



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'ALIMENTATION, DE LA PÊCHE,  
DE LA RURALITÉ ET DE L'AMÉNAGEMENT DU TERRITOIRE

<p><b>Direction générale de l'alimentation</b>  <b>Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire</b>  <b>Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux</b>  <b>Bureau des semences et de la santé des végétaux</b></p> <p>Adresse : 251 rue de Vaugirard - 75 732 PARIS CEDEX 15          Suivi par : Olivier DUFOUR - Tél : 01 49 55 81 64          Courriel institutionnel : <a href="mailto:bssv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr">bssv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr</a>          Réf. Interne : BSSV/ 2010-11-009          MOD10.21 D 22/09/10</p>	<p style="text-align: center;"><b>NOTE DE SERVICE</b>  <b>DGAL/SDQPV/N2010-8316</b>  <b>Date: 17/11/2010</b></p>
--	--

Date de mise en application : immédiate  
 Abroge et remplace : Sans objet  
 Date d'expiration : Sans objet  
 Date limite de réponse : Sans objet  
 Nombre d'annexes : 1  
 Degré et période de confidentialité : aucune

**Objet** : Méthode officielle d'analyse MOA REP 001 version 1b relative au répertoire des recettes en vigueur au laboratoire national de la protection des végétaux (LNPV)

**Références** : Article R 202 du code rural, décret 2006-7 du 4 Janvier 2006 relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural, arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux

**Résumé** : Publication de la méthode officielle d'analyse MOA REP 001 version 1b relative au répertoire des recettes en vigueur au LNPV.

**Mots-clés** : Méthode officielle d'analyse – MOA - analyses – recettes - tampons - solutions – milieux – milieux sélectifs – détection – identification

<b>Destinataires</b>
<p><b>Pour information</b> :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- DRAAF-SRAL</li> <li>- DAF-SPV</li> <li>- LNPV</li> <li>- Laboratoires agréés</li> </ul>

Pour la mise en œuvre des analyses de détection, d'identification ou de confirmation des organismes phytopathogènes de quarantaine, les laboratoires peuvent acheter des réactifs et/ ou des kits commerciaux mais sont souvent amenés à préparer des milieux, solutions, tampons,... en complément, et ce pour presque toutes les techniques (ELISA, immunofluorescence, isolement sur milieu, PCR,...)

Dans le double objectif d'une part d'harmonisation des pratiques entre laboratoires et d'autre part de facilitation du recours à des milieux communs entre les différentes méthodes d'analyses, un document unique regroupant les tampons, solutions et milieux a été élaboré. Ce document, appelé dans l'ensemble des méthodes officielles sous le nom de « REP 001 » ou « répertoire des recettes » est donné en annexe en pièce jointe de la présente note.

La composition des recettes est celle en vigueur au sein du LNPV. Certaines compositions sont issues d'essais internes ayant abouti à l'optimisation de certains milieux (données non publiées). Tous les laboratoires agréés doivent prendre connaissance de son contenu. Si la mise en œuvre de ces recettes n'est pas impérative, en cas de divergence de composition avec les recettes qu'il utilise, le laboratoire est tenu de disposer :

- de publications scientifiques ;
- ou d'études comparatives prouvant l'absence d'incidence sur le résultat des analyses.

Ces écarts doivent être notifiés au laboratoire national de référence (LNR) pour la détection des organismes nuisibles lors des essais inter-laboratoires d'aptitude.

L'ingénieur en Chef des ponts, des eaux et des forêts,  
Sous-directeur de la qualité et de la protection des végétaux

Robert TESSIER



# REPertoire DES RECETTES EN VIGUEUR AU LNPV

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE



### Droits de reproduction et Copyright

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis gratuitement à la disposition des usagers du ministère chargé de l'agriculture en tant que méthode.

Le présent document est la propriété du ministère chargé de l'Agriculture, toute reproduction qu'elle soit totale ou partielle ne peut être effectuée qu'à la condition expresse que la source soit citée.

### Dates de validité du présent document

Le présent document a valeur de méthode officielle à compter de sa date de publication indiquée ci-après. Il remplace alors *de facto* toute version antérieure.

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 18 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

Ce document étant susceptible d'évolution, il est de la responsabilité exclusive des utilisateurs de vérifier régulièrement qu'ils disposent bien de la dernière version.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la méthode.

n° méthode Numéro de la version	Consultation publique		Validité	
	Début	Fin	Début	Fin
MOA REP 001 version 1a	Mai 2010	Août 2010		
MOA REP 001 version 2	Sans objet	Sans objet	Septembre 2010	

SOMMAIRE

<u>SOMMAIRE</u> .....	3
<u>PREAMBULE</u> .....	6
<u>Objet des méthodes officielles</u> .....	6
<u>Glossaire, abréviations et documents connexes</u> .....	6
<u>Considérations d'ordre métrologique</u> .....	6
<u>Revue des méthodes officielles, amendement et modification</u> .....	7
<u>ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS</u> .....	8
<u>PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE</u> .....	9
<u>Modifications</u> .....	9
<u>Améliorations</u> .....	9
<u>DESCRIPTION DE LA METHODE</u> .....	10
<u>1. Objet</u> .....	10
<u>2. Domaine d'application</u> .....	10
<u>3. Exigences générales</u> .....	10
3.1. <u>Personnel, équipements et consommables</u> .....	10
3.2. <u>Pratiques pour le contrôle qualité</u> .....	10
3.3. <u>Le contrôle qualité des milieux</u> .....	11
3.4. <u>Les antibiotiques et assimilés</u> .....	11
<u>4. Le répertoire des recettes</u> .....	11
4.1. <u>Les tampons et solutions</u> .....	13
<u>Chloroforme : alcool isoamylique 24/1</u> .....	16
<u>densité 1,18</u> .....	16
<u>eau physiologique tamponnée</u> .....	13
<u>GEB</u> .....	13
<u>glycérine tamponnée</u> .....	16
<u>Lugol</u> .....	13
<u>MgSO4</u> .....	16
<u>PBS ELISA 1 N</u> .....	14
<u>PBS ELISA 5 N</u> .....	15
<u>PBS T 1 X</u> .....	15
<u>Solution d'iodure de sodium (NaI) 6M</u> .....	19

<a href="#">Solution de bleu d'Evans</a>	15
<a href="#">Solution de KOH</a>	13
<a href="#">Solution enzymatique</a>	16
<a href="#">Suspension de silice</a>	19
<a href="#">Tampon carbonate</a>	13
<a href="#">Tampon conjugué</a>	14
<a href="#">Tampon d'acide maléique</a>	15
<a href="#">Tampon de broyage CTAB 3%</a>	17
<a href="#">Tampon de broyage PBS-T-PVP (20%)</a>	14
<a href="#">Tampon de broyage PBS-T-PVP</a>	14
<a href="#">Tampon de broyage Vigne</a>	14
<a href="#">Tampon de charge</a>	17
<a href="#">Tampon de coating</a>	14
<a href="#">Tampon de dénaturation (15% formaldéhyde)</a>	15
<a href="#">Tampon de détection</a>	15
<a href="#">Tampon de dilution (7,5% formaldéhyde)</a>	15
<a href="#">Tampon de lavage (pour ELISA)</a>	14
<a href="#">Tampon de macération anti-oxydant</a>	19
<a href="#">Tampon de macération PVPP 1X</a>	17
<a href="#">Tampon de macération</a>	13
<a href="#">Tampon de reprise de culot</a>	13
<a href="#">Tampon de rinçage</a>	15
<a href="#">Tampon de saturation</a>	15
<a href="#">Tampon Edwards</a>	17
<a href="#">Tampon IF</a>	16
<a href="#">Tampon PBS (0,01 M, pH = 7,2)</a>	13
<a href="#">Tampon substrat</a>	15
<a href="#">Tampon TENPP</a>	17
<a href="#">Tampon Tris 7-9</a>	18
<a href="#">Tampon Tris borate EDTA (TBE) 10X</a>	18
<a href="#">Tampon Tris EDTA (TE)</a>	18
<a href="#">Tampon Tris EDTA (TE)</a>	18
<a href="#">Tampon Tris HCl (0.1 M, pH 8)</a>	18
<a href="#">Tampon TRIS-PVP</a>	20
<a href="#">TBST 10X</a>	17
<b>4.2. Les milieux de culture non sélectifs</b>	21
<a href="#">Milieu d'isolement (mycologie)</a>	21
<a href="#">Milieu King B</a>	21
<a href="#">Milieu LPG</a>	21
<a href="#">Milieu LPGA</a>	21
<b>4.3. Les milieux de culture sélectifs</b>	22
<a href="#">DCPA</a>	22
<a href="#">Milieu Amidon</a>	22
<a href="#">Milieu Arginine</a>	22
<a href="#">Milieu ARJ</a>	22
<a href="#">Milieu Citrate de Simmons</a>	23
<a href="#">Milieu EPN</a>	23
<a href="#">Milieu Esculine</a>	23
<a href="#">Milieu gélatine de Frazier</a>	23
<a href="#">Réactif de Frazier</a>	23
<a href="#">Milieu gélose au lait</a>	23
<a href="#">Milieu GYCA</a>	23

<a href="#">Milieu KBCA</a> .....	24
<a href="#">Milieu de Hugh et Leifson</a> .....	24
<a href="#">NCTM4</a> .....	25
<a href="#">Milieu PDA</a> .....	25
<a href="#">Milieu SNA</a> .....	26
<a href="#">Milieu Sutton</a> .....	26
<a href="#">Milieu Urée-</a> .....	27
<a href="#">Indole</a> .....	27
<b>4.4. <a href="#">Les milieux d'identification</a></b> .....	<b>28</b>
<a href="#">Milieu BCYE</a> .....	28
<a href="#">Milieu CCT</a> .....	28
<a href="#">Milieu Kelman</a> .....	28
<a href="#">Milieu King B "Pois"</a> .....	29
<a href="#">Milieu LBCA</a> .....	29
<a href="#">Milieu M2' de Luisetti</a> .....	29
<a href="#">Milieu mCS20ABN</a> .....	30
<a href="#">Milieu mFS</a> .....	30
<a href="#">Milieu MNTA</a> .....	31
<a href="#">Milieu NSCAA</a> .....	31
<a href="#">Milieu PTSCA</a> .....	31
<a href="#">Milieu SMSA modifié</a> .....	32
<a href="#">Milieu SNA</a> .....	32
<a href="#">Milieu SRS</a> .....	32
<a href="#">Milieu Wilbrink</a> .....	32
<a href="#">Milieu YDC</a> .....	33
<b><a href="#">ANNEXE SOLUBILITE DES ANTIBIOTIQUES ET PRODUITS</a></b> .....	<b>34</b>
<b><a href="#">LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE</a></b> .....	<b>35</b>
<b><a href="#">BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE</a></b> .....	<b>36</b>

## PREAMBULE

### OBJET DES METHODES OFFICIELLES

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'Agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation...). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode.

Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

### GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps des méthodes officielles.

Certains documents (composition de milieux et tampons...) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

### CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

Afin d'alléger la lecture des méthodes officielles, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte des méthodes).

<b>Volume</b>	<b>volume &lt; à 10 mL</b> : EMT = ± 10% <b>Volume ≥ à 10 mL</b> : EMT = ± 5 %
<b>Masse</b>	EMT = 10%
<b>pH</b>	EMT = 0,3 u
<b>Température</b>	<b>incubateur</b> : EMT = ± 3°C <b>réfrigérateur</b> : 5°C et EMT = ± 4°C <b>congélateur</b> : ≤ -18°C <b>congélateur froid intense</b> : ≤ -65°C
<b>Longueur</b>	EMT = 10%
<b>Temps</b>	EMT = 10%

## **REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION**

Une consultation publique est organisée en tant que de besoin avant la publication des méthodes officielles. Le document de travail est mis à disposition sur le site du ministère en charge de l'Agriculture pendant une période de deux mois, au cours de laquelle les visiteurs sont invités à faire connaître leurs remarques, commentaires et suggestion et à signaler toute erreur, omission ou imprécision.

Les méthodes officielles sont par ailleurs revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'Agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».

Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

## ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS

La présente méthode a été élaborée par le pôle « Développement de méthodes » du LNPV sur la base des publications internationales disponibles et des modes opératoires internes des différentes stations du LNPV.

## PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

Une modification concerne des parties clé ou le fond même de la méthode officielle, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Sa prise en compte peut nécessiter des adaptations importantes, c'est pourquoi un délai est en règle générale accordé pour que les laboratoires de référence, agréés ou officiellement reconnus l'intègrent dans leur processus d'analyses. Dans certains cas, clairement précisés, une modification peut nécessiter une prise en compte immédiate par les laboratoires. En cas de modification majeure, le numéro de version est incrémenté d'une unité (exemple: le version v1c devient v2a). La méthode ainsi modifiée est considérée comme une nouvelle méthode.

Une amélioration est une modification mineure, qui apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. En cas d'amélioration, le numéro de version reste le même mais la lettre associée est incrémentée (exemple: la version v1c devient v1d). La méthode ainsi améliorée n'est pas considérée comme une nouvelle méthode.

### MODIFICATIONS

La présente version les modifications suivantes par rapport à la version 1a soumise à consultation publique :

- la durée de conservation des tampons est rendue plus flexible en laissant la possibilité de les conserver 1 mois et non 15 jours sous réserve que les témoins des analyses donnent les résultats attendus, ceci afin de mettre en cohérence avec la plupart des méthodes officielles spécifiques ;
- la possibilité d'une alternative à l'autoclavage systématique des tampons est offerte par l'utilisation d'eau distillée autoclavée, l'autoclavage des tampons pouvant, dans certains cas, altérer la qualité des composants chimiques ;
- ajouts de recettes pour la nématologie et d'autres analyses ;

### AMELIORATIONS

Sans objet (première version publiée).

## DESCRIPTION DE LA METHODE

### 1. Objet.

L'objet de la présente méthode officielle est de donner la composition et le mode opératoire (« recette ») pour la fabrication des principaux tampons, solutions et milieux utilisés dans les analyses de détection ou identification d'organismes nuisibles dans le domaine de la phytopathologie.

Ce recueil a été élaboré en vue du regroupement des recettes des tampons, solutions et milieux pouvant être communs à plusieurs méthodes officielles, plusieurs organismes nuisibles. S'agissant des milieux, les différentes recettes ont été réparties en milieux non sélectifs, semi-sélectifs et sélectifs (voir explications ci-après) selon leur degré de sélection.

### 2. Domaine d'application.

La présente méthode s'applique communément à toutes les méthodes d'analyse officielles réalisées dans le domaine de la phytopathologie pour le compte du ministère chargé de l'Agriculture. Ces dernières renvoient systématiquement au présent répertoire sous la référence REP 001.

Bien que publiés comme méthode officielle et donc d'application obligatoire en vue d'une harmonisation des pratiques pour les analyses effectuées en vue de la détection des organismes nuisibles sur les végétaux, les milieux et tampons proposés ci-après les laboratoires peuvent, le cas échéant, être modifiés par les laboratoires pour autant :

- qu'ils soient en mesure de justifier soit d'une expérience significative avec le milieu modifié soit de publications scientifiques correspondantes ;
- qu'ils en aient informé le laboratoire national de référence.

Ils doivent en outre avoir obtenu des résultats satisfaisants aux essais d'aptitude.

### 3. Exigences générales

#### 3.1. Personnel, équipements et consommables

Pour la fabrication des milieux, tampons, solutions,... le laboratoire doit faire appel à du personnel autorisé et des équipements et consommables appropriés.

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, les produits et les consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs en ce qui concerne les conditions de stockage avant utilisation ainsi que les modalités de conservation en cours d'utilisation seront suivies. En l'absence de telles données, le laboratoire définira les conditions qu'il jugera les plus optimales.

#### 3.2. Pratiques pour le contrôle qualité

Les dispositions du point 4 de la norme ISO/TS 11133-1 : 2000<sup>1</sup> (partie non reproduite) sont applicables pour la fabrication des milieux, tampons et solutions en ce qui concerne :

- la documentation (point 4.1 de ladite norme) ;
- la conservation (point 4.2 de la norme) à l'exception des éléments donnés ci-après ;
- la préparation des milieux en laboratoire (point 4.3 de la norme) ;

---

<sup>1</sup> *Microbiologie des aliments – Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 1 : guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*

- la préparation avant utilisation (point 4.4 de la norme) ;
- la mise au rebut des milieux (point 4.5 de la norme).

S'agissant de la conservation des solutions et tampons, sauf indications contraires, une fois stérilisés, ils peuvent être conservés 6 mois dans un endroit sec et ventilé, à l'abri de la lumière et de la poussière. A l'ouverture, les flacons stérilisés sont à utiliser dans le mois. Cette durée peut être portée à 15 jours dans certains cas. Les flacons non autoclavés sont à utiliser au maximum dans un délai de 15 jours.

Il est préconisé de réaliser la stérilisation par autoclavage à environ 120°C pendant 20 min sauf indications contraires.

Les milieux de culture doivent quant à eux être utilisés dans un délai de 2 mois après fabrication. En cas de non utilisation dans les deux mois, un nouveau contrôle de conformité du milieu est réalisé. En cas de changement de couleur, de signe d'évaporation/déshydratation ou prolifération microbienne, il convient d'éliminer tout le lot de milieu.

### 3.3. Le contrôle qualité des milieux

Les milieux (cf. point 4.3) font l'objet de contrôle qualité physique et microbiologique conformément aux dispositions des points 5.1 et 5.2 de la norme ISO/TS 11133-1 : 2000 (en ce qui concerne les contrôles qualitatifs).

En l'occurrence, chaque lot de fabrication<sup>2</sup> d'un milieu (commercial ou fabriqué au sein du laboratoire) donnera lieu à une vérification sur au moins :

- 1 souche pour les milieux non sélectifs ou sélectifs ;
- 2 souches pour les milieux de différenciation : l'une devant être inhibée, la seconde ne devant pas l'être.

### 3.4. Les antibiotiques et assimilés

La pesée et de manière plus générale la manipulation des antibiotiques et assimilés est considérée comme critique lors de la fabrication des milieux sélectifs. Les laboratoires doivent mettre en œuvre des procédures adaptées pour la réalisation de ces tâches.

Ces procédures devront nécessairement intégrer les aspects liés à la sécurité des opérateurs.

## 4. Le répertoire des recettes

Pour le présent répertoire, « milieu non sélectif », « milieu d'isolement sélectif », « milieu de différenciation » s'entendent au sens de la norme ISO/TS 11133-1 : 2000 (respectivement points 3.3.4.5.2, 3.3.4.5.1 et 3.3.4.6).

Remarque 1 : s'agissant de l'eau, utilisée pour la fabrication de nombreux tampons, solutions et milieux, sauf indication contraire, l'eau distillée peut être remplacée par de l'eau déminéralisée, (bi)distillée ou osmosée (voir aussi point 4.3.2. de la norme précitée).

<sup>2</sup> On entend par lot de fabrication l'ensemble des boîtes, tubes, flacons,... issus d'une même pesée par le même opérateur le même jour à partir des mêmes numéros de lots de fabrication des composants. Ex : si 2 litres de LPGA ont été fabriqués dans un même flacon de 2 L avec chacun des composants définis pour 1 litre x 2, autoclavé et réparti en boîte = 1 lot. Si 2 flacons ont été préparés, chacun ayant donné lieu à des pesées différentes, même s'il s'agit du même opérateur et que la préparation a été faite le même jour, il s'agira de 2 lots distincts.

Remarque 2 : les laboratoires peuvent choisir d'autoclaver l'eau ou utiliser de l'eau autoclavée et non d'autoclaver les tampons préparés si la qualité des composants chimiques utilisés est susceptible d'être altérée. OK

## 4.1. Les tampons et solutions

<u>Technique</u>	<u>Nom du tampon ou de la solution</u>	<u>Synonyme (s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Réf.</u>
GENÉRIQUE <sup>3</sup>	eau physiologique tamponnée		Voir PBS (0,01 M, pH = 7,2)		
GENÉRIQUE	<u>Lugol</u>		Iode : ..... 5,0 g Iodure de potassium : ..... 10,0 g Eau distillée ..... 100 mL Utilisation en diluant au 1/5 <sup>ème</sup> dans de l'eau distillée	Conservation en bouteille en verre fumé	15
GENÉRIQUE	<u>Solution de KOH</u>	Potasse	Hydroxyde de potassium (KOH) ..... 3,0 g Eau distillée ..... 100 mL		<b>23)</b>
GENÉRIQUE	<u>Tampon de reprise de culot</u>		Hydrogénophosphate de disodium (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O) ..... 2,70 g Dihydrogénophosphate de sodium (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O) ..... 0,40 g Eau distillée ..... 1000 mL pH = 7,2	Stériliser par autoclavage	1 et 4
GENÉRIQUE	<u>Tampon PBS (0,01 M, pH = 7,2)</u>	eau physiologique tamponnée, tampon IF	Chlorure de sodium (NaCl) ..... 8,0 g Hydrogénophosphate de disodium (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O) ..... 2,7 g Dihydrogénophosphate de sodium (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O) ..... 0,4 g Eau distillée ..... 1000 mL pH = 7,2	Stériliser par autoclavage	1 et 4
GENÉRIQUE	<u>Tampon de macération</u>		Hydrogénophosphate de disodium (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O) ..... 10,74 g Potassium phosphate, dibasique (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) ..... 2,72 g Eau distillée ..... 1000 mL pH = 7,0	Stériliser par autoclavage	1 et 4
ELISA	<u>GEB</u>		Sodium sulfite anhydre ..... 1,3 g Ovalbumine ..... 2 g PVP ..... 20 g Tween 20 ..... 20,5 g PBS ..... 1,0 L	Stériliser par autoclavage.	
ELISA	<u>Tampon carbonate</u>	Tampon de coating	Carbonate de sodium (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) ..... 1,59 g Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> ) ..... 2,93 g Eau distillée ..... 1000 mL pH = 9,6	Stériliser par autoclavage	

<sup>3</sup> Générique : pouvant être utilisé dans des manipulations faisant appel à différentes techniques

<u>Technique</u>	<u>Nom du tampon ou de la solution</u>	<u>Synonyme (s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Réf.</u>
ELISA	<u>Tampon conjugué</u>		Tampon PBS-T ..... 10,0 mL Albumine sérique bovine (BSA) ..... 0,02 g  <i>Remarque : du PVP peut être ajouté selon les recommandations du fournisseur</i>	Préparation extemporanée, ne pas autoclaver.	
ELISA	<u>Tampon de broyage PBS-T-PVP</u>		Polyvinylpyrrolidone (PVP 25) ..... 20 g PBS-T 1X ..... 1000 mL	Préparation extemporanée, ne pas autoclaver.	
ELISA	<u>Tampon de broyage PBS-T-PVP (20%)</u>		Polyvinylpyrrolidone (PVP 40) ..... 5 g Sulfite de sodium ..... 0,325 g Albumine sérique bovine (BSA) ..... 0,5 g Tween 20 ..... 5 g PBS-T 1X ..... 100 mL pH = 8,0	Préparation extemporanée, ne pas autoclaver.	
ELISA	<u>Tampon de broyage Vigne</u>		Trizma <sup>®</sup> Base (NH <sub>2</sub> C-(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> ) ..... 24,3 g Chlorure de sodium (NaCl) ..... 8,0 g Polyvinylpyrrolidone (PVP 40) ..... 20,0 g Tween 20 ..... 0,5 mL Pour tampon 1X ..... qsp 1000 mL Pour tampon 10X ..... qsp 100mL pH = 8,0	Stériliser par autoclavage	
ELISA	<u>Tampon de coating</u>		Voir tampon carbonate		
ELISA	<u>Tampon de lavage (pour ELISA)</u>	PBS-T 1 X	Tween 20 ..... 0,5 mL PBS ELISA 1 N ..... 1000 mL* pH = 7,4 <i>* ou 800 mL d'eau distillée + 200 mL de PBS ELISA 5N</i>	Stériliser par autoclavage.	
ELISA	<u>PBS<sup>4</sup> ELISA 1 N</u>	PBS 1X	Chlorure de sodium (NaCl) ..... 8,0 g Dihydrogénophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) ..... 0,2 g Hydrogénophosphate de disodium (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O) ..... 2,9 g (ou Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhydre ..... 1,15 g) Chlorure de potassium (KCl) ..... 0,2 g Eau distillée ..... qsp 1000 mL pH = 7,4	Stériliser par autoclavage	

<sup>4</sup> Phosphate Buffered Saline

<u>Technique</u>	<u>Nom du tampon ou de la solution</u>	<u>Synonyme (s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Réf.</u>
ELISA	<u>PBS ELISA 5 N</u>		NaCl ..... 40,0 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... 1,0 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O ..... 14,5 g KCl..... 1,0 g Eau distillée ..... qsp 1000 mL pH = 7,4	Stériliser par autoclavage	
ELISA	<u>PBS T 1 X</u>	Tampon de lavage	Voir tampon de lavage pour ELISA		
ELISA	<u>Tampon substrat</u>	Tampon diéthanolamine	Diéthanolamine ..... 97,0 mL Eau distillée ..... qsp 1000 mL pH = 9,8 (à ajuster avec une solution HCl concentrée). <i>Certains fabricants préconisent également l'ajout de 0,1 g de MgCl</i>	Avant utilisation, dissoudre 1 mg de pNPP dans 1 mL de tampon substrat.	
Hybridation moléculaire	<u>Tampon d'acide maléique</u>		Chlorure de sodium (NaCl) ..... 17,5 g Acide maléique..... 23,2 g Eau distillée ..... qsp 2000 mL pH = 7,5	Conservation à 5°C +/- 4°C	
Hybridation moléculaire	<u>Tampon de saturation</u>	Tampon de "blocking"	Solution stock de blocking Reagent 10%..... 10 mL Tampon d'acide maléique ..... 90 mL		
Hybridation moléculaire	<u>Tampon de détection</u>		Tris ..... 12,114 g Chlorure de sodium (NaCl) ..... 5,844 g Eau distillée ..... qsp 1000 mL pH = 9,5	Ajuster le pH avec de l'HCl .	
Hybridation moléculaire	<u>Tampon de dénaturation (15% formaldéhyde)</u>		SCC 20 X ..... 180 mL Formaldéhyde à 37% ..... 120 mL	Conservation à 5°C +/- 4°C	
Hybridation moléculaire	<u>Tampon de dilution (7,5% formaldéhyde)</u>		SCC 20 X ..... 8 mL Formaldéhyde à 37% ..... 2 mL	Conservation à 5°C +/- 4°C	
Hybridation moléculaire	<u>Tampon de rinçage</u>		Tampon d'acide maléique ..... 1000 mL Tween 20 ..... 3 mL		
IF	<u>Solution de bleu d'Evans</u>	Contre-marqueur	Bleu d'Evans ..... 100 mg PBS (0,01 M, pH = 7,2) ..... qsp 10 mL	Conservation à 5°C +/- 4°C, à l'abri de la lumière	

<u>Technique</u>	<u>Nom du tampon ou de la solution</u>	<u>Synonyme (s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Réf.</u>
IF	<u>glycérine tamponnée</u>		Hydrogénophosphate de disodium (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O) ..... 3,2 g Dihydrogénophosphate de sodium (Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O) ..... 0,195 g Glycérol (glycérine bidistillée) ..... 50 mL Eau distillée ..... 100 mL pH = 7,6	Aliquotage en microtube Stériliser par autoclavage Aliquots à usage unique	12
IF	<u>Tampon IF</u>	tampon PBS, eau physiologique tamponnée	Voir tampon de rinçage (PBS 0,01 M, pH = 7,2) - générique		
NEMATOLOGIE	<u>MgSO4 densité 1,18</u>	Liquide de séparation	MgSO4 ..... environ 7,2 kg Eau (chaude) ..... environ 12 L Ajuster la densité après mélange complet et refroidissement à 1.18 avec de l'eau ou du MgSO4	Après ajustement, Filtrer sur un tamis de 40 µm pour éliminer toute pollution et stocker la solution dans un fût en plastique à température ambiante. Maintenir la solution à l'abri de la lumière afin d'éviter le développement d'algues  Matériel spécifique nécessaire : Fût de stockage, Cuvette, Récipient circulaire de plus de 15 L, en plastique (seau ou bassine), Agitateur, Entonnoir, Eprovette graduée de grand volume, Tamis de 40 µm, densimètre	
NEMATOLOGIE	<u>Solution enzymatique</u>		Pectinase 15% ..... 150 Cellulase 30% ..... 300 mL Eau ..... qsp 1 L	Mélanger jusqu'à obtention d'un mélange homogène. Conserver la préparation au frais dans le réfrigérateur, pendant une durée maximale de 2 mois. En cas d'apparition de moisissures dans la bouteille, passer la préparation sur un filtre papier ou sur un tamis de 40 µM avant utilisation.	
PCR	<u>Chloroforme : alcool isoamylique 24/1</u>		Chloroforme ..... 24 mL Alcool isoamylique ..... 1 mL		

<u>Technique</u>	<u>Nom du tampon ou de la solution</u>	<u>Synonyme (s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Réf.</u>
PCR	<u>TBST 10X</u>		NaCl ..... 80 g Na NO <sub>3</sub> ..... 2 g KCl..... 2 g Tween 20 ..... 5 mL Tris [hydroxyméthyl] aminométhane (NH <sub>2</sub> C-(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> ) ..... 24 g Eau distillée ..... qsp 1 L pH = 7,4 pour solution 1 X		
PCR	<u>Tampon de broyage CTAB 3%</u>		CTAB ..... 30 g NaCl ..... 81,81 g EDTA..... 7,44 g Tris HCl ou Trizma® base ..... 121,1 g Eau distillée ..... 700 mL pH = 8,0 Eau distillée ..... qsp1000 mL	Ajuster le pH avec environ 20 mL d'HCl concentré	7
PCR	<u>Tampon de charge</u>	Solution de bleu de charge	Bleu de bromophénol..... 0,065 g Glycérine bidistillée stérile (glycérol)..... 7,5 g Eau ultra pure stérile ..... 25 mL	La glycérine bidistillée est parfois remplacée par du saccharose, du xylène cyanol,... dans certaines compositions. La dilution se fait également parfois dans du TBE 0.5X ou du TE x1	
PCR	<u>Tampon Edwards</u>	tampon de lyse	Trizma® hydrochloride (NH <sub>2</sub> C-(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> HCl)..... 1,58 g Chlorure de sodium (NaCl) ..... 0,73 g EDTA, 2H <sub>2</sub> O ..... 0,46 g Dodecyl sulfate de sodium (SDS) ..... 0,25 g Polyvinylpyrrolidone (PVP 360) ..... 1,0 g Eau distillée ..... 50 mL	Stériliser par autoclavage possible	20
PCR	<u>Tampon de macération PVPP 1X</u>		Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ..... 10,0 g Eau distillée ..... 1000 mL	Stériliser par autoclavage possible	
PCR	<u>Tampon TENPP</u>	Tampon d'extraction d'ADN à partir de sol	Trizma Sigma 7-9® ..... 0,61 g EDTA..... 0,75 g Chlorure de sodium (NaCl) ..... 0,59 g Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ..... 5,0 g Eau distillée ..... 100 mL		14

<u>Technique</u>	<u>Nom du tampon ou de la solution</u>	<u>Synonyme (s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Réf.</u>
PCR	<u>Tampon Tris 7-9</u>	Tampon d'extraction d'ADN à partir de sol	Trizma Sigma 7-9® ..... 1,2 g Eau distillée ..... 1000 mL		14
PCR	<u>Tampon Tris borate EDTA (TBE) 10X</u>		Trizma base (Tris[hydroxyméthyl] aminométhane (NH <sub>2</sub> C-(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> )) 108 g Acide borique ..... 55 g EDTA 0,5 mol.L <sup>-1</sup> ..... 40 mL Eau distillée ..... 700 mL pH = 8,0 Eau distillée ..... 1000 mL  NB : la fabrication de TBE 5X est également possible. Adapter en conséquence les quantités	Il est recommandé de se procurer cette solution tampon toute prête à la concentration 10 X. Le TBE est ensuite dilué dans de l'eau osmosée à 0.5 X pour son utilisation pour la préparation des gels d'électrophorèse et du tampon d'électrophorèse.  Il est toutefois envisageable de le fabriquer soi-même en l'autoclavant avant emploi.	
PCR	<u>Tampon Tris EDTA (TE)</u>		EDTA ..... 50 mM Tris-HCl ..... 10 mM pH = 8,0		
PCR	<u>Tampon Tris EDTA (TE)</u>		EDTA anhydre ..... 0,34 g Tris ..... 1,21 g Eau distillée ..... 50 mL pH = 8,0 Eau distillée ..... qsp 1000 mL	Selon exigences ISO 21571	
PCR	<u>Tampon Tris HCl (0.1 M, pH 8)</u>		Tris [hydroxyméthyl] aminométhane (NH <sub>2</sub> C-(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> ) ..... 1,21 g HCl 25% Eau Ultra Pure ..... 100 mL pH = 8,0	a) Préparer 1.21 g de Tris b) Ajouter 80 ml d'Eau Ultra Pure) Ajuster le pH à 8 en ajoutant goutte à goutte HCl à 25% Compléter 100 ml d'Eau Ultra Pure	

<b>Technique</b>	<b>Nom du tampon ou de la solution</b>	<b>Synonyme (s)</b>	<b>Composition</b>	<b>Mode opératoire / précisions</b>	<b>Réf.</b>
Spécifique	<u>Solution d'iodure de sodium (NaI) 6M</u>		Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ..... 0,75 g NaI ..... 45 g Eau distillée ..... 40 mL	Dissoudre 0,75 g de Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> dans 40 mL d'eau déminéralisée. Ajouter 45 g de NaI et agiter jusqu'à dissolution. Filtrer sur papier et stocker à l'obscurité à 5°C. Ne pas conserver si un précipité apparaît.	16)
Spécifique	<u>Suspension de silice</u>		silice ..... 15 g eau ultra pure ..... 2 x 100 mL HCl 1 N	Suspendre 15 g de silice dans 100 mL d'eau ultra pure dans une éprouvette graduée de 100 mL. Bien mélanger et laisser sédimenter pendant 24 heures à température ambiante. Aspirer 85 mL de surnageant et ajouter 100 mL d'eau ultra pure. Remettre en suspension la silice et laisser sédimenter pendant 5 heures. Aspirer 90 mL de surnageant. Ajuster à pH 2,0 avec du HCl 1 N Aliquoter en petit volume et stériliser par autoclavage. Stocker à 5°C.	16)
Spécifique	<u>Tampon de macération anti-oxydant</u>		PVP 10 (polyvynilpyrrolidone) ..... 20,0 g D- mannitol ..... 10,0 g Acide ascorbique ..... 1,76 g Glutathion réduit ..... 3,0 g Tampon PBS ELISA 1N ..... qsp 1000 mL pH = 7,0	Stériliser par filtration (0.22µm). Conservation 6 mois, 2 mois après ouverture.	

<u>Technique</u>	<u>Nom du tampon ou de la solution</u>	<u>Synonyme (s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Réf.</u>
Spécifique	<u>Tampon TRIS-PVP</u>		Trizma® base (NH <sub>2</sub> C-(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> ) .....24,23 g NaCl .....8,0 g PVP40 .....20,0 g Tween 20.....0,5 mL Eau distillée ..... qsp1,0 L pH = 8,0	Stériliser par autoclavage.	

## 4.2. Les milieux de culture non sélectifs

<u>Nom du milieu</u>	<u>Synonyme(s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Ref.</u>
<u>Milieu d'isolement</u> (mycologie)		Extrait de Malt ..... 12 g Chloramphénicol (200 ppm) ..... 2 mL Agar Agar ..... 15 g Eau osmosée ..... 1000 mL		
<u>Milieu King B</u>	Milieu KB	Protéose - peptone n°3 ..... 20,0 g Glycérol (glycérine bidistillée) ..... 10,0 g Potassium phosphate, dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ..... 1,50 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O) ..... 1,50 g Agar bactériologique de type A ..... 15,0 g Eau distillée ..... 1000 mL pH=7.2	Stériliser par autoclavage Avant de couler le milieu, il est recommandé d'incorporer stérilement 0,05 g de cycloheximide .	11)
<u>Milieu LPG</u>		Extrait de levure ..... 5,0 g Peptone ..... 5,0 g Glycérol (glycérine bidistillée) ..... 150 mL Eau distillée ..... 1000 mL	Stériliser par autoclavage. Stocker les flacons à 4°C +/- 3°C. Prévoir de mettre le flacon à température ambiante 2 à 3 jours avant utilisation. Avant utilisation, vérifier l'absence de trouble dans le flacon.	
<u>Milieu LPGA</u>		Extrait de levure ..... 5,0 g Peptone ..... 5,0 g D(+) Glucose ..... 10,0 g Agar Bacto® Difco ..... 15,0 g Eau distillée ..... 1000 mL pH = 7,0	Stériliser par autoclavage. Avant de couler le milieu, il est recommandé d'incorporer stérilement 50 mg de cycloheximide .	12)

## 4.3. Les milieux de culture sélectifs

<u>Nom du milieu</u>	<u>Synonyme(s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Ref.</u>
<u>DCPA</u> <u>(Dichloran</u> <u>Chloramphenicol</u> <u>Peptone Agar)</u>		Peptone bactériologique ..... 15,0 g Potassium phosphate, dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ..... 1,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O) ..... 0,5 g Chloramphénicol (solution éthanolique*) ..... 2,0 mL Dichloran (2-6-dichloro-4-nitroaniline) ( solution éthanolique**) ..... 1,0 mL Crystal violet (solution aqueuse***) ..... 1,0 ml Agar ..... 15,0 g Eau distillée ..... 1000 mL  * : 10,0±0,1 g de chloramphenicol dans 100±2 ml d'éthanol, conservable à 5±3°C pendant 3 mois. ** : 0,20±0,01 g de dichloran dans 100±2 ml d'éthanol, conservable à 5±3°C pendant 6 mois. *** : 0,05±0,01 g de crystal violet dans 100±2 ml d'eau distillée ou osmosée, conservable à 5±3°C pendant 6 mois.	Avant utilisation, ce milieu peut être stocké jusqu'à une semaine à température ambiante et à l'abri de la lumière directe ou jusqu'à 3 mois à 5±3°C à l'abri de la lumière directe.	5)
<u>Milieu Amidon</u>		Bouillon nutritif ..... Amidon soluble de pomme de terre ..... Agar Bacto® Difco ..... Eau distillée .....	Stériliser par autoclavage	15)
<u>Milieu Arginine</u>	Thornley, ADH	Peptone ..... 1,0 g Potassium phosphate, dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ..... 0,3 g Chlorure de sodium (NaCl) ..... 5,0 g Rouge de phénol ..... 0,01 g L(+) arginine (monohydrochloride) ..... 10,0 g Agar bactériologique de type A ..... 3,0 g Eau distillée ..... 1000 mL pH = 7,2	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage	12)
<u>Milieu ARJ</u>	Milieu Ayers, Rupp et Johnson	Dihydrogénophosphate d'ammonium (NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) ..... 1,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O) ..... 0,2 g Chlorure de potassium (KCl) ..... 0,2 g Bleu de bromothymol ..... 0,03 g Agar bactériologique de type A ..... 6,0 g Eau distillée ..... 1000 mL pH = 7 à 7,2	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon (l'ajout d'agar est facultatif). Stériliser par autoclavage puis dissoudre la source carbonée et l'ajouter stérilement.  Ajuster la couleur si nécessaire.	6)

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>Milieu Citrate de Simmons</u>		Dihydrogénophosphate d'ammonium (NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) ..... 1,0 g Potassium phosphate, dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ..... 1,0 g Chlorure de sodium (NaCl) ..... 5,0 g Bleu de bromothymol ..... 0,15 g Citrate de sodium anhydre (C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>7</sub> ) ..... 2,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O) ..... 0,20 g Agar bactériologique de type A ..... 20,0 g Eau distillée ..... 1000 mL	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage (Distribution en pente gélifiée)	15)
<u>Milieu EPN</u>	Eau peptonée nitratée	Bactopeptone ..... 10,0 g Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> ) ..... 1,0 g Eau distillée ..... 1000 mL	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage	8)
<u>Milieu Esculine</u>		Peptone ..... 10,0 g Citrate ammoniacal de fer III (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> ) ..... 0,50 g Esculine ..... 1,0 g Agar bactériologique de type A ..... 12,0 g Eau distillée ..... 1000 mL	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage	12)
<u>Milieu gélatine de Frazier</u>		Extrait de levure ..... 3,0 g Peptone ..... 5,0 g Gélatine ..... 40,0 g Agar bactériologique de type A ..... 15,0 g Eau distillée ..... 1000 mL	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage	8)
<u>Réactif de Frazier</u>		Sulfate de diammonium ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) ..... 76,0 g Eau distillée ..... 100 mL	Ne pas autoclaver	21)
<u>Milieu gélose au lait</u>		<u>Préparation A</u> Extrait de levure ..... 5,0 g Agar nutritif ..... 23,0 g Eau distillée ..... 1000 mL <u>Préparation B</u> Lait écrémé en poudre ..... 10,0 g Eau distillée ..... 100 mL	Préparer séparément les préparations A et B et les stériliser par autoclavage. les milieux sont laissés à refroidir suffisamment pour pouvoir les mélanger et répartir en boîtes de Petri.	15)
<u>Milieu GYCA</u>		D(+) glucose ..... 2,5 g Extrait de levure ..... 2,5 g Carbonate de calcium (CaCO <sub>3</sub> ) ..... 20,0 g Agar bactériologique de type A ..... 7,5 g Eau distillée ..... 500 mL	Faire fondre le milieu avant de le répartir 100 mL en flacon de 250mL puis stériliser par autoclavage Bien agiter pour mettre en suspension le CaCO <sub>3</sub> avant chaque répartition.	13)

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>Milieu KBCA</u>		<u>Milieu de base = milieu King B</u>  <u>Antibiotiques et autres produits</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• céphalexine ..... 40 mg/L</li> <li>• cycloheximide (Actidione) ..... 50 mg/L</li> </ul>	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	11)
<u>Milieu de Hugh et Leifson</u>		Peptone de caséine ..... 2,0 g Potassium phosphate, dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ..... 0,30 g Chlorure de sodium (NaCl) ..... 5,0 g Bleu de bromothymol ..... 0,03 g D(+) glucose ..... 10,0 g Agar bactériologique de type A ..... 3,0 g Eau distillée ..... 1000 mL pH= 7,1	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage Ajuster la couleur si nécessaire.	10)
<u>Milieu Levane</u>		Extrait de levure ..... 2,0 g Peptone ..... 5,0 g D(+) saccharose ..... 50,0 g Chlorure de sodium (NaCl) ..... 5,0 g Agar bactériologique de type A ..... 20,0 g Eau distillée ..... 1000 mL pH=7,2	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage	3)

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>NCTM4</u>		<p><u>Milieu de base</u></p> <p>-Extrait de levure : ..... 7g            -Peptone : ..... 7g            -D(+) glucose : ..... 7g            -Agar : ..... 18g            eau distillée ou osmosée ..... 1000 mL</p> <p><u>Antibiotiques et autres produits</u></p> <p>-Pivmécillinam : ..... 100mg            -Céphalexine : ..... 50mg            Triméthoprim : ..... 10mg            -Néomycine : ..... 3mg            -Propiconazole (20mg/L) : ..... 80µL            pH=7,2</p>	Après autoclavage à environ 120°C pendant 20 minutes et refroidissement à 50°C ± 5°C ajouter stérilement les antibiotiques et produits suivants à partir de solutions mères (filtrer les solutions mères (membrane 0,2µm) avant ajout ).	19)
<u>Milieu PDA</u>	Potato Dextrose Agar	PDA en poudre (Difco) ..... 39 g eau distillée ou osmosée ..... 1000 mL	Avant utilisation, ce milieu peut être stocké jusqu'à une semaine à température ambiante et à l'abri de la lumière directe ou jusqu'à 3 mois à 5±3°C à l'abri de la lumière directe.	

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Réf.
<u>Milieu SNA</u>	Spezieller Nährstoffärmer Agar	Potassium phosphate, dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ..... 1,0 g Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> ) ..... 1,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O) ..... 0,5 g Chlorure de potassium (KCl) ..... 0,5 g Glucose ..... 0,20 g Saccharose ..... 0,20 g Agar ..... 2 g eau distillée ou osmosée ..... 1000 mL	Avant utilisation, ce milieu peut être stocké jusqu'à une semaine à température ambiante et à l'abri de la lumière directe ou jusqu'à 3 mois à 5±3°C à l'abri de la lumière directe	9)
<u>Milieu Sutton</u>		Hydroxyde de sodium (NaOH 1 N) ..... 2,6 mL Solution de chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O) ..... 1,0 g* Extrait de levure ..... 0,50 g Bleu de bromothymol ..... 0,008 g Eau distillée ..... 100 mL Sels de sodium d'acide polygalacturonique ..... 1,50 g**  *dissoudre 1g dans 10 mL d'eau distillée, ajouter ensuite 1,2 de cette solution dans le milieu. **ajouter ce produit en dernier, si le milieu n'est pas suffisamment gélatineux, ajouter en plus jusqu'à 1,2 mL de la solution de chlorure de calcium	Placer le bêcher dans un bain marie à 100°C pendant environ 5 minutes en agitant de temps en temps. Recouvrir le bêcher de papier aluminium. Stériliser par autoclavage (Distribution en pente gélosée).	
<u>Milieu Tween 80</u>		<u>Milieu de base :</u> Peptone ..... 10,0 g Bromure de potassium (BrK) ..... 10,0 g Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> ) ..... 0,34 g Agar bactériologique de type A ..... 15,0 g Eau distillée ..... 1000 mL  <u>Antibiotiques et autres produits</u> Tween 80 stérile ..... 10,0 mL Cycloheximide ..... 75,0 mg Céphaléxine ..... 25,0 mg 5-Fluorouracil ..... 6,0 mg Tobramycine ..... 0,4 mg	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	15)

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Réf.
Milieu Urée- Indole	Urée Indole de Ferguson	L-tryptophane .....0,3 g Dihydrogénophosphate de potassium(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) .....0,1 g Potassium phosphate, dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) .....0,1 g Chlorure de sodium (NaCl)..... 0,5 g Urée..... 2,0 g Rouge de phénol (sol. à 1% dans éthanol)..... 0,25 mL Eau distillée ..... 100 mL	Dissoudre le tryptophane dans l'eau chauffée à environ 80°C, laisser refroidir suffisamment pour pouvoir rajouter les autres produits. Après dissolution, stériliser le milieu par filtration.	8)

## 4.4. Les milieux d'identification

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>Milieu BCYE</u>		ACES (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S) 5,0 g Extrait de levure.....5,0 g Charbon actif..... 1,0 g Agar Bacto® Difco..... 8,5 g Eau distillée ..... qsp 500 mL pH = 6,9  <u>Produits</u> L- cystéine HCl ..... 200 mg Pyrophosphate de fer soluble..... 125 mg	Diluer l'ACES dans environ 250 mL d'eau distillée et le dissoudre à environ 50°C Ajouter les autres produits ,et ajuster le pH Stériliser par autoclavage puis dissoudre les produits indiqués et les ajouter stérilement.	<b>15)</b>
<u>Milieu CCT</u>		Saccharose ..... 100,0 g Sorbitol ..... 10,0 g Sodium tetradecyl sulfate (Niaproof) ..... 1,2 mL Agar nutritif ..... 23,0 g Crystal Violet (solution 0,1% dans éthanol) ..... 2,0 mL pH= entre 7 et 7,2 <u>Antibiotiques</u> Nitrate de thallium (solution 0,1% dans eau) ..... 2,0 mL Cycloheximide ..... 0,05 g	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	17)
<u>Milieu Kelman</u>	Milieu TTC (triphenyl tetrazolium salt)	Hydrolysate acide de caséine (casamino acid) ..... 1,0 g D (+) glucose .....5,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)..... 0,10 g Saccharose..... 10,0 g Gélatine en poudre .....30,0 g Agar bactériologique de type A ..... 16,0 g pH=6,8		<b>15)</b>

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>Milieu King B</u> <u>"Pois"</u>	Milieu KBBCA	Protéose - peptone n°3 (Difco) ..... 20,0 g Glycérine bidistillée (Glycérol) ..... 10,0 g Potassium phosphate, dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ..... 1,50 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)..... 1,50 g Acide borique..... 1,50 g Agar bactériologique de type A..... 15,0 g Eau distillée..... 1000 mL  <u>Antibiotiques</u> céphalexine ..... 40 mg/L cycloheximide (Actidione) ..... 50 mg/L	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	
<u>Milieu LBCA</u>	Milieu levane borate cycloheximide céphalexine	Saccharose 50,0 g Extrait de levure ..... 2,0 g Bactopeptone ..... 5,0 g Acide borique ..... 1,5 g Soude (NaOH) ..... 2,0 ml Agar bactériologique de type A..... 15,0 g Eau distillée..... 1000 mL  <u>Antibiotiques</u> céphalexine ..... 40 mg/L cycloheximide (Actidione)..... 50 mg/L	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	
<u>Milieu M2' de Luisetti</u>		Hydrolysate acide de caséine (casamino acid) ..... 10,0 g Potassium phosphate, dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ..... 2,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)..... 0,10 g Saccharose ..... 10,0 g Gélatine en poudre ..... 30,0 g Agar bactériologique de type A ..... 16,0 g pH=6,8	Stériliser par autoclavage	

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>Milieu mCS20ABN</u>		Peptone de soja 2,0 g Bacto tryptone..... 2,0 g Hydrogénophosphate de diammonium ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ..... 0,80 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O) ..... 0,40 g Dihydrogénophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )..... 1,0 g L-glutamine ..... 6,0 g L-histidine ..... 1,0 g D(+) Glucose..... 1,0 g Amidon soluble ..... 25,0 g (ou amidon de pomme de terre ..... 15,0 g) Agar bactériologique de type A..... 15,0 g Eau distillée..... 1000 mL pH=6,5 <u>Antibiotiques</u> cycloheximide ..... 200 mg bacitracine ..... 100 mg neomycine sulfate ..... 40 mg	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	
<u>Milieu mFS</u>	modified Fieldhouse- Sasser agar	Amidon soluble ..... 25,0 g (ou amidon de Pomme de terre)..... 15,0 g) Extrait de levure ..... 0,10 g Dihydrogénophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )..... 0,80 g Potassium phosphate, dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ..... 0,80 g Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> ) ..... 0,50 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O) ..... 0,10 g Methyl green (solution aqueuse 1%) ..... 1,50 mL Agar bactériologique de type A..... 15,0 g Eau distillée..... 1000 mL <u>Antibiotiques et autres produits</u> cycloheximide ..... 200 mg D- Méthionine (sol à 1%) ..... 3 mL pyridoxine HCl (sol à 1%) ..... 1 mL cephalexine ..... 50 mg trimethoprime ..... 30 mg	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>Milieu MNTA</u>		<u>Milieu de base</u> Extrait de levure ..... 2,0 g D(-) mannitol ..... 2,5 g Potassium phosphate, dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ..... 0,25 g Dihydrogénophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) ..... 0,25 g Chlorure de sodium (NaCl) ..... 0,05 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O) ..... 0,10 g Agar bactériologique de type A ..... 16,0 g Sulfate de manganèse (MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O) ..... 15 <b>mg</b> Sulfate de fer (FeSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O) ..... 5 <b>mg</b> Eau distillée ..... 1000 mL pH = 7,2  <u>Antibiotiques et autres produits</u> acide nalidixique (sol à 1%) ..... 2 mL amphotéricine B ..... 10 mg triméthoprime 60 mg	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	<u>4</u>
<u>Milieu NSCAA</u>	Nutrient Starch Cycloheximide Antibiotic Agar	Agar nutritif ..... 23,0 g Amidon soluble ..... 25,0 g (ou amidon de Pomme de terre ..... 15,0 g) Eau distillée ..... 1000 mL  <u>Antibiotiques:</u> cycloheximide 200 mg nitrofurantoïne 10 mg* vancomycine (sol à 2 mg/mL) ..... 250 µL	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	
<u>Milieu PTSCA</u>		Bactopeptone ..... 10,0 g L-tyrosine ..... 1,0 g Amidon de pomme de terre insoluble ..... 4,0 g (soluble : ..... 15,0g) Chlorure de sodium (NaCl) ..... 5,0 g Agar Bacto® Difco ..... 15,0 g Eau distillée ..... 1000 mL  <u>Antibiotiques et autres produits</u> céphalexine 40 mg cycloheximide (Actidione) ..... 50 mg	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>Milieu SMSA modifié</u>		Hydrolysate acide de caséine (casamino acid) ..... 1,0 g Glycérine bidistillée (glycérol) ..... 5,0 mL Peptone ..... 10,0 g Agar Bacto® Difco ..... 15,0 g Eau distillée ..... 1000 mL pH = 6,5  <u>Antibiotiques et autres produits</u> crystal violet ..... 5 mg sulfate de polymyxine B (env 600 000 U) ..... 78 mg* bacitracine (env 1250 U) ..... 18 mg* sels de tétrazolium (TZC) ..... 50 mg pénicilline G (env 825 U) ..... 0,5 mg* chloramphénicol ..... 5 mg *vérifier selon fournisseur et le lot la quantité à peser	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	<u>1</u>
<u>Milieu SNA</u>	Spezieller Nährstoffärrer Agar	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... 1.0 g KNO <sub>3</sub> ..... 1.0 g MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O ..... 0.5 g KCl ..... 0.5 g Glucose ..... 0,20 g Saccharose ..... 0,20 g Agar ..... 2 g H <sub>2</sub> O distillée ou osmosée ..... qsp 1000 mL	Avant utilisation, ce milieu peut être stocké jusqu'à une semaine à température ambiante et à l'abri de la lumière directe ou jusqu'à 3 mois à 5±3°C à l'abri de la lumière directe	
<u>Milieu SRS (Klément Z et al. 1990)</u>		Extrait de boeuf ..... 5,0 g Bactopeptone ..... 10,0 g D(+) saccharose ..... 40,0 g Eau distillée ..... 1000 mL	Stériliser par autoclavage	
<u>Milieu Wilbrink</u>		Protéose peptone n°3 ..... 5,0 g Saccharose ..... 10,0 g Potassium phosphate, dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ..... 0,5 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O) ..... 0,25 g Nitrate de sodium (NaNO <sub>3</sub> ) ..... 0,25 g Agar bactériologique de type A ..... 15,0 g Eau distillée ..... 1000 mL pH entre 7 et 7,2  <u>Antibiotiques</u> cycloheximide ..... 250 mg	Stériliser par autoclavage puis dissoudre l'antibiotique et l'ajouter stérilement.	<u>22)</u>

<u>Nom du milieu</u>	<u>Synonyme(s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Ref.</u>
<u>Milieu YDC</u>		Extrait de levure..... 10,0 g Glucose..... 20,0 g CaCO <sub>3</sub> ..... 20,0 g Agar bactériologique de type A ..... 15,0 g	Autoclaver 15 minutes à environ 120°C. Bien agiter au préalable pour mettre en suspension le CaCO <sub>3</sub> et utiliser en tube en pente gélosée ou en boîte de Pétri	

## ANNEXE SOLUBILITE DES ANTIBIOTIQUES ET PRODUITS

(liste non exhaustive)

Nom Produit	Solvant
Acide nalidixique	soude
Amoxicilline	éthanol
Amphotéricine B	éthanol
Ampicilline	eau
Bacitracine	eau, éthanol
Carbenicilline	eau
Céfopérazone	eau
Céphalexine	soude
Céphalothine	eau
Chloramphénicol	éthanol
Crystal violet	éthanol
Cycloheximide	éthanol
L-Cystéine	eau
Erythromycine	eau ou éthanol
Gentamycine sulfate	eau
Kanamycine sulfate	eau
D méthionine	eau
Néomycine sulfate	eau
Nitrofurantoïne	eau
Novobiocine	eau
Pénicilline G	eau
Pipéracilline	eau
Polymyxine B sulfate	eau
Pyridoxine/HCl	eau
Pyrophosphate de fer	eau
Rifampicine	éthanol
Rifamycine	éthanol
sels de tétrazolium (TZC)	éthanol
Streptomycine sulfate	eau
Sulfadiazine	eau ou NaOH
Tétracycline	eau
Tobramycine	eau
Triméthoprime	éthanol
Tyrothricine	eau
Vancomycine	eau
5-Fluorouracyl	eau

## LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
<b>GLO 001</b>	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

## BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

- 1) Anonyme. Directive 2006/63/CE de la commission du 14 juillet 2006 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*
- 2) Anonyme. 2000. Norme ISO/TS 11133-1. Microbiologie des aliments – Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 1 : guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire.
- 3) Anonyme, 2004. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. **34**, 159-171
- 4) Anonyme. Directive 2006/56/CEE de la commission du 12 juin 2006 relatif à la lutte contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre (*Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* subsp. *sepedonicus* (Spieckerman et Kotthoff) Davis *et al.*).
- 5) Andrews S., Pitt J., 1986. Selection medium for Fusarium species and dematiaceous Hyphomycetes from cereals. Appl. Environ. Microb.. 51 (6). 1235-1238. (milieu adapté par B. Cahagnier, INRA Nantes, comm. Pers.)
- 6) Ayers S.H., Rupp P., Johnson W.T., 1919. A study of the alkali forming bacteria in milk. USDA Bull., 782.
- 7) Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.
- 8) Freney *et al.* 1992. Manuel de bactériologie clinique volume 1. Collection optionBio Elsevier edition.
- 9) Gerlach, W. Nirenberg, H. 1982 The genus Fusarium-a pictorial atlas. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem 209, 1–406. Links
- 10) Hugh, R., Leifson, E. 1953 The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. Journal of Bacteriology 66, 24.)
- 11) King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D .E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44: 301.
- 12) Lelliott, R.A., Stead, D.E. (1987) Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants - Methods in Plant Pathology vol. 2. Blackwell Scientific Publications, Oxford (GB).
- 13) Méthode Bhs/99/02 version b ces de haricot. Détection de *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolica* et *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* par isolement sur milieux nutritifs.
- 14) Poussier, S., and J. Luisetti. 2000. Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissues by nested-PCR-RFLP. Eur. J. Plant Pathol. 106:255–265.
- 15) Schaad *et al*, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant pathogenic Bacteria.APS Press. 3rd edition.373 p. Saint paul, Minnesota (US)
- 16) Ausubel *et al.*, 1987. Current protocols in molecular biology 1987-1988. John Willey and Sons, New York .
- 17) Ishimaru, C. et E.J. Klos. 1984. New medium for detecting *Ewinia amylovora* and its use in epidemiological studies. Phytopathology 74: 1342-1345.
- 18) Gerlach, W. Nirenberg, H. 1982 The genus Fusarium-a pictorial atlas. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem 209, 1–406. Links

19) Laurent 2009

20) Manceau et al., 2005. Bacterial extraction from grapevine and detection of *Xylophilus ampelinus* by a PCR and Microwell plate detection system. Bulletin OEPP/EPPO bulletin 35, 55-60

21) Kalys, Life science products manual 4<sup>th</sup> edition, p 160

22) Anonymous, 2003. OEPP/EPPO 03/10275-Diagnostic protocols for organisms harmful to plants  
Diagnosis of *Xanthomonas fragariae*

23) Suslow T.V. et al. 1983. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72:917-918.

Pour toute demande à caractère scientifique et technique relative à ce document, le point de contact national désigné par le ministère chargé de l'agriculture est le laboratoire national de référence concerné :

**Laboratoire national de la protection des végétaux,  
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01  
[lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr](mailto:lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr)**

Ce document est édité par :

**Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche  
Direction générale de l'alimentation  
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire  
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux  
251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15  
[www.agriculture.gouv.fr](http://www.agriculture.gouv.fr)**

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.