

Compte-rendu de travaux pratique :

*Importance de la calibration d'un inoculum bactérien pour la mise en pratique
d'inoculum sur plante*

I-Introduction:

Les plantes sont des organismes sessiles, celles-ci doivent par conséquent faire face à de nombreux stress aussi bien abiotiques que biotiques. Parmi ce second type de stress, il y a notamment l'attaque de virus ou de bactéries phytopathogènes. Pour étudier la pathogénicité de ces bactéries envers les plantes, il est notamment essentiel de réaliser l'inoculation artificielle des plantes.

Ainsi, dans le cadre de ce TP, nous avons fait des inocula sur plantes avec les bactéries *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* et *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Pour la réalisation d'inocula liquides bactériens il faut préalablement déterminer la concentration réelle des solutions de suspensions bactériennes à utiliser. Nous avons alors effectué, dans le cas de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, un étalonnage du spectrophotomètre à partir d'une suspension de référence, puis nous avons effectué une estimation de la concentration de la suspension de référence par dénombrement bactérien sur boîte de pétri pour déterminer la relation entre la densité optique et la concentration réelle de la suspension bactérienne.

Ensuite, nous avons vérifié le postulat de Koch et testé l'importance de la calibration de l'inoculum pour l'obtention de symptômes ou bien la mise en évidence de réaction hypersensible (HR). Pour cela, nous avons inoculé les souches bactériennes à diverses concentrations sur *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* cv *Xanthi*, la tomate, le haricot à l'aide d'inocula bactériens calibrés à différentes concentrations.

Enfin, dans un dernier temps, nous avons inoculé la tomate avec le virus de la mosaïque de la tomate pour observer les symptômes.

Remarque:

-*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (CFBP 1615) a été isolée à partir de symptômes sur *Nicotiana tabacum* cv *xanthi* (tabac).

-*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (CFBP 1390) a été isolée à partir de symptômes sur *Phaseolus vulgaris* (haricot).

-*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC 3000 ou CFBP2212) a été isolée à partir de symptômes sur *Solanum lycopersicum* (tomate).

II-Matériels et méthodes:

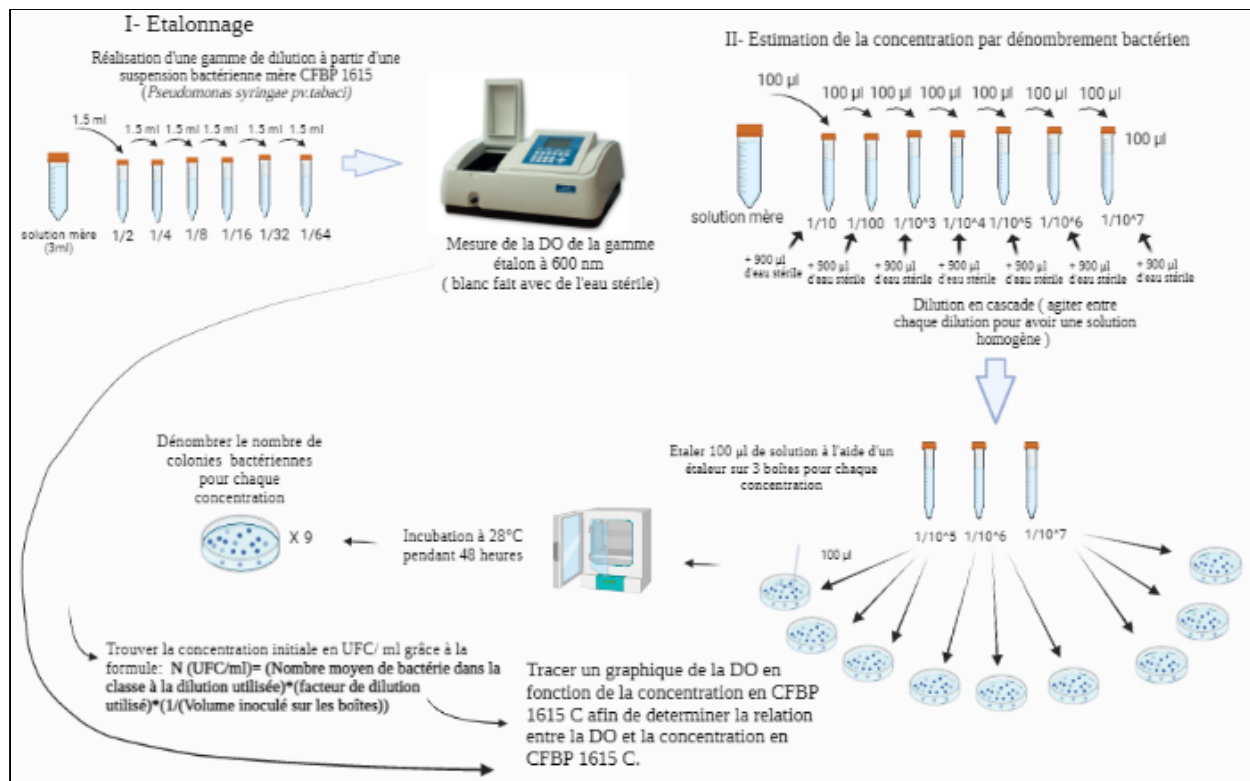
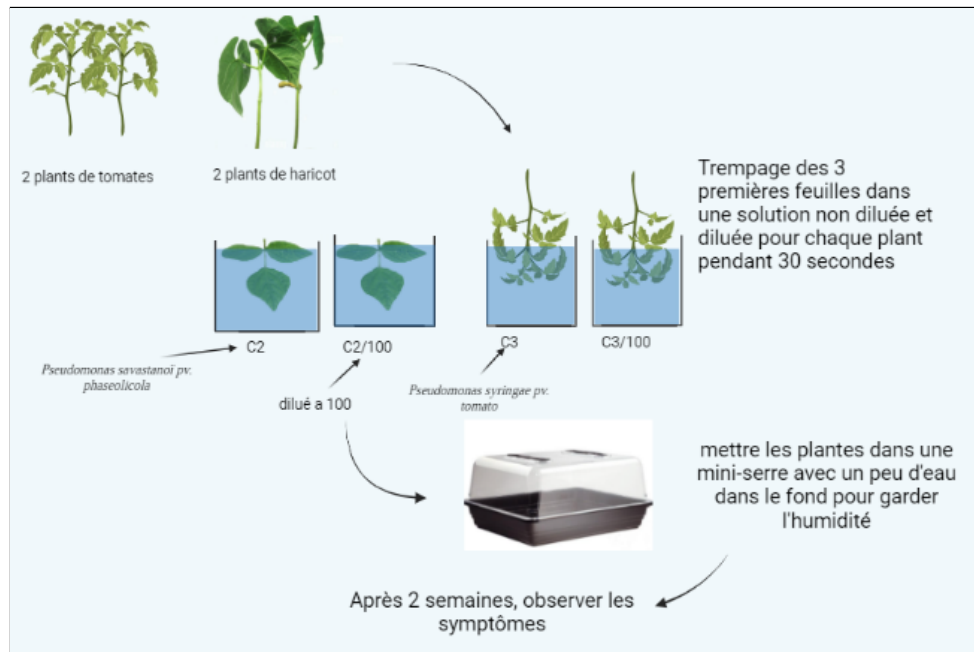
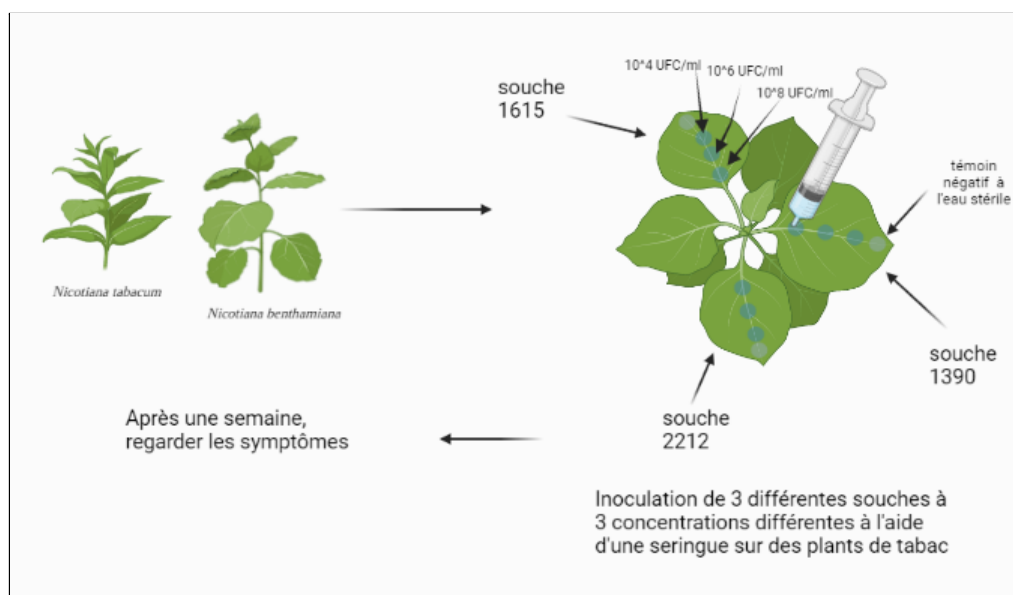


Figure 1: Protocole de la calibration de la souche CFBP 1615



A- Inoculation par trempage de haricot avec *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (CFBP 1390) et de tomate par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC 3000)



B-Inoculation de *Nicotiana benthamiana* et *Nicotiana tabacum* par infiltration avec *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (CFBP 1615) *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (CFBP 1390) et *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC 3000).

Figure 2: Protocole d'observation des symptômes et d'inoculation chez les plants de tomates, d'haricots, de *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* cv *Xanthi* à l'aide d'inocula bactériens calibrés à différentes concentrations

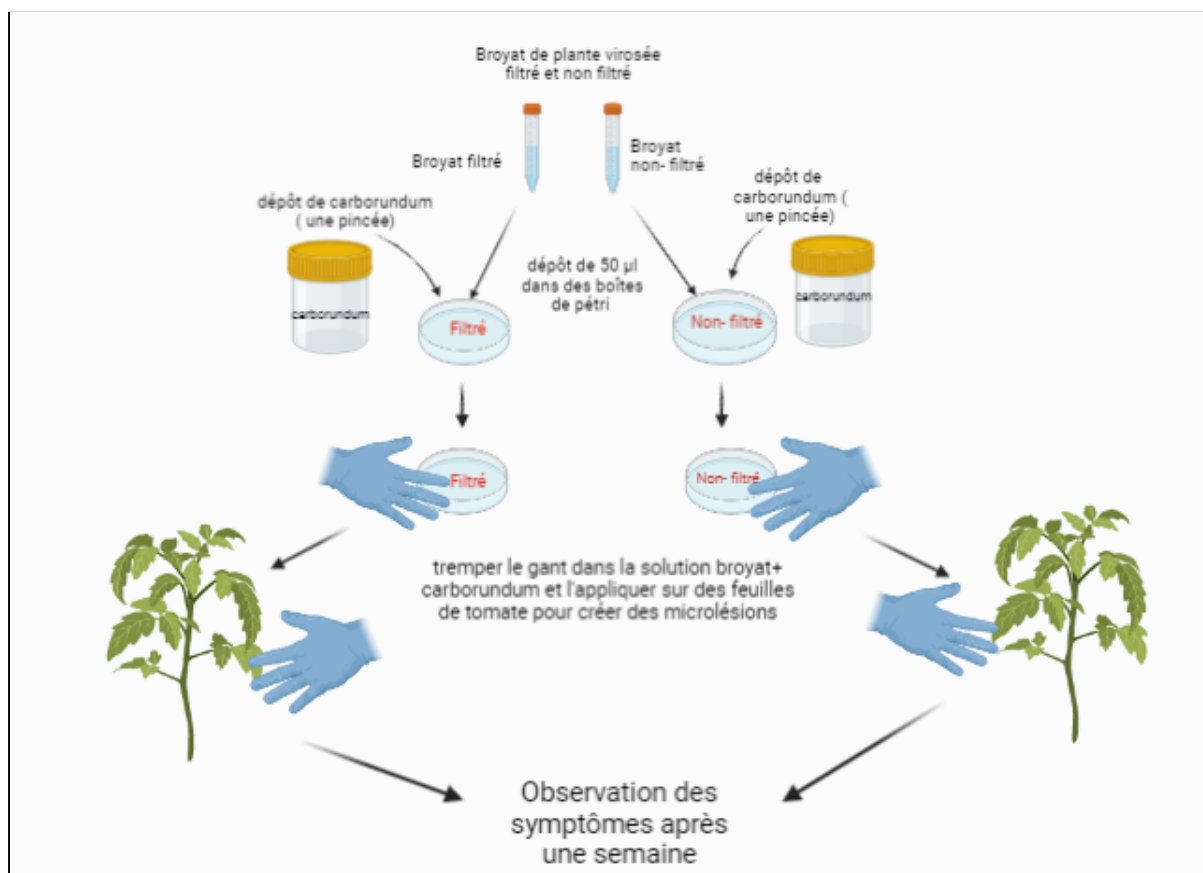


Figure 3: Protocole d'observations des symptômes sur tomate après inoculation de la mosaïque de la tomate

III-Résultats:

1°) Calibration de la souche CFBP 1615:

Tout d'abord, notre suspension de référence possédait une concentration trop faible. Par conséquent, nous n'avons pas pu exploiter nos résultats de densité optique de notre gamme de dilution ainsi que ceux des cultures bactériennes pour la calibration de la souche CFBP 1615. Ainsi, nous avons analysé les résultats d'un autre binôme qui était dans l'autre groupe classe.

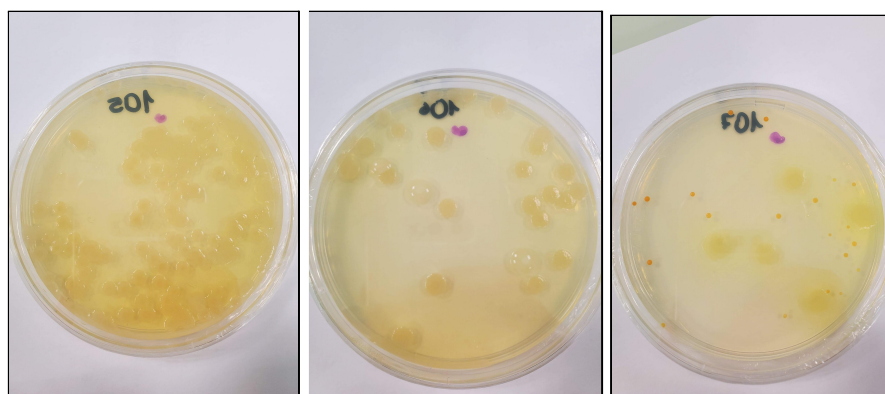
Ainsi, nous avons commencé par déterminer la densité optique de différentes concentrations en CFBP issu de la dilution de la solution de référence (C1).

Tableau I: Densité optique (DO) de la gamme de dilution en CFBP 1615

Concentration en CFBP	C ₁	C _{1/2}	C _{1/4}	C _{1/8}	C _{1/16}	C _{1/32}	C _{1/64}
DO	0,593	0,305	0,132	0,077	0,042	0,020	0,009

Nous observons bien une diminution proportionnelle de la DO en fonction de différentes dilutions. Par exemple, lorsque que la solution de référence est diluée par 8, nous observons que la DO est divisée par 7,7 et lorsque la solution de référence est diluée par 64 la DO est divisée par 65,9. Par conséquent, nous pouvons considérer que la gamme de dilution a été correctement réalisée.

Ensuite, nous avons déterminé la concentration de la suspension de référence (C1) via dénombrement bactérien sur boîte de pétri.



A. Dilution 10⁵ de C1 B. Dilution 10⁶ de C1 C. Dilution 10⁷ de C1

Figure 4: Exemples de boîtes de pétri issues de la souche CFBP 1615 à partir de trois dilutions de la suspension mère (C1)

Nous observons que les différentes colonies issues des trois dilutions possèdent un aspect semblable en terme de forme et de couleur (jaune). Ceci suggère qu'il s'agit bien de la même souche de bactéries entre les 3 dilutions, qui est la souche CFBP 1615 que nous avons mise à cultiver. Toutefois, il faut que pour la dilution à 10⁷, nous observons la présence de petites colonies oranges il s'agit probablement d'une contamination bactérienne.

Tableau II: Dénombrement des colonies de la souche CFBP 1615 pour les 3 répliques de trois dilutions de la suspension mère (C1) (du binôme nous ayant transmis ces résultats)

Dilution de C1	Nombre de colonie par boîte			Moyenne des répliques	Ecart-type des répliques	Coefficient de variation = (Écart-type des répliques / Moyenne des répliques) * 100
	Réplica n°1	Réplica n°2	Réplica n°3			
10 ⁵	>100*	>100*	>100*	/ (>100)	/	/
10 ⁶	26	27	26	26,33	0,58	2,2 %
10 ⁷	5	2	2	3,00	1,73	57,7 %
			(moyenne réplica 10 ⁶) / (moyenne réplica 10 ⁷)	= 8,77		

*du fait d'un trop grand nombre de bactéries dans les boîtes, l'incertitude devient trop grande, ainsi nous n'avons pas pu déterminer le nombre exact de colonies ces boîtes

Nous constatons que pour la dilution de 10⁵ le nombre moyenne de colonie est supérieure à 100 tandis que pour la dilution de 10⁶, celle-ci est de 26,33 et enfin pour la dilution de 10⁷ le nombre moyenne de colonie est de 3. Ainsi, nous constatons bien que plus la dilution de la suspension mère (C1) est importante, moins il y a de bactéries à se développer sur boîte de pétri.

Nous voyons que pour la dilution 10⁶, les 3 répliques possèdent un nombre de colonie très proche: 2 répliques possèdent effectivement un nombre de 26 et le troisième de 27. Par ailleurs, le coefficient de variation entre les 3 répliques est seulement de 2,2 % celui-ci est donc inférieur au seuil limite de 15 %. Les données statistiques sont donc regroupées autour de la moyenne, ce qui témoigne d'une très bonne répétabilité intra-dilution pour celle de 10⁶. Pour la dilution de 10⁷, nous observons un coefficient de variation entre les 3 répliques qui est de 57,7 % celui-ci est par conséquent supérieur au seuil de 15 %. Ainsi, les données sont dispersées, cette dilution de 10⁷ ne possède pas une bonne répétabilité intra-dilution. Pour la dilution 10⁵, nous n'avons pas déterminé la répétabilité intra-dilution à cause du trop grand nombre de colonies dans les boîtes.

Ensuite, pour cette même raison, nous n'avons pas pu déterminer la répétabilité inter-dilution entre la dilution 10⁵ et 10⁶. Toutefois, nous avons pu la déterminer entre la dilution 10⁶ et 10⁷. Effectivement, nous avons remarqué que celle-ci possède en moyenne 8,77 moins de bactéries dans la dilution 10⁷ par rapport à celle de 10⁶, ce qui est très proche d'un facteur attendu de 10. Ceci indique que la dilution en cascade a été correctement réalisée et que l'agitation des suspensions avant chaque dilution a été correctement effectuée.

Tableau III: Dénombrement des colonies de la souche CFBP 1615 sur boîte de pétri pour l'ensemble des binômes

		Dilution de C0		
		10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
Binômes	1	>100	16,50	1,65
	2	>100	18,00	0,33
	3	>100	19,80	6,66
	4	>100	18,00	1,33
	5	>100	26,33	3
Moyenne des binômes		>100	19,73	2,59

Nous observons ainsi une moyenne de 19,73 UFC / boîte de pétri à la dilution 10⁶ ainsi que de 2,59 UFC/ boîte pour la dilution à 10⁷.

Ensuite, à partir de la moyenne de colonies à la dilution 10⁶ et de la formule présentée dans la partie matériel et méthode (Figure 1) nous avons pu déterminer la concentration de la suspension de référence en UFC/mL. Ainsi, nous avons pu déterminer que le nombre bactérie de la souche CFBP contenues dans 1mL de la suspension de référence est de:

$$N_{(\text{UFC/mL})} = \mathbf{197300000}$$

Grâce à cette concentration de la solution de référence, et connaissant grâce à la gamme étalon les valeurs de DO pour cette solution ainsi que pour différentes dilutions de cette solution de référence (Tableau I), nous avons pu déterminer la relation entre la concentration et la densité optique.

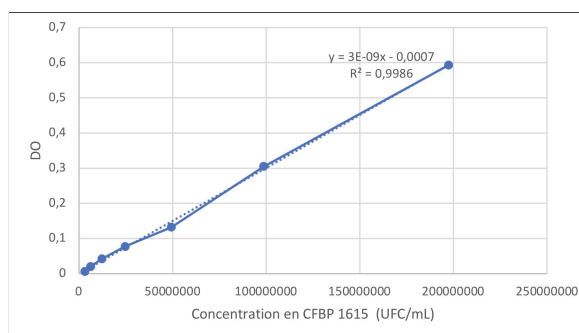


Figure 5: DO en fonction de la concentration en CFBP 1615 en milieu liquide

La réalisation de la gamme étalon à partir de la solution de référence nous a permis d'obtenir la relation entre la Densité Optique (DO) et la concentration en CFBP 1615 en milieu liquide.

Nous retrouvons bien une augmentation linéaire de la DO en fonction de la concentration en bactérie. Nous observons que le coefficient de détermination (R^2) est de 0,9986 Celui-ci est par conséquent supérieur à 0,85 nous pouvons considérer que celui-ci est élevé, il y a alors une forte corrélation entre la DO et concentration en CFBP 1615. Ainsi, la relation entre la concentration en CFBP 1615 et la DO est donnée par l'équation:

Concentration en CFBP (UFC/mL) de la solution = $(DO_{\text{de la solution}} + 0,0007) / 3 \times 10^{-9}$
2°) Inoculation des souches bactériennes sur diverses plantes

A-Inoculation par trempage de haricot avec *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (CFBP 1390) et de tomate par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) :



A-Trempage dans C3

B-Trempage dans C3 dilué par 100

Figure 6: symptôme sur tomate après inoculation par trempage dans deux solutions de concentration différentes en souche CFBP 2212

Nous observons que l'inoculation par trempage dans les suspensions de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (DC 3000 ou CFBP 2212) non dilué ou dilué au 100ème ont tous deux entraîné des symptômes sur les feuilles de la tomate. En effet, chez les deux plantes exposées à des concentrations différentes en CFBP 2212, nous observons l'apparition de nécroses ainsi que des chloroses au niveau des feuilles de tomate. En effet, les feuilles sont devenues de couleurs jaunes et noires aux extrémités.

Cependant, il faut noter que les symptômes sont beaucoup moins étendus et prononcés chez la plante inoculée avec la suspension C3 diluée à 100 que chez la plante ayant été trempée dans la solution non diluée.



A-Trempage dans C2

B-Trempage dans C2 dilué par 100

Figure 7 : Symptômes sur haricot après inoculation par trempage dans deux solutions de concentration différentes en souche CFBP 1390

Nous observons que l'inoculation par trempage dans les suspensions de *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (CFBP 1390) non dilué ou dilué au 100ème ont tous deux entraînés des symptômes sur les feuilles de haricot. Effectivement, chez les deux plantes exposées à des concentrations différentes en CFBP 1390, nous observons l'apparition de tâches grisâtres qui sont des nécroses au niveau des feuilles de haricot.

Néanmoins, chez les plants de haricot trempé dans la solution de *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* non diluée, nous observons la présence d'une nécrose au niveau de la pointe de la feuille de taille assez importante. Tandis que pour le plant trempé dans la même solution (C2) diluée au 100ème, les symptômes sont beaucoup plus légers que le plant précédent puisque nous constatons seulement l'apparition de quelques petites tâches nécrotiques sur la feuille.

B-Inoculation de *Nicotiana benthamiana* et *Nicotiana tabacum* par infiltration avec *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (CFBP 1615) *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (CFBP 1390) et *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC 3000 ou CFBP 2212)

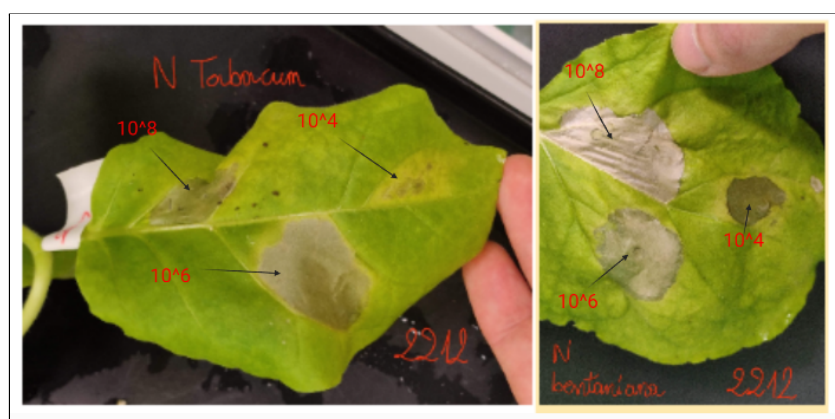


Figure 8: Symptômes sur *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana benthamiana* après inoculation de 3 concentrations différentes en CFBP 2212

Nous pouvons observer très distinctement la présence de symptômes chez les 2 plants *N.tabacum* et chez *N.benthamiana* auxquels nous avons inoculé la souche *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* à trois concentrations. Par ailleurs, pour les 2 espèces, nous constatons que plus les concentrations en CFBP 2212 inoculées sont élevées plus les symptômes sont prononcés. A une concentration à 10^4 la zone nécrosée ou chlorosée est toute petite, comparé à celle présentant une concentration de 10^8 . Le tissu est devenu gris et à certains endroits nous pouvons observer des déchirures. De plus, pour chaque concentration en inoculum nous constatons que les symptômes sont plus prononcés chez *N.benthamiana* que chez *N.tabacum*. En effet, par exemple pour une concentration de 10^4 , nous observons seulement une chlorose chez *N.tabacum* tandis que nous observons une légère nécrose chez *N.benthamiana*. Enfin, chez les deux plantes, nous ne constatons pas d'apparition de symptômes à l'endroit où nous avons inoculé de l'eau stérile.

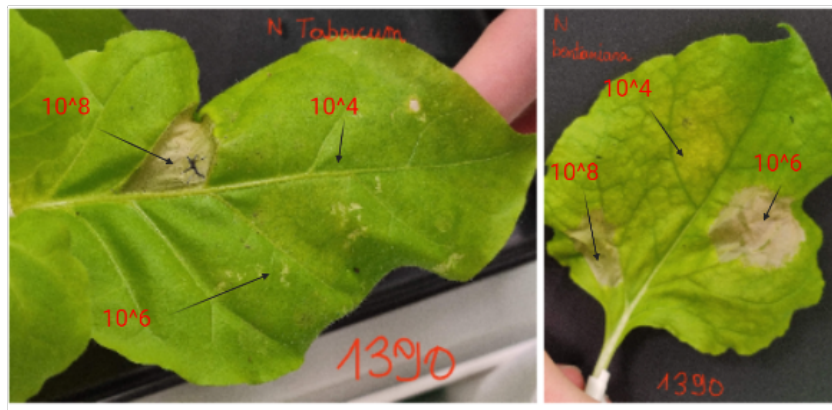


Figure 9: Symptômes sur *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana benthamiana* après inoculation de 3 concentrations différentes en CFBP 1390

Nous observons que l'inoculation de la souche *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, à des concentrations de 10^4 et 10^6 ne provoque pas de réels symptômes chez *N. tabacum*. Ce n'est qu'à partir de la concentration à 10^8 que nous observons l'apparition d'une nécrose. Alors que pour *N. benthamiana*, nous observons l'apparition de symptômes dès la concentration en inoculum la plus faible, en effet, nous constatons la présence d'une chlorose pour une concentration à 10^4 et des nécroses pour une concentration de 10^6 et 10^8 . Enfin, chez les deux plantes, nous ne constatons pas d'apparition de symptômes à l'endroit où nous avons inoculé de l'eau stérile.

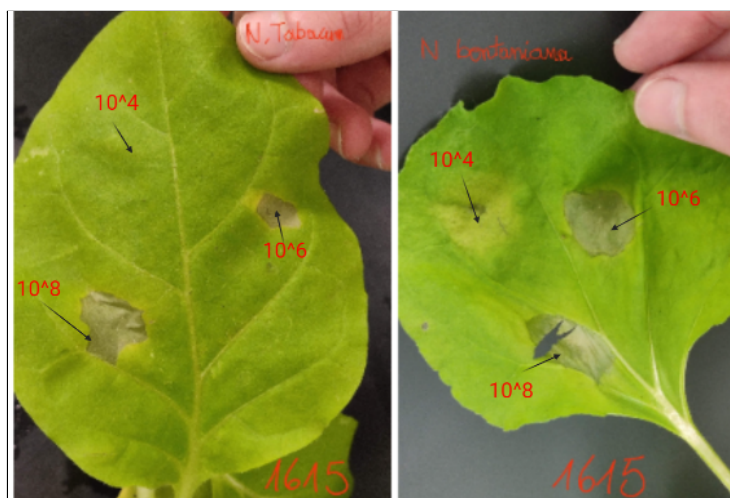


Figure 10: Symptômes sur *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana benthamiana* après inoculation de 3 concentrations différentes en CFBP 1615

Nous observons que la souche *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (CFBP 1615) provoque des symptômes chez les 2 plants de tabac d'espèces différentes et comme précédemment, ceux-ci deviennent de plus en plus prononcés lorsque la concentration en inoculum augmente. Toutefois, nous ne constatons pas de symptômes nécrotiques chez *N. tabacum* à la concentration 10^4 , chez cette espèce ceux-ci seulement à partir de la concentration 10^6 avec la présence d'une tache nécrotique. Pour l'espèce *N. benthamiana*, nous constatons au contraire l'apparition d'une tache nécrotique entourée d'un anneau chlorotique dès l'inoculation avec la solution de CFBP 1615 concentré à 10^4 . De plus, la taille des taches nécrotique aux concentrations 10^6 et 10^8 sont d'un diamètre supérieur chez *N. benthamiana* que chez *N. tabacum*. Enfin, chez les deux plantes, nous ne constatons pas d'apparition de symptômes à l'endroit où nous avons inoculé de l'eau stérile.

Tableau IV: Récapitulatif de la présence ou non de Réaction Hypersensible (HR) chez les 2 espèces de tabac inoculées avec différentes souche de *Pseudomonas*

	<i>N. tabacum</i>			<i>N. benthamiana</i>		
	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸
CFBP 2212 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Pas de HR	HR (début)	HR	HR	HR	HR
CFBP 1390 <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Pas de HR	Pas de HR	HR	Pas de HR	HR	HR
CFBP 1615 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Pas de HR	HR	HR	début de chlorose	HR	HR

Si nous faisons une synthèse des résultats précédents, nous voyons que pour chacune des souches de bactéries inoculées, nous remarquons que *N. benthamiana* met en place une réaction hypersensible (HR) (nécrose) à une concentration plus faible en bactérie que chez *N. benthamiana*.

3°) Inoculation de la tomate avec le virus de la mosaïque de la tomate:

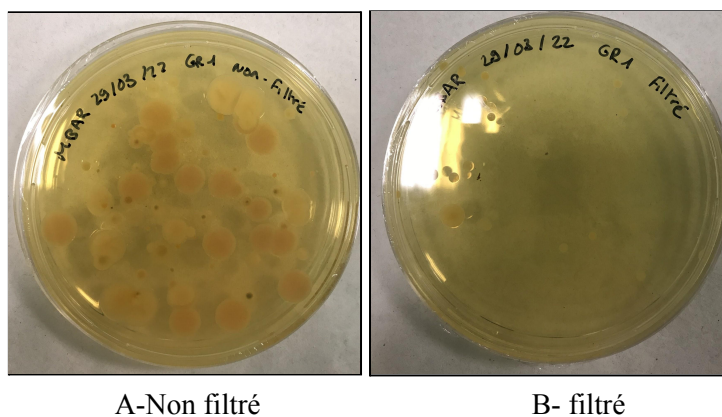


Figure 10: Cultures issu du broyat de plante virosé non filtré ou filtré

Pour le milieu de culture pour lequel, nous avons déposé le broyat issu d'une plante virosé non filtré, nous constatons le développement de très nombreux micro-organismes de formes et de couleurs variables. Pour le milieu sur lequel nous avons déposé un broyat filtré (sur filtre de 0,22 µm) nous observons également le développement de microorganismes néanmoins ceux-ci se retrouvent en nombre bien plus réduit que celui-non filtré. Or étant donné que les virus ne se développent pas sur boîte de pétri, nous n'aurions rien du observé dans la boîte filtrée. Ainsi, soit quelques bactéries ou spores de champignons en suspension dans l'air ont pu contaminer notre boîte lors du dépôt puis se développer, soit le filtre n'a pas pu en éliminer la totalité des micro-organismes tels que des bactéries ou champignons malgré que le filtre ait contribué à éliminer la majorité de ceux-ci.



A- plants non-filtrés



B- plant filtré

Figure 11: Développement de symptôme chez les plantes inoculées avec un broyage filtré ou non filtré issu d'un plant contaminé par la mosaïque de la tomate

Nous pouvons observer la présence de symptômes chez les plantes inoculées avec un broyage non filtré et cela à des degrés divers. En effet, nous avons remarqué que certains avaient seulement l'apparition de tâches nécrotiques sur certaines feuilles, tandis que d'autres plants de tomates étaient totalement nécrosés et morts. Cependant, il est très vraisemblable que cette nécrose sévère s'explique par une contamination fongique. En effet, lorsque les plants étaient conservés sous serre, nous avons observé le développement très rapide d'un champignon (voir annexe 1), il est fort probable que les tuteurs utilisés pour tenir les plants soit à l'origine de la contamination de certains plants inoculés avec un broyage non filtrés. Chez les plants filtrés nous constatons également la présence de tâches nécrotiques sur certaines feuilles.

IV-Discussion:

Tout d'abord, pour la partie calibration de la souche CFBP 1615, les résultats de la densité optique pour la gamme de dilution (Tableau I), ainsi que ceux des analyses de la répétabilité intra-dilution et inter-dilution (Figure 4, Tableaux II et III) via le dénombrement bactérien, suggéraient une bonne réalisation de la manipulation. Par conséquent, la relation entre la DO et la concentration de la souche CFBP 1615 que nous avons déterminé (Figure 5), nous permet désormais de connaître la concentration d'une solution bactérienne CFBP 1615 juste en regardant sa densité optique, et donc de gagner du temps pour la préparation de diverses concentrations de solutions servant à être inoculées sur plante.

En parlant de souches bactériennes que nous avons inoculé sur plantes, il y a notamment *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (CFBP 2212) que nous avons inoculé à diverses concentrations chez la tomate (Figure 6) ainsi que *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (CFBP 1390) que nous avons inoculé chez le haricot (Figure 7). Nous avons remarqué que l'inoculation respective de ces souches entraînent des symptômes nécrotiques chez les plants de tomates et les plants de haricots, ce qui témoigne de la sensibilité de ces dernières face à ces bactéries qui peuvent être alors considérées comme étant pathogènes de la plante sur laquelle elles ont été inoculées. Par ailleurs, étant donné que CFBP 2212 a été à l'origine isolé à partir de symptômes provenant de tomate et que son inoculation sur cette même espèce provoque des symptômes similaires, nous pouvons considérer que le postulat de Koch est ici possiblement respecté. Et nous pouvons faire la même conclusion pour le haricot inoculé cette fois-ci avec CFBP 1390. De plus, à travers cette expérience nous avons remarqué que pour ces deux espèces, plus la concentration en bactéries inoculées est élevée, plus les symptômes (nécrotiques) sont importants.

Ensuite, nous avons inoculé ces deux souches, ainsi que *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (CFBP 1615), chez deux espèces de tabac: *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana benthamiana* (Figures 8, 9 et 10 et Tableau IV). Or nous avons observé que ces trois souches bactériennes entraînent également des symptômes (chlorotiques et nécrotiques) chez ces deux espèces. Ces observations indiquent donc que *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (CFBP 2212) et *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (CFBP 1390) ne provoquent pas seulement des symptômes chez un hôte végétal spécifique mais bien chez plusieurs espèces. De plus, sachant que CFBP 1615 a été isolée à partir de symptômes prélevés sur *Nicotiana tabacum* et que celui-ci provoque des symptômes similaires après inoculation, nous pouvons suggérer que le postulat de Koch est ici possiblement vérifié. Enfin, nous avons observé des différences de sensibilité entre les deux espèces de tabac face aux trois bactéries. En effet, pour chacune des souches de bactéries inoculées, nous avons remarqué que *N. benthamiana* met en place une réaction hypersensible (HR) à une concentration plus faible en bactérie que chez *N. benthamiana*, cette réaction hypersensible consiste en la libération active de Formes Actives de l'Oxygène par la plante (tel que l'H₂O₂), il s'agit d'un « burst oxydatif » qui entraîne une nécrose de la feuille. Ainsi, *N. benthamiana* semble plus sensible que *N. tabacum* face à ces agents pathogènes.

Pour finir, nous avons regardé les symptômes chez des plantes inoculées à partir d'un broyage filtré ou non filtré provenant d'une plante contaminée par la mosaïque de la tomate. Nous avons observé le développement de symptômes aussi bien chez les plantes inoculées avec un broyage non filtré qu'avec un broyage filtré, étant donné que via les boîtes de pétris (Figures 10 et 11), nous avons observé que le filtre possédait un fort pouvoir sélectif pour éliminer les micro-organismes (bactéries et champignons) (même si nous observions toujours la présence de quelques colonies), il est fortement possible que le virus de la mosaïque de la tomate soit responsable des symptômes observés chez les plantes inoculées avec le broyat filtré. Nous pouvons par conséquent considérer que le postulat de Koch est vérifié pour ce virus chez la tomate.

V-Conclusion:

À travers l'ensemble de ces expériences, nous venons de voir toute l'importance de la calibration d'un inoculum bactérien pour la réalisation d'inoculation sur plante. Nous avons notamment vu que la calibration consiste en la détermination de la relation entre la densité optique et la concentration en solution d'une souche. Celle-ci nous permet alors de connaître la concentration d'une solution bactérienne juste en regardant sa densité optique, et donc de gagner du temps pour la préparation de diverses concentrations de solutions servant à être inoculées sur plante. Ensuite, nous avons également remarqué que l'inoculation respective *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et de *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (CFBP 1390) entraînent des symptômes nécrotiques chez les plants de tomates et les plants de haricots. Nous avons appris que ces deux souches ainsi que *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* peuvent provoquer des symptômes chez 2 espèces de tabacs. Par ailleurs, ces différentes inoculations nous ont permis de constater que les plantes mettent en place des mécanismes nécrotiques actifs via la réaction hypersensible permettant de lutter contre les agents pathogènes. D'ailleurs, nous avons vu que l'intensité de ces réactions dépend à la fois de la concentration en inoculum injecté (plus celles-ci est importante, plus la réaction est importante) mais également de la souche du pathogène inoculée. Et que chaque espèce de plante possède une sensibilité variable à chacune des souches de bactéries inoculées. Puis, nous avons appris que l'utilisation d'un filtre est très efficace pour éliminer un grand nombre de micro-organismes provenant d'un broyat végétal. Ainsi, les différentes inoculations nous ont permis de conforter plusieurs postulats de Koch tel que celui de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* sur tomate, de *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* sur haricot, celui de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* sur *Nicotiana tabacum* et enfin celui du virus de la mosaïque de la tomate sur tomate. Néanmoins, pour réellement confirmer ces différents postulats, il faudrait utiliser des outils moléculaires.

VI: Annexe:



Annexe 1: Développement fongique prélevé à partir des symptômes observés chez le plant de tomate inoculées avec le broyat non filtré