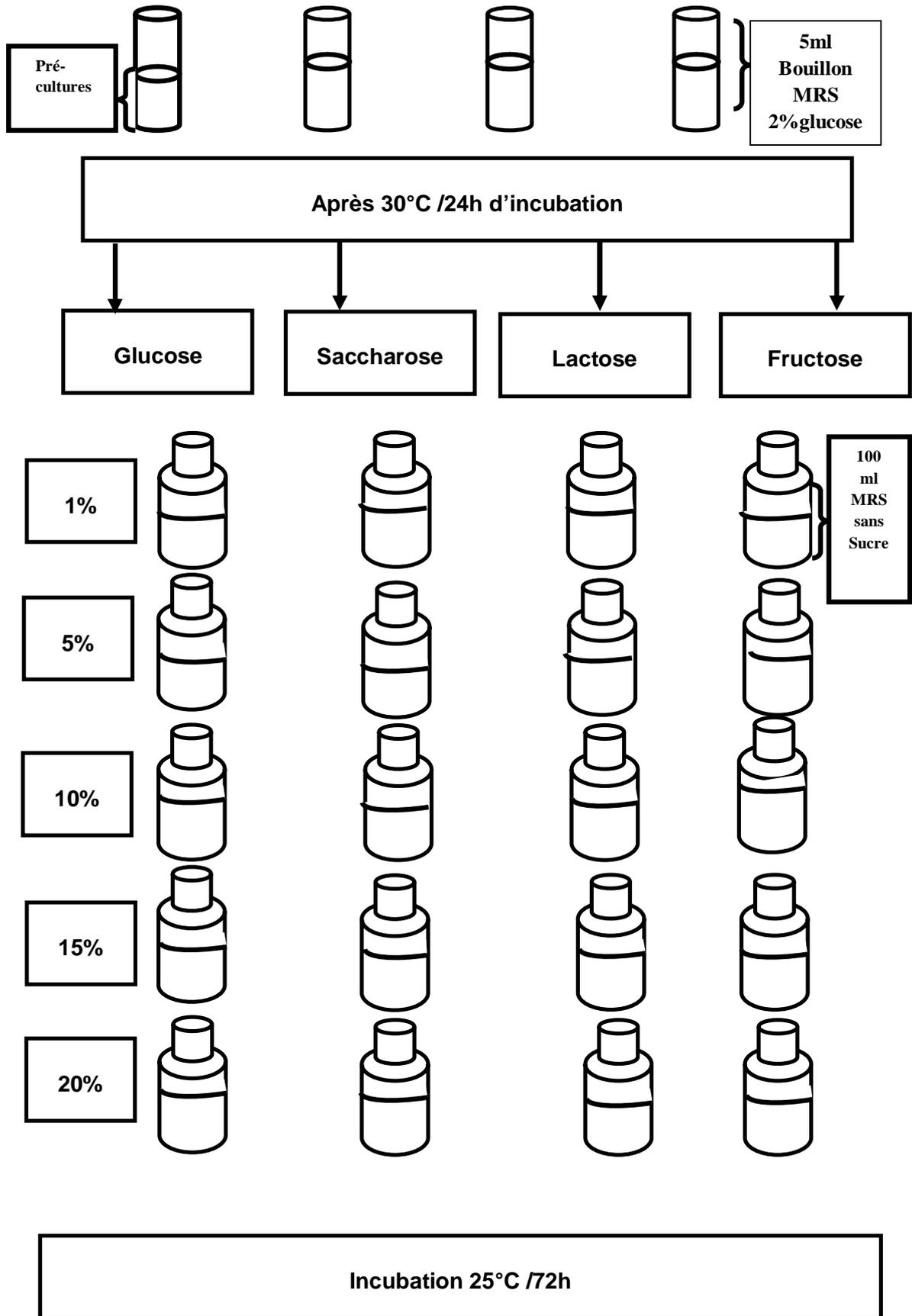


Figure 06. Préparation des cultures bactériennes

I. 4. 2. Dosage des EPS

Après la deuxième centrifugation, les culots récupérés sont suspendus dans 0,5 ml d'eau distillée. 2 ml de l'acide sulfurique (H₂SO₄) à 74% (**Sigma, Allemagne**) et 0,5 ml de phénol à 6% (**Merck**) sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont mis au bain marie à 100°C pendant 15 min puis mis à l'obscurité durant 15 min.

La quantité d'EPS est déterminée par le taux de sucres contenus dans les précipités en utilisant la méthode de Dubois et al. (1956) : dosage des sucres totaux phénol-acide sulfurique en utilisant le glucose comme standard (**Xu et al., 2010**).

I. 4. 2. 1. Principe de la méthode

En milieu acide et à chaud, les liaisons glycosidiques des sucres sont hydrolysées. Les oses simples ainsi libérés subissent une déshydratation intramoléculaire pour des dérivés furfuraux (furfural ou hydroxyméthyl furfural). La fonction aldéhyde des furfuraux se condense ainsi en milieu acide avec l'hydroxyl d'un composé phénolique pour donner des acétals ou héli-acétals de couleur rougeâtre qui absorbent dans le visible (450-500 nm).

I.4. 2. 2. Réalisation d'une courbe d'étalonnage du glucose (DO =f [glucose])

L'établissement de la courbe d'étalonnage est illustré dans le tableau suivant :

Tableau I. Etapes de réalisation de la courbe d'étalonnage pour test d'EPS

Tube Réactif	T ₀ (Blanc)	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
Glucose (0,05 mg/ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
H ₂ O (ml)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Phénol (6%) (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
H ₂ SO ₄ (74%) (ml)	2	2	2	2	2	2
Incubation en bain marie bouillant	15 min					
Incubation à l'obscurité	15 min					

Après 15 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance à 492 nm est mesurée pour pouvoir tracer la courbe $A_{492} = f([\text{glucose}])$ (**Figure 02 ; Annexe III**) ;

I.5. Analyse chimique des EPS

Un volume de 1600 ml de bouillon MRS (20% de glucose) stérile a été ensemencé dans un erlenmeyer de 5L avec un *inoculum* de 1% (v/v) d'une pré-culture (24 h à 30°C) et incubé à 25°C pendant 72 heures. Le procédé de l'extraction des EPS est le même que celui décrit plus haut.

I.5. 1. Caractérisation spectrale des EPS par FT-IR

En utilisant le protocole de **Xu et al. (2012)** modifié, les extraits d'EPS après leur concentration en utilisant un rotavapor (**Büchi, Suisse**) sont déshydratés dans une étuve sous vide à 80°C pendant 24 h au lieu d'être lyophilisés. Après déshydratation, l'extrait en poudre est mélangé avec une poudre de Bromure de Potassium (KBr) avec un ratio de 1:100 et homogénéisés à l'aide d'un mortier. 150 mg du mélange est comprimé sous forme de pastille puis analysés à l'aide d'un spectromètre infrarouge Spectre BX (**Perkin Elmer. USA**). Les conditions d'analyse sont les suivantes: une plage spectrale de 4000-400 cm^{-1} , 32 scans et une résolution de 4 cm^{-1} (**Xu et al., 2012**).

I. 5. 2. Analyse chimique des EPS par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les EPS produits par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ sont caractérisés quant à leur composition par CCM après hydrolyse acide complète. Le protocole est décrit ci-dessous:

I. 5. 2. 1. Hydrolyse acide

Le précipité d'EPS est dissous à raison de 0,5 % (m/v) dans de l'eau distillée puis additionné de 2 ml d'HCl 2N et incubé à 100°C pendant une nuit (environ 20 h). Après la période d'incubation, une évaporation est réalisée sous vide à 90°C (rotavapor) (**Büchi, Suisse**) jusqu'à évaporation complète du HCl, la température peut être augmentée jusqu'à 100°C. Par la suite, une série de 3 lavages des EPS à l'eau distillée est réalisée. Pour chaque lavage, une petite quantité d'eau distillée (5 à 10 ml) est utilisée puis évaporée de la même manière que précédemment (rotavapor). A la fin des lavages, le pH doit avoir une valeur comprise entre 5 et 6.

I. 5. 2. 2. CCM

Le solvant de migration est constitué du mélange suivant : Propanol /pyridine/eau distillée : (65/20/10, v /v /v).

Le dépôt des échantillons et les étalons (glucose, lactose et saccharose) sur la plaque au gel de silice RP8 F₂₅₄ est réalisé à raison de 10 µl à partir d'une solution préparée à 5 mg/ml. La migration est conduite pendant environ 3 à 4 h. Au terme de la période de migration, la plaque est séchée sous hotte (**Caronno Pertusella Varese, Italie**) puis plongée dans la solution de révélation (Diphénylamine 1,8% (p/v), Aniline 1,8% (v/v) (**Acros Organics, Belgique**), acide orthophosphorique 7,7 % (v/v) (**Labosi, France**) préparée dans de l'acétone (**Analar Normapus, France**). La plaque est par la suite séchée à l'étuve (**Termostabil K**) à 100°C /10 min et l'apparition ou non de spots est observée (**Kaci, 2006**).

I. 6. Analyse statistique

Le test ANOVA (Analysis of Variance) est utilisé pour évaluer les différences significatives entre les taux de croissances et les productions des EPS à l'aide de XL-STAT la version 2009, avec un seuil de signification allant de $\alpha= 0,05$ à $\alpha= 0,0001$ (**Annexe V**).

Résultats et discussion

Dans cette étude, une souche de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DZ a été étudiée quant à sa capacité à croître et à produire des exopolysaccharides (EPS) en utilisant différentes sources de carbone (glucose, saccharose, lactose et fructose) à des concentrations allant de 1% à 20%.

II. 1. Croissance bactérienne en fonction du type de sucre et de sa concentration

Après 72 h d'incubation à 25°C, dans du milieu MRS sans sucre, additionné de différentes sources de carbone et à différentes concentrations, la DO des cultures bactériennes a été mesurée à 620 nm. Une corrélation entre DO et nombre de cellules par ml a été obtenue grâce à la courbe standard de croissance préalablement établie (**Figure 1, Annexe III ; Tableau II, Annexe IV**).

La variation de la croissance bactérienne en fonction du type de sucre et de sa concentration est présentée sur les figures suivantes :

II. 1. 1. En présence de glucose

Les résultats du nombre maximal de cellules de *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ obtenue après 72 h à 25°C de culture dans le milieu MRS sans sucre, additionné de concentrations croissantes (1-20%) de glucose comme source de carbone, sont schématisés sur la figure 7.

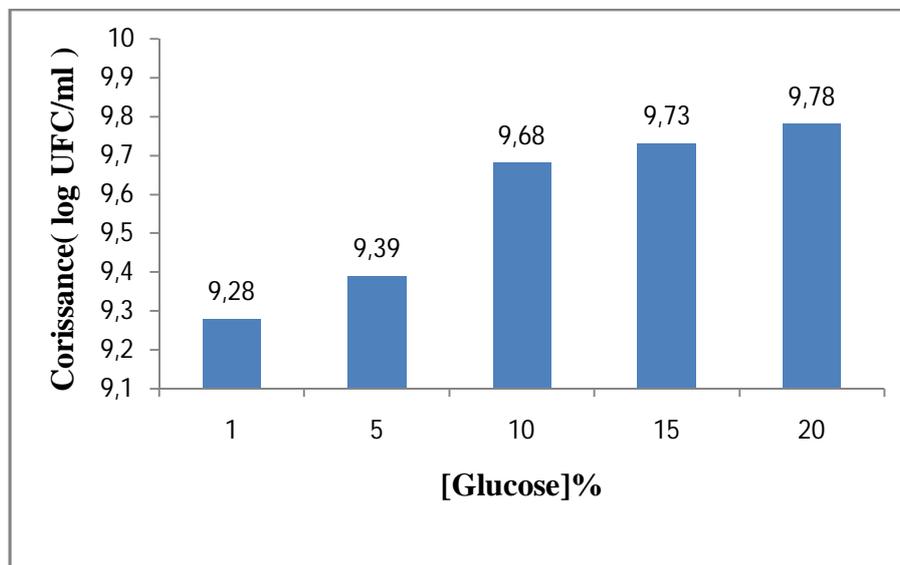


Figure 07. Variation de la Croissance de *Lc.lactis* ssp. *lactis* DZ, dans le bouillon MRS, au bout de 72 h à 25°C, en fonction de concentrations croissantes de glucose.

De la figure 7, on remarque que la croissance de la souche est proportionnelle à la concentration de glucose dans le milieu. Le nombre maximal (9,78 log UFC/ml) étant obtenu en présence 20% de glucose.

L'analyse statistique a révélée une différence très hautement significative ($< 0,0001$) entre les variations de la croissance de *Lc.lactis* ssp.*lactis* DZ en fonction de la concentration de glucose (Tableau I; Annexe V).

II. 1. 2. En présence de saccharose

Les résultats de la croissance de *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ après 72 h à 25°C de culture dans le milieu MRS sans sucre, additionné de concentrations croissantes (1-20%) de saccharose comme source de carbone sont schématisés sur la figure 08.

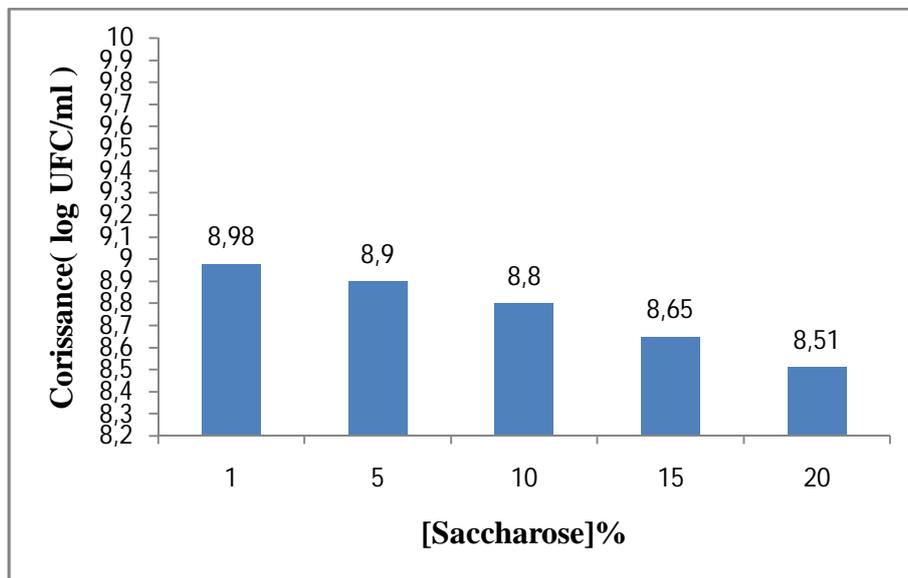


Figure 08. Variation de la croissance de *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ, dans le bouillon MRS, au bout de 72 h à 25°C, en fonction de concentrations croissantes de saccharose.

D'après la figure 08, on constate que la croissance de la souche évolue de manière inversement proportionnelle à l'augmentation de la concentration en saccharose dans le milieu. Le nombre maximal de cellules (8,98 log UFC/ml) étant obtenu en présence de 1% de saccharose tandis que le nombre minimal (8,51 log UFC/ml) est enregistré en présence de 20% de ce sucre.

D'après l'analyse statistique, des différences significatives ont été, uniquement, notées entre la croissance observée en présence de 1 et 20%, 1 et 15%, 5 et 20% de saccharose ($p < 0,0001$) (Tableau II ; Annexe V).

II. 1. 3. En présence de lactose

Les résultats de la croissance de *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ après 72 h à 25°C de culture dans le milieu MRS sans sucre, additionné de concentrations croissantes (1-20%) de lactose comme source de carbone sont schématisés sur la figure 09.

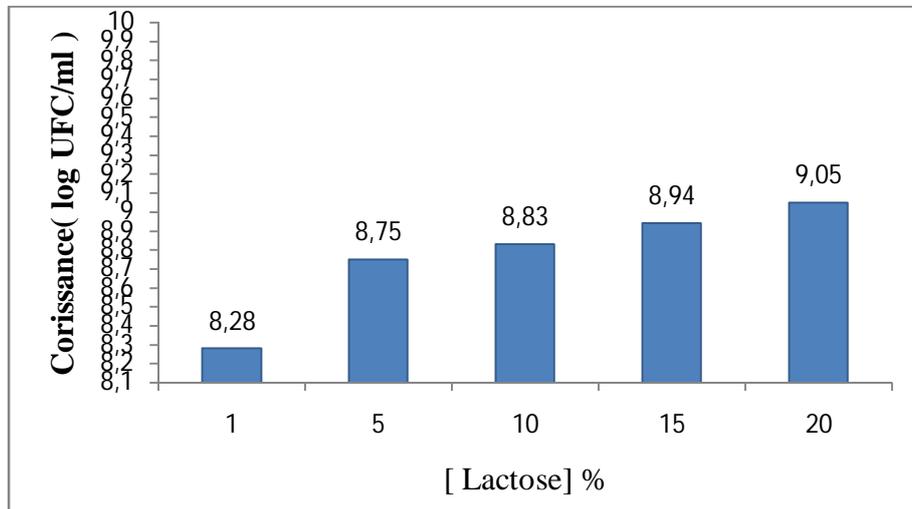


Figure 09. Variation de la croissance de *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ, dans le bouillon MRS, au bout de 72 h à 25°C, en fonction de concentrations croissantes de lactose.

De la figure 09, on remarque que la croissance de la souche évolue de manière croissante avec l'augmentation de la concentration de lactose dans le milieu. La croissance minimale et maximale (8,28 et 9,05 log UFC/ml) étant obtenue en présence de 1 et 20 % de lactose respectivement.

L'analyse statistique montre qu'il y a une différence très hautement significative ($p < 0,0001$) entre la croissance obtenue entre 1% et 20%, 1% et 5%, 1% et 10%, 10% et 20%, 15% et 20% de lactose (**Tableau II; Annexe V**).

II. 1. 4. En présence de fructose

Les résultats de la croissance de *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ après 72 h à 25°C de culture dans le milieu MRS sans sucre, additionné de concentrations croissantes (1-20%) de fructose comme source de carbone sont schématisés sur la figure 10.

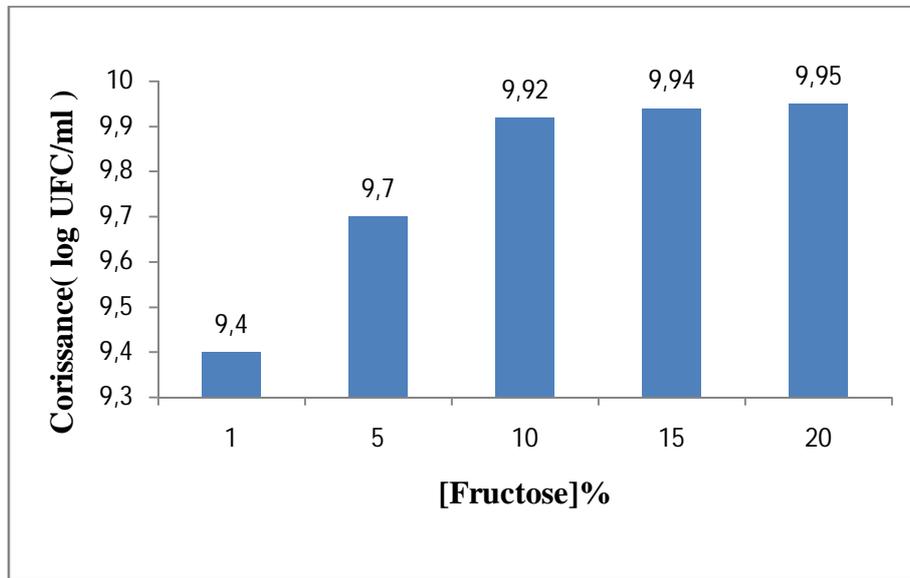


Figure 10. Variation de la croissance de *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ, dans le bouillon MRS, au bout de 72 h à 25°C, en fonction de concentrations croissantes de fructose.

La figure 10 montre qu'il y a une augmentation de la croissance avec l'augmentation de la concentration de fructose dans le milieu. En effet, une meilleure croissance est obtenue en présence de 20% de fructose (9,95 log UFC/ml).

L'analyse statistique révèle des différences très hautement significatives ($p < 0,0001$) entre la croissance enregistrée en présence des différentes concentrations de fructose, hautement significatives ($p < 0,026$) entre 10 et 15%, à l'exception de celle obtenue en présence de 15% et 20% ($p > 0,134$).

En comparant les résultats de la croissance de *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ en présence des quatre sucres à différentes concentrations, il apparaît qu'il n'y a pas de différences significatives ($p > 0,0001$) entre la croissance en présence du saccharose (20-1%) et du lactose (1-20%) mais au sens inverse des concentrations (**Tableau III; Annexe V**).

Par contre, une différence très hautement significative ($p < 0,0001$) est notée entre la croissance en présence de saccharose et de glucose, saccharose et fructose, lactose et glucose, lactose et fructose et ce aux différentes concentrations testées (**Tableau III; Annexe V**).

Selon les résultats obtenus, nous remarquons que la meilleure croissance est enregistrée en présence du fructose (9,95 log UFC/ml), suivi du glucose (9,78 log UFC/ml) puis du lactose (9,05 log UFC/ml) à la même concentration (20%). Par contre le saccharose vient en dernière position en considérant la concentration optimale permettant d'obtenir la croissance maximale en l'occurrence 1%.

Il est admis que chez les bactéries lactiques, le métabolisme du glucose diffère de celui du fructose. En effet, il a été montré que l'utilisation de chaque sucre est directement liée au mécanisme de transport du sucre correspondant (**Nacib et al., 2005**). Le fructose est principalement utilisé dans la production de la biomasse et le métabolisme énergétique tandis que le glucose est plutôt orienté vers le métabolisme énergétique ou la synthèse d'EPS (figure 3) (**Dridier et Prévost, 2009**).

A l'intérieur de la cellule, le glucose est phosphorylé (glucose-6 phosphate), isomérisé en fructose-6 phosphate puis en glucosamine-6 phosphate qui après une série de réactions aboutit à la formation de l'UDP-N-acétylglucosamine-1 phosphate, précurseur dans la formation du peptidoglycane donc de la biomasse mais également dans la production d'EPS. Le glucose peut également être activé en UDP-glucose et/ou polymérisé pour former les EPS. De même le lactose et le saccharose sont scindés en galactose/glucose et fructose/glucose pouvant suivant les mêmes étapes décrites plus haut aboutir à la formation de biomasse et/ou d'EPS (**Dridier et Prévost, 2009**).

II.2. Taux de production des exopolysaccharides (EPS)

La capacité de production des EPS par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ a été vérifiée dans du bouillon MRS sans sucre, additionné de glucose, saccharose, lactose et de fructose à des concentrations de 1, 5, 10, 15 et 20%.

Le dosage des EPS produits a été effectué par la méthode de Dubois *et al.* (1956) : dosage des sucres totaux phénol-acide sulfurique en utilisant le glucose comme standard. La courbe standard du glucose est illustrée sur la **figure 02 (Annexe III)**.

Les concentrations d'EPS produits par la souche dans le milieu MRS en présence des différentes sources de carbone sont regroupées dans les tableaux II, III, IV et V (**Annexe IV**) et schématisées sur les figures suivantes ci-dessous.

II.2. 1. En présence de glucose

Les résultats de taux maximal de production des EPS par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ après 72 h à 25°C de culture dans le milieu MRS sans sucre additionné de 1 à 20% de glucose comme source de carbone sont schématisés sur la figure 11.

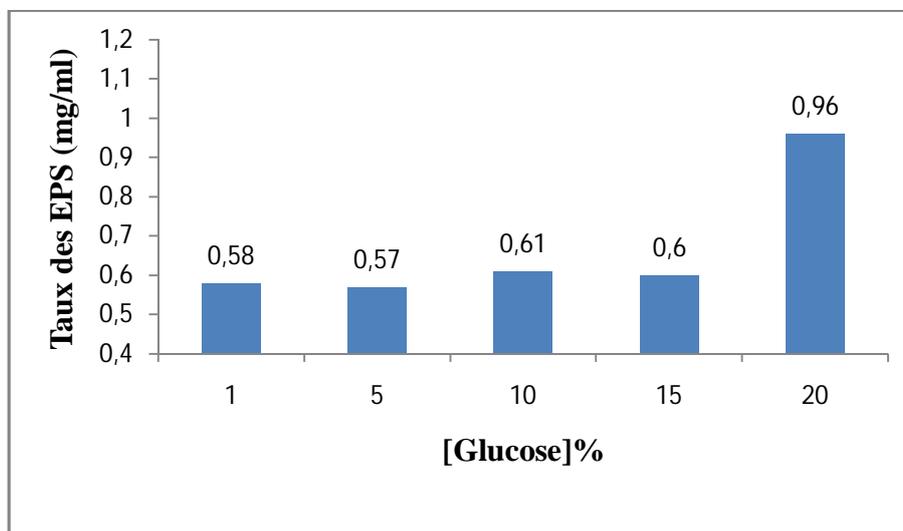


Figure 11. Variation du taux de production des EPS par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ en fonction de concentrations croissantes de glucose.

D'après les résultats obtenus (figure 11), on remarque que le taux des EPS produits par la souche évolue d'une manière croissante avec l'augmentation de la concentration de glucose dans le milieu. De ce fait il apparaît que la production des EPS par cette souche est

positivement stimulée par le glucose; le taux maximal (≈ 1 g/l) et le taux minimal (0,57 g/l) de production sont observés en présence de 20 et 5% de glucose respectivement.

L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative ($p > 0,0001$) entre les taux produits en présence des concentrations situées entre 1 et 15% de glucose tandis qu'il y a une différence significative ($p < 0,0001$) entre le taux enregistré en présence de 1, 5, 10 et 15% et celui obtenu à 20% (**Tableau IV; Annexe V**).

II.2. 2. En présence de saccharose

Les résultats de production des EPS par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ après 72 h à 25°C de culture dans le milieu MRS sans sucre, additionné de 1 à 20% de saccharose comme source de carbone sont schématisés sur la figure 12.

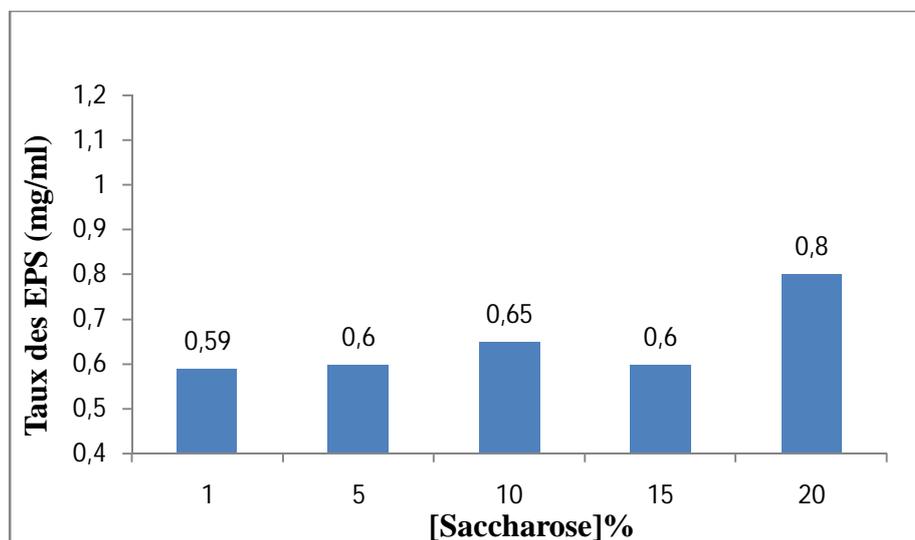


Figure 12. Variation du taux de production des EPS par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ en fonction de la concentration de saccharose.

Similairement que ce qui a été rapporté sur le glucose (figure 11), on note clairement (figure 12) que la production des EPS atteint sa valeur maximale (0,8 g/l) en présence de 20% de saccharose tandis que, des valeurs plus basses (0,59; 0,60; 0,65 et 0,60 g/l) sont atteintes en présence de 1, 5, 10 et 15% de saccharose respectivement. Cette production est invariable en présence de 1, 5, 10 et 15% de saccharose tandis qu'une différence significative ($p < 0,0001$) a été notée entre la production en présence de ces dernières concentrations et celle enregistrée à 20% (**Tableau IV; Annexe V**).

II.2. 3. En présence de lactose

Les résultats de production des EPS par *Lc. lactis ssp. lactis* DZ après 72 h à 25°C de culture dans le milieu MRS sans sucre additionné de 1 à 20% de lactose comme source de carbone sont schématisés sur la figure 13.

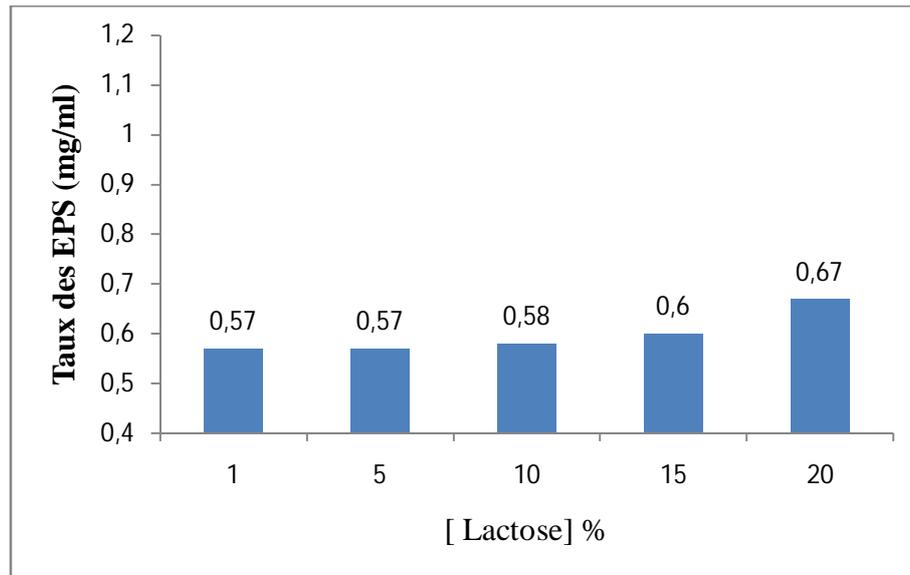


Figure 13. Variation du taux de production des EPS par *Lc. lactis ssp. lactis* DZ en fonction de la concentration de lactose.

A l'instar du glucose et du saccharose, il apparaît (figure 13) que la production des EPS atteint sa valeur maximale (0,67 g/l) à une concentration de 20% de lactose. Cependant, aucune différence significative entre les taux enregistrés aux différentes concentrations de lactose n'a été révélée par l'analyse statistique (**Tableau IV; Annexe V**).

II.2. 4. En présence de fructose

Les résultats de production des EPS par *Lc. lactis ssp. lactis* DZ après 72 h à 25°C de culture dans le milieu MRS sans sucre additionné de 1 à 20% de fructose comme source de carbone sont schématisés sur la figure 14.

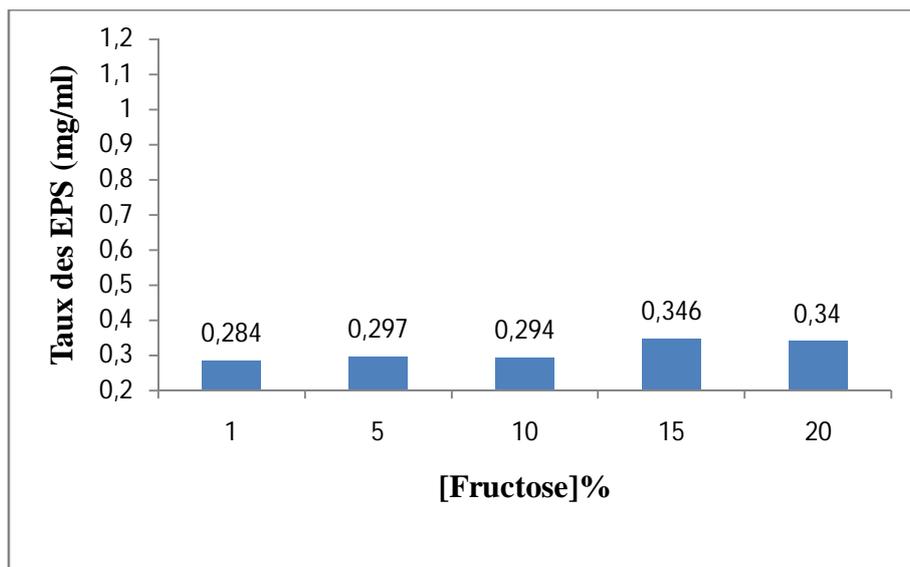


Figure 14. Variation du taux de production des EPS par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ en fonction de la concentration de fructose.

Dans le cas du fructose, le taux de production des EPS aux différentes concentrations (1-20%) est relativement faible (0,284-0,346g/l). Par conséquent, la production des EPS par cette souche n'est pas stimulée par le fructose. L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative entre les taux de production aux différentes concentrations de fructose (Tableau IV; Annexe V).

II. 2. 5. Comparaison entre les différents sucres

L'ensemble des résultats de production des EPS par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ après 72 h à 25°C de culture dans le bouillon MRS sans sucre, additionné séparément de glucose, saccharose, lactose et de fructose à des concentrations de 1, 5, 10, 15 et 20% est regroupé la figure 15.

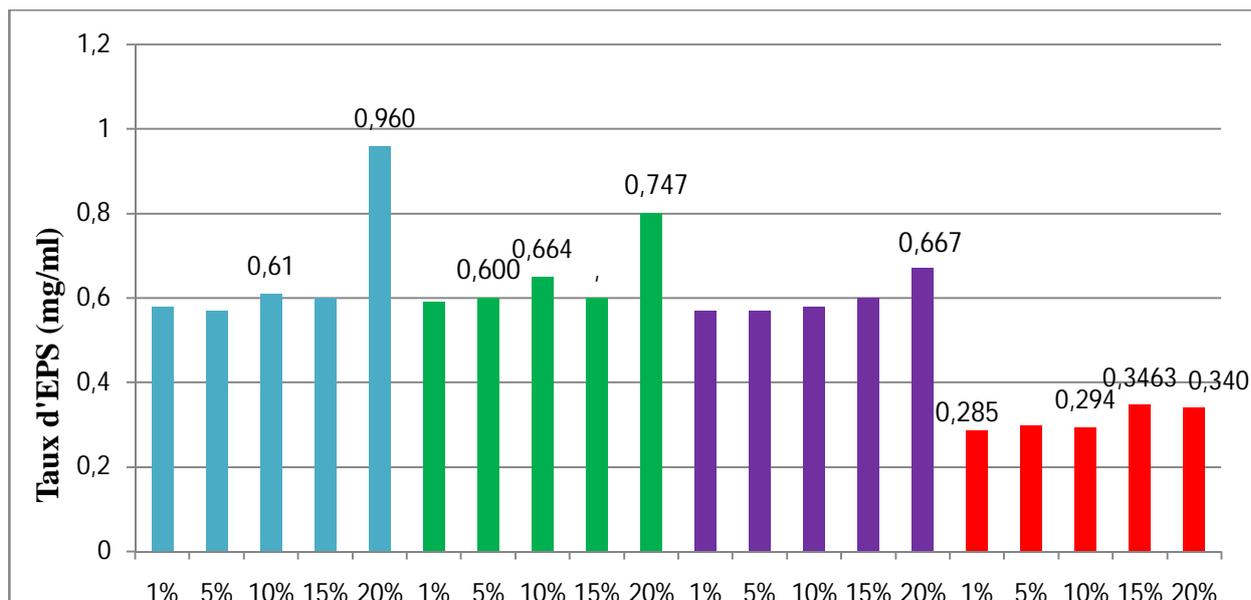


Figure 15. Variation du taux maximal de production des EPS par *Lc. lactisssp. lactis* DZ en fonction de la concentration des différents glucose ■, saccharose ■, lactose ■ et fructose ■.

Suite à la comparaison des taux de production des EPS par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ en présence des quatre sucres étudiés (glucose, saccharose, lactose et fructose) et aux différentes concentrations (figure 15), il ressort que le taux maximal de production des EPS est obtenu en présence de 20% de glucose (0,96 g/l), un taux d'environ 3 fois plus élevé que celui noté en présence de la même concentration de fructose (0,340 g/l). Le plus faible taux de production étant observé en présence de 1% de fructose (0,285 g/l).

II. 2. 6. Discussion générale des résultats du taux de production

D'après **Cerning et al. (1994)**, le rendement total de production des EPS par les bactéries lactiques dépend de la composition du milieu et des conditions dans lesquelles elles se développent. En effet, ces auteurs ont observé que *Lb. casei* CG11 était capable de produire des EPS en présence de divers sources de carbone (glucose, galactose, lactose, saccharose, maltose et mélibiose) avec un taux maximal enregistré en présence de glucose.

Ces résultats concordent avec nos résultats et ceux rapportés par **Xu et al. (2010)** et selon lesquels la source de carbone avait une influence marquée sur la croissance et la production des EPS par *Lb. paracasei* HCT et que le glucose fut la meilleure source de carbone pour la synthèse des EPS. Les travaux de **Vamanu et al. (2010)** affirment également ce constat. En effet, la meilleure production en EPS dans le milieu MRS est obtenue avec le

glucose comme source de carbone en étudiant les deux souches *Lb.paracasei* IL2 et *Lb. plantarum* IL3.

Les travaux du **Yuksekdag et Aslim (2008)** ont également montré que la production des EPS par *Lb.delbrueckii ssp.bulgaricus* et *Sc.thermophilus* dépend de la source de carbone et de sa concentration dans le milieu. Le glucose a été démontré la meilleure source de carbone pour la production des EPS par les souches étudiées par comparaison au fructose, saccharose et lactose. De même, **Grobbe et al. (1996)** ont rapporté que le type de la source de carbone a une grande influence sur la productivité en EPS et peut également affecter la composition de ce dernier. A l'instar de nos résultats obtenus avec la souche *Lc. lactis ssp. lactis* DZ, ces auteurs ont montré que la production des EPS par *Lb.delbrueckii ssp.bulgaricus* NCFB 2772 était plus importante en présence de glucose que de lactose et que cette souche produit trois fois plus d'EPS en présence de glucose que de fructose comme sources de carbone.

Similairement dans l'étude de **Looijesteijn et Hugenholtz (1999)**, la production des EPS par *Lc.lactis ssp. cremoris* NIZO B40 fut importante en présence de glucose comme source de carbone, par contre une faible quantité a été produite avec le fructose.

Douaire (2010) affirme que le rendement en EPS est généralement autour de **0,6 g/l** pour les souches productrices, pouvant dans certains cas aller jusqu'à **1,2 g/l** et leur composition est fortement dépendante de la composition du milieu de culture pour une souche donnée.

Dans cette notre étude, une meilleure production des EPS est observée aux concentrations de sucre les plus élevées (15 et 20%) indépendamment du type de sucre (**Figures 11, 12, 13,14 et 15**). Ces observations seraient liées aux contraintes que subissent les bactéries productrices d'EPS ce qui a mené **Cerning et al. (1994)** à émettre l'hypothèse selon laquelle, un stress environnemental stimulerait la synthèse d'un « gel » protecteur.

En effet, la production des EPS, métabolites secondaires, semble être associée à la survie des bactéries dans les milieux naturels, généralement caractérisés par la coexistence de nombreux facteurs limitants. En réponse à ces conditions environnementales stressantes, les bactéries se protègent en produisant des quantités d'EPS plus importantes constituant ainsi une barrière physique et chimique (**Kaci, 2006**). Dans ces conditions de culture particulière (concentration élevée en substrat carboné), les bactéries réagissent en produisant des quantités

importantes d'EPS qui servent de zone tampon contre les changements extérieurs du potentiel hydrique (**Gamar *et al.*, 1997**).

Dans l'étude de **Duenas *et al.* (2003)**, la production des EPS par la souche *Pediococcusdamnosus*2.6, cultivée à 25 °C dans un milieu semi-défini (SDM), évoluait de manière croissante avec l'augmentation de la concentration de glucose.

II. 3. Corrélation entre le taux de croissance et la production des EPS

La corrélation entre les concentrations d'EPS produites et la croissance maximale de *Lc.lactis ssp.lactis* DZ dans le milieu MRS sans sucre, additionné de différents types de sucres et à différentes concentrations est schématisée sur la figure 16.

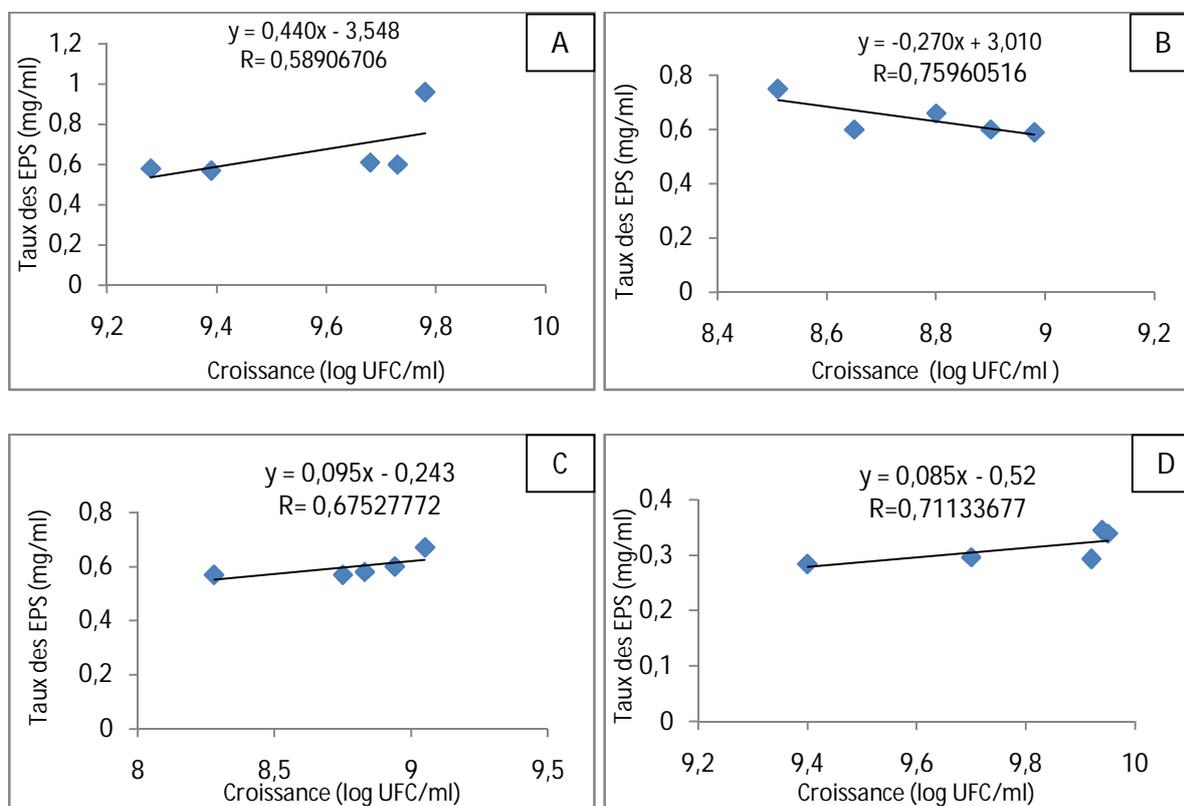


Figure 16. Corrélation entre la croissance maximale et le taux de production des EPS par *Lc. lactis ssp. lactis* DZ en fonction de concentrations croissantes de glucose (A), saccharose (B), lactose (C) et fructose (D) dans le milieu.

De la **figure 16**, on remarque que le glucose, lactose et fructose sont utilisés par la bactérie de façon afin d'assurer à la fois la croissance et la production des EPS. D'après le coefficient de corrélation, on constate qu'il ya une corrélation moyenne et positive entre la croissance et la production d'EPS en fonction de la concentration de glucose.

Il ressort également que le glucose et le fructose ,issus de l'hydrolyse du saccharose, soient utilisés par la bactérie pour produire à la fois des EPS et de la biomasse cellulaire avec utilisation plus importante ou majoritaire plutôt dans la production des EPS que la production de biomasse ,ce qui pourrait être reliée au fort pouvoir d'absorption d'eau du saccharose

créant des conditions stressantes (déshydratation) favorables à la synthèse des EPS et défavorables pour la croissance cellulaire. La corrélation entre la biomasse et le taux d'EPS est plutôt négative avec un coefficient de corrélation moyen ($R=0,75960516$). **Kaci (2006)** a clairement rapporté que le stress osmotique ne constitue pas la seule contrainte engendrée par de fortes concentrations en glucides. En effet et d'après ce même auteur, le saccharose permet de diminuer l'activité de l'eau (a_w) limitant ainsi considérablement l'eau libre dans le milieu de culture. Il s'agit donc d'un stress hydrique qui permet aussi d'augmenter la synthèse des EPS.

Dans les études réalisées par **Habimana (2009)** et **Xu et al. (2010)**, il a été montré que la nature de la source de carbone a un effet significatif sur la croissance et la production des EPS par les bactéries lactiques. En effet, les résultats rapportés par **Yuksekdag et Aslim (2008)**, ont indiqué que la production des EPS et la croissance ont été stimulées par la concentration élevée en glucose (30 g/l) et ceux de **Looijesteijn et Hugenholtz (1999)** ont plutôt mis en évidence le fait que la synthèse des EPS et la croissance de *Lc. lactis* ssp. *cremoris* NIZO B40 ne sont pas strictement liées.

Vamanu et al. (2010) ont montré une augmentation de la quantité d'EPS synthétisée par *Lb. paracasei* IL2 et *Lb. plantarum* IL3, en fonction des concentrations croissantes en glucose et lactose (2 et 10 %). Cette production fut corrélée avec une augmentation de la biomasse.

II. 4. Analyse chimique des EPS

II. 4. 1. Caractérisation spectrale des EPS par FT-IR

Le résultat de l'analyse spectrale des EPS par FT-IR est présenté sur la **figure 17**.

Pour révéler les groupes fonctionnels des EPS, ces derniers ont été analysés par le spectrophotomètre infrarouge « Spectre BX ». Par comparaison à la littérature (**Stuart, 2004**), vu le manque de banques de données disponibles, les résultats ont montré que les bandes spectrales prédominantes étaient les suivantes:

2879 cm^{-1} : le stretching asymétrique de **C–H** de méthyle

1456, 64 cm^{-1} : la bande de recourbement de **CH₂**, méthylène ciseaux

1376, 88 cm^{-1} : Remuement de méthylène **C–H**

436, 21 cm^{-1} : le stretching de **C–Br**.

Les composés hydroxylés peuvent être identifiés entre **1900-1500 cm^{-1}** et **3800-3100 cm^{-1}** , respectivement.

Les bandes dans la région de **2000-1500 cm^{-1}** correspondent à l'étirage de **C = C** et **C = O**. L'étirage carbonyle est l'une des absorptions les plus faciles à reconnaître dans un spectre infrarouge. C'est habituellement la bande la plus intense dans le spectre.

La région entre **1800-900 cm^{-1}** a été analysée en détail, parce que les principaux groupes amide et carboxyliques (groupes fonctionnels des glucides) sont inclus dans cette zone **1700-1600 cm^{-1}** (Amide I). Alors que les autres sont des bandes correspondant aux groupes méthylène. La première bande à haute fréquence montre un composant recouvert à **1456 cm^{-1}** correspond à un recourbement de **CH₂**, la deuxième bande à **1376 cm^{-1}** est une bande de recourbement de **CH₃** symétrique.

La région entre les deux pics apparus entre **750-700 cm^{-1}** correspond aux bandes basculantes de **CH₂**. Probablement la région **800–400 cm^{-1}** contient un **C–X** stretching (X = F, Cl, Br ou I) dans notre cas c'est le bromure (Br.).

Ces données sont insuffisantes pour arriver à une conclusion sur la composition de notre polymère, seule une comparaison à une banque de spectres IR pourrait mener à une bonne orientation de l'identification des groupements fonctionnels de ce polymère. De plus, il faut tenir compte de la présence d'éventuelles contaminations, vu que la purification de notre extrait n'était que partielle.

Date: 18/04/2013

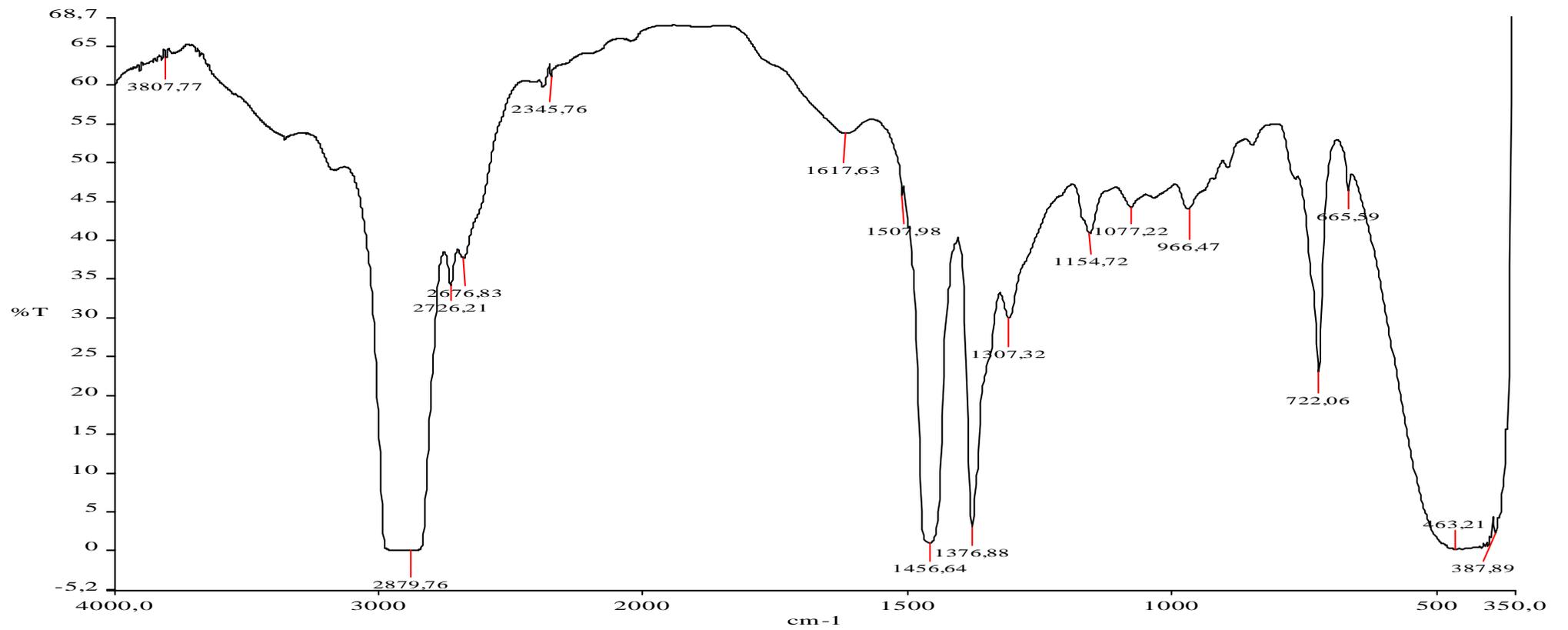


Figure 17. Spectre FT-IR des EPS produit par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DZ

II. 4.2. Analyse chimique des EPS par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les EPS produits par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ sont caractérisés quant à leur composition par CCM.

Le système choisi : Propanol/pyridine/eau distillée : (65/20/10, v/v/v), a permis une séparation des différents monomères du polysaccharide. La visualisation des spots a été effectuée après révélation avec le mélange Diphénylamine 1,8% (p/v), Aniline 1,8% (v/v) acide orthophosphorique 7,7 % (v/v) préparé dans l'acétone. Le Résultat de la migration est observé sur la **figure 18** ci-dessous.

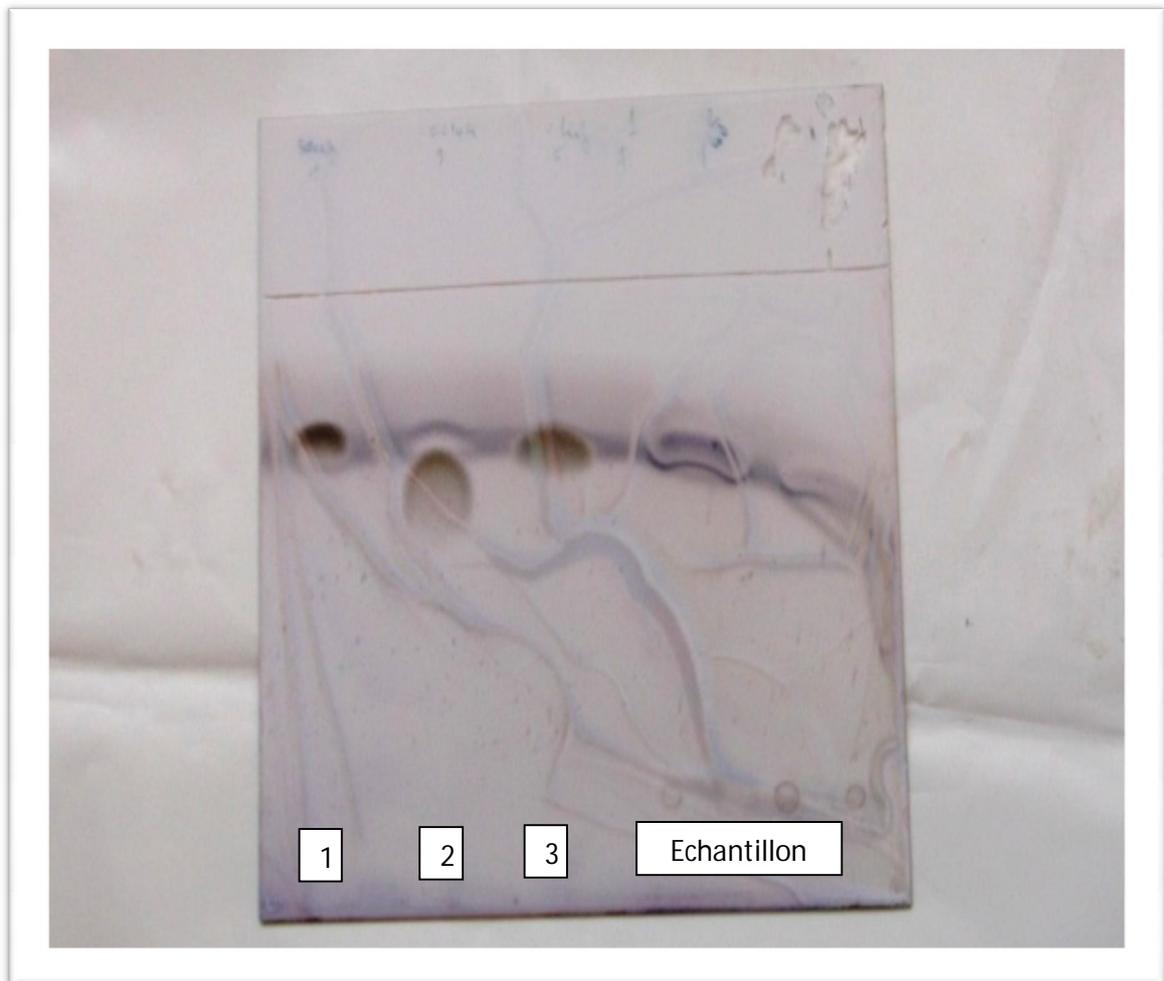


Figure 18. Profile obtenu après CCM de l'extrait d'EPS produit par *Lc. lactis* ssp. *lactis* DZ.

1 : glucose ; 2 : saccharose ; 3 : Lactose

Vu la qualité moyenne de la plaque de CCM suite à une mauvaise manœuvre lors de la révélation (plusieurs immersions dans la solution de révélation), les résultats sont peu exploitables mais à priori nous remarquons la présence unique du glucose.

Ceci pourrait être révélateur de la synthèse d'un homopolysaccharide produit par polymérisation exclusive du glucose tels que les α - glucanes principalement constitués de résidus α -D glucose liés en α (1-6) et α (1-3) rapportés produits par *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* (dextranes) et *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus* (mutanes) (Cerning, 1990) ou *Lactobacillus* spp. G-77 (α -glucane composé d'unités trisaccharidiques de α -D glucose liées en α (1-6) et α (1-2) qui produit également un β - glucane (Dueñas *et al.*, 1998).

Par contre *Lc. lactis* ssp. *cremoris* H414 produit un homopolysaccharide composé d'unités répétitives pentasaccharidiques branchés de galactose (Gruter *et al.*, 1992).

Conclusion

Conclusion

Cette étude réalisée au niveau du laboratoire central de SAIDAL, filiale ANTIBIOTICAL (Médéa, Algérie) avait pour but l'optimisation de la production d'exopolysaccharides (EPS) à partir de la souche *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DZ en étudiant quatre sucres (glucose, saccharose, lactose, fructose) et variant leurs concentrations respectives.

Les résultats relatifs à l'impact du type de sucre et de sa concentration sur la production des EPS nous ont permis d'obtenir ce classement croissant en terme d'effet stimulateur de la production (Glucose > Saccharose > Lactose > Fructose). La plus grande quantité d'EPS synthétisés a été de l'ordre de 959 mg/l obtenue à une concentration de 20% de glucose sous les conditions de l'étude à savoir milieu MRS, température de 25°C, durée de 72 h et un pH non contrôlé (pH initial de 6,5).

Nous avons également observé, d'une part, que la production est plus importante sous des conditions de croissance sub-optimales (25°C). En effet, la synthèse des EPS est indépendante de la croissance cellulaire et une compétition entre la production de biomasse cellulaire et la production d'EPS est notable. D'autre part, que le ou les EPS de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DZ renferme du glucose dans sa composition tel que révélé par CCM.

La caractérisation spectrale Infrarouge à Transformée de Fourier « FT-IR » nous a permis d'obtenir un spectre. Toutefois ce dernier est difficile à interpréter vu que l'analyse a été effectuée sur un polymère semi-pur et le manque de banque de données.

En perspectives, nous suggérons que cette étude soit reprise en utilisant les conditions optimales obtenues et d'utiliser des techniques plus raffinées dans la purification telles que l'HPLC-GC/MS et dans la caractérisation telles que la diffraction rayons X et la résonance magnétique nucléaire (RMN).

Synthèse bibliographique

- Aouni N et Bitouri M. (2006). Proposition d'un plan communication, Edition : Filiale Antibiotical Médéa. 85p.
- Bergmaier D. (2002). Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lb.rhamnosus* rw-9595m d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse de Doctorat de Sciences des Aliments et de la Nutrition. Université Laval, Faculté des sciences de l'agriculture et l'alimentation, Québec, 149p.
- Causse B. (2009). Mécanismes d'adsorption des métaux lourds par les exopolysaccharides bactériens : Le système Xanthane –cuivre comme modèle d'étude Thèse de Doctorat de Sciences de l'Environnement. Université Joseph Fourier-Grenoble I, laboratoire de Géophysique interne et Tectonophysique, Grenoble, 274p.
- Cerning J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters. **87**, 113-130.
- Cerning J. (1994). Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. In : de Roissart H et Luquet FM. (Eds.), Bactéries lactiques. Lorica –Uriage, pp. 309-329.
- Chapot-Chartier M, Watterlot L, Meyrand M, Gaide N, Kharrat P, Blugeon S, Gratadoux J, Flores MJ, Langella P et Bermúdez-Humarán L G.(2010).Variations of N-acetylation level of peptidoglycan do not influence persistence of *Lactococcus lactis* in the gastrointestinal tract. International Journal of Food Microbiology. **144**, 29-34.
- De Vuyst L, Vanderveken F, Van de ven S et Degeest B. (1998). Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. Journal of Applied Microbiology. **84**(6):1059-1068.

- De Vuyst L, De Vin F, Vaningelgem F et Degeest B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **11**, 687-707.
- De Vuyst L, Zamfir M, Mozzi F, Adriany T, Marshall V, Degeest B et Vaningelgem F. (2003). Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *International Dairy Journal*. **13**, 707-717.
- Donot A, Fontana JC, Baccou S et Schorr-Galindo. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*. **87**, 951-962.
- Douaire M. (2010). Etude expérimentale et numérique de la réponse de *Lactococcus lactis* ncd02118 aux conditions hydrodynamiques locales en réacteur couette. Thèse de Doctorat de Génie des Procédés de l'Environnement. Université de Toulouse, France, 296p.
- Doublier L, Garnier C, Renard D et Sanchez C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. **5**, 202-214.
- Drider D et Prevost H. (2009). Bactéries lactiques. Edition : Economica. Paris, pp. 73-97.
- Dueñas M, Miguel A, Rodriguez C, Mateo PT, Espartero JL, Irastorza-Iribas A, Antonio M et Serrano G. (1997). Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp. G-77. *Carbohydrate Research*. **307**, 125-133.
- Dueñas M, Munduate A, Perea A et Irastorza A. (2003). Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semi defined medium under different growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*. **87**, 113- 120.

- Dupont I. (1998). Identification moléculaire de souches de *Lactobacillus* productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches. Thèse de Doctorat de Sciences des Aliments et de Nutrition. Université Laval, Faculté des sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Canada, 273p.
- Gamar-Nourani L, Vanhaverbeke C, Bosso C, Colin-Morel P, Gey C, Blondeau K, Simonet JM et Heyraud A.(1997). Structure of an extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. Carbohydrate Research. **314**, 211-220.
- Gao C, Wang Z, Su T, Zhang J, Yang X . (2012). Optimization of exopolysaccharide production by *Gomphidius Rutilus* and its antioxidant activities *in vitro*. Carbohydrate Polymers .**87**, 2299– 2305.
- Garrido F, Michel C et Morin D. (2002). Les exopolymères bactériens. Edition : BRGM. France, pp. 20-40.
- Garrigues C, Cocaign-Bousquet M, Loubiere P et Lindley ND. (1996). Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. Antonie van Leeuwenhoek .**70** (2-4): 253-267.
- Grobber G., Smith M. R. Sikkema J. de Bont J. A. M. (1996). Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. Applied Microbiology and Biotechnology. **46**, 279–284.
- Gruter M, Leeflang BR, Kuiper J, Johannis PK, Johannes F G et Liegenthart V. (1992). Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H414 grown in a defined medium or skimmed milk. Carbohydrate Research. **231**, 273-291.

- Guiraud JP. (2003). Microbiologie Alimentaire. Edition: Dunod. Paris, 87p.
- Habimana O, Meyrand M, Meylheuc T, Kulakauskas S et Briandet R. (2009). Genetic Features of Resident Biofilms Determine Attachment of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. **75** (24): 7814–7821.
- Harding LP, Marshall V M, Hernandez Y, Gu Y, Maqsood M, McLay N et Laws A P. (2005). Structural characterisation of a highly branched exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB2074. Carbohydrate Research. **340**, 1107-1111.
- Heyraud A, Bresin A, Rinaudo M, Santaella C, Baynast R et Heulin T. (2008). Production industriel d'un polysaccharide bactérien luttant contre le stress hydrique. Edition : Techniques de l'ingénieur, pp. 35-70.
- Jin M, Wang Y, Xu C, Lu Z, Huang M, Wang Y. (2010). Preparation and biological activities of an exopolysaccharide produced by *Enterobacter cloacae* Z0206. Carbohydrate Polymers. **81**, 607–611.
- Jonas R, Farah LF. (1998) .production and application of microbial cellulose. Polymer degradation and stability. **59**, (1-3):101-106.
- Kaci Y. (2006). Les bactéries productrices de polysaccharides dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum*) : effet sur l'agrégation du sol. Thèse de Doctorat, ISN-USTHB, Alger, 201p.

- Liu C, Lu J , Lu L, Liu , Wang F et Xiao M.(2010). Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresource Technology*. **101**, 5528–5533.
- Looijesteijn PJ et Hugenholtz J. (1999). Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* NIZO B40 and optimization of its synthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **88** (2):178-182.
- Looijesteijn PJ, Casteren W, Tuinier R, Doeswijk-Voragen C et Hugenholtz J. (2000). Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in continuous cultures. *Journal of Applied Microbiology*. **89** (1):116-122.
- Macedo M, Lacroix C, Gardner N J et Champagne C P. (2002). Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeates. *International Dairy Journal*. **12**, 419-426.
- Nanci b A, Nancib N, Meziane-Cherif D, Boubendir A, Fick M et Boudrant J. (2005). Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource Technology*. **96**, 63–67.
- Nakajima H, Hirota T, Toba T, Takatoshiltoh et Adachi S. (1992).Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Carbohydrate Research*. **224**, 245-253.
- Notararigo S, Lopez P, Nacher-Vazquez M, Ibarburu I, Werning ML et de Palencia PF, Duenas M T, Aznar R et Prieto A. (2013). Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*. **93**(1):57-64.
- Pan D et Xiuming Mei b. (2010). Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. *Carbohydrate Polymers*. **80**, 908–914.

- Pan D, Guo Y, Li H, Sun Y, Zeng X et Yan B. (2013). Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Food Chemistry. **138**, 84–89.
- Petry S ,Furlan S, Waghorne E, Saulnier L , Cerning J et Maguin E. (2003). Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides. FEMS Microbiology Letters. **221**, 285-291.
- Quérellou J et Guézennec J. (2010). Biotechnologie des extrêmophiles. Editions : Techniques de l'ingénieur, pp.84-121.
- Racine M, Dumont J et Morin A. (1991). Production de polysaccharides microbiens sur des milieux glucidiques en surplus au Québec. Rapport final d'un projet de recherche. Centre de recherche, de développement et de transfert technologique en acériculture (ACER). St-Hyacinthe, Canada, 27p.
- Ramos A, Boels IC, de Vos WM et Santos H. (2001). Relation ship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol.**67** (1):33-41.
- Reddy MS, Washam CJ, Reinbold GW et Vadamuthu ER. (1973).Immunogenic Properties of Slime from Propionibacteria. Journal of Food Technol.**36**, 200-201.
- Roissart H et Luquet FM. (1994). Bactéries lactiques « aspects fondamentaux et technologie ». Edition : LORICA (I), pp. 309-329.
- Ruas-Madiedo P et de los Reyes-Gavilan CG. (2005).Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. Journal of Dairy Sci. **88**, 843-856.

- Sikkema J, Oba T, Higashimura M, Iwasaki T, Matser A M, Steeneken P A M et Robijn G W .(1999). Viscoelastic properties of aqueous solutions of the phosphopolysaccharide “viilian” from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. Carbohydrate Polymers. **39**, 275-281.
- Stuart B. (2004). Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Edition: Wiley .Danemark, pp.70 -163.
- Sutherland RM et Durand RE. (1972). Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. Experimental cell research.**71**, 75-80.
- Sutherland M D et Gregory J P. (1982). The hydrocyanation of free and polymer-bound benzoquinone. Tetrahedron, **38**, 1471-1476.
- Sutherland IW. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. Trends in Biotechnology. **16**, 41-6.
- Vamanu E, Pelnescu D, AvramI ,Vamanu A, Vassu T et Campeanu G .(2010).The identification and the influence of different glucides on the production of exopolysaccharides at the strains *Lactobacillus* sp. IL2 and *Lactobacillus* sp. IL3. Romanian Biotechnological Letters.15(3) :7p.
- Van Kranenburg R, Boels I , Kleerebezem M, de Vos M W. (1999).Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. Current Opinion in Biotechnology. **10**,498-504.
- Venzke D, Domgall I, Köcher, Féthière J, Fischer S et Böttcher B. (2005). Elucidation of the Stator Organization in the V-ATPase of *Neurospora crassa*. Journal of Molecular Biology. **349**, 659-669.
- Whitfield C et Can J. (1988). Bacterial extracellular polysaccharide. Microbiology. **34**, 415-420.

- Xu R, Ma S, Wang Y, Liu L et Li P.(2010). Screening, identification and statistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT. African Journal of Microbiology Research. **4**(9):783-795.
- Xu X, ZhuL, Han-ying Q, Mei-le L, KongY et Yan-wen Y. (2012). Component analysis of extracellular polymeric substances (EPS) during aerobic sludge granulation using FTIR and 3D-EEM technologies. Bioresource Technology. **124**, 455–459.
- Yuksekdag ZN et Aslim B. (2008). Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (b3, g12) and *Streptococcus thermophilus* (w22). Brazilian Archives of Biology and Technology. **51** (3):581-585.

Annexes

Annexe I : Présentation de l'organisme d'accueil (SAIDAL)

1. Historique

En 1989 et suite à la mise en œuvre des réformes économiques SAIDAL devient une entreprise publique économique dotée d'une autonomie de gestion et fut choisie parmi les premières entreprises nationales pour acquérir le statut de société par actions (**Aouni et Bitouri 2006**).

En 1993 des changements ont été apportés au statut de l'entreprise lui permettant de participer à toute opération industrielle ou commerciale pouvant se rattacher à son objet social par voie de création de sociétés nouvelles ou de filiales. En 1997 la société SAIDAL a mis en œuvre un plan de restructuration qui s'est traduit par sa transformation en groupe industriel le 02 février 1998. Le groupe SAIDAL est une société par actions au capital de 2.500.000.00000 DA qui se présente par ses entités centrales de gestion d'un centre de recherche et de développement de centre de distribution d'une direction de marketing et information médicale et trois filiales de production (**Aouni et Bitouri 2006**).

La mission principale est de développer de produire et de commercialiser des produits à usage humain et vétérinaire. La vision du groupe réside dans sa capacité de se projeter dans le futur et d'acquérir une position de leader au niveau régional et national tout en pénétrant le marché international (**Aouni et Bitouri 2006**).

2. Objectifs stratégiques du groupe SAIDAL

Les objectifs du groupe sont (archive de l'entreprise) :

- La recherche de la satisfaction totale du client par la mise en place progressive du processus de management de la qualité.
- La diversification de la gamme de production par le biais d'une politique de recherche et de développement de nouveaux médicaments génériques dans les formes galéniques de nouvelles générations et la mise en place d'une veille technologique.
- Le développement du partenariat déjà engagé à travers des projets avec des laboratoires de notoriété internationale soit de la forme de société en joint-venture soit par le biais d'accord de façonnage.
- La préservation et l'augmentation des parts du marché national pour assurer la pérennité du groupe.

- La pénétration du marché international en assurant les exportations et la recherche permanente de l'accroissement des performances économiques et financières tout en intégrant les préoccupations de santé publique du pays.

3. Présentation de la filiale ANTIBIOTICAL

ANTIBIOTICAL est située à MEDEA (quatre vingt kilomètre au sud d'Alger) s'étend sur une superficie de 25 hectares dont plus de 19 hectares couvert d'une capacité de production de 60 millions d'unités de vente spécialisée dans la production des médicaments antibiotiques et autres dotée de toutes les installations nécessaires à la fabrication des médicaments depuis l'obtention du principe actif jusqu'à la mise en forme galénique du produit à savoir :

- Unité de production des matières premières en vrac par fermentation et semi-synthèse ;
- Deux bâtiments de production de produits finis l'un consacré aux produits pénicilliniques et l'autre aux non pénicilliniques ;
- Une unité de production d'article de conditionnement (imprimerie) ;
- D'une station de traitement des effluents nécessaires au fonctionnement de toutes les installations du complexe appelée services généraux.
- D'un laboratoire doté de plusieurs structures pour effectuer toutes les analyses et contrôles réglementaires dont un laboratoire pilote pour les besoins de la fermentation et la synthèse et d'un laboratoire chargé de la recherche et développement galénique. Le laboratoire central est doté aussi d'une animalerie pour l'élevage des animaux de laboratoire ;
- D'une station de récupération des solvants ;
- D'une station de traitement des effluents pour la protection de l'environnement.

Ces unités répondent aux normes internationales les plus exigeantes grâce à une technologie et un savoir faire de haut niveau.

Aujourd'hui la filiale fabrique plus de 40 formulations utilisées dans différents secteurs thérapeutiques et sous diverses formes de dosage.

C'est aussi un fabricant de matières premières comme la pénicilline G benzathine (**Aouni et Bitouri 2006**).

Annexe II : Réactifs et milieux de culture

1-Réactifs:

Hydroxyde de sodium (NaOH)

- Hydroxyde de sodium.....40 g
- Eau distillé stérile1000ml

Chlorure d'hydrogène (HCL)

- Chlorure d'hydrogène365g
- Eau distillé stérile1000ml

Trichloroacétate (TCA à 15 %)

- Trichloroacétate15 g
- Eau distillé stérile 100ml

Ethanol absolu ($\geq 998\%$)

Acide sulfurique (74%)

- acide sulfurique..... 40 ml
- Eau distillé stérile100ml

Phénol 6%

- Phénol6g
- Eau distillé stérile.....100ml

Bromure de potassium (K Br)

Phase mobile de CCM

- Propane -2 ol.....65ml
- Pyridine..... 20 ml
- Eau distillée10 ml

La solution de révélation de CCM

Diphénylamine 18% (p/v) :

- Diphénylamine18 g
- Acétone100 ml

Aniline 18% (v/v): (Acros Organics Belgique)

- Aniline.....18 ml
- Acétone.....100 ml

Acide orthophosphorique 77% (v/v)(Labosi France)

- Acide orthophosphorique.....77 ml
- Acétone (Analar Normapus France).....100ml

2- Milieux de culture (Guiraud 2003)

MRS (de Man Rogosa et Sharp) (IPA)

Composants	Quantités
Peptone	10 g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate triammonique	2g
Sulfate de magnésium	200 mg
Sulfate de manganèse	50 mg
Eau distillée	Qsp.1L

pH= 6,5 et autoclaver à 120 °C/ 15 min

Annexe III : Liste des figures

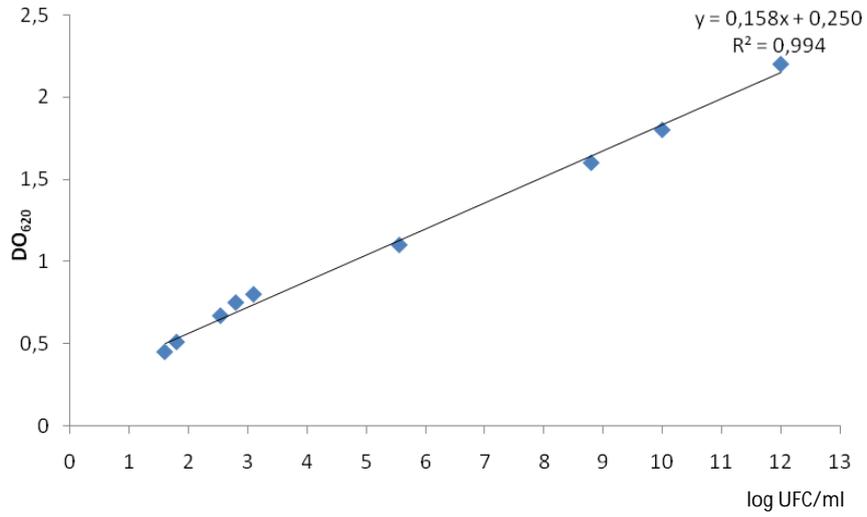


Figure 01. Courbe de croissance *Lc. lactis ssp. lactis*

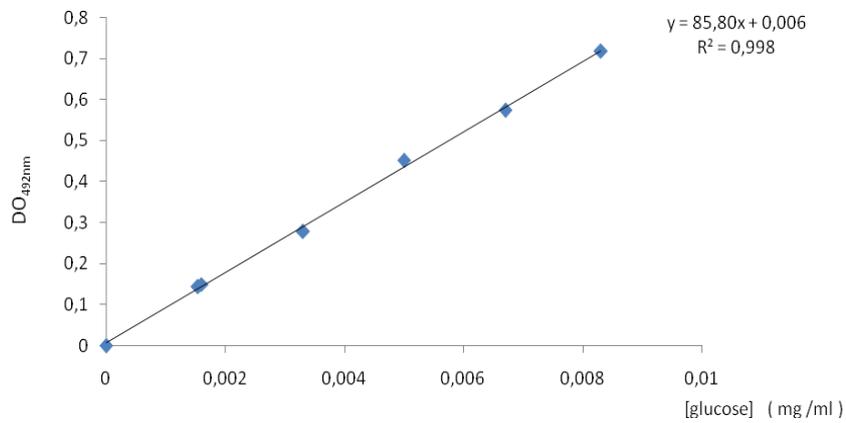


Figure 02. Courbe standard ($A_{492} = f$ [glucose])

Annexe IV : Liste des tableaux

Tableau I. Milieux utilisés pour la production des exopolysaccharides (EPS) par les bactéries lactiques (**Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilan 2005**).

Milieux de culture	Références
CDM	Marshall <i>et al.</i> (1995); van Kranenburget <i>al.</i> (1997); Higashimura <i>etal.</i> (2000).
CDM MRS SDM	Van Geel-Schuttenet <i>al.</i> (1999); Petryet <i>al.</i> (2000).
WP	Nakajima <i>et al.</i> (1990 1992); van Casterenet <i>al.</i> (1998) 2000ab ; Yang <i>et al.</i> 1999 2000; Tuinieret <i>al.</i> (1999b); Dal Bello <i>et al.</i> (2001); Degeestet <i>al.</i> (2001a);Rimada and Abraham (2001); Ricciardiet <i>al.</i> (2002).
SM	Docoet <i>al.</i> (1990) ;van Marle and Zoon (1995);Mozziet <i>al.</i> (1995 1996) ;Faberet <i>al.</i> (1998 2001b) ;Staaf et al.(2000) ;Torino <i>et al.</i> (2000a2001; Navariniet <i>al.</i> (2001) ;Ruas-Madiedoet <i>al.</i> (2002b) ;Petryet <i>al.</i> (2003).
BMM UFM SM	Garcia-Garibay et Marshall (1991); Cerninget <i>al.</i> (1994).
MRS	Grobbenet <i>al.</i> (1995); Dupont <i>et al.</i> (2000); Frengovaet <i>al.</i> (2000);Knoshaug et al. (2000); Pham <i>et al.</i> (2000); Marshall <i>et al.</i> (2001ab);Navariniet <i>al.</i> 2001; Van Calsteren et <i>al.</i> (2002); Harding <i>et al.</i> (2003).
SM SDM	Gruter <i>et al.</i> (1992 1993);Van den Berg <i>et al.</i> (1995); Stingelet <i>al.</i> (1996); Lemoine <i>et al.</i> 1997; De Vuystet <i>al.</i> 1998); Faberet <i>al.</i> (2001a 2002).
SM UFM	Cerninget <i>al.</i> 1986 1988 1992; AbbadAndaloussiet <i>al.</i> 1995; Bouzaret <i>al.</i> 1996 1997.
ST1	Gancel and Novel .(1994).
BMM WP SWP	Bergmaieret <i>al.</i> (2001).
WM	Urashimaet <i>al.</i> (1999).
Sourdough	Korakliet <i>al.</i> (2001).
WPC	Zisuet Shah (2003).

BMM = Basal minimal medium CDM = chemically defined medium MRS = de ManRogosa and Sharpe medium SDM = semi-defined medium SM = skim milk ST1 = semi-synthetic medium SWP = supplemented whey permeate medium UFM = ultrafilteredmilk WM =whey medium WP = whey permeate medium WPC=whey permeatecon centrate medium.

Tableau II : Résultats de la croissance des cultures bactériennes

Source de carbone	[sucre]	DO _{620 nm}			Inoculum×10 ⁸ (UFC/ml)			
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	moyenne
glucose	1%	3,4	3,2	3,1	19,94	18,67	18,04	18,883
	5%	4,53	4,38	4,4	27,09	26,14	26,27	24,596
	10%	7,7	7,92	7,8	47,15	48,54	47,78	47,823
	15%	8,89	8,518	8,710	53,42	52,33	53,54	53,096
	20 %	9,84	10,025	9,75	60,70	61,87	60,13	60,900
Saccharose	1%	1,680	1,803	1,812	9,05	9,83	9,89	9,590
	5%	1,55	1,488	1,501	8,23	7,84	7,92	8,000
	10%	1,25	1,193	1,271	6,33	5,97	6,46	6,253
	15%	1,00	0,936	0,954	4,75	4,34	4,46	4,516
	20 %	0,725	0,765	0,784	3,01	3,26	3,38	3,216
Lactose	1%	0,530	0,582	0,540	1,77	2,1	1,84	1903
	5%	1,95	0,977	1,251	5,98	4,6	6,34	5,64
	10%	1,539	1,110	1,307	8,10	5,44	6,69	6,74
	15%	1,540	1,750	1,590	8,16	9,49	8,48	871
	20 %	2,12	1,964	2,025	11,84	10,85	11,23	11,306
Fructose	1%	3,863	4,980	3,854	22,87	29,94	22,81	49,980
	5%	7,675	8,910	7,854	46,99	54,81	48,13	83,063
	10%	7,675	14,004	13,145	80,53	87,05	81,61	86,660
	15%	13,320	14,220	14,285	82,72	88,42	88,84	89,660
	20 %	13,836	14,610	14,506	85,99	90,89	90,23	89,036

Tableau III: Résultats de la production des EPS par *Lc. lactis* ssp, *lactis* DZ en fonction de la concentration de glucose

	Glucose				
	1%	5%	10%	15%	20%
T1 (mg/ml)	0,5616	0,5604	0,5855	0,5552	0,936
T2 (mg/ml)	0,6053	0,5604	0,6023	0,5895	0,982
T3 (mg/ml)	0,58345	0,5895	0,612	0,6002	0,959
Moyenne	0,58345	0,5701	0,612	0,6002	0,959

Tableau IV : Résultats de la production des EPS par *Lc, lactis* ssp, *lactis* DZ en fonction de la concentration de saccharose :

	Saccharose				
	1%	5%	10%	15%	20%
T1 (mg/ml)	0,5619	0,5701	0,6138	0,5877	0,6411
T2 (mg/ml)	0,6059	0,6258	0,7318	0,6085	0,798
T3 (mg/ml)	0,5952	0,6032	0,6458	0,6134	0,8023
Moyenne	0,5952	0,6032	0,6458	0,6032	0,8023

Tableau V : Résultats de la production des EPS par *Lc, lactis* ssp, *lactis* DZ en fonction de la concentration de lactose :

	Lactose				
	1%	5%	10%	15%	20%
T1(mg/ml)	0,5562	0,5563	0,559	0,5652	0,6064
T2 (mg/ml)	0,592	0,5922	0,599	0,614	0,7139
T3 (mg/ml)	0,5901	0,5806	0,5901	0,6129	0,6802
Moyenne	0,57	0,57	0,58	0,6	0,67

Tableau VI : Résultats de la production des EPS par *Lc, lactis* ssp, *lactis* DZ en fonction de la concentration de fructose :

	Fructose				
	1%	5%	10%	15%	20%
T1 (mg/ml)	0,2744	0,2808	0,278	0,31	0,306
T2 (mg/ml)	0,287	0,3026	0,3005	0,373	0,364
T3 (mg/ml)	0,2928	0,3101	0,3039	0,356	0,35
Moyenne	0,2847	0,2978	0,2941	0,3463	0,34

Tableau VII : Résultats de taux de croissance et la production des EPS en variation de la concentration de glucose dans le milieu :

	Glucose				
	1%	5%	10%	15%	20%
Croissance (log ₁₀ UFC/ml)	9,28	9,39	9,68	9,73	9,78
EPS (mg/ml)	0,58	0,57	0,61	0,60	0,96

Tableau VIII : Résultats de taux de croissance et la production des EPS en variation de la concentration de saccharose dans le milieu,

	Saccharose				
	1%	5%	10%	15%	20%
Croissance (log ₁₀ UFC/ml)	8,98	8,90	8,8	8,65	8,51
EPS (mg/ml)	0,59	0,60	0,66	0,60	0,75

Tableau IX : Résultats de taux de croissance et la production des EPS en variation de la concentration de lactose dans le milieu,

	Lactose				
	1%	5%	10%	15%	20%
Croissance (log ₁₀ UFC/ml)	8,28	8,75	8,83	8,94	9,05
EPS (mg/ml)	0,57	0,57	0,58	0,60	0,67

Tableau X: Résultats de taux de croissance et la production des EPS en variation de la concentration de fructose dans le milieu,

	Fructose				
	1%	5%	10%	15%	20%
Croissance (log ₁₀ UFC/ml)	9,40	9,7	9,92	9,94	9,95
EPS (mg/ml)	0,285	0,297	0,294	0,346	0,34

Annexe V : Analyse statistique

XLSTAT 2009.1.02 - ANOVA - le 05/05/2013 à 10:12:02

Y / Quantitatives : Classeur = croissance + EPS.xlsx / Feuille = Feuill / Plage = Feuill!\$C\$2:\$D\$62 / 60 lignes et 2 colonnes

X / Qualitatives : Classeur = croissance + EPS.xlsx / Feuille = Feuill / Plage = Feuill!\$B\$2:\$B\$62 / 60 lignes et 1 colonne

Intervalle de confiance (%) : 95

Utiliser les moyennes estimées : Oui

Tableau I : Résultat d'analyse des différences taux de croissance entre les modalités (sucre) avec un intervalle de confiance à 95% :Newman-Keuls (SNK)

Modalité	Moyenne estimée(Croissance)	Groupes
Lactose 20%	1,903	A
Saccharose 20 %	3,217	A B
Saccharose 15%	4,517	A B C
Lactose 5%	5,640	A B C D
Saccharose 10%	6,253	A B C D
Lactose 10%	6,743	B C D
Saccharose 5%	7,997	C D E
Lactose 15 %	8,710	C D E
Saccharose 1%	9,590	D E
Lactose 1%	11,307	E
Glucose 1%	18,883	F
Fructose 1%	25,207	G
Glucose 5%	26,500	G
Glucose 10%	47,823	H
Fructose 5%	49,977	H I
Glucose 15%	53,097	I
Glucose 20%	60,900	J
Fructose 10%	83,063	K
Fructose 15%	86,660	L
Fructose 20%	89,037	L

Tableau II: Résultat d'analyse des différences taux de croissance entre les modalités(sucre) avec un intervalle de confiance à 95%

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
Lactose 20% vs Fructose 20%	-87,133	-56,120	3,788	< 0,0001	Oui
Lactose 20% vs Fructose 15%	-84,757	-54,589	3,757	< 0,0001	Oui
Lactose 20% vs Fructose 10%	-81,160	-52,273	3,724	< 0,0001	Oui
Lactose 20% vs Glucose 20%	-58,997	-37,998	3,688	< 0,0001	Oui
Lactose 20% vs Glucose 15%	-51,193	-32,972	3,651	< 0,0001	Oui
Lactose 20% vs Fructose 5%	-48,073	-30,963	3,610	< 0,0001	Oui
Lactose 20% vs Glucose 10%	-45,920	-29,576	3,567	< 0,0001	Oui
Lactose 20% vs Glucose 5%	-24,597	-15,842	3,519	< 0,0001	Oui
Lactose 20% vs Fructose 1%	-23,303	-15,009	3,468	< 0,0001	Oui
Lactose 20% vs Glucose 1%	-16,980	-10,936	3,411	< 0,0001	Oui
Lactose 20% vs Lactose 1%	-9,403	-6,056	3,348	< 0,0001	Oui
Lactose 20% vs Saccharose 1%	-7,687	-4,951	3,277	0,000	Oui
Lactose 20% vs Lactose 15 %	-6,807	-4,384	3,197	0,002	Oui
Lactose 20% vs Saccharose 5%	-6,093	-3,925	3,103	0,006	Oui
Lactose 20% vs Lactose 10%	-4,840	-3,117	2,992	0,037	Oui
Lactose 20% vs Saccharose 10%	-4,350	-2,802	2,856	0,057	Non
Lactose 20% vs Lactose 5%	-3,737	-2,407			Non
Lactose 20% vs Saccharose 15%	-2,613	-1,683			Non
Lactose 20% vs Saccharose 20 %	-1,313	-0,846			Non
Saccharose 20 % vs Fructose 20%	-85,820	-55,274	3,757	< 0,0001	Oui
Saccharose 20 % vs Fructose 15%	-83,443	-53,743	3,724	< 0,0001	Oui
Saccharose 20 % vs Fructose 10%	-79,847	-51,427	3,688	< 0,0001	Oui
Saccharose 20 % vs Glucose 20%	-57,683	-37,152	3,651	< 0,0001	Oui
Saccharose 20 % vs Glucose 15%	-49,880	-32,126	3,610	< 0,0001	Oui
Saccharose 20 % vs Fructose 5%	-46,760	-30,117	3,567	< 0,0001	Oui
Saccharose 20 % vs Glucose 10%	-44,607	-28,730	3,519	< 0,0001	Oui
Saccharose 20 % vs Glucose 5%	-23,283	-14,996	3,468	< 0,0001	Oui
Saccharose 20 % vs Fructose 1%	-21,990	-14,163	3,411	< 0,0001	Oui

Saccharose 20 % vs Glucose 1%	-15,667	-10,090	3,348	< 0,0001	Oui
Saccharose 20 % vs Lactose 1%	-8,090	-5,211	3,277	0,000	Oui
Saccharose 20 % vs Saccharose 1%	-6,373	-4,105	3,197	0,004	Oui
Saccharose 20 % vs Lactose 15 %	-5,493	-3,538	3,103	0,017	Oui
Saccharose 20 % vs Saccharose 5%	-4,780	-3,079	2,992	0,041	Oui
Saccharose 20 % vs Lactose 10%	-3,527	-2,271	2,856	0,175	Non
Saccharose 20 % vs Saccharose 10%	-3,037	-1,956			Non
Saccharose 20 % vs Lactose 5%	-2,423	-1,561			Non
Saccharose 20 % vs Saccharose 15%	-1,300	-0,837			Non
Saccharose 15% vs Fructose 20%	-84,520	-54,437	3,724	< 0,0001	Oui
Saccharose 15% vs Fructose 15%	-82,143	-52,906	3,688	< 0,0001	Oui
Saccharose 15% vs Fructose 10%	-78,547	-50,590	3,651	< 0,0001	Oui
Saccharose 15% vs Glucose 20%	-56,383	-36,315	3,610	< 0,0001	Oui
Saccharose 15% vs Glucose 15%	-48,580	-31,289	3,567	< 0,0001	Oui
Saccharose 15% vs Fructose 5%	-45,460	-29,279	3,519	< 0,0001	Oui
Saccharose 15% vs Glucose 10%	-43,307	-27,893	3,468	< 0,0001	Oui
Saccharose 15% vs Glucose 5%	-21,983	-14,159	3,411	< 0,0001	Oui
Saccharose 15% vs Fructose 1%	-20,690	-13,326	3,348	< 0,0001	Oui
Saccharose 15% vs Glucose 1%	-14,367	-9,253	3,277	< 0,0001	Oui
Saccharose 15% vs Lactose 1%	-6,790	-4,373	3,197	0,002	Oui
Saccharose 15% vs Saccharose 1%	-5,073	-3,268	3,103	0,033	Oui
Saccharose 15% vs Lactose 15 %	-4,193	-2,701	2,992	0,097	Non
Saccharose 15% vs Saccharose 5%	-3,480	-2,241			Non
Saccharose 15% vs Lactose 10%	-2,227	-1,434			Non
Saccharose 15% vs Saccharose 10%	-1,737	-1,119			Non
Saccharose 15% vs Lactose 5%	-1,123	-0,724			Non
Lactose 5% vs Fructose 20%	-83,397	-53,713	3,688	< 0,0001	Oui
Lactose 5% vs Fructose 15%	-81,020	-52,183	3,651	< 0,0001	Oui
Lactose 5% vs Fructose 10%	-77,423	-49,866	3,610	< 0,0001	Oui
Lactose 5% vs Glucose 20%	-55,260	-35,591	3,567	< 0,0001	Oui
Lactose 5% vs Glucose 15%	-47,457	-30,565	3,519	< 0,0001	Oui
Lactose 5% vs Fructose 5%	-44,337	-28,556	3,468	< 0,0001	Oui

Lactose 5% vs Glucose 10%	-42,183	-27,169	3,411	< 0,0001	Oui
Lactose 5% vs Glucose 5%	-20,860	-13,435	3,348	< 0,0001	Oui
Lactose 5% vs Fructose 1%	-19,567	-12,602	3,277	< 0,0001	Oui
Lactose 5% vs Glucose 1%	-13,243	-8,530	3,197	< 0,0001	Oui
Lactose 5% vs Lactose 1%	-5,667	-3,650	3,103	0,012	Oui
Lactose 5% vs Saccharose 1%	-3,950	-2,544	2,992	0,136	Non
Lactose 5% vs Lactose 15 %	-3,070	-1,977			Non
Lactose 5% vs Saccharose 5%	-2,357	-1,518			Non
Lactose 5% vs Lactose 10%	-1,103	-0,711			Non
Lactose 5% vs Saccharose 10%	-0,613	-0,395			Non
Saccharose 10% vs Fructose 20%	-82,783	-53,318	3,651	< 0,0001	Oui
Saccharose 10% vs Fructose 15%	-80,407	-51,788	3,610	< 0,0001	Oui
Saccharose 10% vs Fructose 10%	-76,810	-49,471	3,567	< 0,0001	Oui
Saccharose 10% vs Glucose 20%	-54,647	-35,196	3,519	< 0,0001	Oui
Saccharose 10% vs Glucose 15%	-46,843	-30,170	3,468	< 0,0001	Oui
Saccharose 10% vs Fructose 5%	-43,723	-28,161	3,411	< 0,0001	Oui
Saccharose 10% vs Glucose 10%	-41,570	-26,774	3,348	< 0,0001	Oui
Saccharose 10% vs Glucose 5%	-20,247	-13,040	3,277	< 0,0001	Oui
Saccharose 10% vs Fructose 1%	-18,953	-12,207	3,197	< 0,0001	Oui
Saccharose 10% vs Glucose 1%	-12,630	-8,135	3,103	< 0,0001	Oui
Saccharose 10% vs Lactose 1%	-5,053	-3,255	2,992	0,026	Oui
Saccharose 10% vs Saccharose 1%	-3,337	-2,149	2,856	0,220	Non
Saccharose 10% vs Lactose 15 %	-2,457	-1,582			Non
Saccharose 10% vs Saccharose 5%	-1,743	-1,123			Non
Saccharose 10% vs Lactose 10%	-0,490	-0,316			Non
Lactose 10% vs Fructose 20%	-82,293	-53,003	3,610	< 0,0001	Oui
Lactose 10% vs Fructose 15%	-79,917	-51,472	3,567	< 0,0001	Oui
Lactose 10% vs Fructose 10%	-76,320	-49,155	3,519	< 0,0001	Oui
Lactose 10% vs Glucose 20%	-54,157	-34,881	3,468	< 0,0001	Oui
Lactose 10% vs Glucose 15%	-46,353	-29,855	3,411	< 0,0001	Oui
Lactose 10% vs Fructose 5%	-43,233	-27,845	3,348	< 0,0001	Oui
Lactose 10% vs Glucose 10%	-41,080	-26,458	3,277	< 0,0001	Oui

Lactose 10% vs Glucose 5%	-19,757	-12,725	3,197	< 0,0001	Oui
Lactose 10% vs Fructose 1%	-18,463	-11,892	3,103	< 0,0001	Oui
Lactose 10% vs Glucose 1%	-12,140	-7,819	2,992	< 0,0001	Oui
Lactose 10% vs Lactose 1%	-4,563	-2,939	2,856	0,041	Oui
Lactose 10% vs Saccharose 1%	-2,847	-1,833	2,680	0,273	Non
Lactose 10% vs Lactose 15 %	-1,967	-1,267			Non
Lactose 10% vs Saccharose 5%	-1,253	-0,807			Non
Saccharose 5% vs Fructose 20%	-81,040	-52,195	3,567	< 0,0001	Oui
Saccharose 5% vs Fructose 15%	-78,663	-50,665	3,519	< 0,0001	Oui
Saccharose 5% vs Fructose 10%	-75,067	-48,348	3,468	< 0,0001	Oui
Saccharose 5% vs Glucose 20%	-52,903	-34,073	3,411	< 0,0001	Oui
Saccharose 5% vs Glucose 15%	-45,100	-29,048	3,348	< 0,0001	Oui
Saccharose 5% vs Fructose 5%	-41,980	-27,038	3,277	< 0,0001	Oui
Saccharose 5% vs Glucose 10%	-39,827	-25,651	3,197	< 0,0001	Oui
Saccharose 5% vs Glucose 5%	-18,503	-11,917	3,103	< 0,0001	Oui
Saccharose 5% vs Fructose 1%	-17,210	-11,084	2,992	< 0,0001	Oui
Saccharose 5% vs Glucose 1%	-10,887	-7,012	2,856	< 0,0001	Oui
Saccharose 5% vs Lactose 1%	-3,310	-2,132	2,680	0,161	Non
Saccharose 5% vs Saccharose 1%	-1,593	-1,026			Non
Saccharose 5% vs Lactose 15 %	-0,713	-0,459			Non
Lactose 15 % vs Fructose 20%	-80,327	-51,736	3,519	< 0,0001	Oui
Lactose 15 % vs Fructose 15%	-77,950	-50,205	3,468	< 0,0001	Oui
Lactose 15 % vs Fructose 10%	-74,353	-47,889	3,411	< 0,0001	Oui
Lactose 15 % vs Glucose 20%	-52,190	-33,614	3,348	< 0,0001	Oui
Lactose 15 % vs Glucose 15%	-44,387	-28,588	3,277	< 0,0001	Oui
Lactose 15 % vs Fructose 5%	-41,267	-26,579	3,197	< 0,0001	Oui
Lactose 15 % vs Glucose 10%	-39,113	-25,192	3,103	< 0,0001	Oui
Lactose 15 % vs Glucose 5%	-17,790	-11,458	2,992	< 0,0001	Oui
Lactose 15 % vs Fructose 1%	-16,497	-10,625	2,856	< 0,0001	Oui
Lactose 15 % vs Glucose 1%	-10,173	-6,552	2,680	< 0,0001	Oui
Lactose 15 % vs Lactose 1%	-2,597	-1,672	2,434	0,228	Non
Lactose 15 % vs Saccharose 1%	-0,880	-0,567			Non

Saccharose 1% vs Fructose 20%	-79,447	-51,169	3,468	< 0,0001	Oui
Saccharose 1% vs Fructose 15%	-77,070	-49,638	3,411	< 0,0001	Oui
Saccharose 1% vs Fructose 10%	-73,473	-47,322	3,348	< 0,0001	Oui
Saccharose 1% vs Glucose 20%	-51,310	-33,047	3,277	< 0,0001	Oui
Saccharose 1% vs Glucose 15%	-43,507	-28,021	3,197	< 0,0001	Oui
Saccharose 1% vs Fructose 5%	-40,387	-26,012	3,103	< 0,0001	Oui
Saccharose 1% vs Glucose 10%	-38,233	-24,625	2,992	< 0,0001	Oui
Saccharose 1% vs Glucose 5%	-16,910	-10,891	2,856	< 0,0001	Oui
Saccharose 1% vs Fructose 1%	-15,617	-10,058	2,680	< 0,0001	Oui
Saccharose 1% vs Glucose 1%	-9,293	-5,986	2,434	< 0,0001	Oui
Saccharose 1% vs Lactose 1%	-1,717	-1,106	2,021	0,275	Non
Lactose 1% vs Fructose 20%	-77,730	-50,064	3,411	< 0,0001	Oui
Lactose 1% vs Fructose 15%	-75,353	-48,533	3,348	< 0,0001	Oui
Lactose 1% vs Fructose 10%	-71,757	-46,216	3,277	< 0,0001	Oui
Lactose 1% vs Glucose 20%	-49,593	-31,942	3,197	< 0,0001	Oui
Lactose 1% vs Glucose 15%	-41,790	-26,916	3,103	< 0,0001	Oui
Lactose 1% vs Fructose 5%	-38,670	-24,906	2,992	< 0,0001	Oui
Lactose 1% vs Glucose 10%	-36,517	-23,519	2,856	< 0,0001	Oui
Lactose 1% vs Glucose 5%	-15,193	-9,786	2,680	< 0,0001	Oui
Lactose 1% vs Fructose 1%	-13,900	-8,953	2,434	< 0,0001	Oui
Lactose 1% vs Glucose 1%	-7,577	-4,880	2,021	< 0,0001	Oui
Glucose 1% vs Fructose 20%	-70,153	-45,184	3,348	< 0,0001	Oui
Glucose 1% vs Fructose 15%	-67,777	-43,653	3,277	< 0,0001	Oui
Glucose 1% vs Fructose 10%	-64,180	-41,336	3,197	< 0,0001	Oui
Glucose 1% vs Glucose 20%	-42,017	-27,062	3,103	< 0,0001	Oui
Glucose 1% vs Glucose 15%	-34,213	-22,036	2,992	< 0,0001	Oui
Glucose 1% vs Fructose 5%	-31,093	-20,026	2,856	< 0,0001	Oui
Glucose 1% vs Glucose 10%	-28,940	-18,639	2,680	< 0,0001	Oui
Glucose 1% vs Glucose 5%	-7,617	-4,906	2,434	< 0,0001	Oui
Glucose 1% vs Fructose 1%	-6,323	-4,073	2,021	0,000	Oui
Fructose 1% vs Fructose 20%	-63,830	-41,111	3,277	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Fructose 15%	-61,453	-39,580	3,197	< 0,0001	Oui

Fructose 1% vs Fructose 10%	-57,857	-37,264	3,103	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Glucose 20%	-35,693	-22,989	2,992	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Glucose 15%	-27,890	-17,963	2,856	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Fructose 5%	-24,770	-15,954	2,680	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Glucose 10%	-22,617	-14,567	2,434	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Glucose 5%	-1,293	-0,833	2,021	0,410	Non
Glucose 5% vs Fructose 20%	-62,537	-40,278	3,197	< 0,0001	Oui
Glucose 5% vs Fructose 15%	-60,160	-38,747	3,103	< 0,0001	Oui
Glucose 5% vs Fructose 10%	-56,563	-36,431	2,992	< 0,0001	Oui
Glucose 5% vs Glucose 20%	-34,400	-22,156	2,856	< 0,0001	Oui
Glucose 5% vs Glucose 15%	-26,597	-17,130	2,680	< 0,0001	Oui
Glucose 5% vs Fructose 5%	-23,477	-15,121	2,434	< 0,0001	Oui
Glucose 5% vs Glucose 10%	-21,323	-13,734	2,021	< 0,0001	Oui
Glucose 10% vs Fructose 20%	-41,213	-26,544	3,103	< 0,0001	Oui
Glucose 10% vs Fructose 15%	-38,837	-25,014	2,992	< 0,0001	Oui
Glucose 10% vs Fructose 10%	-35,240	-22,697	2,856	< 0,0001	Oui
Glucose 10% vs Glucose 20%	-13,077	-8,422	2,680	< 0,0001	Oui
Glucose 10% vs Glucose 15%	-5,273	-3,396	2,434	0,004	Oui
Glucose 10% vs Fructose 5%	-2,153	-1,387	2,021	0,173	Non
Fructose 5% vs Fructose 20%	-39,060	-25,157	2,992	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Fructose 15%	-36,683	-23,627	2,856	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Fructose 10%	-33,087	-21,310	2,680	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Glucose 20%	-10,923	-7,035	2,434	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Glucose 15%	-3,120	-2,009	2,021	0,051	Non
Glucose 15% vs Fructose 20%	-35,940	-23,148	2,856	< 0,0001	Oui
Glucose 15% vs Fructose 15%	-33,563	-21,617	2,680	< 0,0001	Oui
Glucose 15% vs Fructose 10%	-29,967	-19,301	2,434	< 0,0001	Oui
Glucose 15% vs Glucose 20%	-7,803	-5,026	2,021	< 0,0001	Oui
Glucose 20% vs Fructose 20%	-28,137	-18,122	2,680	< 0,0001	Oui
Glucose 20% vs Fructose 15%	-25,760	-16,591	2,434	< 0,0001	Oui
Glucose 20% vs Fructose 10%	-22,163	-14,275	2,021	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Fructose 20%	-5,973	-3,847	2,434	0,001	Oui

Fructose 10% vs Fructose 15%	-3,597	-2,317	2,021	0,026	Oui
Fructose 15% vs Fructose 20%	-2,377	-1,531	2,021	0,134	Non

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
saccharose vs Fructose	-60,474	-12,852	2,654	< 0,0001	Oui
saccharose vs Glucose	-35,126	-7,465	2,413	< 0,0001	Oui
saccharose vs Lactose	-0,546	-0,116	2,007	0,908	Non
Lactose vs Fructose	-59,928	-12,736	2,413	< 0,0001	Oui
Lactose vs Glucose	-34,580	-7,349	2,007	< 0,0001	Oui
Glucose vs Fructose	-25,348	-5,387	2,007	< 0,0001	Oui

Tableau III: Résultat d'analyse des différences taux de croissance entre les modalités(sucre) avec un intervalle de confiance à 95% :Newman-Keuls (SNK)

Tableau IV : résultats d'analyse des différences entre les modalités (quantité d'EPS) avec un intervalle de confiance à 95% , Newman-Keuls (SNK).

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr >Diff	Significatif
Fructose 1% vs Glucose 20%	-0,674	-24,268	3,788	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Saccharose 20 %	-0,462	-16,643	3,757	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Lactose 20%	-0,382	-13,753	3,724	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Saccharose 10%	-0,379	-13,643	3,688	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Saccharose 15%	-0,318	-11,462	3,651	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Glucose 10%	-0,315	-11,345	3,610	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Saccharose 5%	-0,315	-11,336	3,567	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Lactose 15 %	-0,313	-11,252	3,519	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Saccharose 1%	-0,303	-10,903	3,468	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Glucose 1%	-0,299	-10,752	3,411	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Lactose 10%	-0,298	-10,725	3,348	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Glucose 15%	-0,297	-10,686	3,277	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Lactose 1%	-0,295	-10,607	3,197	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Lactose 5%	-0,292	-10,497	3,103	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Glucose 5%	-0,285	-10,271	2,992	< 0,0001	Oui
Fructose 1% vs Fructose 15%	-0,062	-2,217	2,856	0,194	Non
Fructose 1% vs Fructose 20%	-0,055	-1,989			Non
Fructose 1% vs Fructose 5%	-0,013	-0,471			Non
Fructose 1% vs Fructose 10%	-0,009	-0,338			Non
Fructose 10% vs Glucose 20%	-0,665	-23,930	3,757	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Saccharose 20 %	-0,453	-16,305	3,724	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Lactose 20%	-0,373	-13,414	3,688	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Saccharose 10%	-0,370	-13,305	3,651	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Saccharose 15%	-0,309	-11,124	3,610	< 0,0001	Oui

Fructose 10% vs Glucose 10%	-0,306	-11,006	3,567	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Saccharose 5%	-0,306	-10,998	3,519	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Lactose 15 %	-0,303	-10,914	3,468	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Saccharose 1%	-0,294	-10,565	3,411	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Glucose 1%	-0,289	-10,413	3,348	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Lactose 10%	-0,289	-10,386	3,277	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Glucose 15%	-0,288	-10,348	3,197	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Lactose 1%	-0,285	-10,269	3,103	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Lactose 5%	-0,282	-10,158	2,992	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Glucose 5%	-0,276	-9,933	2,856	< 0,0001	Oui
Fructose 10% vs Fructose 15%	-0,052	-1,879	2,680	0,253	Non
Fructose 10% vs Fructose 20%	-0,046	-1,651			Non
Fructose 10% vs Fructose 5%	-0,004	-0,133			Non
Fructose 5% vs Glucose 20%	-0,661	-23,797	3,724	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Saccharose 20 %	-0,449	-16,171	3,688	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Lactose 20%	-0,369	-13,281	3,651	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Saccharose 10%	-0,366	-13,172	3,610	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Saccharose 15%	-0,305	-10,991	3,567	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Glucose 10%	-0,302	-10,873	3,519	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Saccharose 5%	-0,302	-10,865	3,468	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Lactose 15 %	-0,300	-10,781	3,411	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Saccharose 1%	-0,290	-10,432	3,348	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Glucose 1%	-0,286	-10,280	3,277	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Lactose 10%	-0,285	-10,253	3,197	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Glucose 15%	-0,284	-10,215	3,103	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Lactose 1%	-0,282	-10,135	2,992	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Lactose 5%	-0,279	-10,025	2,856	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Glucose 5%	-0,272	-9,800	2,680	< 0,0001	Oui
Fructose 5% vs Fructose 15%	-0,049	-1,746	2,434	0,201	Non
Fructose 5% vs Fructose 20%	-0,042	-1,518			Non

Fructose 20% vs Glucose 20%	-0,619	-22,279	3,688	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Saccharose 20 %	-0,407	-14,654	3,651	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Lactose 20%	-0,327	-11,763	3,610	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Saccharose 10%	-0,324	-11,654	3,567	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Saccharose 15%	-0,263	-9,473	3,519	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Glucose 10%	-0,260	-9,356	3,468	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Saccharose 5%	-0,260	-9,347	3,411	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Lactose 15 %	-0,257	-9,263	3,348	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Saccharose 1%	-0,248	-8,914	3,277	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Glucose 1%	-0,243	-8,762	3,197	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Lactose 10%	-0,243	-8,735	3,103	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Glucose 15%	-0,242	-8,697	2,992	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Lactose 1%	-0,239	-8,618	2,856	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Lactose 5%	-0,236	-8,507	2,680	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Glucose 5%	-0,230	-8,282	2,434	< 0,0001	Oui
Fructose 20% vs Fructose 15%	-0,006	-0,228	2,021	0,821	Non
Fructose 15% vs Glucose 20%	-0,613	-22,051	3,651	< 0,0001	Oui
Fructose 15% vs Saccharose 20 %	-0,401	-14,426	3,610	< 0,0001	Oui
Fructose 15% vs Lactose 20%	-0,321	-11,536	3,567	< 0,0001	Oui
Fructose 15% vs Saccharose 10%	-0,317	-11,426	3,519	< 0,0001	Oui
Fructose 15% vs Saccharose 15%	-0,257	-9,245	3,468	< 0,0001	Oui
Fructose 15% vs Glucose 10%	-0,254	-9,128	3,411	< 0,0001	Oui
Fructose 15% vs Saccharose 5%	-0,253	-9,119	3,348	< 0,0001	Oui
Fructose 15% vs Lactose 15 %	-0,251	-9,035	3,277	< 0,0001	Oui
Fructose 15% vs Saccharose 1%	-0,241	-8,686	3,197	< 0,0001	Oui
Fructose 15% vs Glucose 1%	-0,237	-8,534	3,103	< 0,0001	Oui
Fructose 15% vs Lactose 10%	-0,236	-8,507	2,992	< 0,0001	Oui
Fructose 15% vs Glucose 15%	-0,235	-8,469	2,856	< 0,0001	Oui
Fructose 15% vs Lactose 1%	-0,233	-8,390	2,680	< 0,0001	Oui
Fructose 15% vs Lactose 5%	-0,230	-8,279	2,434	< 0,0001	Oui

Fructose 15% vs Glucose 5%	-0,224	-8,054	2,021	< 0,0001	Oui
Glucose 5% vs Glucose 20%	-0,389	-13,997	3,610	< 0,0001	Oui
Glucose 5% vs Saccharose 20 %	-0,177	-6,372	3,567	< 0,0001	Oui
Glucose 5% vs Lactose 20%	-0,097	-3,482	3,519	0,055	Non
Glucose 5% vs Saccharose 10%	-0,094	-3,372			Non
Glucose 5% vs Saccharose 15%	-0,033	-1,191			Non
Glucose 5% vs Glucose 10%	-0,030	-1,074			Non
Glucose 5% vs Saccharose 5%	-0,030	-1,065			Non
Glucose 5% vs Lactose 15 %	-0,027	-0,981			Non
Glucose 5% vs Saccharose 1%	-0,018	-0,632			Non
Glucose 5% vs Glucose 1%	-0,013	-0,480			Non
Glucose 5% vs Lactose 10%	-0,013	-0,454			Non
Glucose 5% vs Glucose 15%	-0,012	-0,415			Non
Glucose 5% vs Lactose 1%	-0,009	-0,336			Non
Glucose 5% vs Lactose 5%	-0,006	-0,226			Non
Lactose 5% vs Glucose 20%	-0,383	-13,772	3,567	< 0,0001	Oui
Lactose 5% vs Saccharose 20 %	-0,171	-6,146	3,519	< 0,0001	Oui
Lactose 5% vs Lactose 20%	-0,090	-3,256	3,468	0,083	Non
Lactose 5% vs Saccharose 10%	-0,087	-3,147			Non
Lactose 5% vs Saccharose 15%	-0,027	-0,966			Non
Lactose 5% vs Glucose 10%	-0,024	-0,848			Non
Lactose 5% vs Saccharose 5%	-0,023	-0,840			Non
Lactose 5% vs Lactose 15 %	-0,021	-0,756			Non
Lactose 5% vs Saccharose 1%	-0,011	-0,407			Non
Lactose 5% vs Glucose 1%	-0,007	-0,255			Non
Lactose 5% vs Lactose 10%	-0,006	-0,228			Non
Lactose 5% vs Glucose 15%	-0,005	-0,190			Non
Lactose 5% vs Lactose 1%	-0,003	-0,110			Non
Lactose 1% vs Glucose 20%	-0,380	-13,661	3,519	< 0,0001	Oui
Lactose 1% vs Saccharose 20 %	-0,168	-6,036	3,468	< 0,0001	Oui

Lactose 1% vs Lactose 20%	-0,087	-3,146	3,411	0,094	Non
Lactose 1% vs Saccharose 10%	-0,084	-3,037			Non
Lactose 1% vs Saccharose 15%	-0,024	-0,855			Non
Lactose 1% vs Glucose 10%	-0,021	-0,738			Non
Lactose 1% vs Saccharose 5%	-0,020	-0,729			Non
Lactose 1% vs Lactose 15 %	-0,018	-0,645			Non
Lactose 1% vs Saccharose 1%	-0,008	-0,296			Non
Lactose 1% vs Glucose 1%	-0,004	-0,145			Non
Lactose 1% vs Lactose 10%	-0,003	-0,118			Non
Lactose 1% vs Glucose 15%	-0,002	-0,079			Non
Glucose 15% vs Glucose 20%	-0,377	-13,582	3,468	< 0,0001	Oui
Glucose 15% vs Saccharose 20 %	-0,166	-5,957	3,411	< 0,0001	Oui
Glucose 15% vs Lactose 20%	-0,085	-3,067	3,348	0,097	Non
Glucose 15% vs Saccharose 10%	-0,082	-2,957			Non
Glucose 15% vs Saccharose 15%	-0,022	-0,776			Non
Glucose 15% vs Glucose 10%	-0,018	-0,659			Non
Glucose 15% vs Saccharose 5%	-0,018	-0,650			Non
Glucose 15% vs Lactose 15 %	-0,016	-0,566			Non
Glucose 15% vs Saccharose 1%	-0,006	-0,217			Non
Glucose 15% vs Glucose 1%	-0,002	-0,065			Non
Glucose 15% vs Lactose 10%	-0,001	-0,038			Non
Lactose 10% vs Glucose 20%	-0,376	-13,544	3,411	< 0,0001	Oui
Lactose 10% vs Saccharose 20 %	-0,164	-5,918	3,348	< 0,0001	Oui
Lactose 10% vs Lactose 20%	-0,084	-3,028	3,277	0,090	Non
Lactose 10% vs Saccharose 10%	-0,081	-2,919			Non
Lactose 10% vs Saccharose 15%	-0,021	-0,738			Non
Lactose 10% vs Glucose 10%	-0,017	-0,620			Non
Lactose 10% vs Saccharose 5%	-0,017	-0,612			Non
Lactose 10% vs Lactose 15 %	-0,015	-0,528			Non
Lactose 10% vs Saccharose 1%	-0,005	-0,179			Non

Lactose 10% vs Glucose 1%	-0,001	-0,027			Non
Glucose 1% vs Glucose 20%	-0,376	-13,517	3,348	< 0,0001	Oui
Glucose 1% vs Saccharose 20 %	-0,164	-5,891	3,277	< 0,0001	Oui
Glucose 1% vs Lactose 20%	-0,083	-3,001	3,197	0,079	Non
Glucose 1% vs Saccharose 10%	-0,080	-2,892			Non
Glucose 1% vs Saccharose 15%	-0,020	-0,711			Non
Glucose 1% vs Glucose 10%	-0,016	-0,593			Non
Glucose 1% vs Saccharose 5%	-0,016	-0,585			Non
Glucose 1% vs Lactose 15 %	-0,014	-0,501			Non
Glucose 1% vs Saccharose 1%	-0,004	-0,152			Non
Saccharose 1% vs Glucose 20%	-0,371	-13,365	3,277	< 0,0001	Oui
Saccharose 1% vs Saccharose 20 %	-0,159	-5,740	3,197	< 0,0001	Oui
Saccharose 1% vs Lactose 20%	-0,079	-2,849	3,103	0,090	Non
Saccharose 1% vs Saccharose 10%	-0,076	-2,740			Non
Saccharose 1% vs Saccharose 15%	-0,016	-0,559			Non
Saccharose 1% vs Glucose 10%	-0,012	-0,442			Non
Saccharose 1% vs Saccharose 5%	-0,012	-0,433			Non
Saccharose 1% vs Lactose 15 %	-0,010	-0,349			Non
Lactose 15 % vs Glucose 20%	-0,362	-13,016	3,197	< 0,0001	Oui
Lactose 15 % vs Saccharose 20 %	-0,150	-5,390	3,103	< 0,0001	Oui
Lactose 15 % vs Lactose 20%	-0,069	-2,500	2,992	0,148	Non
Lactose 15 % vs Saccharose 10%	-0,066	-2,391			Non
Lactose 15 % vs Saccharose 15%	-0,006	-0,210			Non
Lactose 15 % vs Glucose 10%	-0,003	-0,092			Non
Lactose 15 % vs Saccharose 5%	-0,002	-0,084			Non
Saccharose 5% vs Glucose 20%	-0,359	-12,932	3,103	< 0,0001	Oui
Saccharose 5% vs Saccharose 20 %	-0,147	-5,306	2,992	< 0,0001	Oui
Saccharose 5% vs Lactose 20%	-0,067	-2,416	2,856	0,132	Non
Saccharose 5% vs Saccharose 10%	-0,064	-2,307			Non
Saccharose 5% vs Saccharose 15%	-0,003	-0,126			Non

Saccharose 5% vs Glucose 10%	0,000	-0,008			Non
Glucose 10% vs Glucose 20%	-0,359	-12,924	2,992	< 0,0001	Oui
Glucose 10% vs Saccharose 20 %	-0,147	-5,298	2,856	< 0,0001	Oui
Glucose 10% vs Lactose 20%	-0,067	-2,408	2,680	0,092	Non
Glucose 10% vs Saccharose 10%	-0,064	-2,299			Non
Glucose 10% vs Saccharose 15%	-0,003	-0,118			Non
Saccharose 15% vs Glucose 20%	-0,356	-12,806	2,856	< 0,0001	Oui
Saccharose 15% vs Saccharose 20 %	-0,144	-5,180	2,680	< 0,0001	Oui
Saccharose 15% vs Lactose 20%	-0,064	-2,290	2,434	0,069	Non
Saccharose 15% vs Saccharose 10%	-0,061	-2,181			Non
Saccharose 10% vs Glucose 20%	-0,295	-10,625	2,680	< 0,0001	Oui
Saccharose 10% vs Saccharose 20 %	-0,083	-2,999	2,434	0,013	Oui
Saccharose 10% vs Lactose 20%	-0,003	-0,109	2,021	0,914	Non
Lactose 20% vs Glucose 20%	-0,292	-10,516	2,434	< 0,0001	Oui
Lactose 20% vs Saccharose 20 %	-0,080	-2,890	2,021	0,006	Oui
Saccharose 20 % vs Glucose 20%	-0,212	-7,626	2,021	< 0,0001	Oui

Résumé

La production des exopolysaccharides (EPS) a été étudiée chez *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DZ dans le bouillon MRS contenant différentes sources de carbone (glucose, saccharose, lactose et fructose) et à différentes concentrations (1-20%) dans son optimisation. Pour cette souche, le glucose fut la source de carbone la mieux métabolisée pour la production d'EPS suivie du saccharose, lactose puis du fructose. En outre, l'influence de la concentration de la source de carbone sur la production et la croissance a révélé que la meilleure production d'EPS a été obtenue avec 20% de glucose, cependant la meilleure croissance était avec la même concentration de fructose (9,95log UFC/ml).

La quantité d'EPS obtenue en présence de 20% de glucose (959mg/l) était environ trois fois plus élevée que celle obtenue en présence de la même concentration de fructose (340mg/l). Par ailleurs, les résultats ont clairement montré que la production d'EPS et la production de biomasse sont très influencées par le type et la concentration du substrat carboné mais que ces deux phénomènes sont souvent indépendants l'un de l'autre, la production des EPS n'est pas strictement liée avec la croissance.

Mots clés: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DZ, exopolysaccharides, sources de carbone, optimisation, MRS, croissance.

Abstract

Exopolysaccharides (EPS) production was studied in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DZ in MRS containing various carbon sources (glucose, saccharose, lactose and fructose) at different concentrations (1-20%), in the aim of the optimization of their production. For this strain, glucose was the most metabolized carbon source for EPS production, followed by saccharose, lactose and fructose. Furthermore, the influence of carbon source concentration on the EPS production revealed that maximum quantity of exopolysaccharides is obtained was 20% of glucose; however the best growth was with the same concentration of fructose (9.95 log CFU/ml).

The amount of EPS obtained in the presence of 20% glucose (959 mg/l) was almost three times most important than that obtained with fructose at the same concentration (340 mg/l).

Elsewhere, the results clearly indicated that EPS production and growth were largely influenced by the nature and the concentration of carbon substrate but these two phenomena are usually independent and EPS production was not strictly coupled to growth.

Keywords: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DZ, exopolysaccharides, carbon sources, optimization, MRS, growth.