**Annexes**

**Annexe 01 :** Le dosage de l'acidité Dornic (Vignola, 2002)

 La solution de soude utilisée pour titrer l'acidité Dornic est préparée par dilution de 4,44 g de soude dans 1 litre d’eau distillée, ce qui nous donne une solution de soude de concentration N/9. Un échantillon de 10 ml de lait est placé dans un bécher en présence de trois gouttes de phénolphtaléine à 1% ; la soude Dornic est ajoutée à la burette graduée à 0,1 ml jusqu’à obtenir une coloration rose persistante du contenu du bécher. Le nombre de degrés Dornic correspond alors au nombre de dixième de ml de soude Dornic qu’il aura fallu ajouter pour obtenir le virage de l’indicateur coloré.

**Annexe 02 :** La détermination de la matière grasse selon la méthode acido butyrométrique de GERBER :

Mesurer 10 mL d’acide sulfurique concentré (densité 20°C :1,820) et les introduire dans un butyromètre sec. Prélever 11 ml de lait (doucement homogénéisé avec une baguette de verre) avec la pipette spéciale et les verser dans le butyromètre sans mouiller le col de celui-ci, de façon qu’il forme une couche au-dessus de l’acide, ajouter 1 mL d’alcool isoamylique (densité 20°C : 0,813). Bien boucher le butyromètre avec un bouchon sec sans perturber son contenu.

Envelopper le butyromètre dans un chiffon, puis, en maintenant le bouchon, le retourner lentement 3 ou 4 fois ; agiter alors énergiquement pour dissoudre complètement la caséine. Le mélange brunit, s'échauffe vers 80°C et s'homogénéise.

Centrifuger aussitôt en plaçant le butyromètre dans la centrifugeuse à butyrométres, bouchons vers la périphérie, pendant 5 minutes. Si la centrifugation ne peut pas avoir lieu immédiatement après l'homogénéisation, maintenir le butyromètre dans un bain thermostaté à 65 ± 2°C pour que la matière grasse reste en fusion. Réchauffer le butyromètre en le plaçant, bouchon vers le bas, dans un bain thermostaté à 65 ± 2°C quelques minutes. S'assurer que la colonne grasse est entièrement dans l'échelle graduée, si non agir sur le bouchon en conséquence. Repérer la position inférieure de la colonne grasse, soit x, lire aussitôt la position supérieure, soit x'.

Vérifier que la position du niveau inférieur n'a pas variée. Sinon, réajuster et refaire une nouvelle lecture de x'. Retenir x' lorsque deux lectures consécutives sont identiques. Si l'on n'a pas réussi ceci en 10 seconde, replonger le butyromètre dans le bain thermostaté et refaire un cycle de lecture après 2 à 3 minutes. La graduation est en g de matière grasse pour 100 mL de lait, x' - x représente la valeur recherchée (KONUSPAYEVA, 2007).

**Annexes 03 :** Détermination du taux de protéines par la méthode colorimétrique de LOWRY et *al* (1951) (Citée par GAVRILOVIC et *al* 1996).

1. Préparation des solutions :
* Solutions alcalines A :

Soude 0.1N ………………………………………………. 500 ml

Carbonate de sodium anhydre (NaCO3) …………………. 10 g

* Solution cuivrique B :

Sulfate de cuivre (CuSO4, 5 H2O) (0.32g/100ml) ………. 2 ml

* Solution C :

Solution A ………………………………………………... 50 ml

Solution B ………………………………………………... 1 ml

* Solution mère de BSA (sérum albumine bovin) :

BSA ……………………………………………………… 10 mg

Eau distillée ……………………………………………… 100 ml

1. Gamme d’étalonnage :

Préparation des dilutions graduées de la solution de BSA (tableau ci-dessous) :

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Concentration en BSA µg/ml | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 |
| la solution mère de BSA µl | 0 | 200 | 400 | 600 | 800 |
| Eau distillée µl  | 1000 | 800 | 600 | 400 | 200 |

1. Traçage de la courbe d’étalonnage :
* Ajouter 1 ml de la nouvelle solution ABS avec 5 ml de la solution C et mélanger.
* Laisser 10 mn à température ambiante.
* Ajouter 0.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu.
* Laisser 30 mn à l’obscurité.
* Lire les D.O à 75 nm.
* Tracer la courbe d’étallonage D.O = f(C).
* Déterminer la concentration de la protéine inconnue X par le graphe.

**Annexe 04 :** Composition des milieux de culture

**Milieu PCA** (Leyral et Vierling, 2007)

Tryptone 5 g

Extrait de levure 2.5 g

Glucose 1 g

Agar 9 g

Eau distillée 1000 ml

pH final 7.2.

**Milieu VRBL** (Marchal et *al.*, 1987):

Extrait de levure 3 g

Peptone 7 g

Désoxycholate de sodium 0.5 g

Lactose 10 g

NaCl 5 g

Mélange de sels biliaires 1.5 g

Rouge neutre 30 mg

Cristal violet 2 mg

Agar 13 g

Eau distillée 1000 ml

pH final 7.4.

**Milieu VRBG** (Branger et *al*., 2007)

Extrait de levure 3 g

Peptone pepsique de viande 7 g

Sels biliaires 1.5 g

Glucose 10 g

NaCl 5g

Rouge neutre 30 mg

Cristal violet 2 mg

Agar 13 g

Eau distillée 1000 ml

pH final 7.4.

**Composition et préparation de milieu de Baird-Parker** (Marchal *et al.*, 1987):

Le milieu de base (commercialisé sous forme déshydratée ou prête à l’emploi) a la formule (en g/l d’eau distillée) suivante :

Peptone trypsine de caséine 10

Extrait de viande 5

Extrait de levure 2

Pyruvate de sodium 10

Glycocolle 12

Chlorure de lithium 5

Agar 14

Eau distillée 1000 ml

pH final 7.2.

Porter à l’ébullition en agitant jusqu’à dissolution complète, répartir en flacons et autoclaver pendant 20 min à 120°C.

Pour préparer le milieu complet, faire fondre le milieu de base au bain-marie bouillant. Refroidir à 50°C. Ajouter dans chaque flacon les solutions stériles suivantes, commercialisées en ampoules :

Tellurite de potassium à 1% (agent sélectif) 1 ml

Emulsion de jaune d’œuf à 10% en eau physiologique 5 ml

Sulfaméthazine à 0.2% (inhibiteur de *Proteus*) 2.5 ml

**Milieu BEA (Bile-Escaline Agar)** (Marchal *et al.*, 1987):

Extrait de viande 3 g

Peptone de viande 5 g

Bile de bœuf 40 g

Esculine 1 g

Citrate de fer (III) 0.5 g

Agar-agar 14.5g

pH final 6.6.

**Milieu de viande-foie sulfité (VF)** (Bonnefoy et *al*., 2002)**:**

Peptone trypsine 10g

Extrait de viande 3g

Extrait de levure 6g

Chlorure de sodium 5g

Glucose 2g

Chlorhydrate de cystéine 0.3g

Amidon soluble 5g

Na2S2O5  1g

Agar 15g

Eau distillée 1000 ml

pH final 7.2.

**Milieu de Man, Rogosa et Sharpe** (MRS) (Marchal *et al.*, 1987) :

Peptone trypsine de caséine 15 g

Extrait de viande 10 g

Extrait de levure 5 g

Acétate de sodium 5 g

Citrate bi-ammonique 2 g

Phosphate bipotassique 2.4 g

Tween 80 1 ml

MgSO4, 7 H2O 0.2 g

MnSO4, 4 H2O 0.05 g

Glucose 20 g

Agar 12 g

Eau distillée 1000 ml

pH final 6.5.

**Milieu M17** (Dworkin et *al*., 2006):

Peptone phytone 5 g

Polypeptone 5 g

Extrait de viande 2.5 g

Extrait de levure 5 g

Acétate de sodium 5 g

Lactose 5 g

Acide Ascorbique 0.5 g

Β-Disodium glycerophosphate 19 g

MgSO4, 7 H2O (1 M) 1.0 ml

Agar 10 g

Eau distillée 1000 ml

pH final 7.1.

**Annexe 05 :** Nombre de différents groupes microbiens des échantillons de lait camelin collectés par différente lots (Log cfu/ml) avec analyse de la variance par le test ANOVA pour chaque paramètre (p value)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Paramètres | A0 | A10 | A25 | A50  | Moyenne | P |
| FAMT Log cfu/ml | 4.77 ± 0.64 | 4.42 ± 0.35 | 4.41 ± 0.06 | 2.85 ± 0.74 | 4.11 ± 0.9 | 0.001\* |
| CT Log cfu/ml | 1.67 ± 1.15 | 2.83 ± 0.91 | 3.27 ± 0.54 | 0.00 ± 0.00 | 1.94 ± 1.48 | 0.0003\* |
| CTT Log cfu/ml | 1.48 ± 0.97 | 2.19 ± 0.70 | 2.70 ± 0.72 | 0.00 ± 0.00 | 1.59 ± 1.22 | 0.0008\* |
| Entérobactérie Log cfu /ml | 1.65 ± 0.79 | 1.087 ± 1.17 | 2.86 ± 0.53 | 0.00 ± 0.00 | 1.59 ± 1.25 | 0.001\* |
| BLM Log cfu /ml | 3.58 ± 1.11 | 4.3 ± 0.5 | 4.26 ± 0.54 | 2.51 ±0.17 | 3.68 ± 0.97 | 0.007\* |
| BLT Log cfu /ml | 3.12 ± 0.91 | 3.7 ± 0.72 | 3.86 ± 0.8 | 2.41 ± 0.23 | 3.27 ± 0.87 | 0.05\* |
| Lactocoques Log cfu /ml | 3.31 ± 0.81 | 3.51 ± 0.09 | 3.88 ± 0.58 | 2.23 ± 0.5 | 3.23 ± 0.81 | 0.008\* |