

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB. BLIDA 1**

**Faculté des sciences de la nature et de la vie**

**THESE DE DOCTORAT**

En Agronomie.  
Spécialité : Pathologie végétale.

ETUDE CONCEPTUELLE DE LA COMPETENCE RHIZOSPHERIQUE  
CHEZ LES RHIZOBACTERIES PHYTOBENEFIQUES (PGPR).

Par  
**Rafik BERDJA.**

Devant le jury composé de :

M <sup>me</sup> H. Belkahla	Professeur U. Blida 1	Présidente
M <sup>r</sup> H. Boutoumi	Professeur U. Blida 1	Examineur
M <sup>r</sup> M. Laamari	Professeur U. Batna 1	Examineur
M <sup>r</sup> Y. Kaci	Professeur USTHB	Examineur
M <sup>r</sup> M. Khali	MCA, CTIIA - Boumerdes	Examineur
M <sup>r</sup> M. Benchabane	Professeur U. Blida 1	Directeur de thèse

Blida, Octobre 2019.

## *REMERCIEMENTS*

L'expression de mon entière gratitude et de mes plus vifs remerciements vont d'abord à mon promoteur Monsieur le P<sup>r</sup>. Benchabane Messaoud, professeur en pathologie végétale au sein du département des sciences agronomiques de l'université Blida 1. A ce Monsieur, je serais toujours reconnaissant car il fut parmi les grands cadres de l'équipe de formation qui m'ont donné le goût de la pathologie végétale contemporaine et orienté après une longue coopération en ingénierat et en magister vers le domaine des biomathématiques appliquées à l'étude des systèmes dynamiques. Ainsi et du haut de sa grande perspicacité, son orientation m'a orienté et m'a permis de sortir de ma zone de confort et de m'ouvrir à diverses autres disciplines scientifiques pas toujours évidentes à maîtriser pour un maître agronome habitué à traiter de problématiques purement agrobiologiques.

Pour avoir été un modèle et une référence, pour son enseignement, son désir du meilleur en tout temps et en toute circonstance, pour ces conseils et l'empreinte qu'il laisse en moi, je lui répète aujourd'hui ma profonde et éternelle gratitude.

Mes remerciements les plus vifs vont également à Madame Belkahla et monsieur Lamari, deux professeurs que j'ai eu l'honneur de côtoyer et qui ont eu un impact certain sur ma formation et ma carrière. Ayant eu la chance de vous connaître personnellement, je vous dirais que vous êtes à mes yeux des modèles de compétence et de sérieux qui de mon ressenti, m'avez toujours suivi et conseillé dans mes choix avec beaucoup de bienveillance. A ces deux personnes généreuses, je réitère mes plus chaleureux remerciements.

C'est également avec un grand plaisir que je remercie monsieur Boutoumi, monsieur Kaci et monsieur Khali, qui m'honorent aujourd'hui de leur présence et qui ont généreusement donné de leurs temps pour examiner ce modeste travail,

que j'espère toutefois être digne de leurs rangs et à la hauteur de leurs exigences.

Également un grand merci à Faïza et Djamila, qui furent de tout temps avec et derrière moi, toujours avec un mot juste et gentil d'encouragements et qui ont partagé avec moi toutes mes joies et moments de moins bien.

Un merci tout spécial va à ma famille, et à mes ami(e)s, en particulier à mes très chers parents qui ont fait de moi ce que je suis et qui m'ont toujours assuré de leur soutien inconditionnel et indéfectible. Sans vous maman, papa, je ne serais et n'aurais jamais été ce que je suis devenu aujourd'hui (les mots ne seraient pas assez pour dire tous mes sentiments à votre égard, sans vous je ne suis personne, mes très cher !).

Un grand Big up, va également à mes deux frères (Aghiles & Nazim) et à ma chère sœur (Lylia), complices de toujours qui ont et auront une place particulière dans mon cœur.

Aussi, je n'oublie pas de remercier ma cher et dévoué épouse (Nassima) pour son soutien continuel, ainsi que la toute dernière arrivée dans la team des Berdja, je nomme la sublime et magnifique mademoiselle Lycia (Papouchinette à son papa, prunelle de mes yeux), bien après est venu lili ou dois 'je dire princesse Léa cèle que je prénomme déjà mon antidépresseur naturel que j'aime de tout mon être.

Enfin, une pensée particulière va directement à toutes les personnes merveilleuses que nous avons connu et que nous aurions voulu avoir aujourd'hui parmi nous pour partager ces instants mais qui hélas nous ont quitté. Pour toutes ces personnes qui ont marqué mon existence je prie le tout puissant miséricordieux de les accueillir dans son vaste paradis.

## Résumé

La nutrition en fer pour les bactéries, présente un défi fondamental en raison de sa très faible solubilité dans les sols agricoles. Pour une croissance optimale, les bactéries telluriques du genre *Pseudomonas* exercent une chélation accrue pour cet élément par le biais de sidérophores typiques. Ainsi, ces rhizobactéries en s'approvisionnant le fer, font profiter les plantes de cet élément nécessaire à leurs activités métaboliques. L'importance de l'implication des sidérophores est souvent relatée dans la stimulation de la croissance des plantes, l'induction systémique de la résistance, ainsi que le biocontrôle de des agents phytopathogènes, nonobstant les avantages écologiques de compétition et de colonisation rhizosphérique procurés aux rhizobactéries.

Le présent travail est axé principalement sur l'étude des sidérophores chez les *Pseudomonas fluorescens*. Sur le plan biologique, les essais portent sur des aspects de colonisation rhizosphérique, de synthèse et de caractérisation (siderotypage). Sur le plan conceptuel, nous procédons à une étude de simulation *in silico*.

Les essais, conduits en microcosmes, en interaction avec des plantules de tomate, de lin et de blé dur, en conditions normales et de déficit en fer, ont montré que les souches rhizobactériennes étudiées se caractérisent par des compétences rhizosphériques appréciables, avec des seuils de colonisation atteignant  $10^{11}$  CFU/g de sol et ce en dépit de leurs origines végétales initiales. Dans des essais complémentaires mettant en évidence le rôle des sidérophores, il a été observé que pour le cas du mutant déficient en pyoverdines (pvd -), une colonisation appréciable de la rhizosphère a été néanmoins obtenue. Ainsi, la sécrétion de pyoverdines n'est pas le seul mécanisme impliqué dans le processus complexe de la compétence rhizosphérique. En utilisant des souches bactériennes modèles, en parallèles avec leurs mutants déficients en synthèse de pyoverdines (pvd-), les opérations de siderotypage ont révélé, certes la présence de pyoverdines caractéristiques pour ce type de bactéries, mais également l'existence de formes variables, considérées comme des pyoverdines atypiques.

L'étude conceptuelle de la compétence rhizosphérique (Paramétrisation & analyse de sensibilité) a été conduite avec la souche de *Pseudomonas fluorescens* pf-10, à travers l'étude d'un modèle mathématique issu d'une conceptualisation qualitatif-phénoménologique du processus de chélation du fer en milieu appauvri. Les résultats de cette étude ont donné des niveaux d'ajustement satisfaisant, et ont permis de prédire la dynamique du fer dans le temps, notamment en l'absence de données expérimentales pouvant servir comme base de comparaison. L'analyse de sensibilité a confirmé avec succès les caractéristiques cinétiques clés de toutes les variables d'état. La conceptualisation indique les composants du système qui devraient être mesurés avec plus de précision, afin d'obtenir de meilleures prédictions en termes de synthèse de pyoverdines (rendements pyoverdiniques).

**Mots clés** : PGPR, *Pseudomonas fluorescens*, pyoverdines, sidérophores, modélisation.

## Abstract

Iron nutrition for bacteria presents a fundamental challenge because of its very low solubility in agricultural soils. For optimal growth, *Pseudomonas* telluric bacteria chelate for this element through typical siderophores. Thus, these rhizobacteria by obtaining supplies, make the plants benefit from this freely available iron, which is necessary for their metabolic activities. The importance of the involvement of siderophores is often related in the stimulation of plant growth, the systemic induction of their resistance, as well as the biocontrol of various plant pathogens, notwithstanding the ecological advantages of competition and rhizospheric colonization provided to rhizobacteria.

The present work focuses mainly on siderophores in *Pseudomonas fluorescens*. On a biological level, the tests concern aspects of rhizospheric colonization, synthesis and characterization (siderotyping). In addition, we have tried, to perform a conceptual modelling study on our own laboratory practical data.

The microcosmic experiments, in interaction with tomato, flax and durum wheat seedlings under normal conditions and iron deficiency, have shown that the applied rhizobacteria strains are characterized by appreciable rhizosphere colonization ( $10^{11}$  UFC / g of soil). Despite their initial plant origins, we found high colonization thresholds in the rhizosphere of the various plants studied. In further trials demonstrating the role of siderophores, it was observed that for the case of the pyoverdines deficient mutant (pvd -), appreciable colonization of the rhizosphere was obtained. Therefore, the secretion of pyoverdines is not the only mechanism involved in the complex process of rhizospheric competence.

By using model bacterial strains, in parallel with their mutants deficient in pyoverdines synthesis (pvd-), the siderotyping operations revealed, certainly the presence of characteristic pyoverdines for this type of bacteria, but also the existence of variable forms, considered as atypical pyoverdines.

The conceptual study of the rhizospheric competence (Parametrization & Sensitivity Analysis) was conducted with the *Pseudomonas fluorescens* pf-10 strain, via the study of a mathematical model resulting from a qualitative-phenomenological conceptualization of the chelation process iron in depleted environment. The results gave very satisfactory levels of fit, predicting the dynamics of iron over time, especially in the absence of experimental data for comparison. In addition, the sensitivity analysis successfully confirms the key kinetic characteristics of all state variables. The conceptualization clearly indicates the components of the system that should be measured more precisely, in order to obtain better predictions in pyoverdines synthesis (pyoverdine yields).

**Key words:** PGPR, *Pseudomonas fluorescens*, pyoverdines, siderophores, modelling.

## الملخص

تمثل التغذية الحديدية للبكتيريا تحدياً جوهرياً بسبب قابليتها للذوبان المنخفضة جداً في التربة الزراعية. لتحقيق النمو الأمثل، تمارس البكتيريا *Pseudomonas tellurica* عملية تثبيت محددة لهذا العنصر من خلال siderophores النموذجي. وهكذا، فإن هذه الجراثيم من خلال الحصول على الإمدادات، وجعل النباتات تستفيد من الحديد المتاحة اللازمة لنموها وأنشطة التمثيل الغذائي. غالباً ما ترتبط أهمية إشرارك حامض الحديد بفعالية تحفيز نمو النبات، وتحريض مقاومتها النظامية، فضلاً عن المكافحة الحيوية للعديد من مسببات الأمراض النباتية، بغض النظر عن المزايا البيئية للمنافسة والاستيطان على الجذور التي يتم توفيرها للبكتيريا.

يركز هذا العمل بشكل رئيسي على Siderophores لدى *Pseudomonas fluorescens*. على المستوى البيولوجي، تتعلق الاختبارات بجوانب الاستيطان الجذري والتوليف والتصنيف. بسبب تعقد هذه الجزيئات الحيوية، كما في تطورها وتدخلها في الجذور، حاولنا، من البيانات العملية، تنفيذ نموذج من خلال دراسة مفاهيمية.

وقد أظهرت التجارب المخبرية، بالتفاعل مع الطماطم والكتان وشتلات القمح في الظروف العادية ونقص الحديد، أن سلالات البكتيريا المطبقة تتميز بمنطقة الجذور البارزة. الاستيطان يصل إلى  $10^{11}$  CFU / g من التربة. على الرغم من أصول النباتات الأولية، وجدنا عتبات استيطان عالية في منطقة الجذور من النباتات المختلفة التي تمت دراستها. في التجارب الأخرى التي تثبت دور حاملي الحديد، لوحظ أنه بالنسبة لحالة المتحولين pyoverdine (pvd)، تم الحصول على استيطان مرتفع من الجذور. ولذلك، فإن إفراز بيوفاردين ليس الآلية الوحيدة التي تشارك في العملية المعقدة للكفاءة في الجذور.

وباستخدام سلالات بكتيرية نموذجية، وبالتوازي مع طفراتها الناقصة في تخليق البايوفدين (pvd-)، كشفت عمليات التنقيط، وبالتأكيد عن وجود البايوفيرديينات المميزة لهذا النوع من البكتيريا، ولكن أيضاً وجود أشكال متغيرة، اعتبرت أنها pyoverdines غير نمطية.

أجريت الدراسة النظرية للكفاءة الجذرية (تحليل و الحساسية) باستخدام سلالة *Pseudomonas fluorescens* pf-10، وذلك من خلال دراسة نموذج رياضي ناتج عن تصوّر ظاهري نوعي لمركبة عملية استقلاب الحديد في البيئة المستنفدة. أعطت النتائج مستويات مرضية للغاية من التوقع، والتنبؤ بديناميكية الحديد مع مرور الوقت، وخاصة في غياب البيانات التجريبية للمقارنة. بالإضافة إلى ذلك، فإن تحليل الحساسية يؤكد بنجاح الخصائص الحركية الرئيسية لجميع متغيرات الحالة. يشير المفهوم بوضوح إلى مكونات النظام التي ينبغي قياسها بشكل أكثر دقة، من أجل الحصول على تنبؤات أفضل في تخليق البايوفاردين (محاصيل pyoverdine).

### الكلمات المفتاحية

الكفاءة الجذرية:- تحليل والحساسية - نموذج المعلمات

*Pseudomonas fluorescens* Pyoverdine PGPR -

REMERCIEMENTS

RESUMES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION.....	1
1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	5
1.1 Généralités sur les rhizobactéries.....	6
1.1.2 Les rhizobactéries .....	6
1.2.3 Stimulation de la croissance végétale .....	8
1.3.4 Induction de la résistance systémique .....	8
1.4.5 Protection contre les maladies d'origines telluriques.....	10
1.2. La Compétence Rhizosphérique.....	10
1.2.1 Rôle de l'antigène-O des Lipopolysaccharides .....	12
1.2.2 Les antibiotiques .....	12
1.2.3 Synthèse et rôle des acides aminés.....	14
1.2.4 Production d'acide indole acétique.....	15
1.2.5 Production d'éthylène .....	15
1.2.6 Système de sécrétion de type III (SST3S) .....	116
1.2.7 Quorum sensing.....	17
1.2.8 Production de sidérophores .....	19
1.2.9 Structures et variabilité des pyoverdines .....	19

1.2.10	Biosynthèse de pyoverdines .....	20
1.2.11	Transport du fer par les sidérophores et signalisation bactérienne .....	22
1.3.	Notions de modélisation biomathématique .....	24
1.3.1	Etapes de la modélisation .....	25
1.3.2	Types de modélisation .....	25
1.3.3	Limites de l'expérimentation statistique et intérêt de la modélisation .....	26
1.3.4	Paramétrisation des modèles.....	28
1.3.5	Vérification de modèle .....	30
1.3.6	Difficultés liés à la paramétrisation.....	31
1.3.7	Analyse de sensibilité .....	31
1.3.8	Analyse de sensibilité locale .....	32
1.3.9	Méthodes de screening (Approche de Morris) .....	33
1.3.10	Applications de l'analyse de sensibilité .....	34
2.	MATERIEL ET METHODES .....	36
2.1.	Le sol.....	36
2.2.	Souches bactériennes .....	36
2.3.	Etude de la compétence rhizosphérique .....	38
2.3.1	Traitements préalable du végétal .....	38
2.3.2	Microcosme.....	39
2.3.3	Bactérisation des microcosmes.....	39



2.3.4	Essai de la dynamique des populations bactériennes.....	39
2.3.5	Essai de l'effet de la synthèse des pyoverdines.....	40
2.3.6	Dénombrement bactérien.....	41
2.3.7	Mesure de la croissance et dosage des sidérophores.....	41
2.4.	Chromatographie liquide haute performance (HPLC ; UV-Visible) .....	42
2.5.	Etude <i>in silico</i> des pyoverdines.....	42
2.5.1	Souches de <i>Pseudomonas</i> et gènes concernés.....	43
2.5.2	Alignement multiple BLAST .....	43
2.5.3	Construction des arbres phylogénétiques.....	44
2.6.	Présentation du modèle mathématique .....	45
2.6.1	Variables du modèle .....	45
2.6.2	Calibration du modèle .....	47
2.6.3	Représentation de la biomasse microbienne.....	48
2.6.4	Estimations de l'incertitude des paramètres.....	49
2.6.5	Analyse de sensibilité .....	50
3.	RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	53
3.1.	Compétence rhizosphérique.....	53
3.1.1	Effet de la plante hôte .....	53
3.1.2	Effet de la synthèse de pyoverdines .....	57
3.1.3	Discussion.....	59
3.2.1.	Siderotypage .....	63

3.2.2	Discussion.....	65
3.3.1	Analyse phylogénétique <i>in silico</i> .....	67
3.3.2	Phylogénie des <i>Pseudomonas</i> en fonction de la capacité de synthèse des pyoverdines .....	68
3.3.3	Les principaux gènes codant pour la synthèse des pyoverdines ....	69
3.3.4	Phylogramme des <i>Pseudomonas</i> selon les pyoverdines .....	72
3.3.5	Arbre phylogénétique des récepteurs de la protéine TonB.....	73
3.3.6	Arbre phylogénétique des gènes <i>gyrB</i> et de <i>rpoD</i> .....	73
3.3.7	Discussion .....	74
3.4.	Estimation des paramètres et prédictions du modèle mathématique ....	77
3.4.1	Discussion.....	81
3.5.1	Analyse de sensibilité ; un paramètre à la fois (OAT) .....	87
3.5.2	Analyse de sensibilité multivariée .....	89
3.5.3	Analyse de robustesse des paramètres.....	92
3.5.4	Analyse de robustesse des variables d'état .....	94
3.5.5	Discussion.....	94
4.	DISCUSSION GENERALE .....	98
	CONCLUSION.....	104

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1: Souches bactériennes. ....	37
Tableau 2 2: Valeurs numériques des paramètres et plages utilisées dans les simulations du modèle mathématique .....	46
Tableau 3.1: Gènes codant pour la synthèse de la Pyoverdine-I chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01.....	70
Tableau 3.2: Vecteurs initiale, optimale et étendu de variation des paramètres associés à la biomasse et à la teneur en pyoverdine.....	77
Tableau 3.3: Intervalle de confiance (IC) des résultats obtenu pour les vecteurs de paramètres optimaux $\theta_w^*$ .....	80

## LISTE DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES

Figure 1.1 : Schémas des 3 groupes de PVD de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> avec différentes variantes de pyoverdines. ....	20
Figure 1.2 : Assimilation du fer chez les microorganismes aérobies et aéroanaérobies facultatifs .....	21
Figure 1.3: Schéma du processus de construction d'un modèle dans le cadre bayésien.....	29
Figure 3.1 : Croissance des plantes dans les microcosmes. ....	54
Figure 3.2 : Evolution des populations bactériennes en fonction du temps dans les microcosmes des trois plantes.....	55
Figure 3.3 : Evolution des niveaux de populations bactériennes en fonction du temps. ....	56
Figure 3.4 : Evolution des niveaux de populations bactériennes en fonction du temps. ....	57
Figure 3.5 : Evolution des niveaux de populations bactériennes en fonction du temps. ....	59
Figure 3.6: Profils HPLC des extraits actifs des souches de <i>Pseudomonas</i> .. ..	64
Figure 3.7: Groupes taxonomiques capables de synthétiser les pyoverdines.....	67
Figure 3.8 : Arbre phylogénétique de quelques espèces de proteobacteria (A) et des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents (B), construit à partir de l'ARN 16S par la méthode NJ (Neighbour Joining). ....	69
Figure 3.9 : Cladogramme des souches de <i>Pseudomonas</i> PAO1 et CHA0. ....	70

Figure 3.10 : Carte de restriction des gènes de biosynthèse du chromophore de la pyoverdine de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . .....	71
Figure 3.11 : Voies de biosynthèse de la Pyoverdine-I chez <i>P. aeruginosa</i> PA01. ....	71
Figure 3.12 : Arbre phylogénétique de quelques espèces de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents construit à partir des gènes <i>pvd I</i> par la méthode du NJ (Neighbour Joing).....	72
Figure 3.13 : Arbre phylogénétique des relations phylogénétiques entre les espèces de <i>Pseudomonas</i> , construit selon la méthode du NJ (Neighbour Joing) des séquences concaténées et alignées des gènes <i>TonB</i> . ....	73
Figure 3.14 : Arbre phylogénétique des relations phylogénétiques entre les espèces de <i>Pseudomonas</i> , construit selon la méthode du NJ (Neighbour Joing) des séquences concaténées et alignées a partir des gènes complètement séquencés de <i>gyrB</i> et <i>rpoD</i> .....	74
Figure 3.15 : (A) Qualité d'ajustement des données de la croissance bactérienne théoriques et réel. (B) Qualité d'ajustement des données de la quantité de pyoverdine théorique et réel. ....	78
Figure 3.16 : (A) Prédiction du modèle pour le fer libre. (B) prédiction du modèle pour le fer chélaté ; Résiduelles pour la production de biomasse (C) ; et de pyoverdine (D).....	79
Figure 3.17 : Graphiques de l'analyse de sensibilité a un seul paramètre pour l'effet de $k$ (A; A-1); $\beta$ (B); $\sigma$ (C; C-1); $Y_n$ (D; D-1; D-2); $\mu$ (E; E-1; E-2); $v$ (F; F-1; F-2), sur la solution optimale du modèle. ....	86
Figure 2.18 : Fonctions de sensibilité des sorties du modèle par rapport aux huit (08) paramètres étudiés. ....	87
Figure 3.19 : Classement des sensibilités du modèle.....	88

Figure 3.20 : Représentation en pourcentage de la sensibilité des différentes variables d'état à l'ensemble des huit (08) paramètres pris en compte dans les 10,000 vecteurs pseudos aléatoires, pour 05 points temporelle représentative .....91

Figure 3.21 : Distribution des trois paramètres d'entrée les mieux classés en fonction du nombre d'événements. ....93

## LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

BCAs : Agents de lutte biologique.

PGPR : Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes.

ISR : Résistance Systémique Induite.

CNN : Compétition accrue pour les nutriments et les niches.

SA : Analyse de sensibilité.

MHB : Agents de lutte biologique.

PR : Pathogenesis related proteins.

PAL : Phenylalanine ammonialyase.

NADH : Ubiquinone oxydoréductase.

NDH-1 : NADH déshydrogénase I.

LPS : Lipopolysaccharides.

King B : Milieu de culture.

DAPG : 2,4- Diacéthylephloroglucinol.

PHZ : Phénazines.

PLT : Pyoluteorine.

PRN : Pyrrolnitrine.

HCN : Cyanure d'hydrogène.

AIA : Acide indole -3- acétique.

ACC : Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylate sythase.

AM : Arbuscules mycorhiziens.

AHLs : N-acyl-homosérine lactones.

AFM : Métabolites secondaires antifongiques.

Fe(OH)<sub>3</sub> : Hydroxyde de fer.

PVD : Pyoverdine.

a Thr : Allo-threonine.

cDab : Tetrahydropyrimidine.

Chr : Chromophore.

cOHOrn : N<sup>5</sup>-hydroxyornithine cyclique.

Dab : 2,4-diaminobutyrate.

fOHOrn, N<sup>5</sup>-formyl-hydroxyornithine.

CM : Cytoplasmique.

ATP : Adenosine tri phosphate.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

Pb : Paires de base.

ORF : Open reading frame.

LSH : Echantillonnage en hypercube latin.

H : Heure.

C° : Degré Celsius.

Tr/mn : Tours minute.

MS : spectroscopie de masse

HPLC : chromatographie à haute pression liquide.

MW : Poids moléculaire.

$\epsilon$  : Coefficient d'extinction.

O.D : Densité optique.

N : Densité de la population bactérienne.

P : Quantité du sidérophore chélateur (pyoverdine).

S : Quantité de fer libre.

Q : Quantité de fer chélaté.

$\alpha$  (t) : Etat physiologique de la population.

Y<sub>n</sub> : Constante de niveau de croissance, communément appelées facteur de rendement substrat-biomasse, utilisées pour convertir entre le taux de croissance cellulaire et le niveau d'utilisation du substrat.

$\mu$  : Taux ou vitesse de croissance spécifique qui est fonction de la concentration en substrat.

k : Constante d'affinité du micro-organisme qui est donné par la concentration en substrat pour laquelle le taux de croissance spécifique de la population  $\mu_N$  est égal à la moitié du taux spécifique de croissance maxima  $\mu_{N,max}$ .

S<sup>∞</sup> : Niveau de fer déclenchant la synthèse de la pyoverdine.

$\sigma$  : Coefficient lié au phénomène de libération du fer chélaté dans le cytosol.



$v$  : Niveau de récupération de la population PGPR.

$\delta$  et  $\beta$  : Coefficients liés à des fonctions linéaires dépendant de la quantité de fer librement disponible dans le système.

NLS : Méthode des moindres carrés non linéaires.

$\theta$  : Vecteurs de paramètres pseudo-aléatoires.

LHSDESIGN : Fonction Matlab d'hyper cube latin.

$SSE_N$  : Mesure de la déviation entre la solution du modèle par rapport aux mesures prises des données expérimentales pour  $N$ .

$SST_N$  : Terme mesurant la variation des données expérimentales.

$\bar{N}$  : Moyenne des données  $N_i$ .

$R^2$  : Carré de la valeur d coefficient de corrélation (Coefficient de détermination.

$\alpha$  : Intervalles de confiance.

$\bar{X}$  : Moyenne de l'échantillon.

$n$  : Taille d'échantillon.

SD : Ecart type de l'échantillon.

$t_{\alpha/2}$  : Valeur  $t$  avec une aire  $\alpha/2$  à sa droite.

$\theta_w^*$  : Vecteur de paramètres optimaux.

OAT : Analyse de sensibilité locale (un paramètre à la fois).

## INTRODUCTION

Après des décennies d'agriculture intensive, tout azimut, orienté vers l'utilisation systématique des intrants chimiques dans le but de l'augmentation des rendements (fertilisants) ou la protection des cultures (pesticides). Ces dernières années et à l'unanimité on commence à tirer la sonnette d'alarme en parlant de dangers sur l'individu et les écosystèmes naturels (sol, eau et chaînes alimentaires). Ce constat a incité de nombreux pays à établir des réglementations restrictives à l'égard de l'usage de nombres de substances chimiques, notamment celles qui ont été identifiées comme nocives ou causent des dégradations écologiques. En contrepartie, on assiste à la promotion des principes de bonnes pratiques agricoles, utilisant les intrants chimiques de manière raisonnée, avantageant les conduites culturales durables, respectueuses de l'environnement et de la santé humaine.

Dans cette nouvelle orientation, il est cependant soulevé le souci majeur de comment remplacer les nombreuses formulations chimiques jusque-là, très rentables et efficaces par des moyens qui n'ont pas toujours fait l'unanimité concernant leur efficacité dans la gestion des défis phytosanitaires contemporains ? Ainsi, il apparaît aujourd'hui que le domaine de la protection des cultures est désormais dans une situation de refonte totale qui doit repenser les stratégies de gestion phytosanitaire, en puisant principalement dans le grand pool des ressources naturelles qui offrent une multitude d'options basé sur les potentialités biologiques de différents microorganismes [1-3].

Dans ce contexte, les bactéries phytobénéfiques d'origine tellurique sont recherchés et utilisés, car elles sont généralement bien adaptées aux contraintes de leur environnement biologique et physicochimique [4]. Ces agents de lutte biologique (BCAs) ou rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) représentent la majeure partie des produits biopesticides actuellement commercialisés.

Parmi les microorganismes promus, les *Pseudomonas* sont utilisées comme agents de biocontrôle d'un grand nombre de microorganismes pathogènes des plantes. En plus de leur diversité catabolique, ces bactéries synthétisent un nombre remarquable d'exoproduits dotés d'activités antimicrobiennes, chélatrices de métaux, lytiques ou à action phytohormonale de stimulation de la croissance végétale [5-9].

En effet, les souches de *Pseudomonas*, n'impliquent pas l'utilisation systématique de composés antibiotiques (antagonisme direct), contre les agents phytopathogènes. Ces dernières, actionnent d'autres mécanismes qui induisent la phytostimulation et l'activation des potentialités défensives naturelles chez les plantes [10, 11].

Dans cette optique nombre de travaux actuels, à travers le monde, sont conduits afin d'isoler, caractériser et sélectionner les meilleurs antagonistes bactériens pour le contrôle des phytopathogènes. Cependant, le développement de produits commerciaux contenant des cellules viables de *Pseudomonas*, a connu, un succès limité étant donné que seulement quelques souches sont actuellement approuvées pour des utilisations à grande échelle [12-15]. Cette faiblesse en terme de formulations commercialisables est due en partie au long et lent processus de criblage de souches performantes, fortement tributaire des techniques d'échantillonnages sur terrain, souvent coûteuses en termes de temps et main d'œuvre. De plus, il est nécessaire d'effectuer des analyses de laboratoire souvent très compliquées et fortement fastidieuses.

En réponse à ces problématiques et dans l'optique d'alléger certaines de ces contraintes, les techniques de modélisation prédictive qui s'appuient sur l'utilisation de modèles mathématiques (déterministe ou stochastique), est de plus en plus utilisées comme moyen alternatif pour la sélection des meilleures souches antagonistes. Après évaluation et mesure, via des essais de laboratoire, les principales variables biologiques sont déduites et les résultats obtenus sont utilisés comme entrées pour la conception de modèles (modélisation biologique), permettant à terme de prédire ou de déduire, indirectement certains paramètres clés mesurables ou non liés au phénomène biologique objet de l'étude.

En pratique, l'utilisation de la modélisation mathématique fournit un cadre systématique pour quantifier, expliquer et décrire le fonctionnement des systèmes biologiques complexes, en explorant un nombre incalculable de scénarios *in silico* [16].

Ainsi, il est fréquent d'associer les méthodes analytiques de calibration (paramétrisation) des paramètres avec une analyse de sensibilité locale ou globale. Les objectifs de ces procédures, visent à déterminer les valeurs les plus probables que peuvent prendre les paramètres inconnus d'un modèle et à déterminer les schémas de réponse (interrelations) pouvant survenir à la suite de la variation d'un ou plusieurs paramètres du modèle de simulation [17]. Aussi, l'analyse de sensibilité sert à guider et orienter les analyses d'estimation de paramètres vers ceux qui sont les plus influents et qui contribuent le plus à l'incertitude de la réponse du modèle étudié [16, 18-20].

Actuellement, de nombreux travaux de modélisation s'intéressent à la description des populations bactériennes (rhizobactéries) et de leurs sidérophores [21]. Cet intérêt est d'autant plus grand depuis que les premières descriptions de ces rhizobactéries et la synthèse de siderophores typiques (pyoverdines) ont été avancées comme mécanisme indispensable pour la colonisation des rhizosphères. Grâce à ces métabolites, ces rhizobactéries exercent une compétition trophique accrue pour le fer, en activant le métabolisme des plantes et en inhibant le développement des agents phytopathogènes autour des racines des plantes [22]. D'autres travaux abondant dans le même sens, ont signalé que ces pyoverdines sont également déterminants dans la structuration des populations rhizobactériennes en communautés [23] ou en signalisation et communication bactérienne (quorum sensing) [24].

Pour ces pyoverdines, certes leur étude *in vitro* est assez fréquente et accessible avec des techniques et des méthodologies standardisées. Néanmoins, le suivi de leur évolution et de leurs interactions *in vivo* (cellules bactériennes) et *in planta* (interaction avec les plantes) est un processus difficile à réaliser. Ces phénomènes restent à élucider, au niveau des rhizosphères où la complexité multifactorielle (paramètres pédologiques du sol, caractéristiques botaniques de la plante, activités microbiennes....) rend l'étude quasiment impossible avec les procédures expérimentales classiques.

Le présent travail s'est principalement axé sur l'étude des sidérophores chez des souches de *Pseudomonas fluorescens*. Sur le plan biologique, les essais portent sur des aspects de colonisation rhizosphérique et de synthèse et de caractérisation (sidérotypage).

De plus, nous avons à partir de données pratiques, réalisé une modélisation mathématique à travers une étude conceptuelle qualitatif-phénoménologique du processus de chélation du fer. L'objectif étant de calibrer un modèle complexe, à partir de nos données biologiques mesurés en laboratoire et prédire la dynamique du fer par rapport au temps même en l'absence de données expérimentales et effectuer une analyse de sensibilité sur les principales variables afin d'obtenir les meilleures prédictions en terme de niveaux de synthèse en pyoverdine (rendements pyoverdinique).

# Synthèse bibliographique

## 1. 1. Généralités sur les rhizobactéries

### 1.1.2. Les rhizobactéries

Les rhizobactéries sont des bactéries compétentes de la rhizosphère qui colonisent intensivement les racines des plantes. De par leurs abondance celles-ci peuvent se multiplier et coloniser toutes les niches écologiques racinaires à toutes les étapes de croissance de la plante, et ce en dépit de la présence d'une flore microbienne concurrente [25, 26].

Les *Pseudomonas*, forment un large groupe de microorganismes qui colonisent le sol, les plantes et l'eau ; la plupart sont saprophytes. Ces bactéries sont des bacilles à coloration Gram négative (Gram -), non sporulantes, très généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires. Le métabolisme de ces bactéries est mésophile, chimioorganothorphe avec un mode de respiration aérobie obligatoires, à l'exception de certaines qui possèdent la capacité d'utiliser le NO<sub>3</sub>, comme accepteur d'électrons [25].

Parmi les diverses espèces qui constituent ce grand groupe taxonomique que constitue le genre des *Pseudomonas*, on cite : *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas chlororaphis* que l'on retrouve majoritairement dans la rhizosphère [25, 27, 28] ainsi que d'autres espèces décrites ultérieurement à l'exemple de *Pseudomonas jassenii* [29] ou *Pseudomonas lini* [28].

Depuis la découverte du genre *Pseudomonas* [30], plusieurs changements de nomenclatures ont été proposés dès le début de l'année 1968. Par la suite, l'édition de 2005 du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology rapporte une soixantaine d'espèces appartenant au genre *Pseudomonas* [31]. Néanmoins, 191 espèces sont actuellement répertoriées dans la base de données du NCBI : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9103655>. En 2016, plus de 400 souches de *Pseudomonas* avaient été séquencées.

Cependant, le séquençage des génomes de centaines de souches a révélé des espèces très divergentes au sein de ce genre ou en effet, il a été trouvé que de

nombreux génomes de *Pseudomonas* ne partageaient que 50 à 60% de leurs gènes en commun, (ex : *P. aeruginosa* et *P. putida* qui ne partagent que 2971 protéines sur 5350  $\approx$  55%) [32]. Actuellement, on dénombre plus de 190 nouvelles espèces, après les dernières opérations de réarrangement et reclassification de ce groupe bactérien [33].

Les différentes espèces de *Pseudomonas* possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes comme agents de lutte biologique. Ainsi, leurs remarquables capacités de colonisation et de maintien à forte densité de population (rhizocompétence), grande aptitude à métaboliser plusieurs types de composés issus des exsudations racinaires couplé à leurs grande facilité d'isolement et de culture en laboratoire, font que les bactéries du genre *Pseudomonas* surpassent de loin le reste des autres rhizobactéries phytobénéfiques [21, 34-36].

Globalement, l'association des bactéries du genre *Pseudomonas* aux différentes espèces végétales cultivés induit deux types de réactions qui peuvent mener à une situation de déséquilibre métabolique causant une maladie chez les plantes hôtes sensibles ou alors à des interactions mutualistes très largement répandu parmi les bactéries à effet PGPR, promoteur de la croissance des plantes, via l'amélioration de la santé des plantes et l'induction de la résistance systémique contre plusieurs agents phytopathogènes [37]. En outre, d'autres effets bénéfiques sur le plan écologique leurs sont conférés notamment pour leurs rôle dans la dégradation de certaines substances xénobiotiques dans le sol et les eaux pollués [25, 38-42].



### **1.2.3. Stimulation de la croissance végétale**

Outre les activités de biocontrôle, plusieurs études ont montré la capacité des *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la phytostimulation de la croissance de diverses espèces végétales [43-46].

La mise en évidence de cette stimulation a été rapportée lors du développement des vitroplants et de la rhizogénèse [47-49], sur la levée et l'élongation des tiges aussi que l'accroissement de la phytomasse de plantes herbacées et ligneuses [50].

Les mécanismes qui induisent ces gains de croissance sont souvent : les cytokinines [51], l'acide gibbérellique [52], l'éthylène [53] l'acide succinique [54], l'acide abscisic (ABA) [55] et les vitamines [56]. De plus, divers autres mécanismes sont impliqués dans la phytostimulation des plantes cultivés, citons à titre d'exemple le phénomène de fixation d'azote (N<sub>2</sub>) et la solubilisation du fer, phosphore, azote et manganèse [57], l'inhibition de la synthèse d'éthylène par la plante (hormone de stress) et la diminution de la toxicité des métaux lourds [58, 59].

Aussi, certaines souches appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents, semblent améliorer la germination des graines lorsque les conditions environnementales sont défavorables. Ainsi, Kloepper et al, (1989), ont démontré que le taux de germination des graines de colza, semés dans un sol froid et battant, pouvait être significativement augmenté grâce à l'inoculation préalable de ces dernières. De même höfte et al (1991), ont enregistré une augmentation significative du taux de germination de semences de maïs soumises au froid après inoculation de deux souches de *Pseudomonas* fluorescentes.

### **1.3.4. Induction de la résistance systémique**

Chez les plantes, les réactions de défense sont variables et peuvent être orientés de manière spécifique en fonction de la nature du bio agresseur et de l'état physiologique de la plante. Ainsi, divers mécanismes de défenses sont connus chez les végétaux [60-63].

La protection des plantes peut se dérouler de manière indirecte via la stimulation des mécanismes de défense inductibles qui confèrent à l'hôte une résistance accrue en réponse à d'éventuelles futures agressions. Ce processus inductible, dit : ISR (Induced Systemic Resistance) ou (résistance systémique induite) est systémique car il a été démontré que le traitement des racines de tomates par des PGPR produit des effets protecteurs sur d'autres parties de la plante, et ce, sans migration des bactéries inductrices au travers du système vasculaire de la plante ou des tissus [64, 65]. Ce mécanisme a été par la suite mis en évidence chez plusieurs autres plantes, tel que le radis, le tabac, l'haricot et le concombre [66-69].

La réussite du processus d'induction de la résistance systémique est fonction du niveau de colonisation du système racinaire des plantes cultivées qui doit atteindre un seuil suffisant, pour déclencher ce phénomène. Ainsi, chez les *Pseudomonas* ce seuil doit être d'un minimum de  $10^3$  à  $10^5$  cellules par gramme de racines [70].

Il est également important de signaler que le phénomène de l'ISR ne confère pas une protection totale contre l'infection et que l'installation des mécanismes de résistance se fait de manière progressive et atteint son action maximale après 4 à 5 jours suite à l'application de l'agent inducteur et diminue au fil du temps en fonction du couple plante hôte considérée et souche bactérienne appliquée [71, 64, 72].

Globalement, les exemples démontrant l'efficacité du phénomène de l'ISR dans la littérature sont nombreux. Ainsi, plusieurs souches de *Pseudomonas* peuvent contrôler des infections causées par plusieurs types de nématodes (*Globodera pallida* chez la pomme de terre, *Heterodera schachtii* chez la betterave sucrière et *Meloidogyne incognita* sur le coton et la tomate); divers agents pathogènes du sol tel que *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* ou *Pythium aphanidermatum*, mais également contre les dommages causés par les agents pathogènes qui ciblent les parties aériennes à l'exemple d'*Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lagenarium* ; et des bactéries appartenant aux genres : *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris* ainsi que des phytovirus et divers insectes [73-76].

#### **1.4.5. Protection contre les maladies d'origines telluriques**

L'utilisation de bactéries du groupe des *Pseudomonas spp. fluorescents* pour lutter contre les maladies d'origine tellurique a fait l'objet de nombreuses synthèses bibliographiques [77-79].

Certaines souches de ce groupe exercent une activité antagoniste contre divers microorganismes pathogènes, contribuant à la réduction de leur croissance, diminuant ainsi la fréquence des infections racinaires et le nombre de plants malades [80, 81]. Ces souches bénéfiques peuvent coloniser la graine et la surface des racines en occupant les mêmes sites d'attachement que ceux privilégiés par les mycètes phytopathogènes [82, 83].

Des résultats intéressants en matière de biocontrôle ont été obtenus dans le cas du piétin échaudage des céréales, les fontes de semis du concombre et du blé [84-87], la pourriture racinaires de la pomme de terre (*Erwinia Carotovora*) [44], les fusarioses vasculaires provoquées par diverses formes spécifiques de *Fusarium oxysporum* [88-92].

#### **1.2. La Compétence Rhizosphérique**

weller et Thomashow (1996), ont défini la compétence rhizosphérique comme étant le processus par lequel les rhizobactéries introduites sur semences, organes de multiplication végétative ou sol, se multiplient activement, puis persistent durant plusieurs semaines en présence de la microflore locale.

La colonisation des racines inclut deux schémas majeurs de colonisation caractérisant deux groupes de rhizobactéries ayant chacune des spécificités préférentielles pour coloniser la rhizosphère, rhizoplan (ex : *Pseudomonas*, *Bacillus*), et/ou l'intérieur des racines (ex : *Rhizobium Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium et, Sinorhizobium*). La compétence rhizosphérique est sous la dépendance d'un nombre important de déterminants de diverses natures pouvant être génétiques, physiologiques ou biochimiques.

Parmi les facteurs génétiques, la recombinaison site spécifique qui désigne la capacité que possèdent certaines bactéries à générer des sous-populations extériorisants des phénotypes différents de la souche originelle (réarrangements génétiques survenant au niveau de l'ADN) lors de la mise en culture de ces dernières dans un milieu astringent [93].

Ces réarrangements génétiques (Rapide et efficace) ont pour rôle de promouvoir la recombinaison conservatrice réciproque (qui ne nécessite pas la synthèse d'ADN), par réarrangements de segments d'ADN (Restriction, Echange, Ligature) qui se fait après reconnaissance et liaison à de courtes séquences d'ADN (sites d'environ 15 pb) [94 , 95 , 96].

La recombinaison site spécifique, est enfin impliqué dans nombre de processus cellulaires tel que : la réplication des génomes bactériens, la différenciation et la pathogénèse, le mouvement d'éléments génétiques (îlots de pathogénicité), la régulation de l'expression des différents motifs antigéniques de la surface cellulaire à savoir les fimbriae, flagelles, LPS, et lipoprotéines [93 , 97].

Sagissant des facteurs physiologiques (présence de la NADH déshydrogénase I et de la nitrate réductase), plusieurs expérimentations ont été menées sous condition d'anaérobiose sur des mutants WCS365 de *P. fluorescens*. Ces études, ont montré que l'enzyme NADH : ubiquinone oxydoréductase ou **NADH** déshydrogénase I de la chaîne respiratoire aérobie de *P. fluorescens*, est responsable de la génération d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane plasmique qui génère une force motrice utilisé pour : la synthèse de l'ATP, le transport actif de divers nutriments et la rotation des flagelles (ATP dépendent) permettant une colonisation concurrentielle de la coiffe des racines ainsi que le maintien stable de l'état physiologique de la population qui demeure de tout temps compétitif [98], [99]

De plus, il a été démontré que dans les conditions d'anaérobiose, la capacité de réduction des nitrates en di nitrogène par la souche sauvage de *Pseudomonas fluorescentes* C7R12, procurait un avantage concurrentiel à la souche sauvage (augmentation du temps de génération et de la mobilité), par rapport aux mutants

défectueux, du fait de la possibilité additionnelle d'alternation entre diverses voie métabolique (chaîne respiratoire & respiration azotée) [100].

### **1.2.1. Rôle de l'antigène-O des Lipopolysaccharides**

Les *Pseudomonas* arborent sur leurs membranes externes des Lipopolysaccharides (LPS) qui constituent à la fois des motifs antigéniques et/ou des facteurs de virulences chez les organismes pathogènes ; ces motifs peuvent être de taille et de structures différentes [101]. Chez les *Pseudomonas*, les études immunospécifiques ont montré que les antigènes – O des LPS, représentaient le constituant majeur des différents motifs antigéniques présent [101].

La connaissance de la structure, nombre et ordre d'agencements des oligosaccharides permet d'élucider la voie de biosynthèse de ces différents groupes antigéniques et de dégager les différents stéréotypes immunospécifiques différenciables de par le saccharide non réductible situé à l'extrémité de la chaîne LPS O-polysaccharide [101].

Ainsi, la perte de la capacité de synthèse de l'antigène-O LPS chez les mutants de *P.fluorescens* WCS374 et *P. putida* WCS358, est associée à une incapacité de colonisation des racines de la tomate et de la pomme de terre. Néanmoins, ces souches demeurent avoir le même temps de génération si on les compare avec leurs souches sauvages respectives [102].

### **1.2.2. Les antibiotiques**

La production d'antibiotiques est reconnue comme étant un mécanisme par lequel les PGPR (*Pseudomonas*), peuvent empêcher la prolifération de certains agents phytopathogènes [103-105].

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des producteurs potentiels d'une gamme variée d'antibiotiques, avec un large spectre d'action, leur permettant de contribuer à la compétence écologique des souches productrices [106].

L'antibiose exercée par certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents a d'abord été mise en évidence *in vitro* [61]. Ainsi, plusieurs métabolites à effet

antibiotiques tels que : le 2,4- diacétylphloroglucinol (DAPG) [107, 108], Les phénazines (PHZ) [109, 110], la pyrrolnitrine (PRN) [111, 112], la pyolutéorine (PLT) [113], et le Cyanure d'hydrogène (HCN) [114], la tropolone, l'oomycine , des viscosinamides, des tiensines et des amphisines, ont été isolés à partir de ces bactéries [105, 115-120].

La production d'antibiotiques est sous la dépendance de plusieurs facteurs abiotiques (oxygène, température, pH, microéléments et sources spécifiques de carbone et d'azote) ; biotiques (plante hôte, le pathogène, microflore indigène, densité de population de la souche productrice) et physiologiques tel que le quorum sensing qui a été identifié comme étant l'un des facteurs les plus influents sur la production des antibiotiques chez les agents bactériens de biocontrôle [121, 122].

La biosynthèse des antibiotiques ou autres composés antifongiques est régulée par une cascade de signaux moléculaires endogènes qui mettent en jeu des récepteurs kinase, qui réagissent aux stimuli de l'environnement et répondent par la régulation des gènes codés par les gènes **lemA** et **gacA** de la cellule bactérienne productrice [106, 123, 124] ; facteurs sigma codé par le gène **rpoD** [123] et **rpoS** [124] et le quorum sensing auto inductible par l'N-acyl-homéométrie lactone [125].

En outre, les phénazines (PHZ) et le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG) sont les déterminants majeurs rapportés dans le biocontrôle de plusieurs agents phytopathogènes notamment vis-à-vis de : *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, responsable du piétin échaudage dans des agro écosystèmes où se pratique la monoculture du blé. De plus, ces métabolites manifestent des propriétés antagonistes à l'encontre de différents autres genres fongiques tels que : *Alternaria*, *Cladosporium*, *Diyaploia*, *Helminthosporium*, *Pyricularia*, *Pythium*, *Rhizoctonia* et *Fusarium* [119, 126-128, 113, 129-131, 21, 61, 103, 132-135].

D'autres molécules appartenant à la classe des lipopeptides cycliques [62], tels que la viscosinamide [136] qui empêche l'infection de la betterave sucrière par *Pythium ultimum* [137], la tensine [137], l'amphisine et l'oomycine A, se sont avérés être dotés de potentialités remarquables de bio protection des cultures [21, 138].

Kaur et al (2006), ont suggéré que l'acide D-gluconique été l'antifongique le plus important produit par la souche AN5 de *Pseudomonas* spp, agent de biocontrôle du piétin- échaudage des céréales [139].

Aussi, la production de l'acide cyanhydrique (HCN) par certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* peut influencer les pathogènes telluriques [140]. Ce mécanisme est souvent rapporté chez la souche de référence CHAO, comme mécanisme potentiel de suppression de *Tielaviopsis basicola* sur tabac ainsi que sur d'autres champignons telluriques [140].

Enfin, Il a été démontré que la production de molécules antibiotiques aidait à l'établissement des populations bactériennes introduites sur boutures ou semences durant les premières phases de la colonisation de la rhizosphère. Plusieurs études ont montré que l'introduction de souches déficientes en synthèse d'antibiotiques n'avaient pas plus d'avantage de colonisation ou d'effet de bio contrôle et/ou de stimulation par rapport à leurs souches sauvages respectives. Ce constat pourrait être expliqué par le fait qu'au-delà d'un certain seuil d'accumulation des antibiotiques dans la rhizosphère, aucun effet bénéfique ne peut être apporté [12, 39, 141].

### **1.2.3. Synthèse et rôle des acides aminés**

La capacité de synthétiser les acides aminés et organiques qui sont des sources importantes d'énergie pour les bactéries du sol, s'est révélée être essentielle pour la colonisation des racines. Les mutants de *P.fluorescens* WCS365, n'ayant pas la capacité de croître avec certains sucres constitutifs des exsudats racinaires, ont montré les mêmes aptitudes de colonisation que leurs souches sauvages respectives.

En revanche, les mutants ne métabolisant pas les acides organiques qui représentent le principal groupe de composés exsudés, ont montré une réduction de leurs taux de colonisation et niveau de concurrence, dans la rhizosphère de la tomate [142].

Les mutants auxotrophes pour la leucine, arginine, histidine, valine/ isoleucine, ou même du tryptophane sont incapables de coloniser efficacement les racines de la tomate même si l'acide aminé en question est ajouté de manière exogène [143].

Cependant, il a été démontré que chez *P. putida*, l'ajout de la proline (composants majeur des exsudats racinaires), est utilisés comme source de carbone et d'azote par les micro-organismes du sol durant les premières étapes de la colonisation des racines. Ce dernier, semble agir comme inducteur et amplificateur (4 à 20 fois) de l'activité de deux gènes **PutA** et **PutP**, codant respectivement pour une polyprotéine unique et une protéine intégrale de la membrane interne [144, 145].

#### **1.2.4. Production d'acide indole acétique**

L'acide indole -3- acétique, auxine principale chez les plantes, est impliquée dans tous les aspects de la croissance et du développement [146]. La production de l'AIA par les rhizobactéries a été associée avec la promotion de la croissance des plantes, la morphogénèse des racines et l'initiation et l'élongation de ces dernières [147-150].

L'aptitude de synthétiser l'AIA, ou des produits apparentés, ainsi que la solubilisation des phosphates sont des caractéristiques pouvant avantager la souche porteuse dans le processus de compétition et son adaptation à divers écosystèmes (sol nu et sol rhizosphérique). Ainsi, plusieurs souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère à partir de diverses cultures ont démontré une capacité de production des auxines [150-152].

#### **1.2.5. Production d'éthylène**

L'éthylène est une hormone de stress, car sa synthèse au niveau des tissus végétaux augmente en fonction du niveau des stress biotiques et/ou abiotiques [153]. La production d'éthylène a été souvent associée à une croissance réduite et à une sénescence prématurée, et peut donc être un indicateur de la susceptibilité des plantes aux stress (sécheresse, fortes températures, froid, etc...) [154-156]. L'un des principaux mécanismes utilisé par les souches de *Pseudomonas* pour stimuler la croissance des plantes, est l'action visant à abaisser la concentration de l'éthylène par hydrolyse de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylic, précurseur immédiat de l'éthylène dans les plantes. Ainsi, il a été observé que les plantes inoculées avec des souches présentant l'ACC deaminase était nettement plus résistantes aux effets délétères de l'éthylène [157], la présence de métaux lourds [158], la présence d'agents



phytopathogènes [159], la sécheresse, et la présence de teneurs élevées en sels [160, 161]. De plus, certaines *Pseudomonas* produisent une ACC désaminase capable d'hydrolyser l'ACC exsudé par les racines et réduisent la formation d'éthylène. Cela a pour conséquence, de favoriser le développement racinaire, augmenter la nodulation et par conséquent, améliorer le niveau de fixation d'azote [162, 163].

De surcroît, les produits de la réaction, ammonium et  $\alpha$ -cétoglutarate, peuvent être utilisés par les bactéries et les plantes comme source secondaire de nutriments [164].

Il est à noter enfin que les substances exsudées par les racines des plantes peuvent être des précurseurs dans la biosynthèse de l'ACC. Les rhizobactéries capables de synthétiser la désaminase peuvent dégrader l'ACC et l'utiliser comme source de carbone.

#### **1.2.6. Système de sécrétion de type III (SST3S)**

Les SST3Ss sont connues pour être des médiateurs des interactions de nature pathogène entre les cellules bactériennes et les eucaryotes [96]. Cependant, la présence de souches saprotrophes de *Pseudomonas* spp. fluorescents, ayant un pouvoir de biocontrôle contre les pathogènes telluriques dans la rhizosphère, indique l'implication de ces systèmes dans des processus autres, tels que, les associations symbiotiques menant à l'augmentation du taux d'échange des nutriments au niveau des arbuscules mycorhiziens (MA), se développant sur les cellules corticales des racines [165, 166].

Des études de colonisation conduites avec des souches de *Pseudomonas fluorescens* C7R12, ayant subi une altération du gène (*hrcC* -) du SST3 par mutagenèse dirigée, ont démontré que la présence du SST3 n'avait aucun effet sur la survie de la bactérie dans la rhizosphère et que contrairement à la souche SST3 + qui avait montré un effet de biostimulation de la croissance des racines lié à l'association avec les MA. les mutants *hrcC* - ont été plutôt neutres, voir délétères au processus de mycorhization [167, 168].

La relation entre les MA et l'augmentation de la croissance survenant sous l'action de la souche C7R12 est supposée être le fait de la croissance végétale liée à la promotion de la croissance du système racinaire. Ce dernier est tributaire de l'effet bénéfique qu'apporte les MA et non pas à la fixation d'azote atmosphérique [169].

L'abondance des *Pseudomonas* spp. fluorescents possédant un SST3 dans la rhizosphère indique qu'ils sont préférentiellement associés aux racines mycorhizes plutôt qu'aux racines nues. Aussi il a été observé que ces bactéries étaient actives au contact de mycorhizes fonctionnelles, plutôt qu'avec des champignons mycorhizogènes pré symbiotique [167, 170].

### **1.2.7. Quorum sensing**

Le quorum sensing est un système de communication bactérien permettant à une population de coordonner l'expression d'un ensemble de gènes cibles par induction ou répression [171]. La plupart des signaux du quorum sensing sont de petites molécules organiques ou de peptides composés de 5-20 acides aminés [23, 172, 173].

Pour qu'une molécule soit classée comme molécule signal induisant une réponse de type quorum sensing plusieurs critères importants doivent être réunies : (i) production du signal durant des stades spécifiques de la croissance ou en réponse à un changement particulier de l'environnement, (ii) le signal doit s'accumuler dans l'environnement extracellulaire et être reconnu par un récepteur membranaire spécifique, (iii) l'accumulation de la molécule signal doit atteindre une concentration nécessaire et suffisante, supérieure ou égale à un seuil critique capable de déclencher une réponse coordonnée, (vi) la réponse cellulaire doit dépasser le stade des changements physiologiques nécessaires au métabolisme ou à la détoxification [23, 174].

Chez les bactéries Gram négatif, le quorum sensing est basé sur la synthèse et la détection de petites molécules signal auto-inductrices, appelées *N*-acyl-homosérine lactones (HSLs). Cette molécule est généralement associée à un comportement pathogène ou symbiotique [175-177].

Les HSL diffusibles, représentent un groupe de molécules signal reconnues et utilisées pour maintenir une balance écologique équilibrée pas les différentes communautés poly-microbiennes qui les métabolisent, mais également par d'autres organismes présent dans la rhizosphère et la phyllosphère des plantes [178-180]. Selon Venturi (2006), le genre *Pseudomonas*, a la capacité de produire une multitude de molécules signals d'N - acyl homosérine lactone (HSL).

Ainsi, la concentration des HSL est étroitement liée à la densité microbienne. Donc plus le nombre de bactéries augmente, plus la concentration de cette molécule est importante. Cependant, d'autres facteurs peuvent réduire la concentration de cette molécule signal, à savoir : la formation de biofilms, l'agrégation bactérienne. le pH élevé et la dégradation enzymatique [181, 182] .

Chez la plupart des *Pseudomonas fluorescents*, plusieurs traits bénéfiques (production d'antibiotiques de type phénazine, production de métabolites secondaires antifongiques (AFM), production de toxines et d'exo polysaccharides, formation de biofilm, de facteurs de virulence, et la mobilité ...), sont régulés par le quorum sensing médié par l'émission de molécules autoinductrices de l'N- acylhomosérine lactone (HSL) [183].

### **1.2.8. Production de sidérophores**

Le terme sidérophores vient du grec « sideros », qui signifie « porteur de fer ». Ces métabolites sont des molécules à faible poids moléculaire (500 - 1500 Daltons), qui ont pour rôle de chélater les ions ferriques et de les transporter à l'intérieur de la cellule microbienne [79]. La production de siderophores est un mécanisme hautement spécifique développé par la plupart des micro-organismes [185-187].

La synthèse de sidérophores n'a lieu qu'en situation de carence en fer [102], puisque dans les conditions d'aérobie et de pH neutre, le fer se trouve sous des formes oxydées et polymérisées d'hydroxyde de fer  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  totalement insoluble, difficilement assimilable par les bactéries [188].

### **1.2.9. Structures et variabilité des pyoverdines**

Il existe dans la nature plusieurs groupes de sidérophores (catécholate et hydroxamate (parfois  $\beta$ -hydroxy-acide)), qui fournissent des sites de haute affinité pour la liaison avec le  $\text{Fe}^{3+}$  [189, 190].

La pyoverdine (PVD), qui représente le système primaire d'absorption du fer chez les *Pseudomonas fluorescens*, désigne également un autre groupe de sidérophores diffusible (vert fluorescent), historiquement reconnu comme trait phénotypique distinctif du groupe 1 d'homologie ARNr [190].

Ainsi, une grande diversité de structures des PVD a mené à l'élaboration d'un système de typage spécifique aux *Pseudomonas* spp, dit sidérotyping [186, 191]. À ce jour, la structure de plus de 50 PVDs appartenant à différentes souches et espèces de *Pseudomonas*, ont été déterminées. Ces PVDs sont tous composés de trois parties (Figure 1.1) : (i) un chromophore conservé dihydroxyquinoline fluorescentes ; (ii) une chaîne latérale acyle (soit de l'acide dicarboxylique ou un amide) lié au groupe amine du chromophore, et (iii) une chaîne peptidique variable liée par un groupe amide au C1 (rarement C3) groupe carboxyle du chromophore responsable de la reconnaissance et liaison avec les récepteurs membranaires apparentes [192, 193].

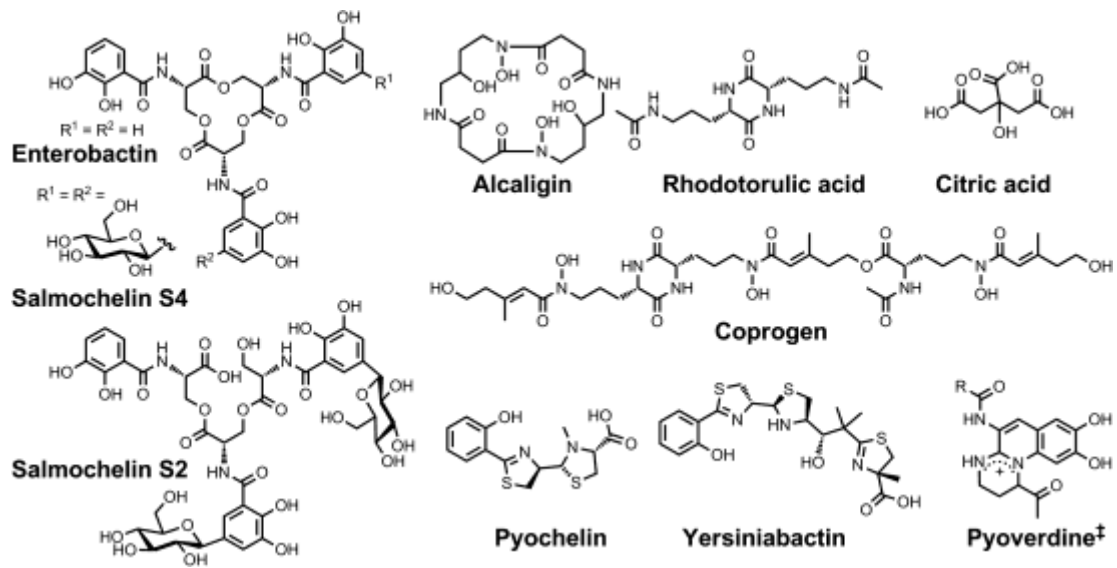


Figure 1.1 : Schémas des 3 groupes de PVD de *Pseudomonas aeruginosa* avec différentes variantes de pyoverdines [193].

### 1.2.10. Biosynthèse de pyoverdines

Il est à noter que *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens* ont une capacité remarquable d'utilisation d'un large spectre de pyoverdines secrétées par d'autres micro-organismes, tandis que leurs pyoverdines ne peuvent être utilisées par aucunes de ces dernières [70, 194, 195].

Moore et al (1984), ont identifié les gènes codant pour la biosynthèse des pseudobactines (**Figure 1.2**).

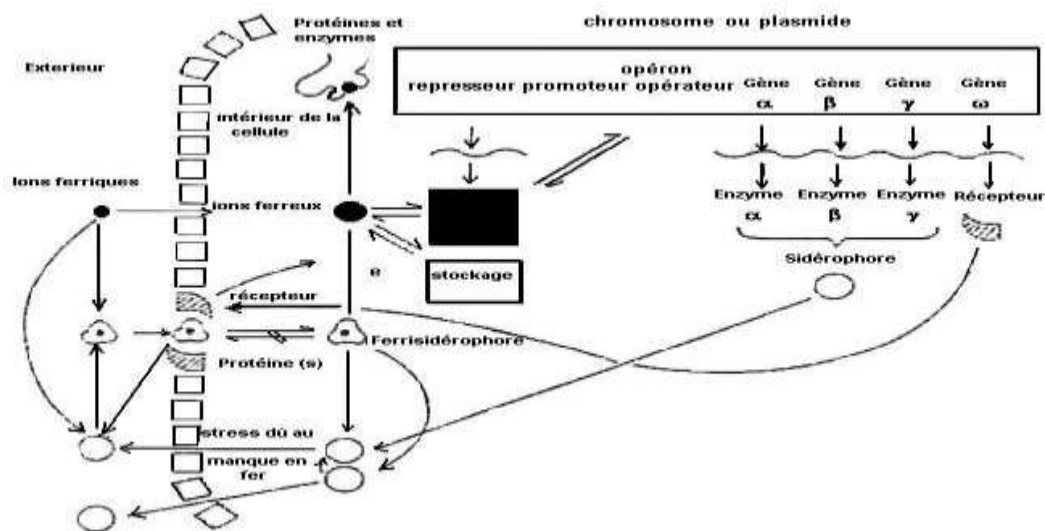


Figure 1.2 : Assimilation du fer chez les microorganismes aérobies et aéroanaérobies facultatifs [196].

Certaines souches de *Pseudomonas* spp produisent un autre type de sidérophore non fluorescent qui est la pyochéline, qui possède une affinité moindre pour le fer (ex *Pseudomonas fluorescens* CHAO) [197, 198]. Les pyoverdines et la pyochéline sont des sidérophores synthétisés typiquement par le genre *Pseudomonas* pour lesquels une activité élicitrice de la résistance systémique induite a été démontrée [192].

A titre d'exemple, la souche WCS 358 de *P. putida* peut éliciter grâce à ses pseudobactines l'ISR chez l'*Arabidopsis*, l'haricot, la tomate et l'eucalyptus [11, 199]. La souche mutante, qui ne produit plus la pseudobactine, s'est avérée avoir perdu sa capacité d'induction de l'ISR chez la tomate mais pas chez l'haricot [11, 200].

En plus du fer, le zinc et le cadmium semblent stimuler la production des pyoverdines [201, 202], tandis que le vanadium se présente comme un facteur qui diminue la production des pyoverdines par augmentation du niveau de fer dans le milieu [203].

### 1.2.11. Transport du fer par les sidérophores et signalisation bactérienne

La production de sidérophores dans la rhizosphère par les *Pseudomonas* spp. fluorescents est très dépendante des facteurs environnementaux à savoir, la température, le pH du sol, le carbone, l'azote, le phosphore et la concentration en micro-éléments y compris les ions ferriques [204].

Dans la rhizosphère, les  $Fe^{3+}$  chargés (Ferri-) sidérophores sont sélectivement reconnus et liés à des récepteurs de haute affinité se trouvant sur la surface cellulaire [la membrane externe (OM) des bactéries Gram-négatif], puis transportés dans la cellule. Certains de ces récepteurs se lient à l'apo-sidérophores apparenté en l'absence de ferri-sidérophores ; le déplacement de l'apo-sidérophores à partir du récepteur du ferri-sidérophores apparenté initie un transport actif à travers l'OM [204].

Le transport des sidérophores par les récepteurs de la OM est couplé à la perte du gradient de protons sur la membrane cytoplasmique (CM). La transduction de l'énergie est médiée par la protéine **TonB** dans le périplasme (PP), qui répond à la force proton-motrice de la CM [204].

Selon le modèle actuel, le passage de **TonB** de la CM à l'OM, où ce dernier achemine l'énergie au récepteurs lié au ligand-chargées, puis se réassocie avec ses partenaires **ExbB**, **ExbD** de la CM, qui sont nécessaires pour l'excitation et l'association de **TonB** avec la CM [204].

La fixation du ferri-sidérophores induit un changement dans la conformation du domaine plug qui permet le transport du ferri-sidérophores vers le PP.  $Fe^{3+}$  ou  $Fe^{3+}$ -sidérophores chargés sont ensuite transférés dans le cytoplasme par une protéine periplasmique d'attachement (PBP), qui les livre à un transporteur ABC apparentés situé sur la CM. En suite le transporteur ABC transloque le ligand à travers la CM utilisant l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP dans le cytoplasme. L'expression de la synthèse des sidérophores et des gènes d'absorption est réprimée dans des conditions où le milieu est riche en fer par une protéine répresseur, qui s'assemble en complexe avec le  $Fe^{2+}$  sur le promoteur des gènes en charge du transport du fer. Certains sidérophores ont également des propriétés autorégulatrices qui permettent

une expression maximale des gènes apparentés à la synthèse et absorption et ce dans le cas où les sidérophores sont efficaces dans leur capacité de livraison du  $Fe^{3+}$  à la cellule. Un mécanisme comme celui-ci implique une voie de signalisation qui est déclenchée lorsque le récepteur se lie au ligand approprié [204].

Chez *P. aeruginosa* PAO1, la signalisation PVD implique quatre partenaires protéiques : le récepteur PVD de la MO **FpvA**, le CM- couvrant le facteur antisigma **FpvR** et deux facteurs sigma extra cytoplasmique (ECF-s), PVD et **Fpvl**. Après fixation du ligand par le récepteur **FpvA**, un signal est transmis au facteur antisigma **FpvR**, résultant sur l'activation des facteurs sigma **Fpvl** et **PvdS**. **PvdS** dirige la transcription de gènes de synthèse PVD, en plus de ceux codant des enzymes sécrétées, **Fpvl** reconnaît le promoteur du gène codant pour **FpvA**. Grace à ce mécanisme, la molécule PVD déclenche non seulement sa propre synthèse et absorption, mais également l'expression coordonnée de plusieurs gènes de virulence **PvdS**-dépendant, qui contribuent en fin à la pathogénicité de *P. aeruginosa*.



### **1.3. Notions de modélisation biomathématique**

La notion de «modèle» est fondamentalement différente dans les sciences théoriques et expérimentales. Bien que la modélisation en tant qu'activité de production de modèles soit centrale dans la démarche scientifique, les objectifs poursuivis dépendent du rapport avec l'entité modélisée, étant donné qu'on ne modélisera évidemment pas de la même manière, ni pour les mêmes raisons, un objet accessible (directement manipulable expérimentalement), et un objet inaccessible (au sens où son observation ne peut être qu'indirecte; un atome par exemple), un concept ou un évènement à venir (dans le cadre des sciences de la conception) [205].

En agronomie, les textes de références donnent des définitions générales au mot modèle. Ainsi, selon Vries (1989), un modèle est généralement défini comme étant une représentation ou une simplification du fonctionnement réel d'un système. D'autres définitions s'appuient quant à elles, sur les formalismes mathématiques, définissent un modèle comme étant une tentative systématique de traduction et de compréhension conceptuelle d'un système réel (phénomène physique, économique, biologique...) en des termes mathématiques.

En générale, le modèle sera descriptif et destiné à "expliquer" des phénomènes observés et à les reproduire, en adoptant une approche d'analyse systématique des conséquences d'une modification de paramètres, en réponse à un stimulus et d'évaluer les issues associés à ce changement [206].

De ce fait, la mise en action d'un modèle, n'est que le passage de la description du modèle au calcul et à la visualisation des conséquences de cette description. On peut alors considérer, à l'instar de Parrochia (2000), que la simulation ne fait que prolonger la modélisation en permettant de réaliser des expériences sur le modèle.

Ainsi, La plupart des disciplines scientifiques utilisent la simulation comme outil auxiliaire de la construction d'hypothèses, de la découverte, de la validation ou de la prévision.

### **1.3.1. Etapes de la modélisation**

Globalement, tout processus de modélisation comporte trois étapes (Nouvel, 2002) :

- i. Identification des composants du système et de leurs limites,
- ii. Identification des interactions entre les composantes,
- iii. Caractérisation de ces interactions en utilisant des abstractions quantitatives des processus mécanistes déterminé par les objectifs du modèle.

Une fois que le modèle a été entièrement défini, on passe à la deuxième étape « simulation » qui est la mise en œuvre, test et ajustement du modèle aux données expérimentales sur ordinateur.

Par ailleurs, un modèle peut être composé d'un ensemble d'équations mathématiques, constituées de variables, qui caractérisent l'état du système à différents pas de temps mais aussi de paramètres, qui définissent l'intensité des relations pouvant exister entre les variables d'état du système [206].

### **1.3.2. Types de modélisation**

Schématiquement, on peut séparer les modèles en deux grandes classes. Les modèles de nature mécanistes, qui s'appuient sur une connaissance à priori des mécanismes pour générer le modèle et les modèles "boite noire" qui sont davantage basés sur les données collectées.

Dans les modèles mécanistes les mesures qui ont pu être recueillies sur le système réel ne servent à aucun moment dans la construction du modèle, seuls les préceptes contenus dans le discours sur la réalité sont utilisés, en faisant donc l'hypothèse forte qu'ils sont suffisants et légitimes. Les modèles « boîte-noire » ne font pas appel à un discours sur le réel, mais se basent sur un ensemble de données disponibles.

En fait, dans ce type d'approche, un modèle générique est implicitement utilisé (modèle linéaire de grande dimension, modèle non linéaire) et la modélisation se résume à l'estimation des paramètres de ce gros modèle.

En biologie, les modèles que l'on rencontre se situent généralement dans une de ces deux classes extrêmes. En effet, on peut s'aider des données disponibles pour mieux formaliser le discours sur la réalité et en limiter les hypothèses fragiles.

D'un autre côté, trois types d'approches de modélisation peuvent être utilisés pour produire une description des plus concises possible des phénomènes biologiques à savoir : (i) l'approche mathématique avec les systèmes d'équations différentielles ordinaires et à dérivées partielles, (ii) les simulations stochastiques globales, et (iii) les systèmes de simulation entité-centrés [207].

### **1.3.3. Limites de l'expérimentation statistique et intérêt de la modélisation**

Que ce soit en agronomie, en écologie ou en physiologie, « utiliser » des mathématiques a longtemps été essentiellement identifié à « faire des statistiques ». Chaque étude doit être faite sur une population, elle-même échantillon d'une population plus grande. Il faut donc établir moyenne, médiane, variance, écart type, etc..., avant de comparer les résultats.

Cette vision réductrice, limitée aux statistiques, des relations possibles entre mathématiques et biologie est frappante en biologie, qu'il s'agisse de modèles déterministes ou aléatoires. Ils permettent de créer des plans expérimentaux, d'expliquer ou de prévoir des données biologiques, prendre des décisions en analysant des situations biologiques qui introduisent l'aléa au cœur des explications.

Ceci est d'autant plus problématique que les systèmes biologiques sont connus pour être des problématiques de recherche multidimensionnelles pouvant posséder plusieurs optima, ne donnant pas toujours des résultats satisfaisants, s'opposant ainsi à la majorité des systèmes physiques auxquels nous nous sommes habitués à travailler avec [208]. Ces systèmes sont difficiles à mesurer par manque de capteurs et de par le nombre important de mesures qui se présentent souvent sous forme d'une succession d'étapes manuelles compliquées et fastidieuses, engendrent des données fortement bruitées à faible fréquence d'échantillonnage.

Enfin ces systèmes se caractérisent par leur complexité inhérente à l'hétérogénéité des systèmes vivants sur une très large palette d'échelles (de la molécule à la population). Cette grande complexité structurelle se double d'une complexité comportementale, guère étonnante en couplant un aussi grand nombre de systèmes non linéaires, pouvant générer, dans certaines conditions, des comportements étranges voir instables (Chaos), rendant leurs évolution difficile à prédire et à expliquer.

La complexité intrinsèque démarque les systèmes biologiques de la plupart des autres systèmes physiques, où on est confronté aux aléas des expériences portant sur des systèmes dont on ne connaît pas tous les tenants et les aboutissants : les comportements observés peuvent varier du tout au tout à cause d'une infime variation des paramètres, principalement ceux qu'on ne connaît pas ou qu'on contrôle mal. En d'autres termes, les expériences ne sont pas facilement reproductibles car les conditions extérieures variables, peuvent avoir une grande influence sur les phénomènes observés [207].

En raison de toutes ces difficultés et du manque de théories satisfaisantes pour expliquer certains types de phénomènes biologiques, les experts en la matière s'appuient de plus en plus sur des outils de modélisation ainsi que sur la simulation pour essayer de comprendre le comportement de ces systèmes et d'expliquer les mécanismes mis en jeu pour prédire les comportements qui seront vérifiés lors de futures expériences.

L'approche rationnelle de modélisation peut apporter beaucoup à la compréhension des organismes vivants car le fait de pouvoir faire des expériences virtuelles *in silico* avec des outils théoriques et des logiciels éprouvés fait gagner beaucoup de temps à l'expérimentateur. En effet, en testant des hypothèses sur un modèle, on peut fréquemment éviter de faire des expériences inutiles.

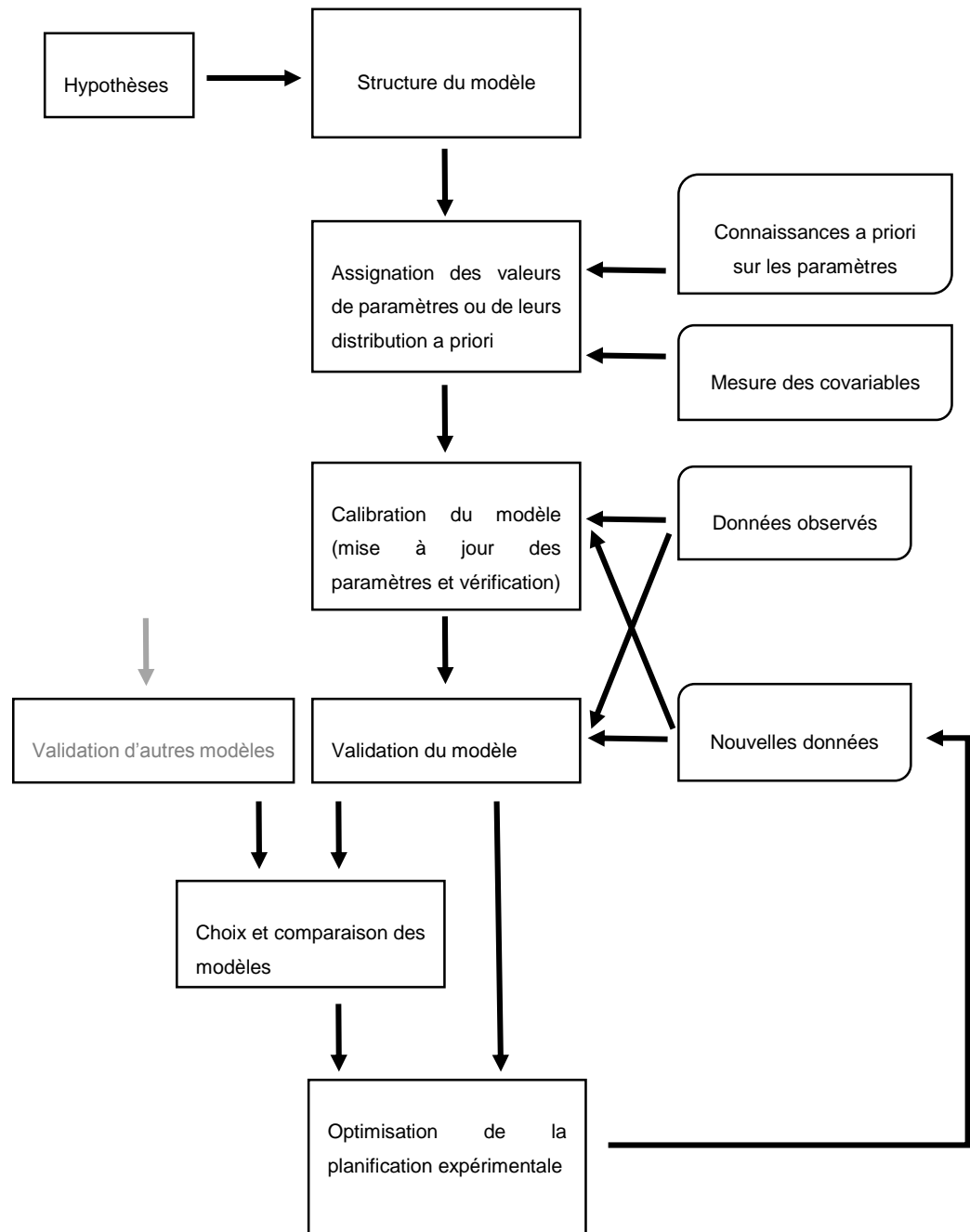
#### **1.3.4. Paramétrisation des modèles**

La calibration de modèle représente un volet très important dans la modélisation biomathématique vu qu'elle permet aux chercheurs de résoudre toute sorte de problématique inverses, en procédant à un ajustement dans lequel quelques aspects (Paramètres) non conformes d'un modèle sont «retouchés» ou optimisés par rapport à des données de références, ou à des observations réelles (**Figure 1.3**) [206, 209 ].

Le processus d'ajustement des paramètres qui permet de faire rentrer les paramètres dans les marges de leurs plage d'incertitudes respectives, a pour but d'obtenir une représentation qui soit la plus fidèle à la réalité biologique du processus modélisé, tout en satisfaisant un certain nombre de critères pré-convenus (qualité d'ajustement ou fonction de coût).

La calibration des paramètres d'intérêt requiert l'utilisation des techniques d'optimisation qui permettent une attribution juste et objective aux valeurs des paramètres inconnus. Ces attributions sont faites de sorte que les différences dans les performances des modèles soient attribuées aux différences de structure plutôt qu'à la pertinence des valeurs affectées aux dits paramètres [210].

L'assignation des valeurs de paramètres dans la modélisation biologique peut fortement affecter les performances des modèles, et être difficile à définir avec fidélité et précision. En pratique, la paramétrisation de paramètres est souvent utilisée en sciences agrobiologiques, sur les résultats d'études obtenu sur terrain ou au laboratoire [211].



Les cadres rectangulaires représentent chacun des pas du processus et les formes ovales indiquent les différents types de données utilisées. Le rectangle grisé correspond à une étape d'un processus parallèle.

Figure 1.3: Schéma du processus de construction d'un modèle dans le cadre bayésien [212].

Globalement, il est recommandé d'éviter dans chaque procédure d'estimation de paramètres, les sur-paramétrisation de modèles vu qu'il est évident qu'un système sur-paramétré, « aura tellement de degrés de liberté qu'il ne pourra pas être bien calibré et donner des simulations acceptables pour les séries de résultats observés ( à condition qu'acceptable ne soit pas défini de façon très restrictive ) [213]. Ainsi, il incombe à l'utilisateur du modèle de trouver l'équilibre entre le type et le nombre de paramètres nécessaires à calibrer pour représenter les processus de façon à ce qu'ils soient faciles à déterminer et à mesurer et qu'ils n'introduisent pas trop d'incertitudes dans le résultat final de la modélisation. Ainsi, le résultat de la paramétrisation, dépendra de la clarté avec laquelle les paramètres ont été définis et reliés aux données mesurées et de celle que soit l'échelle de travail [214].

### **1.3.5. Vérification de modèle**

Après calibration de modèle, il est nécessaire de vérifier son ajustement aux données. Plusieurs représentations graphiques permettent de visualiser les différences entre les prédictions du modèle et les données expérimentales. La plus répandue superpose les données expérimentales à la courbe d'ajustement du modèle. Ensuite, une quantification de l'écart entre les prédictions et les observations peut être évaluée, notamment par le calcul des erreurs résiduelles ou relatives [212].

Pour atteindre ce but, les va-et-vient entre modélisations et vérifications expérimentales sont incontournables [215]. Ainsi, il est donc indispensable que chaque modèle soit confronté à la réalité biologique qu'il est censé représenter. Cette démarche est à l'origine d'un processus synergique d'une efficacité tout à fait étonnante : un modèle indique très précisément ce qui devrait être observé expérimentalement, quand, où, comment et pourquoi. De ce fait, nous obtenons des avancées d'une rapidité et d'une pertinence remarquables. Toutefois, pour obtenir les connaissances fonctionnelles requises, il est nécessaire d'intégrer une énorme quantité d'informations, très largement disséminées sous une multitude de formes et de représentations, correspondant à une immense complexité [215].

### **1.3.6. Difficultés liés à la paramétrisation**

Dans la plupart des approches existantes, les hétérogénéités locales (du champ de concentration comme de la population microbienne) ne sont pas prises en compte. Il faut convenir que l'étude expérimentale est extrêmement complexe autant dans sa mise en œuvre que dans l'analyse d'hypothétiques résultats [216].

La démarche théorique établie concernant ce type de problématique multi-échelle consiste à modéliser les phénomènes dont les échelles de tailles et de temps se situent en dessous de l'échelle retenue pour la simulation [216].

Il est donc nécessaire de trouver une méthode de transition de la mesure ponctuelle à une valeur globale qui pourrait être utilisée par le modèle. Pour pallier à ces difficultés, plusieurs approches sont proposées dans la littérature [217] :

- S'attaquer à la recherche d'une équivalence entre les paramètres des modèles et les mesures du terrain. On parle alors de paramètres équivalents.
- Utiliser des techniques d'agrégation pour passer de l'échelle locale de la mesure à l'échelle globale.
- Mettre à l'échelle (Scaling) les lois régissant les processus [218].

### **1.3.7. Analyse de sensibilité**

De manière générale, tout problème de physique (thermique, mécanique des fluides ou autres) est traité par le biais d'une équation ou d'un système d'équations différentielles, qui traduisent un lien entre la grandeur d'intérêt  $y$  (ici un scalaire) et la variable de travail  $x$  (le temps ou les variables d'espace), les paramètres  $p$  du modèle (de dimension  $N_p$ ) et les entrées  $X$  du modèle (de dimension  $N_e$ ).

Les paramètres  $p$  sont des grandeurs parfaitement connues pour le modèle étudié. Par contre, les entrées  $X$  du modèle sont a priori "connues" de par leurs tendances moyennes mais leurs valeurs nominales sont liées à une certaine incertitude, fonction du temps ou de l'espace (c'est pour cette raison qu'on les dissocie des paramètres du modèle).



Ces incertitudes liées aux entrées  $X$  du modèle peuvent avoir des conséquences sur la grandeur recherchée  $y$ , en introduisant une incertitude sur la valeur obtenue.

L'analyse de sensibilité (AS) permet d'analyser un modèle mathématique en étudiant l'impact de la variabilité des facteurs d'entrée du modèle sur la variable de sortie. En déterminant les entrées responsables de cette variabilité à l'aide d'indices de sensibilité, l'AS permet de prendre les mesures nécessaires pour diminuer la variance de la sortie si celle-ci est synonyme d'imprécision, ou encore d'alléger le modèle en fixant les entrées dont la variabilité n'influe pas sur les variables de sortie [219].

Globalement, il est possible de grouper les méthodes d'analyse de sensibilité en trois classes : les méthodes de screening, qui consistent en une analyse qualitative de la sensibilité de la variable de sortie aux variables d'entrée, les méthodes d'analyse locale, qui évaluent quantitativement l'impact d'une petite variation autour d'une valeur donnée des entrées, et enfin les méthodes d'analyse de sensibilité globale, qui s'intéressent à la variabilité de la sortie du modèle dans l'intégralité de son domaine de variation [220, 219].

### **1.3.8. Analyse de sensibilité locale**

Une analyse de sensibilité locale mesure la sensibilité des variations de la sortie du modèle (ici  $y$ ) en ne faisant varier qu'une seule variable d'entrée alors que les autres restent fixées à leurs valeurs nominales.

Il convient alors de considérer que de faibles variations pour chacune des composantes de  $X$  (entrées du modèle) sont appliquées. L'analyse de sensibilité locale étudie comment de petites perturbations autour d'une valeur de référence des entrées, influent sur la sortie du modèle. Cette analyse est donc liée à un "point de fonctionnement" particulier (pour des valeurs données de  $X$ ).

L'analyse de sensibilité locale donne une information valable uniquement autour du point nominal  $X^0$  où l'analyse est appliquée. Celle-ci, ne renseigne en rien sur l'influence des paramètres d'entrée sur l'ensemble de leurs domaines de variabilité : ceci est le rôle de l'analyse de sensibilité globale.

Globalement, la méthode locale de décomposition de scénario utilise trois types d'évaluation : des évaluations avec une variation sur un facteur, une évaluation avec l'ensemble des facteurs choqués et des évaluations avec l'ensemble des facteurs choqués sauf un. À l'aide de ces trois types d'évaluations, il est possible de calculer deux types d'indices de sensibilité : un indice du premier ordre qui fait la différence entre la valeur du facteur choqué et la valeur de base et un indice total qui fait la différence entre la valeur choquée sur tous les facteurs et la valeur choquée sauf un. Le premier indice reprend la logique de la méthode OAT tandis que le second mesure l'impact total de la variable en prenant en compte les interactions. Cette méthode tient compte des interactions, mais elle ne mesure pas les effets d'une non-linéarité [221].

La mesure de la non-linéarité est mise en évidence de manière graphique à l'aide du graphique en toile d'araignée qui est une méthode qui cherche à tracer les fonctions de variations marginales pour les différents facteurs; cette méthode n'intègre pas la représentation des interactions entre facteurs [221].

### **1.3.9. Méthodes de screening (Approche de Morris)**

L'approche de Morris est en quelque sorte une généralisation de la méthode OAT sur l'ensemble du domaine de variabilité de chaque variable d'entrée. Cette technique permet d'apporter plus d'informations sur le modèle étudié comparé à l'approche OAT, en permettant de classer (sans quantifier) les entrées selon trois classes [222]:

1. Entrées ayant des effets négligeables.
2. Entrées ayant des effets linéaires et sans interaction avec les autres variables d'entrée.
3. Entrées ayant des effets non linéaires et/ou avec interactions.

### **1.3.10. Applications de l'analyse de sensibilité**

L'analyse de sensibilité peut être utile pour beaucoup d'applications [223] :

1. Test de la robustesse d'un modèle ou d'un système en présence d'incertitude.
2. Une meilleure compréhension des relations entre l'entrée et la sortie des variables dans un modèle donné.
3. La réduction de l'incertitude, à travers l'identification des entrées du modèle qui causent une incertitude importante et devrait donc être le centre de l'attention.
4. La recherche d'erreurs dans le modèle (incohérences inattendue des relations entre les entrées et les sorties du modèle).
5. La simplification des modèles, en fixant les entrées qui n'ont pas d'effet sur la sortie, ou en identifiant et supprimant les parties redondantes dans la structure du modèle.
6. L'amélioration de la communication entre modélisateurs et décideurs (par exemple en formulant des recommandations plus crédibles, compréhensibles, irréfutables ou de persuasion).
7. Identifier des régions dans l'espace des entrées pour lesquelles la sortie du modèle est maximale ou minimale, ou répond à un certain critère d'optimalité (optimisation et méthode de Monte Carlo).
8. Calibration des modèles avec un grand nombre de paramètres. ici l'analyse de sensibilité peut faciliter le réglage des paramètres en se concentrant sur les paramètres sensibles. Sans connaître la sensibilité des paramètres, beaucoup de temps et d'effort peuvent être gaspillés pour ajuster des paramètres peu sensibles [224].
9. Chercher à identifier les liens importants entre les observations, les entrées du modèle, et des prédictions ou des prévisions, conduisant à l'élaboration de meilleurs modèles [225, 226 ].

# **MATERIEL ET METHODES**

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Le sol

Le sol utilisé dans nos expérimentations a été prélevé à partir d'une parcelle nue non cultivée au niveau de la station expérimentale du département des sciences agronomiques de l'université de Blida - 1. Les caractéristiques physicochimiques du sol ont été étudiées durant l'année 2016 au niveau du laboratoire de pédologie du même département [228] (APPENDICE B).

Après séchage et tamisage ( $\phi = 4$  mm). Le sol a été désinfecté par autoclavage (deux autoclavages à 120°C pendant 30 minutes séparées de 24 heures d'intervalle).

### 2.2. Souches bactériennes

Sept souches de *Pseudomonas fluorescens* ont été utilisées dans nos expérimentations (**Tableau 2.1**), il s'agit des souches CHAO, S20, D1, D2, CK4 et pf-10.

La souche S20 a été isolées respectivement à partir de la rhizosphère du palmier dattier dans la région de Ghardaïa et de la rhizosphère de l'abricotier (Mitidja) [229].

La souche D1 de *Pseudomonas fluorescens* et la souche D2 de *Pseudomonas putida* toutes deux originaires de France, sont fréquemment utilisées dans de nombreux travaux portant sur l'étude de leurs aptitudes de biocontrôle et de colonisation rhizosphérique [230].

Les souches CHAO et CK4 sont des souches de références, utilisées dans de nombreux travaux de recherche [128, 185, 230-232].

La souche CHAO se caractérise par sa forte capacité de colonisation rhizosphérique et par la production de divers métabolites secondaires, notamment les pyoverdines, l'H<sub>2</sub>CN et les phénazines [114].

La souche CK4 est un mutant déficient en pyoverdines (pvd-) de la CHAO. Cette dernière est utilisée spécialement, à titre de comparaison, pour étudier l'effet de la synthèse des pyoverdines sur le statut de la compétence rhizosphérique [37].

Pour l'étude de simulation, la souche Pf-10 qui est une autochtone isolée à partir de la rhizosphère du palmier dattier a été étudiée. Cette souche a été caractérisée pour être : (i) résistante à la rifampicine, (ii) solubilisatrice du phosphate, (iii) productrice de l'acide indole-3-acétique, (iv) sidérophore, (v) l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase et du 2,4 diacétylphloroglucinol (DAPG), ce qui fait d'elle une potentielle PGPR, à priori très prometteuse dans le domaine du biocontrôle [91 , 233].

Tableau 2.1: Souches bactériennes.

<b>Souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i></b>	<b>Rhizosphère</b>	<b>provenance</b>	<b>Origine</b>
CHAO et CK4	Tabac	Suisse	Envoi du Pr. Keel (laboratoire de phytomédecine, Zurich) suisse.
D1	Tomate	France	Collection du laboratoire de phytopathologie de l'université de Blida 1.
D2 (PP)	Lin	France	Collection du laboratoire de phytopathologie de l'université de Blida 1.
S20	Palmier dattier	Algérie	Collection du laboratoire de phytopathologie de l'université de Blida 1.
Pf-10	Palmier dattier	Algérie	Collection du laboratoire de phytopathologie de l'université de Blida 1.

La pureté des souches a été vérifiée en réalisant plusieurs repiquages successifs sur le milieu B de King (KB) [234] (Appendice C).

### **2.3. Etude de la compétence rhizosphérique**

L'étude de la compétence rhizosphérique vise à évaluer les potentialités d'adaptation et de colonisation des souches bactériennes au niveau de la rhizosphère. A cet effet, deux essais ont été réalisés en interaction avec des plantes herbacées.

➤ Le premier essai porte sur la mise en évidence de l'effet de la plante sur les aptitudes de trois souches bactérienne à coloniser la rhizosphère. Cette interaction a été réalisée avec trois espèces végétales à savoir : la tomate (*Lycopersicum esculentum* variété Heinz 1370), le blé dur (*Triticum durum* variété waha) et le lin (*Linum usitassinum* variété opaline), en association avec les trois souches bactériennes (D1, D2 et S20) (**Tableau 2.1**).

➤ L'objectif du deuxième essai est la mise en évidence de l'effet de la synthèse des pyoverdines sur la compétence rhizosphérique des souches CHAO, S20 et CK4 (**Tableau 2.1**) en interaction avec des plants de tomate (*Lycopersicum esculentum* variété Heinz 1370).

Ici, le sol utilisé a subi un changement dans la concentration du fer, ou certains microcosmes (représentation à l'échelle du laboratoire des conditions de culture présentes dans un sol naturel carencé en fer par la suite de l'addition d'un chélateur de fer (l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA)) à une concentration de 0.01g / ml, et d'autres microcosmes enrichie en fer par addition du FeCl<sub>3</sub> à teneur de 0.01 g / ml.

#### **2.3.1. Traitements préalable du végétal**

Les espèces végétale utilisées dans les essais relatifs à la compétence rhizosphérique, (tomate, lin et blé dur), ont subi une désinfection par trempage dans l'eau javellisée à 6° pendant 20 minutes, suivi de trois rinçages successifs de 3 minutes chacun dans de l'eau distillé stérile et séchées sur du papier filtre stérile.

### **2.3.2. Microcosme**

Les essais ont été conduits dans des microcosmes conçus selon la description de Latour et al (1997).

Le microcosme se compose de trois parties :

- Un tube à essai d'une dimension de 150 mm x 25 mm, contenant 20 ml d'eau.
- Une seringue stérile d'un volume de 5 ml.
- Une bande de tissu stérile absorbant mesurant 8 cm de long sur 2 Cm de large, insérée partiellement, d'environ 1 cm, à la base de la seringue remplie avec 9 g de sol désinfecté. L'ensemble du dispositif est placée dans le tube à essai.

### **2.3.3. Bactérisation des microcosmes**

Les graines de tomates désinfectées ont été déposées dans un tube contenant 9 g de sol et recouvert immédiatement par 1g du même substrat, pour avoir 10 g de sol dans chaque microcosme.

La suspension bactérienne a été obtenue à partir d'une culture bactérienne âgée de 24 heures, prélevée sur le milieu B de King. La charge bactérienne de la suspension a été évaluée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 580 nm.

La suspension bactérienne a été additionnée aux microcosmes à une concentration de  $10^8$  CFU/ g de sol.

### **2.3.4. Essai de la dynamique des populations bactériennes**

Cet essai a été réalisé selon un dispositif expérimental en randomisation totale avec 12 répétitions pour chaque traitement, comparant l'interaction des deux facteurs.

Facteur 1 : Trois espèces végétales Lin, Tomate et Blé dur.

Facteur 2 : Trois souches bactériennes D1, D2 et S20.



L'étude a été réalisée en deux périodes après 15 et 30 jours de la bactérisation. Les 9 traitements issus de cette l'interaction sont :

- T1, T2, T3 : Plants du lin bactérisés respectivement par les souches D1, D2 et S20.
- T4, T5 et T6 : Plants du blé bactérisés respectivement par les souches D1, D2 et S20.
- T7, T8 et T9 : Plants de tomate bactérisés respectivement par les souches D1, D2 et S20.

### **2.3.5. Essai de l'effet de la synthèse des pyoverdines**

Cet essai a été conduit selon un dispositif expérimental en randomisation totale. Nous avons étudié l'effet de deux facteurs et de leur interaction sur la dynamique des populations bactériennes.

- Le premier facteur concerne la bactérisation représentée par trois niveaux correspondants aux trois souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents : S20, CHAO et CK4.
- Le deuxième facteur concerne les additifs apportés aux microcosmes selon deux niveaux : apport en  $\text{FeCl}_3$  et apport en EDTA.

Au total, nous avons étudié 9 traitements dont 6 traitements bactérisés et amendés et trois traitements témoins avec 12 répétitions par traitement. Ces traitements sont :

- T1, T2 et T3 : Microcosme amendé de  $\text{FeCl}_3$  et bactérisé respectivement par les souches CHAO, CK4 et S20.
- T4, T4 et T6 : Microcosme amendé d'EDTA et bactérisé respectivement par les souches CHAO, CK4 et S20.

A titre de comparaison, les témoins ont été représentés par des microcosmes bactérisés sans addition de  $\text{FeCl}_3$  ou d'EDTA), les trois traitements se représentent comme suit :

- T7 : Microcosme bactérisé par la souche CHAO.
- T8 : Microcosme bactérisé par la souche CK4.
- T9 : Microcosme bactérisé par la souche S20.

L'ensemble des microcosmes ont été déposés dans un phytotron durant 30 jours avec une photopériode de 16 heures à 25 °C.

### **2.3.6 Dénombrement bactérien**

Pour les deux essais, nous avons adopté la même procédure de dénombrement. En premier lieu procéder à la découpe des parties aériennes, au ras du sol contenu dans les microcosmes, avec un scalpel désinfecté, le contenu de la seringue, a été récupéré et mis en suspension dans un Erlen Meyer contenant 90 ml d'eau distillée stérile. Après homogénéisation la suspension obtenue est mixée (mixeur Blender) pendant 5 minutes. 1ml de la mixture est déposé dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile. A partir de cette dilution, une série de dilutions de 10 par 10 a été pratiqué sur les dilutions  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$ , avec 3 répétitions pour chaque dilution.

L'ensemencement a été effectué avec 0.1 ml de chaque dilution, étalé à l'aide de billes en verre, ( $\varnothing$ 2 mm), sur la surface de la boîte de Pétri contenant le milieu King B. L'incubation a été réalisée à 25 °C pendant 24 à 48 heures. Selon le protocole de dénombrement établi au laboratoire d'écologie microbienne et pathologie des sols (UMR-INRA-Dijon-France), seules les boîtes présentant entre 30 et 600 colonies ont été retenues. Le calcul de la concentration bactérienne de la solution mère se fait selon la formule suivante :

$$\text{Concentration de la solution mère} = \frac{\text{Nombre de colonies}}{(\text{Volume} \times \text{dilution})}$$

Les résultats obtenus ont subi une analyse de la variance et la comparaison des moyennes des traitements a été effectuée selon le test de Newman-Keuls au seuil de risque d'erreur de 5% pour déterminer les ensembles homogènes [235].

### **2.3.7. Mesure de la croissance et dosage des sidérophores**

Pour l'étude de simulation, la *Pseudomonas fluorescens* pf-10 a été cultivées pendant 40 heures à 25° C sous agitation (200 tr / min) dans des flacons Erlenmeyer de 500 ml contenant 125 ml du milieu King B à (pH 7).

Pour les mesures de la croissance bactérienne et de la quantité de pyoverdine, des échantillons de 1,4 ml ont été prélevés au début de l'expérimentation ( $T_0$ ), puis à intervalles réguliers d'une heure, pendant toute la période d'incubation.

Les deux paramètres biomasse et teneur en sidérophores ont été déterminées selon la méthode de Meyer et Abdallah (1978). La croissance bactérienne a été estimée par mesure de la turbidité à 600 nm.

La quantité de sidérophore sécrétée dans le milieu de culture a été déterminée en éliminant les débris des cellules bactériennes par centrifugation et en mesurant l'absorbance du surnageant à 400 nm [236].

### **2.4. Chromatographie liquide haute performance (HPLC ; UV-visible)**

Pour confirmer la présence de la pyoverdine, des cultures liquides ont été cultivées pendant 3 jours. Les fractions liquides ont été transférées dans des tubes à essai contenant 40 µl d'une solution de FeCl<sub>3</sub> (1 M). Chaque culture a été agitée pendant 20 minutes et les bactéries ont été éliminées par centrifugation (22 minutes, 10 000 g) et filtration (membrane à pores fins de 0,2 µm). Les analyses HPLC ont été effectuées en milieu de culture filtrée ajustée à pH 5,0 à 5,3 dans une colonne C18 de Nucleosyl (4.6 x 250 mm), utilisant un détecteur spectrophotométrique UV-visible à photodiodes en réseau Waters PDA 996 couvrant une plage de longueur d'onde de détection comprise entre 200 et 500 nm. La détection de la pyoverdine a été réalisée à une longueur d'onde de 403 µm.

Dans cette expérimentation nous avons utilisé une solution tampon de NaOH-acide acétique à 17 mM (pH 5,3). Une injection d'un volume de 20 µL a été utilisée à un flux de 1 ml. min<sup>-1</sup> [237, 238].

### **2.5. Etude *in silico* des pyoverdines**

L'objectif de cette étude est double, en premier lieu, nous voulons interroger la base de données bioinformatiques Genbank, hébergée sur le portail NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), par rapport aux nombreux travaux réalisés sur les aspects phénotypiques et génomiques relatifs aux pyoverdines, notamment ceux spécifiques au groupe des *Pseudomonas* fluorescents. En second lieu, nous voulons connaître, grâce aux analyses comparatives des structures, des gènes codants et éventuellement, des voies de biosynthèse, l'évolution hypothétique des structures des molécules de pyoverdine.

Notre recherche bioinformatique a ciblé des séquences génomiques et protéiques des pyoverdines, spécifiquement portés par *Pseudomonas*, soumises et archivées dans la banque de données NCBI.

### **2.5.1. Souches de *Pseudomonas* et gènes concernés**

Pour les *Pseudomonas*, nous avons ciblé les séquences génomiques des souches de référence, les plus utilisées et les plus fréquemment sollicitées : *Pseudomonas* CHA0 et ses mutants C7R2 et pf10, utilisées dans notre travail en association avec d'autres souches de l'archivage de la banque de données NCBI que nous utilisons à titre comparatif et illustratif.

### **2.5.2. Alignement multiple BLAST**

Les séquences biologiques (gène, ou protéine), sont traitées avec le programme ClustalW, intégré automatiquement dans la base de données NCBI. Ce dernier permet d'introduire les séquences, selon des identifiants (ID), pour la réalisation d'alignements multiples.

Les formats sont homogénéisés et alignés par la méthode basique locale avec BLAST (Basic Local Aligement Search tool). L'objectif étant de rechercher et de trouver, dans la base de données, toutes les vraisemblances de similitudes entre les séquences biologiques introduites et celles constituant la base de données. Les similarités ainsi obtenues sont exprimées après calcul de la signification statistique.

L'algorithme mesure les meilleures identités (score d'alignement) à partir d'un ensemble de séquences (taxons). Par la suite, ce dernier fait ressortir la meilleure paire de séquences ayant le meilleur score d'alignement, puis continue toutes les comparaisons pour finir avec la dernière séquence à inclure dans l'alignement multiple [239]. Ainsi, les séquences les plus identiques sont alignées en premier puis les plus distantes ou les plus divergentes.

L'alignement multiple fait ressortir des zones de fortes similitudes et / ou des zones à faibles similarités. Les premières indiquent une forte conservation des nucléotides (ou des acides aminées) entre les séquences. A contrario, le second cas de figure qui présente des zones à faibles similarités des l'alignement multiple implique l'existence de forts taux de mutations (substitutions ou insertions / délétions) ayant survécu sur/entre les séquences alignées.

Les séquences sont enregistrées sous le format FASTA et introduites en ligne sur le site <https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fastal/>. Cet outil fournit une recherche de similarité de séquences avec des bases de données de protéines à l'aide de la suite de programmes FASTA. Il fournit une recherche heuristique avec une requête sur le domaine des protéines. FASTX et FASTY traduisent une requête ADN. Les recherches optimales sont disponibles avec SSEARCH (local), GGSEARCH (global) et GLSEARCH (requête globale, base de données locale).

### **2.5.3. Construction des arbres phylogénétiques**

Les résultats des alignements sont traités avec le logiciel MEGA. (Version 6.06), téléchargeable sur le site NCBI. Le programme fournit des analyses de l'évolution phylogénétique et moléculaire <http://www.kumarlab.net> [240].

Le programme MEGA est utilisé pour construire les arbres phylogénétiques, en utilisant la méthode des distances du neighbor-joining (NJ). Cette dernière constitue une méthode de construction d'arbres phylogénétiques à partir d'un indice d'écart (distances). Elle est basée sur la recherche d'une paire d'OTU (operational taxonomic units) qui minimisent la longueur totale des branches de l'arbre à chaque phase de regroupement [178, 241, 242].

## **2.6. Présentation du modèle mathématique**

Le modèle utilisé dans la présente étude est dérivé du modèle de Baranyi (1994), ce dernier est très largement utilisé pour sa grande applicabilité à différentes conditions environnementales dynamiques, et pour l'aisance d'interprétation des paramètres biologique constitutifs du modèle [243].

Dans la présente étude, nous considèrerons une variante du modèle de Baranyi qui possède la particularité de prendre en charge la phase de latence (modèle de type *Lag-phase*), issu des travaux de Fgaier et al 2008.

Le système non autonome est construit autour d'équations différentielles ordinaires non linéaires. L'hypothèse sous-jacente à ce modèle est que seule une fraction ( $\alpha$ ) de l'ensemble de la population bactérienne (N) contribue au processus de croissance lorsqu'elle est introduite dans un nouvel environnement, tandis que les cellules restantes adaptent leur état physiologique aux nouvelles conditions [244].

### **2.6.1. Variables du modèle**

La population bactérienne est caractérisée par deux variables d'état à savoir : la taille de la population (N) et son état physiologique, exprimé sous forme d'une fonction  $\alpha(t)$  et la quantité de sidérophore (pyoverdine) qui est modélisé dans le système par sa quantité, donnée par la variable d'état (P).

Ici, la croissance bactérienne est tributaire du niveau de biodisponibilité du fer dans le système et est représentée sous sa forme librement dissoute, dénotée par (S), et liée par des molécules chélatrices, représentée par (Q).

Le modèle de croissance de la population PGPR se représente comme suit :

$$\frac{dN}{dt} = \alpha(t)Nf_1(S) + \alpha(t)Nf_2(Q) \quad \text{Équation 1}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_n} \alpha(t)Nf_1(S) - f_3(S)P \quad \text{Équation 2}$$

$$\frac{dP}{dt} = \alpha(t)Nf_4(S) \frac{dN}{dt} \quad \text{Équation 3}$$

$$\frac{dQ}{dt} = f_3(S)P - \frac{1}{Y_n} \alpha(t)Nf_2(Q) \quad \text{Équation 4}$$

Avec :

$$\frac{d\alpha}{dt} = v\alpha(1 - \alpha) \quad \text{Équation 5}$$

Pour le contrôle de la production en pyoverdine, le modèle utilise les équations de cinétique d'inhibition standard sont utilisés et donné par :

$$\left\{ \begin{array}{l} f_1(S) = \frac{\mu S}{k+S} \\ f_2(Q) = \sigma Q \\ f_3(S) = \beta S \\ f_4(S) = \frac{\delta}{S^\infty+S} \end{array} \right. \quad \text{Équations 6}$$

Tous les paramètres du modèle  $k; \mu; Y_n; \sigma; \beta; \delta; S^\infty$ ; et  $v$  sont positives (Tableau 2.2) [244].

Tableau 2.2 : Valeurs numériques des paramètres et plages utilisées dans les simulations du modèle mathématique [244].

Paramètres	Unités	Valeurs	Plage
<b>k</b>	$\mu\text{M. ml}^{-1}$	1.604	0 – 4
<b><math>\delta</math></b>	$\mu\text{M}$	0.127	0 – 0.13
<b><math>\beta</math></b>	$\text{h}^{-1}/\text{OD}$	0.857	0 – 1
<b><math>\sigma</math></b>	$\text{h}^{-1}/\mu\text{M}$	0.089	0 – 0.9
<b><math>Y_n</math></b>	$\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$	0.329	0 – 1
<b><math>\mu</math></b>	$\text{h}^{-1}$	0.122	0 – 0.5
<b><math>S^\infty</math></b>	$\mu\text{M}$	0.609	0 – 0.7
<b>v</b>	No Unit	0.478	0 – 0.5

Légende :

$Y_n$  : Constante de niveau de croissance, communément appelée facteur de rendement substrat-biomasse, utilisée pour convertir entre le taux de croissance cellulaire et le niveau d'utilisation du substrat.

$\mu$  : Taux ou vitesse de croissance spécifique qui est fonction de la concentration en substrat.

$k$  : Constante d'affinité du micro-organisme qui est donné par la concentration en substrat pour laquelle le taux de croissance spécifique de la population  $\mu_N$  est égal à la moitié du taux spécifique de croissance maximal  $\mu_{N,max}$ .

$S^\infty$  : Niveau de fer déclenchant la synthèse de la pyoverdine.

$\sigma$  : Coefficient lié au phénomène de libération du fer chélaté dans le cytosol.

$v$  : Niveau de récupération de la population PGPR.

### 2.6.2. Calibration du modèle

Afin d'obtenir un bon ajustement entre la solution approximée du modèle et les données assimilées  $N(t_i; \theta) = \hat{N}_i$ ,  $P(t_i; \theta) = \hat{P}_i$ , le problème de calibration du modèle présentement étudié, est formulé sous la forme d'une problématique à résolution inverse par ajustement et optimisation des résultats du modèle aux données expérimentales. Ceci est fait en appliquant la méthode des moindres carrés non linéaires (NLS), dont la fonction objectif est donnée par l'équation suivante [244]:

$$J(\theta) := w \|\hat{N} - N(\theta)\|_N + (1 - w) \|\hat{P} - P(\theta)\|_P \quad \text{Équation 7}$$

Ici, il est nécessaire de minimiser l'équation 8 donnée par :

$$\min_{\theta} J(\theta) = \min_{\theta} w J_1(\theta) + (1 - w) J_2(\theta) \quad \text{Équation 8}$$

Incluant les termes :

$$J_1(\theta) := \|\hat{N} - N(\theta)\|_N = \frac{1}{n_N} \sum_{i=1}^{n_N} (\hat{N}_i - N(t_i^N; \theta))^2 \quad \text{Équation 9}$$

$$J_2(\theta) := \|\hat{P} - P(\theta)\|_P = \frac{1}{n_P} \sum_{i=1}^{n_P} (\hat{P}_i - N(t_i^P; \theta))^2 \quad \text{Équation 10}$$

$w$ , est un poids que nous laissons volontairement libre ou constant à une valeur fixe de 0.5 (Résultats de la présente étude), afin de voir l'effet que peut avoir ce dernier sur les solutions du modèle.



Il est à noter que l'évaluation de la fonction objective  $J(\theta)$ , nécessite la solution numérique du modèle sous-jacent (2 à 6) ; (7) et (8).

Ainsi, pour résoudre le problème scalaire (quantité physique spécifiée par sa grandeur) des moindres carrés (8), nous avons utilisé une approche de résolution séquentielle implémentée dans Matlab 12, en résolvant le problème d'optimisation (8) par utilisation d'un solveur numérique de type rigide (ODE 23s) pour la résolution des équations différentielles sous-jacentes (Appendice F).

### **2.6.3. Représentation de la biomasse microbienne**

Dans le but de fournir plus de points d'entrées au vecteur des données expérimentales qui se sont révélées être denses lors de la phase de croissance initiale et éparpillées par la suite (Contraintes techniques), nous avons procédé à une interpolation linéaire à des pas de temps spécifiques correspondants aux points où nous avons des valeurs expérimentales manquantes.

Aussi et dans le but d'obtenir des représentations réalistes des scénarios de croissance microbienne, des estimations initiales des variables d'état dépendantes et des paramètres du modèle ont été générées par la méthode de l'hypercube latin (fonction Matlab : LHSDESIGN). Ainsi, nous avons généré 10.000 vecteurs aléatoires ( $\theta$ ), dans lesquels les valeurs de paramètres ont été échantillonnées indépendamment les uns par rapport aux autres chacun à l'intérieur de son intervalle respective (**Tableau 2.2**). Cette méthode garantit une couverture complète de l'étendue de chaque variable car elle consiste à répartir l'aire de chaque distribution théorique en  $N$  intervalles ( $N =$  nombre d'échantillons) et tire au hasard un échantillon dans chaque intervalle.

Pour les concentrations de biomasse microbienne initiale, nous avons pris  $N$  égale à 0,05 OD ; une teneur initiale en pyoverdine (P) de 0,001 OD ; une concentration initiale en substrat primaire (fer,  $\text{Fe}^{2+}$ ) notée par (S) de 100  $\mu\text{M}$  et une quantité initiale de fer chélaté (Q) de 0  $\mu\text{M}$  (**Tableau 2.2**).

Chaque simulation a couvert un intervalle de temps s'étendant virtuellement sur deux journées après la date de l'inoculation.

Pour la mesure de la qualité d'ajustement du modèle, Un coefficient de régression non linéaire a été calculé en utilisant les équations suivantes : [245].

$$R_N^2 = \frac{SSR_N}{SST_N} = 1 - \frac{SSE_N}{SST_N} \quad \text{Équation 11}$$

Ici,  $SSE_N$  Donne une mesure de la déviation entre la solution du model par rapport aux mesures prises des données expérimentales pour N.

$$SSE_N = \sum_{i=1}^{n_N} (\hat{N}_i - \hat{N}(t_i^N; \theta_w^*))^2 \quad \text{Équation 12}$$

$SST_N$  donnent le terme qui mesure la variation des données expérimentales.

$$SST_N = \sum_{i=1}^{n_N} (\hat{N}_i - \bar{N})^2 \quad \text{Équation 13}$$

$\bar{N}$  , est la moyenne des données  $N_i$ . Une définition analogue est faite pour  $R_p^2$ . Ainsi, la statistique  $R^2$  est le carré de la valeur du coefficient de corrélation (Coefficient de détermination) liant les valeurs expérimentales observées et les valeurs prédites du modèle. Ici, plus la valeur du  $R_{N,p}^2$  est proche de 1, meilleur est l'ajustement [246].

#### **2.6.4. Estimations de l'incertitude des paramètres**

L'analyse postérieure des modèles calibrés est une étape importante. De ce fait, les intervalles de confiance des prédictions du modèle sont calculés, ainsi que les diagrammes de dispersion des résiduelles pour (N) et (P).

Les intervalles de confiance (95 et 99% ;  $\alpha = 0,05$  et  $0,01$ ) pour les différents paramètres ont été définis en utilisant la distribution t. La formule utilisée à cet effet se représente comme suit :

$$\bar{X} \pm t_{\alpha/2} \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad \text{Équation 14}$$

Ici,  $\bar{X}$  est la moyenne de l'échantillon,  $n$  la taille de l'échantillon,  $SD$  est l'écart type de l'échantillon, et  $t_{\alpha/2}$  est la valeur  $t$  avec une aire  $\alpha/2$  à sa droite [247].

### 2.6.5. Analyse de sensibilité

A l'issue du processus d'optimisation qui a permis de calibrer le modèle aux données assimilées, nous avons procédé à une analyse de sensibilité locale "Un paramètre à la fois ; One factor At a Time" aux alentours du vecteur optimal  $\theta_w^*$ .

Cette analyse consiste en la variation individuelle de chaque un des (08) paramètres du vecteur  $\theta_w^*$  par un facteur de  $\pm 10$  &  $20$  % de sa valeur nominale, dans le but de la mise en évidence de l'effet de ces derniers sur les quatre (04) sorties du modèle, et ce pour tout le long de la période de croissance.

De plus, nous avons procédé à une étude de la robustesse du modèle en procédant à une analyse de sensibilité par randomisation extensive des paramètres du modèle afin d'étudier l'importance et l'effet que pouvait avoir chaque paramètre sur le comportement du système.

A cet effet, nous avons calculé les sensibilités locales relatives (indices de sensibilité)  $S_i(t)$  aux instants  $t$  (41 points temporels discrétisés en sous-intervalles de 1 h, couvrant un temps virtuel de simulation de presque deux jours), définis par des dérivées partielles selon la définition standard de Mitrophanov et al (2007).

$$S_i = \left( \frac{\partial y(t)}{\partial X_i} \right) \Big|_{x = x^0} \quad \text{Équation 15}$$

Ici,  $y(t)$  est la  $i^{\text{ème}}$  variable du modèle,  $X_i$  est le  $j^{\text{ème}}$  paramètre du modèle (Un des 8 paramètres principaux du modèle) et  $S_i$  exprime l'effet sur  $y$  d'une perturbation de la variable d'entrée  $X_i$  autour d'un point de fonctionnement  $x^0$  [248].

L'indice de sensibilité  $S_i$ , défini par la fonction (16), n'est pas une grandeur normée ce qui rend impossible la comparaison de plusieurs indices de sensibilité issus de grandeurs physiques qui ne sont pas exprimés par les mêmes unités de mesure. De plus, nous avons utilisé les valeurs absolues des indices de sensibilités pour la comparaison et le classement des rangs de paramètres.

Ainsi, le calcul d'un indice de sensibilité normé est donné par,

$$S_i = \left( \frac{x_i^0}{y^0} \frac{\partial y}{\partial x_i} \Big|_{x = x^0} \right) \quad \text{Équation 16}$$

Où,  $y^0$  est la valeur de sortie du modèle obtenue pour le vecteur  $x^0$  comme variables d'entrée. Globalement, plus la valeur de l'indice de sensibilité est importante, plus le paramètre d'entrée étudié a une influence sur la sortie du modèle.

L'analyse de sensibilité locale au voisinage du jeu de paramètres par défaut, ainsi que l'analyse de robustesse du modèle simulé avec un ensemble de 10.000 vecteurs pseudo-aléatoires (Echantillonnage en hyper cube latin) ou chacun des paramètres a été échantillonné indépendamment de son intervalle respective avec des déviations doublement supérieures ou inférieures aux valeurs par défaut. Cela a été faite de manière à représenter autant que possible les variations naturelles pouvant survenir dans l'environnement de croissance (différents scénarios de culture) [248].

**RESULTATS  
ET  
DISCUSSIONS**

### 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

#### 3.1. Compétence rhizosphérique

Au terme de la période d'incubation, les boîtes de Pétri présentant entre 30 à 600 colonies sont sélectionnées pour le comptage du nombre de colonies

##### 3.1.1. Effet de la plante hôte

Les résultats obtenus à partir des différents microcosmes (blé, lin et tomate) (Appendice D), révèlent une nette évolution des populations bactériennes par rapport aux densités bactériennes introduites initialement ( $10^8$  CFU/ g de sol). En effet après 15 jours (P1), les densités de population enregistrées été très élevées et ont atteint jusqu'à  $10^9$  à  $10^{11}$  CFU/ g de sol pour les trois souches bactériennes.

A la deuxième période (P2), après 30 jours du semis, il a été constaté une légère diminution des densités bactériennes, lorsqu'on les compare à ceux enregistrées lors de la première période (P1). Ces densités restent nettement plus importantes comparées à la densité initialement apportée dans les microcosmes (**Figure 3.1**).

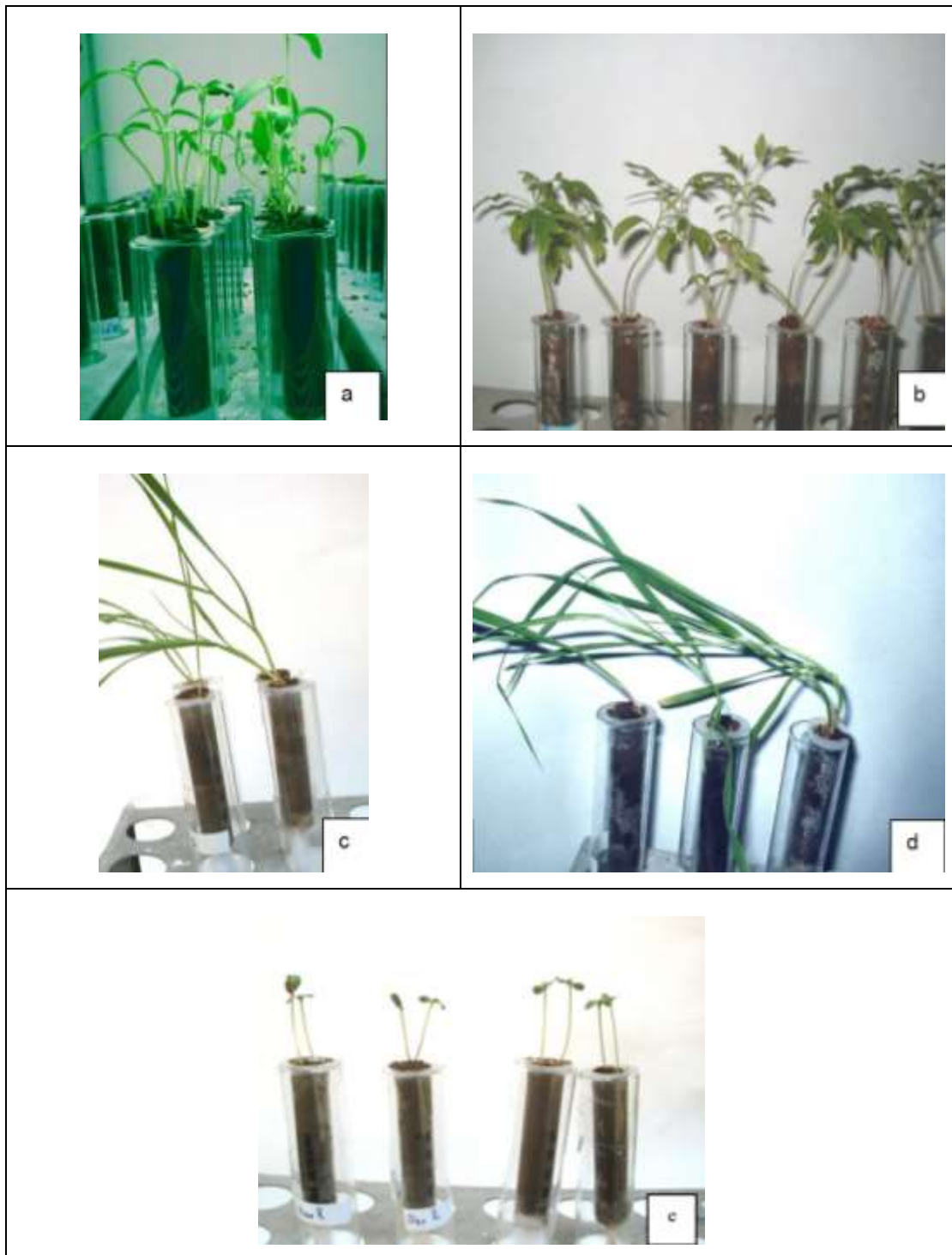


Figure 3.1 : Croissance des plantes dans les microcosmes.

Légende :

- (a) et (b) : Tomate, après 15 et 30 jours ; (c) et (d) : Blé après 15 jours 30 jours ; (e) : lin après 15 jours.

Les dénombrements effectués après 15 jours de la bactérisation (P1) révèlent une évolution des populations bactériennes que l'on peut subdiviser en trois

groupes homogènes distincts (a, b, c), selon le test de Newman-Keuls au seuil du risque  $\alpha = 5\%$ .

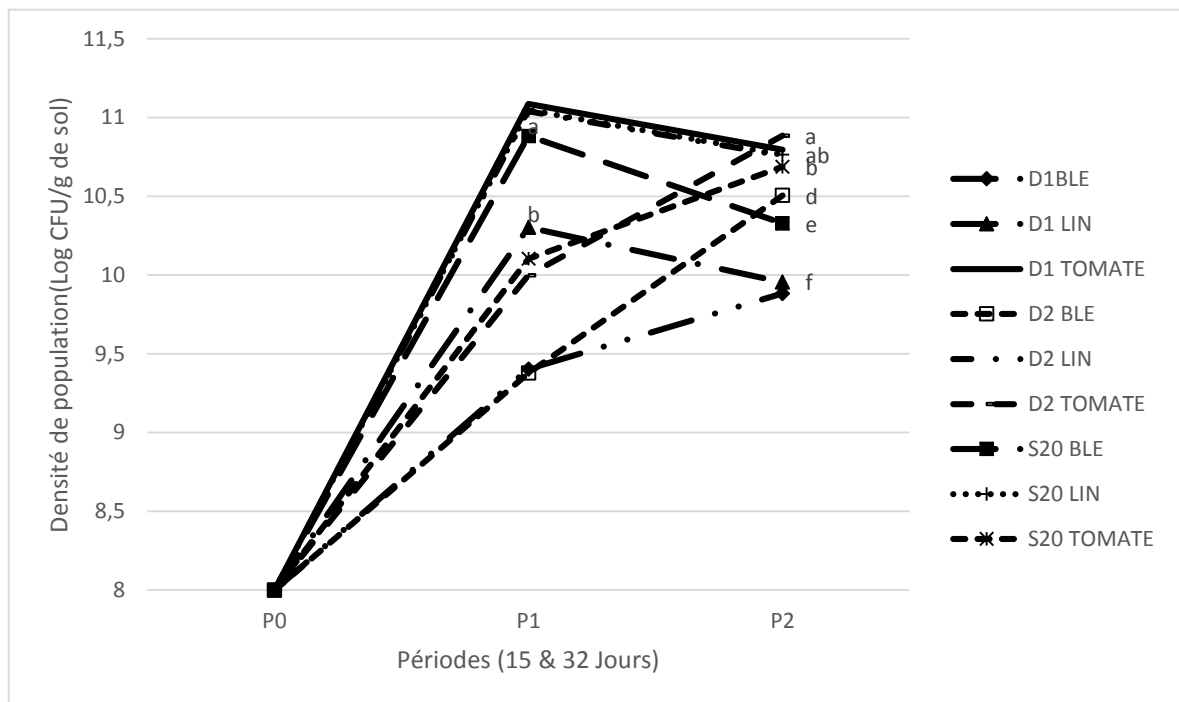


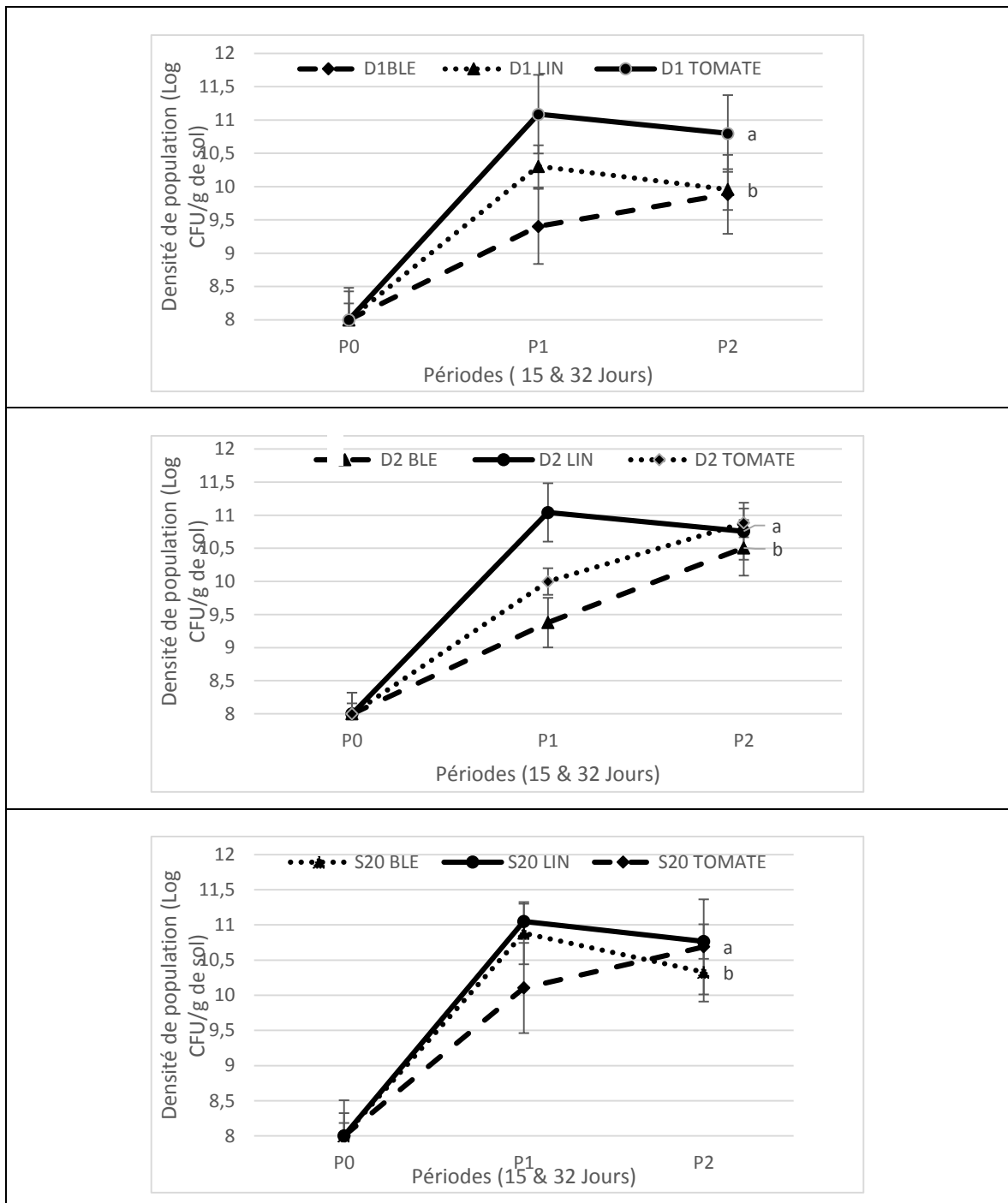
Figure 3.2 : Evolution des populations bactériennes en fonction du temps dans les microcosmes des trois plantes.

- Les interactions (D1- tomate, D2 – lin, S20 – blé et S20 – lin), formant le groupe (a), ont montré les niveaux de colonisation les plus élevés, avec des concentrations avoisinant  $10^{11}$  CFU/ g de sol.
- Concernant le groupe homogène (b), celui-ci regroupe les traitements (D1 - lin, D2 - tomate et S20 – tomate) avec des concentrations bactériennes enregistrées avoisinant les  $10^{10}$  CFU/ g de sol.
- Le dernier groupe homogène (c), a exhibé des concentrations proche de  $10^9$  CFU / g de sol, et regroupe les traitements D1 et D2 en interaction avec le blé.

Il est constaté qu'après 30 jours de la bactérisation des microcosmes (P2), il se produit une légère diminution des concentrations bactériennes par rapport à la première période, et ce, pour la totalité des traitements étudiés. Aussi, il a été observé que de légères baisses dans les tailles des populations bactériennes pour le cas des souches D1 et D2 en interaction respective avec les plantes de la tomate



et du lin où nous avons enregistré des diminutions de l'ordre de :  $1.32. 10^{11}$  à  $6.27.10^{10}$  CFU/ml et  $1.10.10^{10}$  à  $5.73.10^{10}$  CFU/ml (**Figure 3.3**).



**Figure 3.3** : Evolution des niveaux de populations bactériennes en fonction du temps.

P0 : Au moment de l'inoculation des microcosmes.

P1 : Première période, 15 jours après inoculation des microcosmes.

P2 : Deuxième période, 30 jours après inoculation des microcosmes.

D1, D2 et S20 : souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

### 3.1.2 Effet de la synthèse de pyoverdines

Le dénombrement effectué sur les microcosmes ayant subis un changement dans la concentration en fer (Appendices D), révèle que les densités bactériennes des souches étudiées ont plus ou moins, évoluées positivement dans le temps pour l'ensemble des traitements, si ces derniers sont comparés à leurs témoins respectifs.

Après 15 jours de la bactérisation, les isoléments effectués ont révélé une augmentation assez importante des niveaux de populations par rapport aux densités initiales (**Figure 3.4**). Globalement, la plus forte progression a été enregistrée avec les plantules bactérisées par la souche CHAO et les traitements TCHAO-Fe, TCHAO-EDTA et TCHAO, qui constituent, un seul et unique, groupe homogène (a) avec une densité de population fluctuant aux alentours de  $10^{11}$  CFU /g de sol.

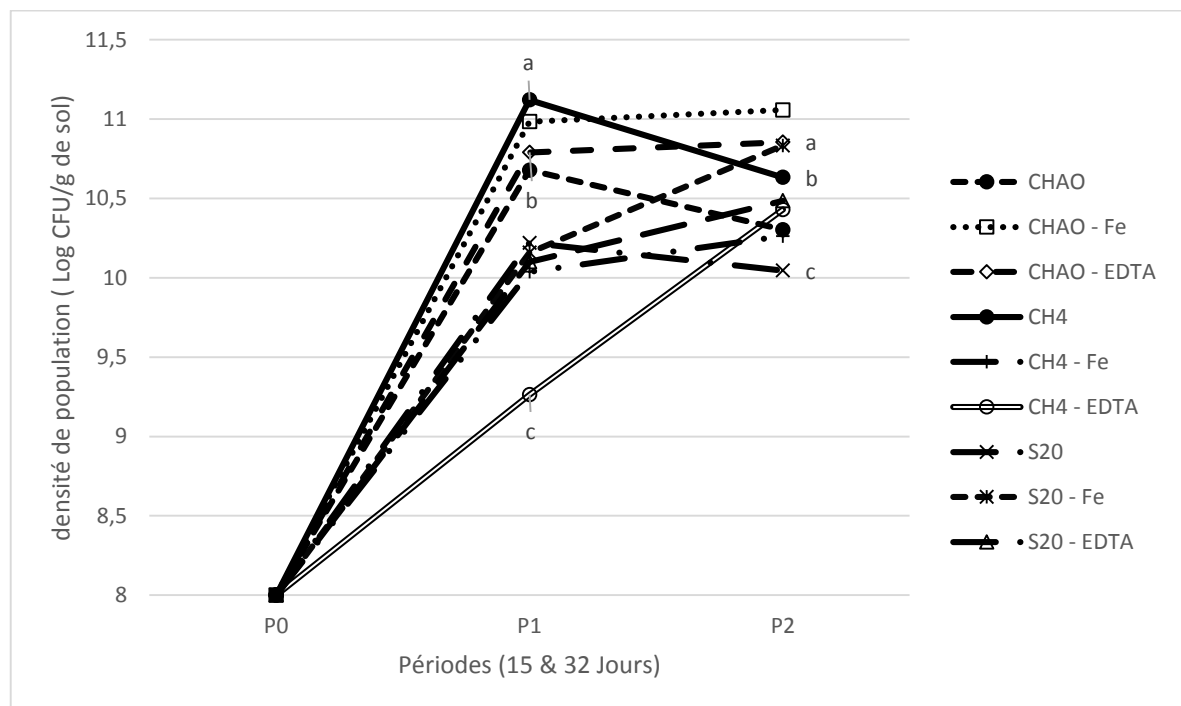
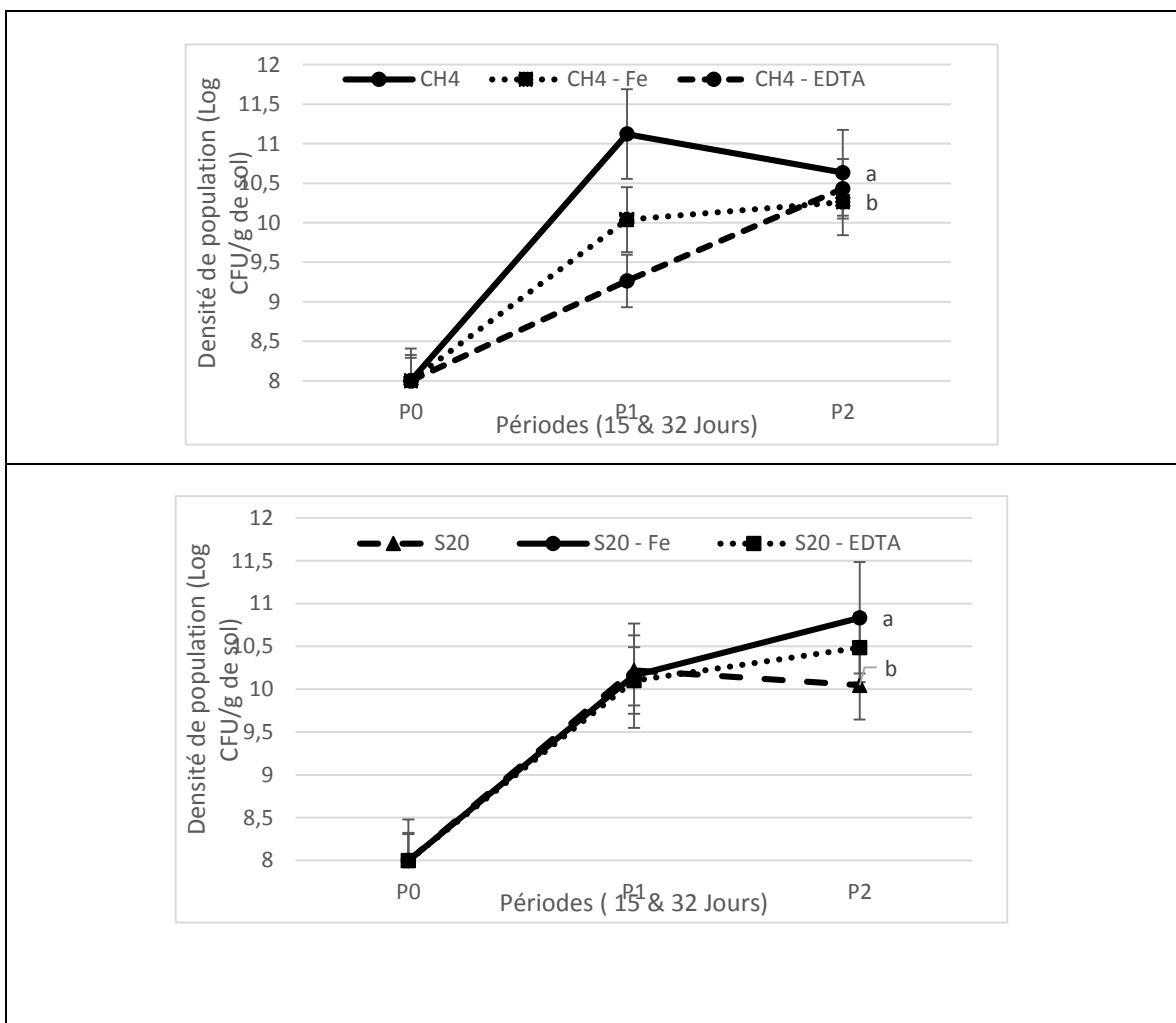


Figure 3.4: Evolution des niveaux de populations bactériennes en fonction du temps ; \* : Les traitements avec la même lettre ne présentent pas de différence au seuil  $\alpha = 5\%$ .

## Résultats et discussions

Les dénombrements effectués après 32 jours de la bactérisation, ne montrent pas une variation notable par rapport aux résultats obtenus après 15 jours de croissance.

Dans cet essai, les baisses les plus notables concernent les traitements TCHAO où la densité de population a diminué de  $1.48 \times 10^{11}$  à  $3.03 \times 10^{10}$  CFU/g de sol. A contrario, les traitements TCK4 - EDTA et TS20-Fe ont enregistré quant à eux une nette augmentation passant respectivement de  $1.83 \times 10^9$  à  $1.62 \times 10^{10}$  et de  $1.36 \times 10^{10}$  à  $5.94 \times 10^{10}$  CFU/g de sol.



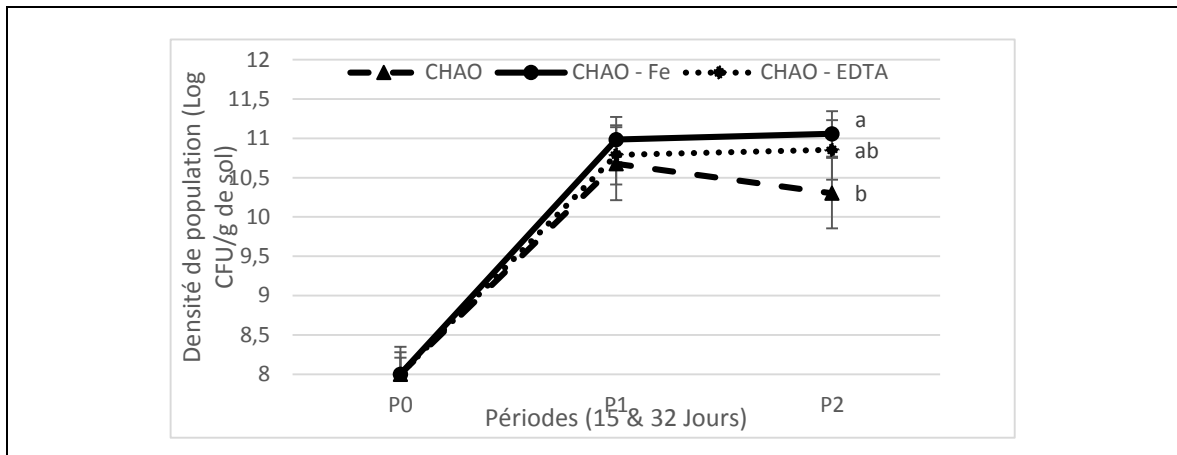


Figure 3.5 : Evolution des niveaux de populations bactériennes en fonction du temps.\* : les traitements avec la même lettre ne présentent pas de différence au seuil  $\alpha=5\%$ .

P0 : Au moment de l'inoculation des microcosmes.

P1 : Première période, 15 jours après inoculation des microcosmes.

P2 : Deuxième période, 30 jours après inoculation des microcosmes.

CHAO, CH4 et S20 : Souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Fe : Fer ; EDTA (Acide éthylène diamine tétra acétique).

### 3.1.3. Discussion

Les dénombrements effectués dans les microcosmes ont révélé une bonne aptitude de colonisation des systèmes racinaires, se traduisant par une compétence rhizosphérique appréciable des différentes souches bactériennes étudiés.

Généralement, la comparaison des niveaux de variations enregistrées lors des deux périodes de dénombrements (P1 = 15 jours & P2 = 30 jours) par rapport aux inocula initialement apportés à (P0), a clairement démontré que les souches bactériennes étaient beaucoup plus actives entre la période s'étalant de (P0) à (P1). Durant la deuxième période de croissance (P1 à P2), nous avons relevé que les densités de population de ces souches étaient plafonnées par le haut (plateau de croissance maximal). Hypothétiquement, ce seuil ne peut être dépassé, du fait qu'il s'agit d'un seuil maximal probablement prédéfini par les potentialités génétiques de chacune des souches et des contraintes abiotiques de croissance.

Chez le groupe des *Pseudomonas* ssp. *fluorescents*, la compétence rhizosphérique est le résultat d'une somme de traits physiologiques sous dépendance génétique permettant de : (i) croître rapidement et être produite, en masse sur milieu de culture artificiel; (ii) métaboliser rapidement le contenu des

exsudats racinaires; (iii) se multiplier et coloniser l'environnement rhizosphérique et la spermosphère ; (iv) conférer le caractère suppressif à certains sols; (v) produire un large spectre de métabolites bioactives; (vi) être agressive en tant que compétiteur de la microflore indigène; et en fin (vii) s'adapter à des environnements stressants (hautes températures, dessiccation, exposition aux formes actives d'oxygène, forte osmolarité, faible taux de matière organique, etc...) [249-255].

Etant donné que selon les travaux de Scher et al (1984), le seuil de  $5.10^3$  CFU / g de sol constituerait un bon indice de la réussite de la colonisation racinaire et ce quelle que soit la souche étudiée ou l'origine rhizosphérique dont elle est issue. Il a été constaté que l'ensemble des souches que nous avons étudié (lin, tomate ou palmier dattier) ont montré une bonne capacité d'adaptation aux différents environnements rhizosphériques, en exhibant des densités de population d'environ  $10^{11}$  CFU / g de sol. Ceci traduit une activité intense des PGPR dans les microhabitats dont ils ont été dénombrés.

Globalement, il a été constaté que la forte aptitude de colonisation des souches D1, D2 et S20, pour la colonisation de la rhizosphère du lin et de la tomate a été plus importante que celle relevé dans la rhizosphère du blé. Ceci peut s'expliquer par le fait que les plantules de lin et de tomate exercent un effet rhizosphérique plus important que celui exprimé dans la rhizosphère du blé.

Aussi, la nature qualitative et quantitative de la matière organique exsudée (rhizodépôts) dans la rhizosphère, associé au type d'espèce végétale considéré (caractéristiques des racines, durée de vie, anatomie, morphologie, composition chimique) et à la nature du sol cultivé, peuvent avoir joué un rôle prépondérant dans cet écart de niveau de colonisation racinaire. En effet, l'action plante et type de sol (caractéristiques pédologiques) ont été avancés comme déterminants dans la dynamique des populations bactériennes [230, 256-258].

Un autre facteur liée aux conditions de croissance de la souche pouvant expliquer ces densités de populations élevées, est la composition des milieux de culture utilisés en laboratoire pour préparer les inoculas. Selon Baysse et al (2000). Les milieux de culture ont des effets significatifs sur le potentiel des souches de *P. fluorescens*. Ainsi, l'exposition des souches bactériennes au stress oxydatif en

milieux artificiels en boîtes de Pétri, est similaire à l'action qu'exerce les anions super oxyde et peroxyde d'hydrogène générés par la peroxydase membranaire des racines sur les parois bactériennes.

Aussi, il a été démontré l'existence d'une relation entre le potentiel de colonisation des souches bactériennes cultivées *in vitro*, et l'osmotolérance qui confère aux bactéries colonisatrices du système racinaire la capacité de persister et de coloniser efficacement le rhizoplan [29]. De ce fait et étant donné que nous n'avons pas utilisé des d'antioxydants ou autres pièges à radicaux libres dans nos cultures, il se pourrait que nos inoculas aient été positivement stimulés en adaptant leurs physiologie à leur nouvel environnement sans pour autant avoir perdu leur capacité de former des colonies. Cette caractéristique est considérée comme étant un événement extrême survenant à la suite d'une exposition des souches à un stress oxydatif violent dans les boîtes de Pétri [28, 259].

Concernant la deuxième partie de cette étude, portant sur les amendements apportés au sol contenu dans certains microcosmes, il semblerait que dans certains cas, ces derniers aient affecté la dynamique des populations bactériennes. Plus spécifiquement, dans le cas de la souche CHAO, où l'addition du fer et de l'EDTA a engendré des variations significatives par rapport au sol naturel (Témoin).

Cette variabilité a été importante dans les 15 premiers jours qui ont suivi la bactérisation, où les différents traitements ont eu approximativement le même comportement comparé au témoin ; signe d'une adaptation rapide aux conditions du milieu. Après 32 jours de culture, le traitement ( $T_{\text{CHAO-Fe}}$ ) a affiché une stabilité remarquable de la souche étant donné la grande disponibilité des éléments nutritifs essentiels à sa croissance, combiné à l'absence de tout autre concurrent dans le sol.

Pour le traitement ( $T_{\text{CHAO-EDTA}}$ ), la souche bactérienne a pu tant bien que mal s'adapter et survivre à une carence en fer via la sécrétion probable de sidérophores qui ont permis la chélation du fer, le rendant ainsi facilement accessible à la cellule bactérienne. Néanmoins les concentrations obtenues témoignent d'une bonne

colonisation rhizosphérique qui reste, quel que soit le traitement, aux alentours de  $10^{10}$  CFU / g de sol ; ce qui dénote une forte colonisation.

L'adaptation forcée, peut s'expliquer par la mise en jeu de plusieurs autres caractéristiques génotypiques relatives aux profils trophiques ainsi qu'à la production de métabolites analogues ou similaires, qui peuvent compenser la déficience en production de pyoverdines.

Selon les travaux réalisés par Mossialos et al (2000), sur des mutants de *Pseudomonas fluorescens* déficients en pyoverdines, plusieurs souches ont pu survivre à des milieux carencés en fer via la production d'un autre type de sidérophore, par activation d'une voie de biosynthèse alternative aboutissant à la production de la quinolobactine qui possède néanmoins une affinité moindre au fer.

Par ailleurs, Duffy et Défago (2000), ont démontré que des mutants de la souche CHAO produisaient en cas de carence en fer, dix (10) fois plus de pyochéline que la souche sauvage, comme réponse adaptative au changement.

Pour la souche CK4, mutant déficient en pyoverdine, cette dernière semble elle aussi avoir le potentiel de sécréter d'autres types de sidérophores autre que les pyoverdines étant donné la bonne adaptation de ce mutant déficient aux milieux contenant des chélateurs de fer.

Dans le cas des autres traitements associés à la souche S20, nous constatons une variabilité significative des niveaux de population en présence du fer et d'EDTA. Globalement, les concentrations bactériennes respectives ont positivement évolué en présence du fer et sont restées stationnaires lorsqu'on les compare au témoin dans le cas où nous avons additionné l'EDTA (sol naturel).

En fin, il semblerait que la production de sidérophores soit négativement corrélée avec la croissance bactérienne. Ainsi, dans les milieux de cultures amendées en fer, nous observons une baisse de la production de sidérophore en faveur du niveau de croissance. Bien au contraire, nous observons l'effet inverse dans des milieux de cultures pauvres en fer. Cet état indique que la production de sidérophores est régulée par la biodisponibilité du fer dans l'environnement qui rappelons-le est faiblement soluble en solution aqueuse ( $\text{Fe}^{3+}$  à pH 7,  $10^{-18}$   $\mu\text{M}$ ) et

participe de nombreux processus métaboliques tel que : le cycle de Krebs, le transport des électrons et des acides aminés, la biosynthèse des pyrimidines, la synthèse de l'ADN, et d'autres fonctions physiologiques essentielles en relation avec le transport membranaire [260].

### **3.2.1. Siderotypage**

Les extraits actifs des différents isolats ont fait l'objet d'une analyse par HPLC qui a donné différents profils d'absorbances entre 200 et 400 nm (Figure 3.6). Comparé au profil de la souche de référence CHAO qui présente quatre pics d'absorbance (220, 265, 365 et 385 nm), les profils issus des isolats appartenants aux souches S20 et pf-10 sont les plus apparentés avec des couples respectifs de longueur d'onde d'absorbance/absorbance de l'ordre de (205/10, 215/4, 260/0.764, 385/0.178 et 205/3.59, 215,10, 255/1.5, 400/0.55 mAU) ; ces profils d'absorbance UV-visible demeurent être relativement similaires.

Les souches (D2 et CH4) et la souche D1 ont respectivement présenté deux et un pic d'absorbance correspondant a (210/4.4, 26/0.718 ; 205/10, 215,10 et 210/10 mAU) ; les deux souches D1 et D2 semblent être apparentés aux deux souches CHAO et S20 et la souche CK4, mutant de la CHAO déficient en pyoverdines qui semble exhiber un profil apparenté à la souche pf-10.



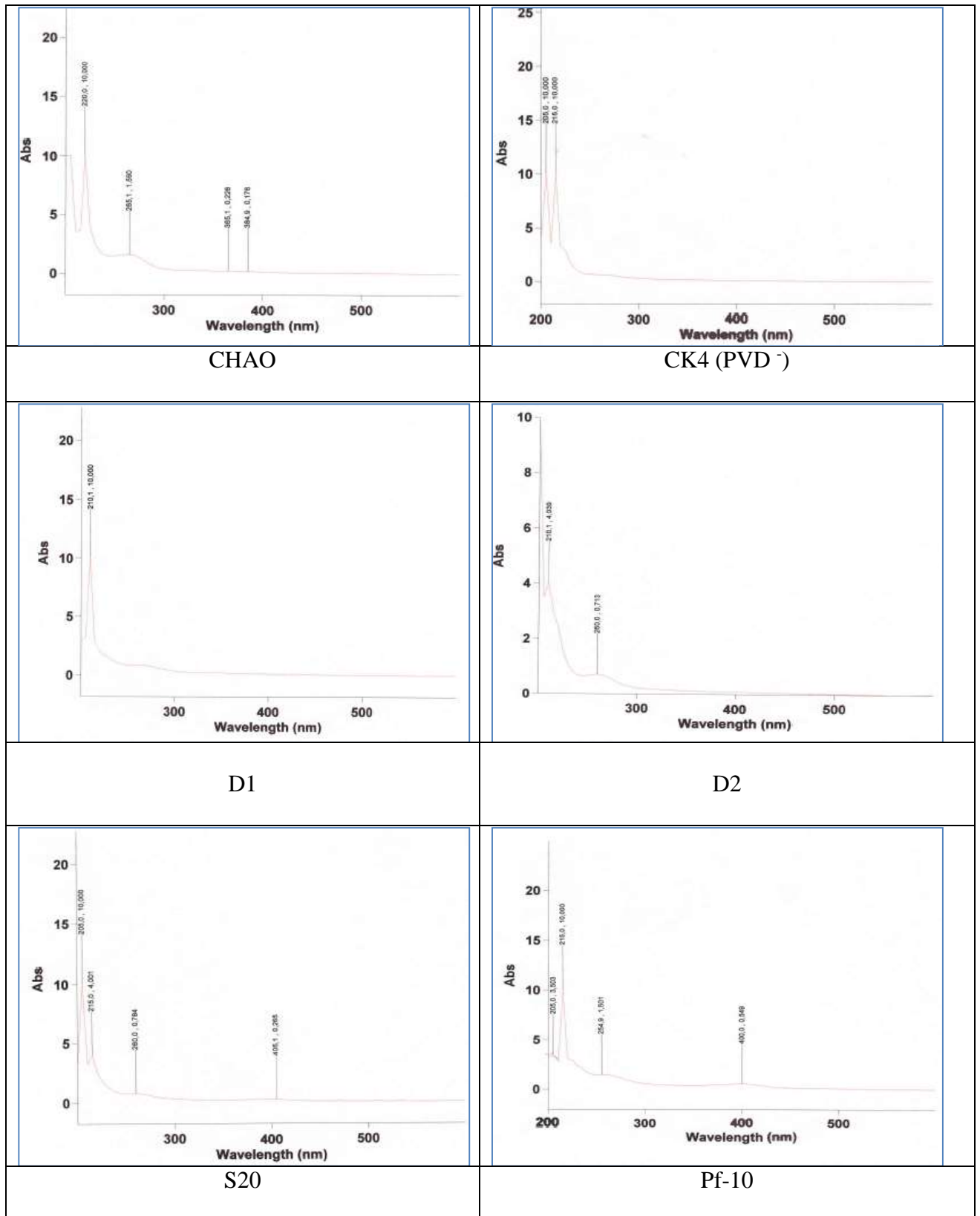


Figure 3.6: Profils UV-Visible des extraits actifs des souches de *Pseudomonas*..

### 3.2.2 Discussion

L'analyse par HPLC des extraits actifs, nous a permis de confirmer la présence de la pyoverdine dans les différents milieux réactionnels. La comparaison des profils d'absorbance UV-visible par rapport à celui de la souche type de *P. fluorescens* CHA0 (souche de référence), indique la présence de différentes formes de pyoverdines atypiques. Cette grande variabilité des pyoverdines, est fonction des valeurs des constante  $K_{FeIII}$ , qui indiquent des capacités différentes en terme de potentialités de chélation du fer [261, 655].

Les pyoverdines atypiques associés au Fe (III) sont davantage influencées par la composition des chaînes peptidiques que leurs homologues typiques. Dans ce contexte, l'étude de la chaîne peptidique (séquence et nature des acides aminés) impliqués dans le processus de chélation du fer et des voies évolutives des pyoverdines pourrait être utile. Ainsi, il est possible d'utiliser ces caractéristiques comme marqueurs utiles, surtout qu'il est de plus en plus difficile de trouver des caractéristiques phénotypiques corroborant les résultats issus d'études taxonomiques et phylogéniques complexes [262].

Le choix de ce type de marqueurs est motivé par le fait que les pyoverdines sont produits à l'issue du déroulement de processus enzymatiques hautement spécifiques, où les ligands de liaison au fer sont synthétisés à l'aide de la peptide synthétase par la voie unique de l'ornithine ou de l'asparagine [263].

Cette caractéristique pourrait expliquer la conservation relative des acides aminés et refléter la manière dont les pyoverdines évoluent au fil du temps. De cette manière, les souches qui produisent des pyoverdines avec la même chaîne peptidique seraient regroupées en siderovars, ce qui est déjà le cas chez les *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* qui comptent respectivement 19 et 13 siderovars [264].

La comparaison de la stabilité des phytosidérophores, généralement synthétisées à partir de l'acide mugineique et qui possède une constante de stabilité  $K_{FeIII}$  d'environ 20, fait que les sidérophores bactériens sont plus stables et possèdent des valeurs de  $K_{FeIII}$  variant entre 19 à 52 [265, 266].

Le sidérotypage est à recommander dans le cadre du processus d'identification des souches appartenant au genre des *Pseudomonas*. Cependant, l'utilisation des tests spectrophotométriques ne permettent pas de déterminer avec exactitude le type de pyoverdine à qui nous avons affaire, en raison de la production simultanée de sous-produits métaboliques, ou de précurseurs de la pyoverdine. Ces derniers sont également absorbés aux alentours de 400 nm. Ainsi, en fonction de leur concentration ces derniers peuvent biaiser les analyses et fausser les mesures. Si on cite que cet exemple, l'action du pH basique, dégrade chimiquement l'isoforme de la pyoverdine succinamide en acide succinique ou des composés autres que les pyoverdines dans les surnageants lesquels affectent le gradient du pH [236].

Ainsi, il est recommandé de pratiquer des spectroscopies de masse (MS) par piège à ions (outil rapide et précis pour la caractérisation des pyoverdines). Cette procédure permet de déterminer sans ambiguïté l'identité des pyoverdines connues ou inconnues sur la base de leurs extraits en phase solide. Ici, les pyoverdines identiques en terme de profil de migration iso-électrophorétique et de capacité d'absorption du fer, sont prouvées être de la même structure, bien qu'ils soient produits par des souches génétiquement distantes, à l'exemple de *P. viridiflava* et les pathovars distants de *P. syringae* qui produisent des pyoverdines atypiques identiques [267].

Enfin, la stimulation de la croissance induite par les PVD, est certainement la plus rapide des méthodes de sidérotypage, vu qu'elles nécessitent moins de 10 h pour une grande majorité de souches. Cependant, en raison de la possibilité de présence de systèmes supplémentaires d'absorption du fer inductibles par la PVD, il est conseillé de confirmer les résultats d'analyse par l'application d'une autre méthode d'identification tel que l'analyse d'HPLC couplé à la spectroscopie de masse qui peut être utilisée, même chez des espèces considérées à présent comme représentées par un seul siderovar. Cette approche a montré un potentiel de diagnostic supérieur à celui de toutes les autres méthodes : visuelles, spectrophotométriques, profils de migration iso-électrophorétiques ou d'immunodétection [191].

### 3.3.1. Analyse phylogénétique *in silico*

Au vu des connaissances actuelles sur la taxonomie des organismes vivants capables de synthétiser les pyoverdines, la base de données NCBI (National Center of Biotechnology Information ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), donne une organisation taxonomique hiérarchisée en groupes de taxons où nous distinguons une grande diversité d'organismes vivants. Il est constaté que plus de 206 taxons eucaryotiques, ajoutés aux taxons fongiques avec plus de 500 entités confondues, comprises entre les ascomycètes qui contiennent 186 représentants et 31 membres appartenant aux Saccharomycétales (Figure 3.7).

Egalement, les pyoverdines sont retrouvées chez les oomycétales et d'autres classes fongiques, ainsi que les plantes vertes et les protozoaires (Figure 3.7).



Figure 3.7: Groupes taxonomiques capables de synthétiser les pyoverdines. (NCBI : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=PYOVERDINES>)

Chez les procaryotes, des milliers d'organismes bactériens arborent les séquences génomiques responsables de la synthèse de pyoverdines, notamment les espèces appartenant au  $\gamma$ -proteobacteria où on recense plus de 6648 espèces :

Bacteria (6650).

proteobacteria (6648).

- $\gamma$ -proteobacteria (6641).
- $\beta$ -proteobacteria (4).
- $\alpha$ -proteobacteria (1).
- actinobacteria (2).

### **3.3.2. Phylogénie des *Pseudomonas* en fonction de la capacité de synthèse des pyoverdines**

Le cladogramme (Figure 3.8) montre que pratiquement toutes les espèces apparentées au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents sont dans le même clade, avec des distances minimales voire presque similaires entre les *P. fluorescens*, dont fait partie notre souche CHA0 et *P. proteogenes*. Le séquençage des génomes de ces espèces est presque identique. De courtes distances sont observées lorsqu'on compare les espèces entre elles.

*P. cetronellosis* et *P. enzymogenes*, sont écologiquement différentes par rapport au groupe des *P. fluorescents* (Figure 3.8). Dans le groupe des *P. fluorescents*, les espèces de *P. chlororaphis* et *P. proteogenes*, démontrant, de faibles distances dénotant de grandes similitudes génomiques, et ce, même si elles sont positionnées par l'algorithme de classement dans deux clades différents (**Figure 3.8**).

Une analyse d'hybridation soustractive *in silico* a identifié des séquences conservées. Dans cette analyse, les valeurs d'homologie sont supérieures à 95 %.

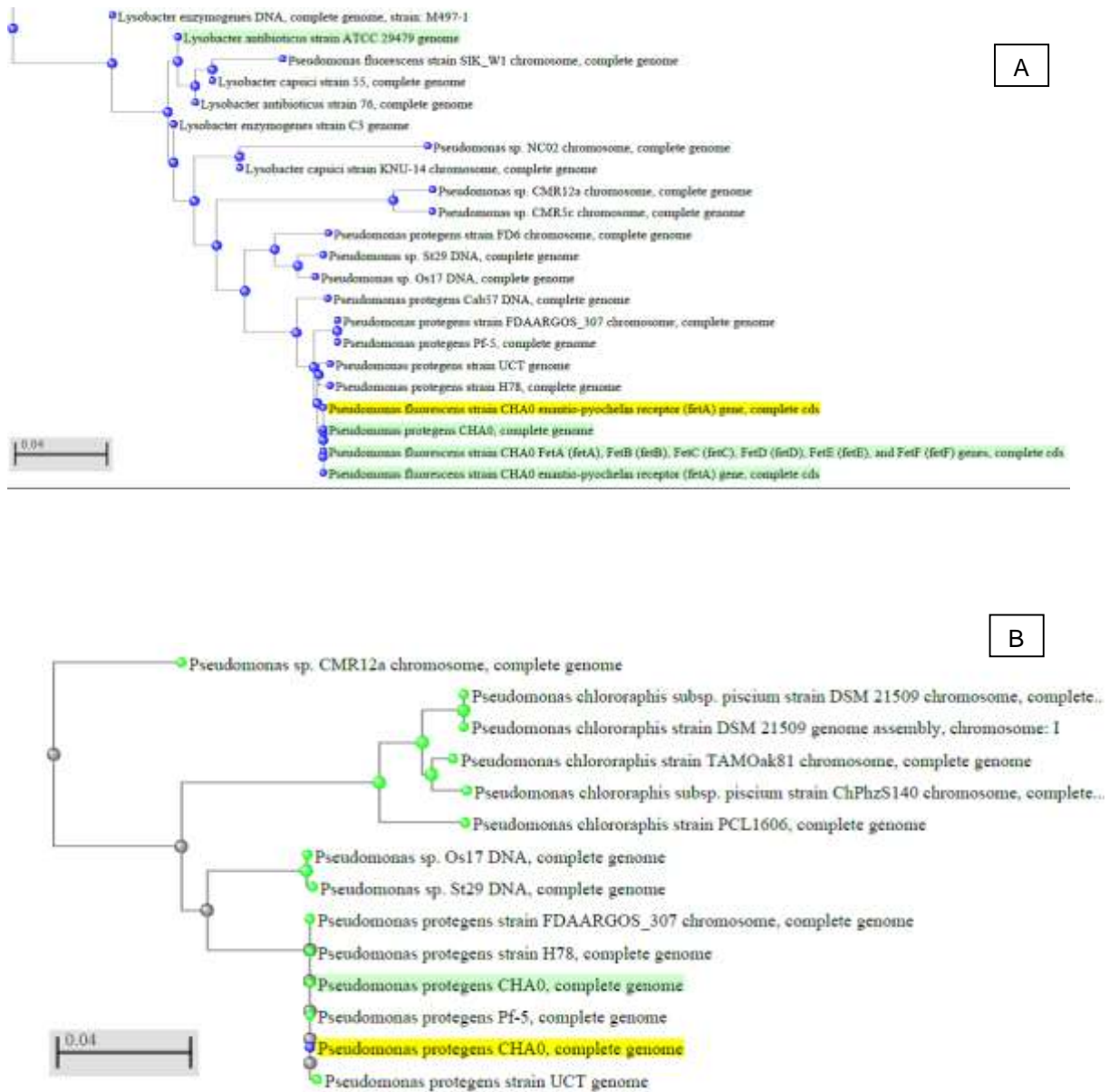


Figure 3.8 : Arbre phylogénétique de quelques espèces de proteobacteria (A) et des Pseudomonas spp. fluorescents (B), construit à partir de l'ARN 16S par la méthode NJ (Neighbour Joining).

### 3.3.3. Les principaux gènes codant pour la synthèse des pyoverdines

Notre investigation sur les séquences pyoverdiniques, archivées dans la banque de donnée (NCBI), montre des résultats assez détaillées de la souche de *P. aeruginosa* PA01. La recherche de similarités entre cette souche et la souche de référence CHA0 donne un classement qui classe pratiquement les deux souches de référence dans le même clade (Figure 3.9).

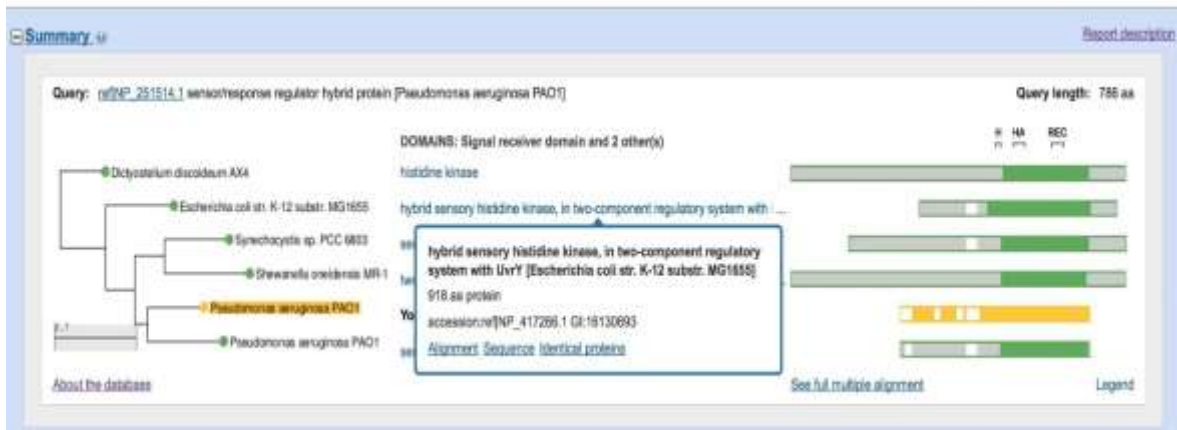


Figure 3.9 : Cladogramme des souches de Pseudomonas PAO1 et CHA0.

Génétiquement, ce sont sept (7) gènes qui codent la synthèse de la Pyoverdine-I, et qui conduisent à la synthèse du produit final (Pyoverdine-I). Cette opération se fait à partir de la métabolisation de huit acides aminés précurseurs distincts. Ces gènes sont énumérés sous différentes formes (Identifiant, Code du gène, Nom du gène, Fonction, etc...), (Tableau 3.1).

Tableau 3.1: Gènes codant pour la synthèse de la Pyoverdine-I chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

pyoverdine I biosynthesis

Gene ID	Gene Accession	Gene name	Reaction id	Reaction EC	Enzymatic activity	Evidence	Organism
G-11721	PA2413	pvdH	R181-RXN	2.6.1.76	L-2,4-diaminobutyrate:2-ketoglutarate 4-aminotransferase	EV-EXP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
G-11719	PA2386	pvdA	RXN-11128	1.14.13.195	L-ornithine 5-monoxygenase	EV-EXP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
G-11720	PA2396	pvdF	RXN-11127	No EC#	hydroxy-L-ornithine formylase	EV-EXP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
G-11725	PA2399	pvdD	RXN-11126	6.3.2.-	ferribactin synthase	EV-EXP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
G-11724	PA2400	pvdJ	RXN-11126	6.3.2.-	ferribactin synthase	EV-EXP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
G-11723	pvdI	RXN-11126	6.3.2.-	ferribactin synthase	EV-EXP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	
G-11722	PA2424	pvdL	RXN-11126	6.3.2.-	ferribactin synthase	EV-EXP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1

La carte de restriction des gènes de biosynthèse du chromophore de la pyoverdines de *Pseudomonas aeruginosa* et des clusters incluant les gènes de la PvcA (pvcA), PvcB (pvcB), PvcC (pvcC), et PvcD (pvcD), avec l'activateur

transcriptionnel PtxR (ptxR), s'étalant sur une longueur de 6397 pb, donnant une carte de restriction comptant 10 amorces variables (10 primers) (Figure 3.10).

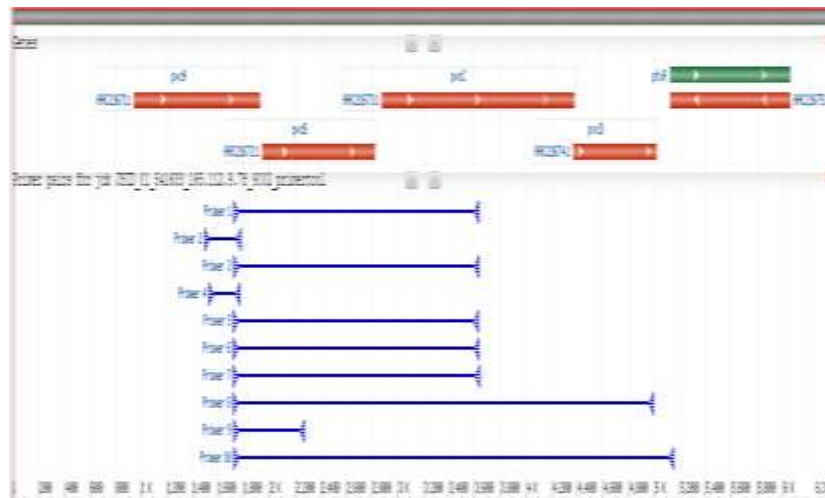


Figure 3.10 : Carte de restriction des gènes de biosynthèse du chromophore de la pyoverdine de *Pseudomonas aeruginosa*.

Cette structure a été confirmée et obtenue à partir de la cristallographie à rayon X de la protéine isolée à partir de la souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* PA01

Les différentes voies de biosynthèse conduisant à la synthèse de la Pyoverdine-I, sont résumées dans la (Figure 3.11) qui suit :

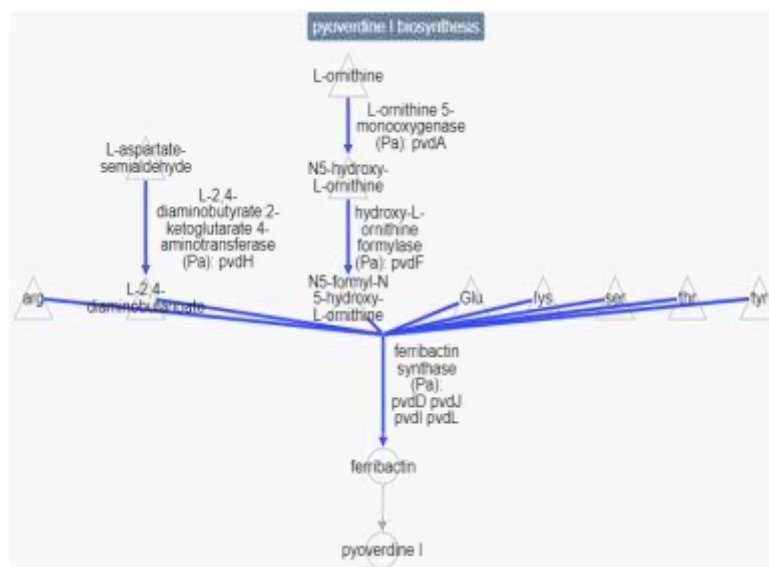


Figure 3.11 : Voies de biosynthèse de la Pyoverdine-I chez *P. aeruginosa* PA01[192].



### 3.3.4. Phylogramme des *Pseudomonas* selon les pyoverdines

La phylogénèse des homologues de PvdP, montrent clairement que chez les espèces liées étroitement sont *P. protegens*, *P. fluorescens* et *P. brassicacearum*. Les homologies sont très élevées, ce qui fait que ces derniers sont classés dans les même clades (Figure 3.12).

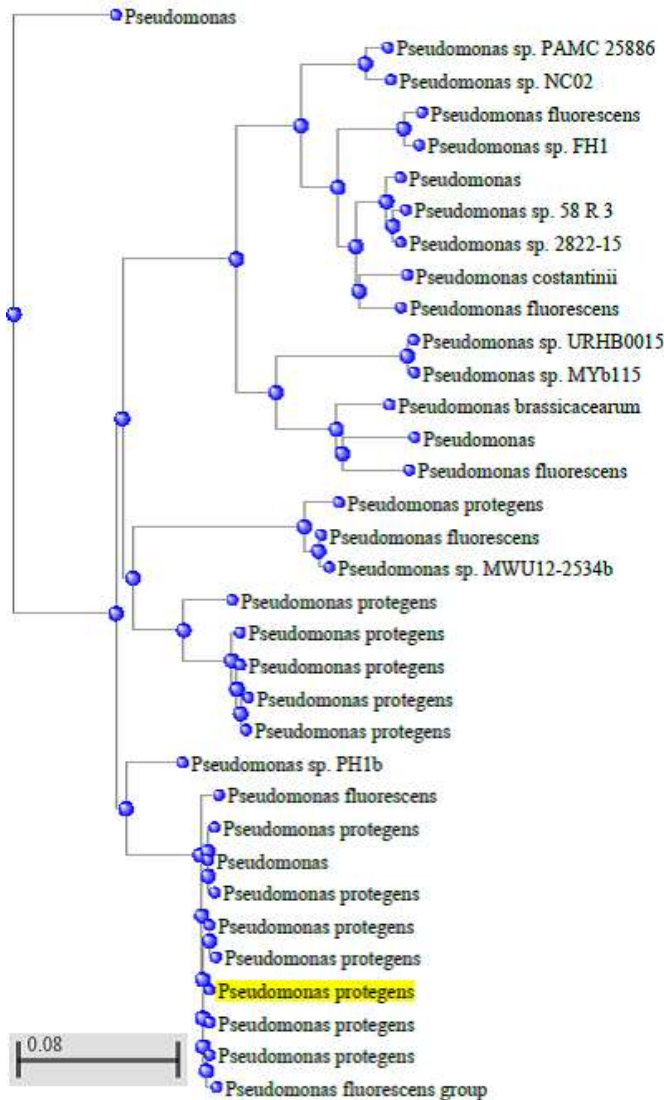


Figure 3.12 : Arbre phylogénétique de quelques espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents construit à partir des gènes pvd I par la méthode du NJ (Neighbour Joining).

### 3.3.5. Arbre phylogénétique des récepteurs de la protéine TonB

Pour la protéine TonB, l'arbre phylogénétique montre que notre souche CHA0 est quasiment positionnée au même rang que les autres espèces de *Pseudomonas* synthétisant les pyoverdines chélateurs de Fe<sup>III</sup> (Figure 3.13).

L'alignement des séquences d'acides aminés des récepteurs dépendants de diverses structures de TonB détectés dans les génomes est fait par rapport à une sélection de récepteurs connus de la pyoverdine ferrique provenant de différents génomes de *Pseudomonas* séquencés.

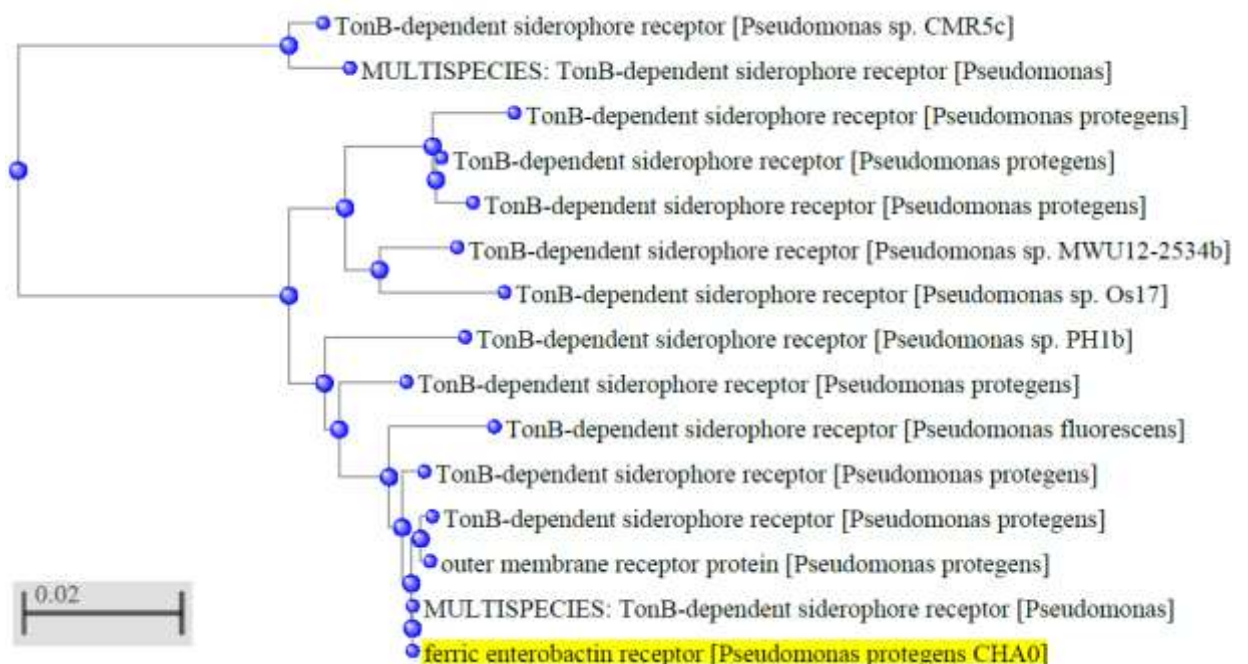


Figure 3.13 : Arbre phylogénétique des relations phylogénétiques entre les espèces de *Pseudomonas*, construit selon la méthode du NJ (Neighbour Joining) des séquences concaténées et alignées des gènes TonB.

### 3.3.6. Arbre phylogénétique des gènes *gyrB* et de *rpoD*

D'autres arbres phylogénétique de séquence complètement séquencée chez des *Pseudomonas* a été effectué sur la base de deux gènes d'entretien (ménager) (*gyrB* et *rpoD*) (Figure 3.14). L'arbre a montré que *P. fluorescens* est étroitement lié à *P. chlororaphis* et *P. brassicacearum*. Dans une deuxième classe, nous observons la présence de différentes souches qui s'agglomèrent sur les mêmes feuillettes.

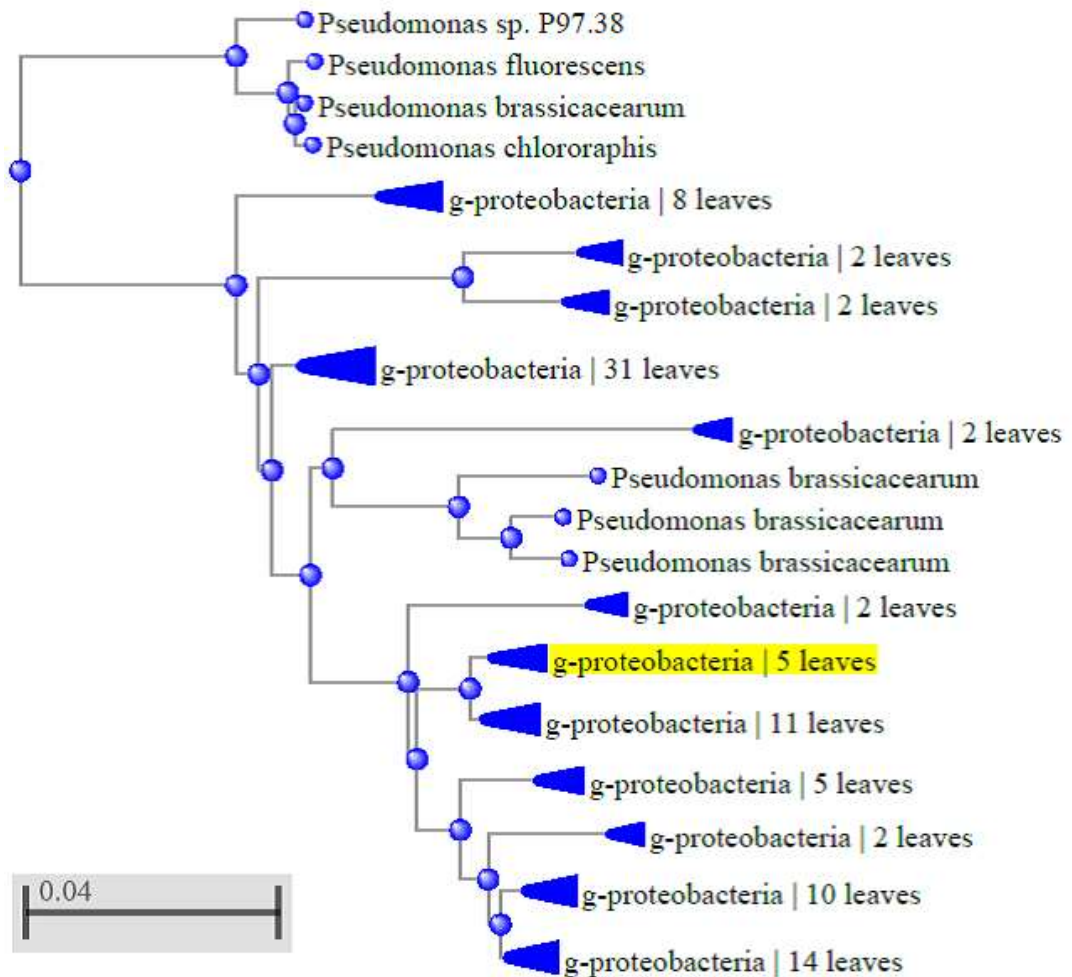


Figure 3.14 : Arbre phylogénétique des relations phylogénétiques entre les espèces de *Pseudomonas*, construit selon la méthode du NJ (Neighbour Joining) des séquences concaténées et alignées à partir des gènes complètement séquencés de *gyrB* et *rpoD*.

### 3.3.7. Discussion

Etant donné que la plupart des souches types ne sont pas entièrement séquencées et que de nouvelles espèces sont fréquemment décrites, la corrélation entre la taxonomie et l'analyse phylogénomique reste incomplète et parsemée être d'une grande hétérogénéité entre les souches. Cette énorme hétérogénéité phénotypique et génétique est également le lot des souches appartenant au groupe des *P. fluorescens* où l'approche taxinomique ne permet pas une évaluation facile de la phylogénie qui à terme a fait, émerger une hypothèse qui suggérerait qu'un complexe d'espèces pourrait façonner le groupe des *P. fluorescens* [204].

De ce fait, les études contemporaines s'orientent vers l'investigation des sidérophores qui constituent actuellement un axe prioritaire de recherche appliquée en biotechnologie végétale et environnementale. L'importance de ces molécules, réside en plus de leurs rôles dans la phytostimulation des plantes et la compétition trophiques chez les bactéries, dans une possible utilisation comme biocapteurs dans le domaine de la biorémediation étant donné leur capacité de liaison à divers métaux ; en plus du fer.

Les sidérophores d'origine microbienne sont globalement repartit en quatre types : les hydroxamates produites par les bactéries (ferrioxamine B) et par les champignons (ferrichrome), les carboxylates que l'on retrouve chez les rhizobactines, les catecholates dominant le groupe de enterobactines et les pyoverdines (PVD) qui sont des structures mixtes que l'on rencontre chez les bactéries sans distinction [266].

La molécule de pyoverdine, issue d'une séquence polypeptidique composée de 815 acides aminés, donnant naissance à une protéine complexe composé de quatre structures élémentaires qui constituent les protéines du monde vivant à savoir (i) des hélices de type  $\alpha$  et  $3/10^{\text{ème}}$ , (ii) de ponts sulfurés, (iii) des ponts  $\beta$ , (iv) ainsi que des sites actifs d'attachement des ligands non organiques. Les séquences d'acides aminés ainsi que leurs structures protéiques associés sont données dans l'Appendice A [192].

De plus, les PVD jouent un rôle crucial dans le contrôle biologique des micro-organismes phytopathogènes de la rhizosphère [128]. À pH neutre ou légèrement alcalin, les souches capables d'émettre les PVD sont capables de jouer un rôle d'antagoniste bactérien en séquestrant le pool limité de fer présent dans la rhizosphère par le biais de la formation de complexes stables avec le  $\text{Fe}^{3+}$ , d'ont l'assimilation aide respectivement d'une manière directe et indirecte à la croissance de l'organisme producteur et des végétaux annexe.

Les sidérophores PVD nécessitent un large éventail de protéines pour leur synthèse, leur transport et leur maturation. Une élucidation complète de la voie PVDI est cruciale pour comprendre la nature chimique de ce sidérophore complexe. De plus, le fer étant l'un des principaux facteurs limitants, de la croissance

bactérienne. L'interférence de la production de sidérophores peut contribuer au développement de nouveaux agents antimicrobiens capables d'interférer avec la synthèse de sidérophores. L'ajout de PvdP à la liste des enzymes associées à une réaction dans la biosynthèse de PVDI, entraîne la conversion de la chaîne latérale attachée de l-Glu en différentes chaînes observées dans PVDI, les seules réactions restantes pour les enzymes non caractérisées restantes (PvdM, PvdN et PvdO) [268].

Le gène pvdP est généralement codé à côté de l'opéron pvdMNO, qui code trois autres protéines périplasmiques qui pourraient agir comme des enzymes responsables des premières modifications post transcriptionnelles [204, 268].

Actuellement, on pense qu'une seule enzyme, PvdP, catalyse l'oxydation complète du fluorophore. Cependant, on avait au paravent postulé l'hypothèse selon laquelle que la dihydroxyoverdine, était l'intermédiaire obligatoire dans la biogenèse des fluorophores. Ceci, suggère l'existence de deux étapes d'oxydation successives pour la biogenèse des fluorophores. Le gène pvdP est généralement codé de manière adjacente à l'opéron pvdMNO, qui code pour trois autres protéines périplasmiques pouvant agir comme des enzymes. La dernière version de la PvdN est disponible sur le site : <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.RA117.000121>  
**JBC**

Concernant, les fonctions de la PvdM et PvdO, ces dernières n'ont pas encore été résolues. Cependant, des études de mutagenèse dirigée par utilisation d'interposons, suggèrent que les deux protéines sont essentielles pour la formation de pyoverdine. La structure de PvdO a été récemment résolue. Il a été démontré que sa structure est liée à l'enzyme génératrice de formylglycine (FGE), mais comme les résidus catalytiques de FGE ne sont pas conservés dans PvdO, aucune fonction n'a pu être attribuée à cette protéine importante jusqu'à la présente en tant que protéine périplasmique. Ainsi, la PvdO devrait jouer un rôle important dans les processus de maturation périplasmique de la pyoverdine, qui sont la formation de fluorophores et la modification de la pyoverdine.

### **3.4. Estimation des paramètres et prédictions du modèle mathématique**

Dans la présente section, la paramétrisation du système d'équations différentielles est effectuée sur la base de données entrantes réelles, que nous avons obtenu à partir d'une étude menée en laboratoire (étude de la croissance bactérienne "*Pseudomonas fluorescens* pf-10 et la production de métabolites secondaires "pyoverdine"). Les résultats obtenu à l'issu du processus d'optimisation sont représentés dans la colonne des valeurs optimales que nous rapportons ci-dessous (Tableau 3.2) :

L'estimation et optimisation de paramètres dans les systèmes non linéaires est rarement une tâche simple. Cependant, il est théoriquement possible d'assigner objectivement et de manière parcimonieuse des valeurs optimales aux différents paramètres à partir d'observations ou de mesures sur terrain. De ce fait, l'utilisation des différentes techniques d'optimisation formelles fait en sorte que les modèles soient uniquement comparés en termes de structure [269].

Tableau 3.2: Vecteurs initiale, optimale et étendu de variation, des paramètres associés à la biomasse et à la teneur en pyoverdine.

Symboles des paramètres	Valeurs initiales	Valeurs optimales	Etendue
<b>k</b> ( $\mu\text{M}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	1.604	2.3326	(0 - 4)
<b><math>\delta</math></b> ( $\mu\text{M}$ )	0.127	0.0412	(0 - 0.13)
<b><math>\beta</math></b> ( $\text{h}^{-1}/\text{OD}$ )	0.857	0.4109	(0 - 1)
<b><math>\sigma</math></b> ( $\text{h}^{-1}/\mu\text{M}$ )	0.089	0.0534	(0 - 0.9)
<b>Yn</b> ( $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ )	0.329	0.4952	(0 - 1)
<b><math>\mu</math></b> ( $\text{h}^{-1}$ )	0.122	0.1115	(0 - 0.5)
<b>S<sup>∞</sup></b> ( $\mu\text{M}$ )	0.609	0.6857	(0 - 0.7)
<b>v</b> /	0.478	0.3831	(0 - 0.5)
<b>Variables d'état</b>		<b>Variables estimés</b>	
<b>N</b> (OD)	0.05	0.0896	
<b>S</b> ( $\mu\text{M}$ )	$\text{Log}_{10}(100)$	$10^2$	
<b>P</b> (OD)	0.001	0.01	
<b>Q</b> ( $\mu\text{M}$ )	0	0.0617	

Afin d'illustrer graphiquement la qualité d'ajustement obtenue pour le vecteur de paramètres optimaux  $\theta_w^*$ , issue de l'ensemble des 10.000 simulations, nous

présentons, ci-après, la solution du modèle associé aux données expérimentales recueillies au laboratoire.

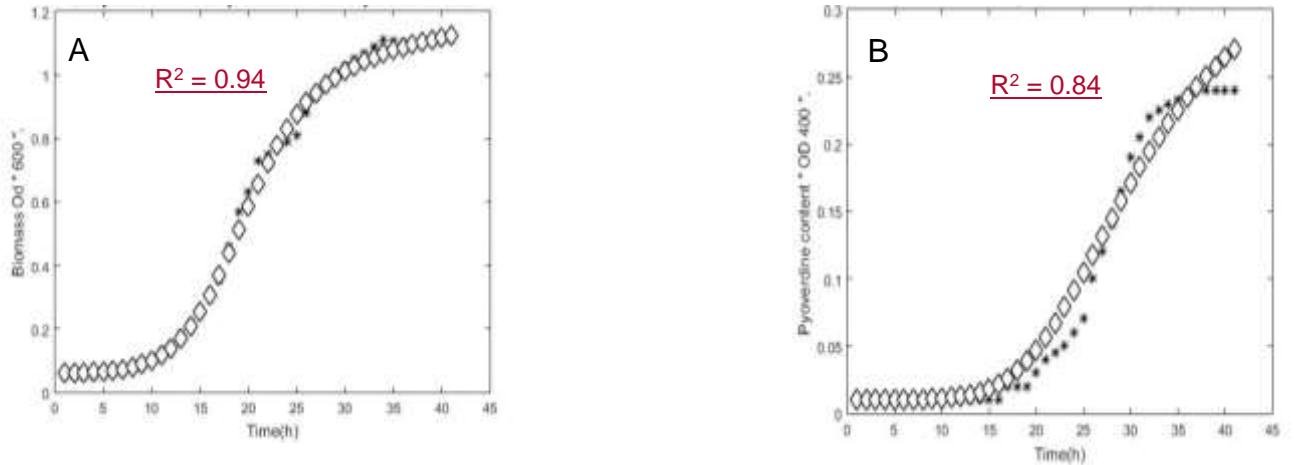


Figure 3.15 : (A) Qualité d'ajustement des données, de la croissance bactérienne théoriques et réelles. (B) Qualité d'ajustement des données de la quantité de pyoverdines théoriques et réelles.

Les graphiques de la qualité d'ajustement pour les deux variables biomasse et quantité de pyoverdines produites, montrent que, malgré le fait que nous ayons anticipé en amont sur les éventuels problèmes de manque d'ajustement du fait de la présence de plusieurs valeurs manquantes dans les vecteurs des données expérimentales, (Application d'une interpolation linéaire). L'ajustement du modèle a été presque parfait avec un coefficient de détermination "  $R^2$  " de 0.94, pour la biomasse (N) sur l'ensemble des points d'entrée et légèrement moindre pour les données associé à la quantité de pyoverdine produite (P) avec un "  $R^2$  " de 0.84.

Dans les Figure 3.16 (A & B), nous présentons les courbes d'évolution des concentrations prédites pour le fer libre (S) et chélaté (Q), pour lesquelles, aucune mesure de laboratoire n'est disponible pour faire office de vecteurs de comparaison ainsi que, les graphiques des résiduelles obtenues, au terme de l'ajustement des données théoriques prédites pour la biomasse (N) et de la teneur en pyoverdine (P), par rapport aux données expérimentales que nous présentons ci-après dans la Figure 3.16 (C & D).

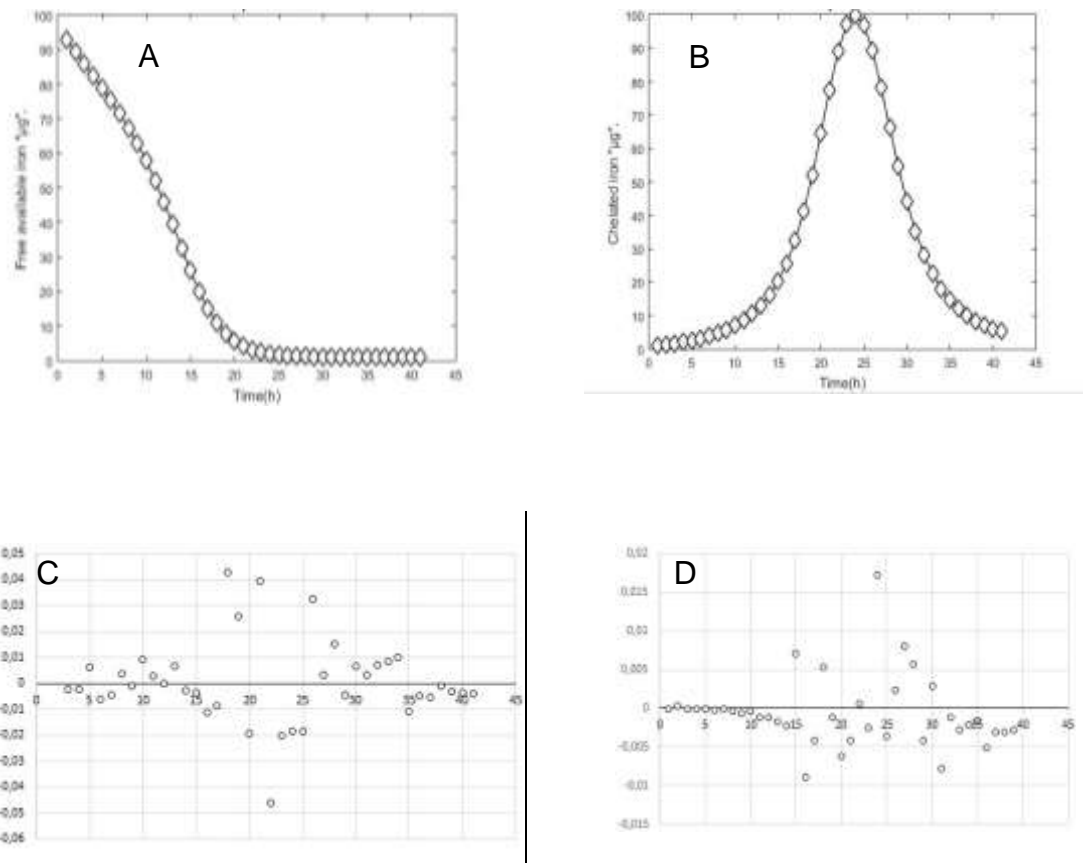


Figure 3.16 : (A) Prédiction du modèle pour le fer libre. (B) prédiction du modèle pour le fer chélaté ; Résiduelles pour la production de biomasse (C) ; et de pyoverdine (D).



L'ajustement du modèle de croissance cinétique non linéaire, montre des valeurs résiduelles très petites qui se répartissent de manière aléatoire autour de la moyenne nulle. Ces résultats indiquent une bonne adéquation du modèle pour la représentation du phénomène biologique étudié.

En s'appuyant sur les précédents résultats, les intervalles de confiance ont été calculées pour chaque vecteur de données sortantes. Au terme de la simulation, le coefficient de détermination est égal ou supérieur à 0,7. Les autres simulations ont été écartées du calcul.

L'Intervalle de confiance (IC des meilleurs vecteurs de paramètres optimaux  $\theta_w^*$  est donnée ci-dessous.

Tableau 3.3: Intervalle de confiance (IC) des résultats obtenus pour les vecteurs de paramètres optimaux  $\theta_w^*$ .

Paramètres		Moyenne	CI (95 and 99 %)
<b>k</b>	<b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	1.9380	[1.8320; 2.0441]
<b><math>\delta</math></b>	<b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	0.0366	[0.0333; 0.0398]
<b><math>\beta</math></b>	<b>(<math>\text{h}^{-1}/\text{OD}</math>)</b>	0.5191	[0.4999; 0.5383]
<b><math>\sigma</math></b>	<b>(<math>\text{h}^{-1}/\mu\text{M}</math>)</b>	0.2168	[0.1974; 0.2361]
<b><math>Y_n</math></b>	<b>(<math>\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}</math>)</b>	0.5774	[0.5626; 0.5922]
<b><math>\mu</math></b>	<b>(<math>\text{h}^{-1}</math>)</b>	0.3569	[0.3428; 0.3709]
<b><math>S_\infty</math></b>	<b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	0.4634	[0.4484; 0.4785]
<b>v</b>	<b>/</b>	0.1921	[0.1821; 0.2021]

Globalement, la performance du modèle est plutôt bonne, la dimension des intervalles de confiance des paramètres et des solutions du modèle sont cohérentes et les écarts d'inadéquation (Résiduelles), statistiquement insignifiants.

### **3.4.1. Discussion**

Dans la présente étude de simulation, l'intégration du système a été réalisée pendant une période suffisamment longue pour atteindre la phase stationnaire de croissance correspondant au plateau limite (maximum) de croissance. Au cours de cette étude, aucun problème de stabilité ou autre comportement irrégulier ou imprévisible (régime périodique, chaos, émergence, ...), n'a été constaté sur les 10.000 simulations.

De plus, les solutions du modèle, se sont avérées fiables dans leur ensemble. Cependant, ces dernières ainsi que les valeurs de la fonction objective  $J(\theta)$  se sont révélées être sensibles à la valeur du facteur libre  $w$ .

Ainsi, l'exécution de la même procédure d'optimisation avec une valeur constante du facteur libre  $w$  (0.5), a donné des solutions sortantes globalement en faveur de la production de biomasse (qualités d'ajustement toujours supérieure), cela même en dépit du fait que le modèle ait été équitablement paramétré, faisant en sorte qu'il n'y ait pas de favoritisme du terme consacré à la production de biomasse et au détriment de celui rendant compte de la teneur en pyoverdine (Design équilibré) (Figure 3.22). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans les travaux de Fgaier et al (2008), et contribuent à l'accroissement de la validité du modèle proposé pour la simulation des phénomènes étudiés.

Globalement, les données mesurées expérimentalement ont été capturées avec succès par le modèle, et ce sur toute la période de simulation. La qualité d'ajustement des résultats expérimentaux et ceux prédits par le modèle, confortent les hypothèses et mécanismes phénoménologiques sur lesquelles le présent modèle mathématique a été construit, (Figure 3.22 (A et B)) pour la production de biomasse (N) et la quantité de pyoverdine (P) produite.

En somme, la qualité de l'ajustement quantitatif du modèle est satisfaisante, malgré l'existence d'un certain nombre de points de discordance, prenant place à partir du début de la phase de croissance exponentielle. Ce manque d'ajustement peut s'expliquer par le fait que les observations et mesures de quelle que nature que se soient sont actuellement insuffisantes pour contraindre avec précision le nombre de paramètres requis par n'importe quel modèle biologique de quelconque niveau de complexité qu'il soit, ainsi, qu'à la grande variabilité des paramètres, entropie (augmentation du désordre) et sous-détermination typique qui est inhérente aux problématiques de modélisation inverse ou l'unicité des valeurs des coefficients estimées n'est jamais garanties pour aucune solution optimale [270]

De plus, le manque d'adéquation peut survenir en raison des incertitudes liées aux (i) variables qui ne peuvent être expérimentalement mesurées ( coût, échelle de mesure, instruments,...), (ii) données manquantes, (iii) forçage physique (iv) conditions initiales différentes (v) manque de connaissances [17 , 270 , 271]. Par conséquent, plusieurs paramètres peuvent être définis n'importe où sur une large gamme de valeurs tout en offrant un bon d niveau ajustement aux données expérimentales [272].

Enfin, ce manque d'ajustement peut être dû à la variabilité expérimentale qui nécessiterait des techniques et des dispositifs expérimentaux plus sensibles et plus précis ou alors à des déficiences structurelles dans certaines des hypothèses sous-jacentes au modèle car si l'on venait à la critique de ce dernier, il s'avérerait évident que le présent modèle ne tient pas en compte (i) la consommation de substrat pour les besoins de maintenance (ii) l'ajout de substrat supplémentaire au cours du processus de croissance (iii) l'existence de plus d'un substrat limitant (iv) la non cessibilité du substrat (vi) la compétition entre plus d'une population bactérienne.

D'un autre côté, la bonne qualité d'ajustement que nous avons obtenu à l'issue de nos expériences de simulation soit le fait de l'utilisation d'un schéma d'échantillonnage robuste (méthode de l'hyper cube latin) qui a aidé le processus d'optimisation à converger rapidement vers des solutions fiables.

Il est également utile de noter que la génération de vecteurs initiaux uniformément échantillonnées à partir de chacune des plages bornées respectives (Tableau 3.3), a empêché ces paramètres de prendre des valeurs irréalistes.

Ceci se traduit, par, les valeurs moyennes qu'ont eu les paramètres du modèle ainsi que par les intervalles de confiance de chacun d'entre eux, qui, confirment le fait que tous les paramètres du modèle sont utiles (pas de forte variation) à la modélisation des phénomènes étudiés (Tableau 3.3).

Aussi, ces résultats indiquent, que, le modèle étudié n'est pas un modèle sur-paramétré (modèle avec un grand nombre de paramètres avec un grand nombre de degrés de liberté) ou sur-ajusté (la qualité de l'ajustement n'est valable que pour le présent jeu de données). Ceci est essentiellement due, à la flexibilité, et à, la structure du modèle qui donne une description robuste des données disponibles, sans avoir besoin de recourir à un recalibrage ultérieur [243, 273].

D'autre part, et contrairement à de nombreux modèles prédictifs, qui prennent en charge le même type de problématiques biologiques de type inverse, le présent modèle n'impose pas a priori de structure mathématique qui prédéfinisse à l'avance une densité de population maximale fixe ( $N_{max}$ ). De ce fait, ce dernier peut être utilisé sur n'importe quel niveau d'échelle et prendre en charge tout type de phénomène de croissance, fonction d'un substrat limitant dans le milieu de culture. A l'exception de la variable d'état rendant compte de la quantité de fer bio disponible (S), ou nous avons eu besoin de recourir initialement à une transformation logarithmique ( $\log_{10}$ ), afin d'obtenir des résultats de sorties cohérentes, en adéquation avec le niveau d'échelle du processus de chélation étudié.

Enfin, Le présent modèle peut prédire avec succès et en temps réel, la quantité de métabolites secondaires (pyoverdine) qui est produite, la quantité de fer libre et chélaté (niveau de déplétion du substrat) à partir des mesures de croissance et vice versa, pour de longues périodes de culture théorique [274 , 275].

### **3.5. Analyse de sensibilité ; un paramètre à la fois (OAT)**

Etant donné l'action que peuvent avoir les paramètres d'un modèle sur la sensibilité des variables d'état [276]. Nous avons procédé à une analyse de sensibilité au voisinage du vecteur optimal de paramètres  $\theta_w^*$ , et ce, afin de déterminer les paramètres les plus sensibles et d'étudier l'effet de la variation de ces derniers, sur les sorties des quatre variables d'état du modèle.

Les résultats de cette étude de simulation se présentent sous différentes formes (Figure 3.17). Les résultats de simulation issue de l'utilisation du vecteur optimal  $\theta_w^*$ , montrent un comportement dynamique différent avec différents degrés d'amplitude pour toutes les variables d'état. Ainsi, nous avons observé que la densité de population bactérienne (N) passe par une phase de latence, durant laquelle, les cellules microbiennes s'adaptent à leur nouvel environnement et deviennent entièrement saines, suivies d'une phase de croissance exponentielle où les cellules se multiplient et produisent de la pyoverdine (P) qui se diffuse progressivement dans le milieu de culture. Enfin lorsque le fer vient à manquer, la population bactérienne atteint une phase de croissance stationnaire durant laquelle la densité de population maximale est atteinte.

En parallèle, la déplétion du fer (S) librement disponible dans le milieu, passe par différentes phases, qui sont d'abord lentes au début du processus de croissance mais qui s'accélèrent au fur et à mesure que la population passe la phase initiale de latence et d'adaptation. La chute de la concentration en fer libre (S) induit automatiquement (Réaction stoechiométrique 1 :1) une augmentation de la quantité de fer chélaté (Q), qui à terme, tend vers un état d'épuisement total.

Spécifiquement, la variation unique des paramètres Beta, Sigma, Delta et  $S^\infty$ , indiquent peu ou pas d'effet sur les deux variables biomasse (N) et quantité de fer libre (S).

Cependant, ces derniers montrent un effet décroissant sur le degré de pente de la quantité produite en pyoverdine (Figure 3.17 (B ; C-1 ; D-1)), vu que nous observons différents niveaux de vitesse de synthèse donnant lieu, à la production de plus en plus de molécules chélatrices, au cours du temps si les valeurs optimales des dits paramètres sont abaissées de leurs valeurs nominales respectives.

Néanmoins et contrairement au reste des autres paramètres qui n'ont pratiquement eu aucun effet sur les profils de la quantité de fer chélaté (Q). Le paramètre Sigma a montré un effet modéré qui s'est exprimé en termes de vitesse de chélation des molécules libres de fer (Figure 3.17 (C)).

Il est à noter que l'action du paramètre Sigma intervient au cours du dernier segment de la phase de croissance exponentielle, et est associé, à une chute du nombre de molécules chélatrices, au fil du temps, jusqu'à atteinte de l'état d'épuisement total. Graphiquement, l'action de ce dernier Sigma s'observe à travers la convergence progressive des différentes courbes en une seule.

De plus il 'a été observé, une relation inverse entre la variable d'état production de biomasse (N) et synthèse de sidérophores (P). Cette relation se traduit, par le fait que, l'augmentation de la valeur nominale du paramètre (Mu) est associée à une augmentation de la teneur en pyoverdine avec une baisse légère mais néanmoins retardée de la quantité de biomasse produite (Figure 3.17 (E ; E1)). En parallèle, l'augmentation de la valeur nominale du paramètre (Mu), entraîne un retard de chélation du fer libre d'environ 5 à 6 heures, conduisant à une déplétion moins rapide de ce dernier dans le système (Figure 3.17 (E2)).

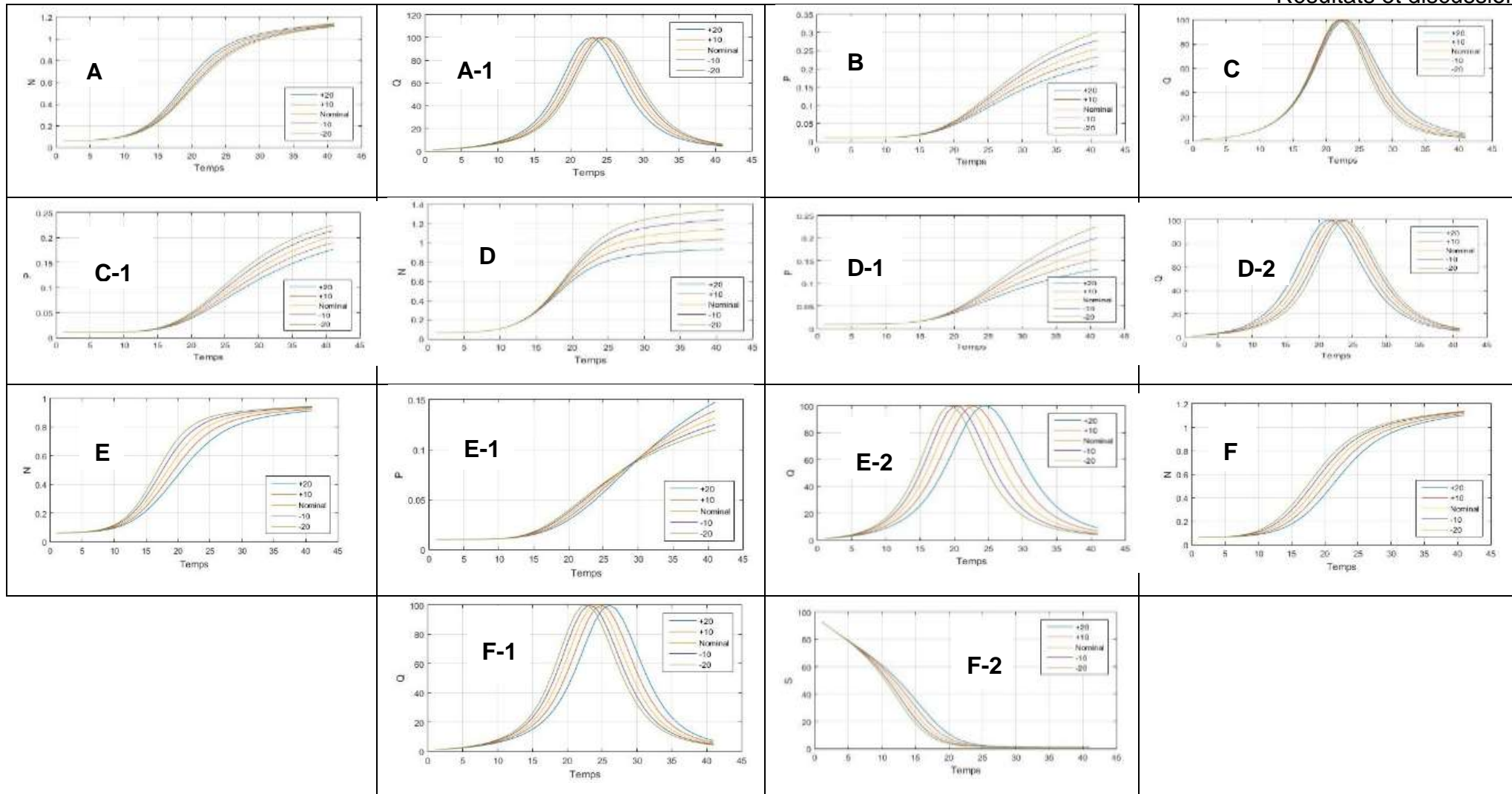


Figure 3.17 : Graphiques de l'analyse de sensibilité a un seul paramètre pour l'effet de  $k$  (A; A-1);  $\beta$  (B);  $\sigma$  (C; C-1);  $Y_n$  (D; D-1; D-2);  $\mu$  (E; E-1; E-2);  $v$  (F; F-1; F-2), sur la solution optimale du modèle.

Enfin, on observe que comparé à l'effet de ( $v$ ), ( $\mu$ ) a un effet beaucoup plus prononcé sur la pente de toutes les variables d'états et sur la vitesse à laquelle la phase d'équilibre stationnaire est atteinte pour les variables biomasse microbienne ( $N$ ) et concentration en pyoverdine ( $P$ ). En plus de l'action des deux paramètres ( $\mu$ ) et ( $v$ ), s'avèrent être diamétralement opposé à l'action du paramètre ( $k$ ), qui possède toutefois le même impact que le paramètre ( $v$ ) (Figure 3.17 (A ; E ; F) ; Figure 3.18).

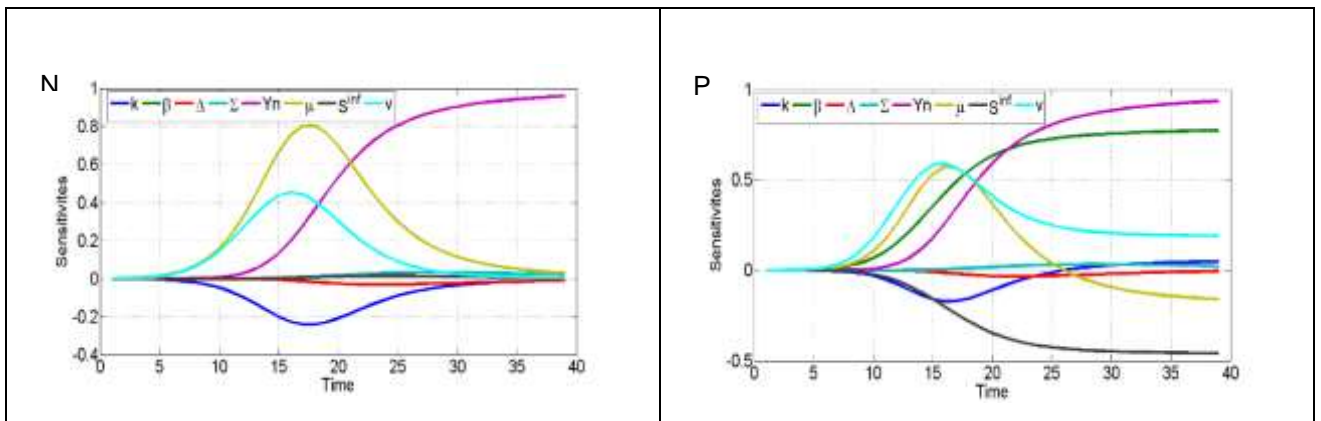


Figure 3.18: Fonctions de sensibilité des sorties du modèle par rapport aux huit (08) paramètres étudiés.

### 3.5.1 Analyse de sensibilité multivariée

L'analyse de sensibilité multivariée utilise les sensibilités absolues des deux sorties du modèle biomasse ( $N$ ) et quantité de pyoverdine ( $P$ ) par rapport aux huit (08) paramètres du vecteur optimal  $\theta_w^*$ . Ici, la valeur de sensibilité la plus élevée est associée au paramètre le plus important. Par conséquent, ces grandeurs peuvent être utilisées pour comparer ou classer les paramètres d'entrée et aider les utilisateurs à sélectionner les paramètres les plus influents pouvant être optimisés ultérieurement (Figure 3.19) [18, 277, 278].



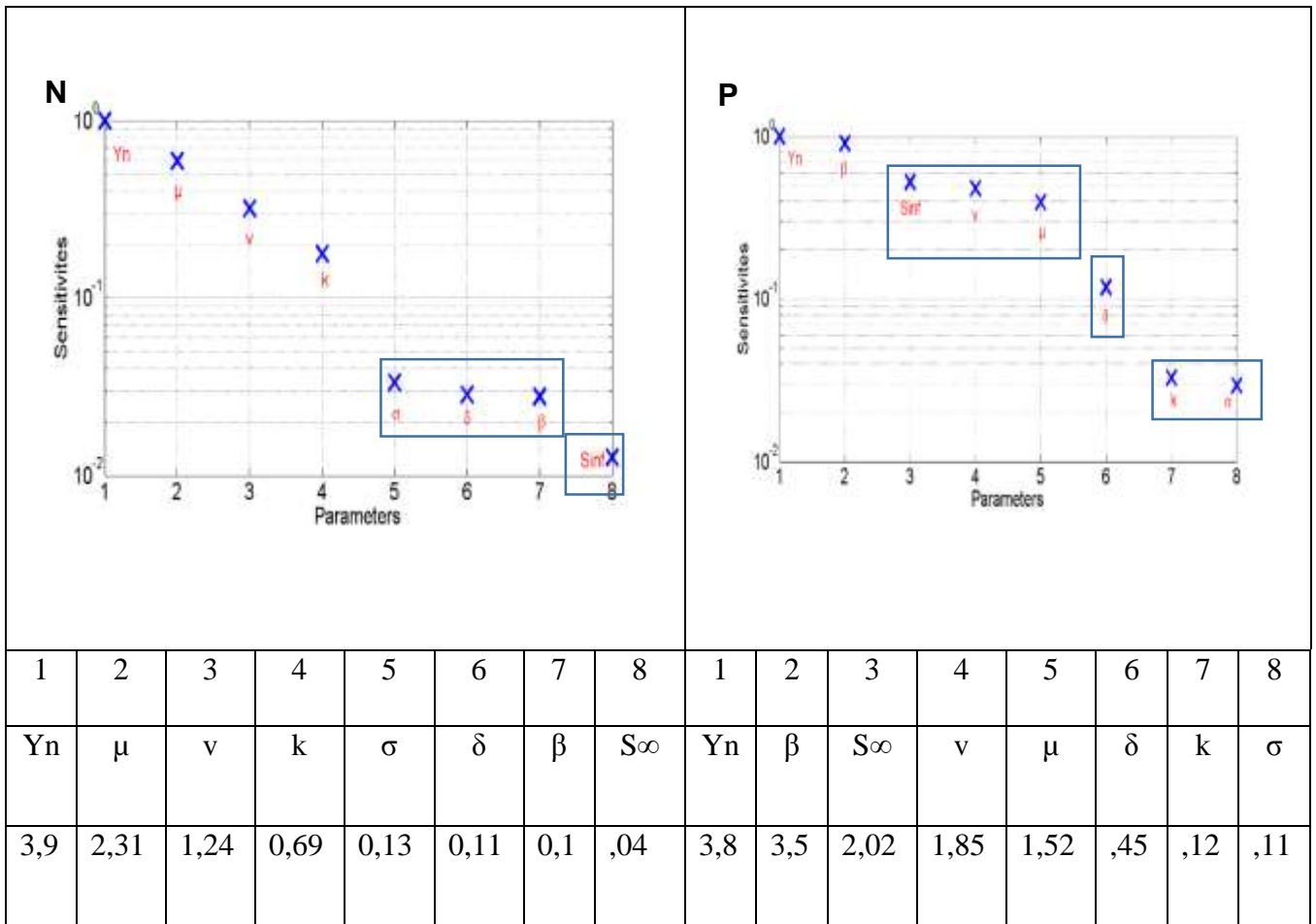


Figure 3.19 : Classement des sensibilités du modèle.

Selon la Figure 3.25, nous pouvons procéder à une investigation de l'effet que peut avoir tout paramètre d'entrée. Par exemple, le paramètre Yn possède la valeur d'indice de sensibilité la plus élevée (3,9 et 3,8), ce qui signifie qu'avec une faible augmentation de la valeur de Yn (+/- 10%), la quantité de biomasse et de pyoverdine produite augmentera de 3,9 et 3,8 fois ( $\cong 4\%$  en moyenne).

Cependant, si les indices de sensibilité sont trop similaires, comme dans le cas des paramètres Beta, Delta, Sigma et  $S_{\infty}$ , où les fonctions de sensibilité sont probablement, fortement corrélées (Figure 3.19). L'estimation conjointe de ces combinaisons de paramètres peut ne pas être possible sur ces seules données expérimentales. Ainsi, l'augmentation de la valeur de l'un de ces paramètres générera approximativement la même réponse de sortie, si la valeur des autres paramètres est baissé avec la même grandeur [279].

### **3.5.2. Analyse de robustesse des paramètres**

En raison des boucles de rétroactions complexes qui sont associées aux réseaux biologiques, certains paramètres peuvent avoir un impact positif sur une variable d'état à un certain moment et passer brusquement à l'opposé. Par conséquent, il faut non seulement connaître quels sont les paramètres critiques qui affectent les sorties du modèle, mais également à quel moment survient le changement et combien de temps dure-t-il ? Pour ce faire, la robustesse de nos résultats a été testée en procédant à une analyse de sensibilité locale aux environs de 10.000 vecteurs aléatoires, générés par la méthode de l'hyper cubes latin.

Ci-dessous, nous présentons les résultats de 2 jours de simulation (8 h, 16 h et 24h ...), pour chacun des 10.000 vecteurs, où nous avons identifié les paramètres qui induisaient les plus grandes variations dans les concentrations de nos quatre variables d'état.

Globalement, nous avons vérifié que pour plus de 70 % des simulations, les sensibilités des deux paramètres ( $\mu$ ) et ( $Y_n$ ) étaient les plus importantes sur une large majorité de points d'entrées temporelles. Ces résultats ont été obtenus à partir du calcul des fréquences d'occurrences respectives, qui ont été, de l'ordre de 39 et 34 %, chez toutes les variables d'état du modèle (Figure 3.20).

Spécifiquement, l'analyse des résultats indique que jusqu'à 16 h de croissance, le taux de croissance spécifique ( $\mu$ ) est le paramètre le plus sensible à la variation de la biomasse microbienne ( $N$ ). Passé ce temps, cette sensibilité tend à diminuer en faveur du paramètre ( $Y_n$ ).

Inversement, la sensibilité du paramètre ( $Y_n$ ) tend à progressivement augmenter, avec le temps faisant d' $Y_n$  le paramètre le plus sensible comparé aux autres, chez la variable d'état ( $P$ ). Cette augmentation se produit au cours de la période de latence (Lag-phase ; 1-18h après inoculation) au détriment du taux de récupération ( $v$ ) et du taux de croissance spécifique ( $\mu$ ).

La représentation biologique de ces succession de sensibilité, se traduit par le fait que la souche de *Pseudomonas* doit s'adapter, croître et finalement produire une quantité suffisante de pyoverdine pour séquestrer, assimiler et métaboliser les molécules de fer bio disponible, dans le but ultime de persister dans son nouvel environnement [280].

D'un autre côté, les variables liées à la bio disponibilité du substrat, montrent que le fer libre (S) est la variable d'état la plus sensible au paramètre ( $\mu$ ). Cependant et au fur et à mesure que le temps progresse, la sensibilité de cette dernier tend à diminuer en fréquence d'occurrence au profit d'une mosaïque d'autres paramètres que l'on peut classer en deux groupes selon un ordre décroissant de grandeur qui sont ( $\delta$  ;  $Y_n$  ;  $\sigma$ ) suivie de (k ; Beta ;  $S^\infty$ ).

Ces derniers cumulent moins 30 % de fréquences d'occurrence pour le premier groupe et sont négligeable pour le deuxième groupe avec moins de 5 % de fréquence d'occurrence par paramètres.

Par ailleurs, le fer chélaté (Q) exhibe une sensibilité qui est exclusive au paramètre ( $\delta$ ) lors de la première phase de croissance bactérienne (Lag phase : 1 - 8 h), puis décroître progressivement jusqu' à s'annuler sous l'action du paramètre ( $\mu$ ) qui atteint son maximum d'action après 24 h de croissance. À son tour, ce dernier décroît sous l'effet du paramètre ( $\sigma$ ) qui progressivement et à partir du milieu de la phase de croissance exponentielle devient le paramètre le plus sensible avec la fréquence d'occurrence la plus élevée.

Ces résultats indiquent que la première phase ascendante de la courbe de chélation du fer (Figure 7.B), est sous l'action du paramètre ( $\delta$ ) et y est sensible.

Biomathématiquement, les paramètres ( $\delta$ ), ( $\mu$ ) et ( $\sigma$ ) contrôlent respectivement le processus de chélation du fer, la régulation du taux de croissance en fonction de la quantité de substrats mobilisables et le processus de libération du fer dans le cytosol, Ils correspondent graphiquement, à la partie ascendante, point d'inflexion (milieu de la phase de croissance exponentielle (Figure 3.20.A) et à la partie descendante de la courbe de chélation du fer (Figure 3.20.B)

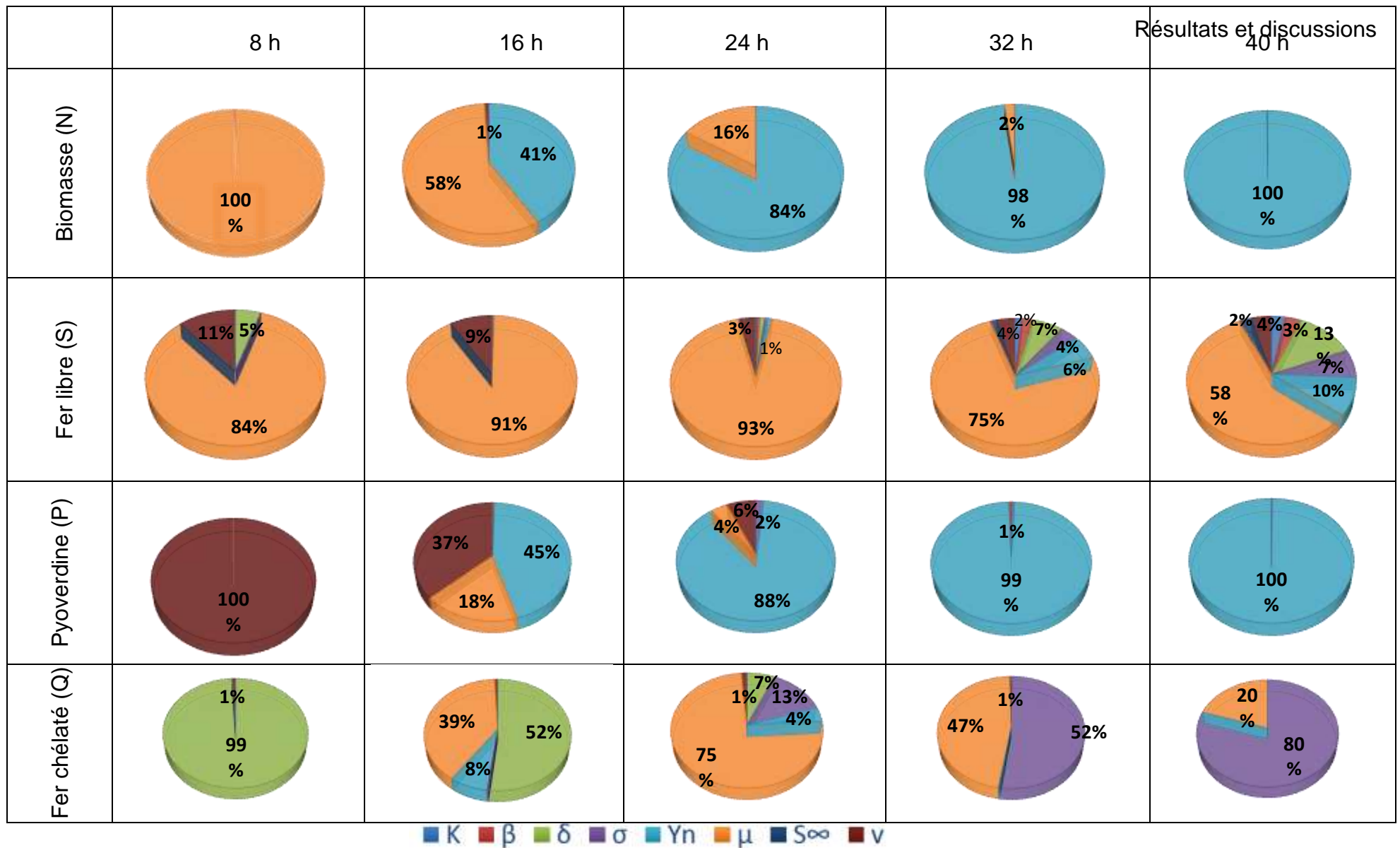


Figure 3.20 : Représentation en pourcentage de la sensibilité des différentes variables d'état à l'ensemble des huit (08) paramètres pris en compte dans les 10,000 vecteurs pseudos aléatoires, pour 05 points temporelle représentative 91

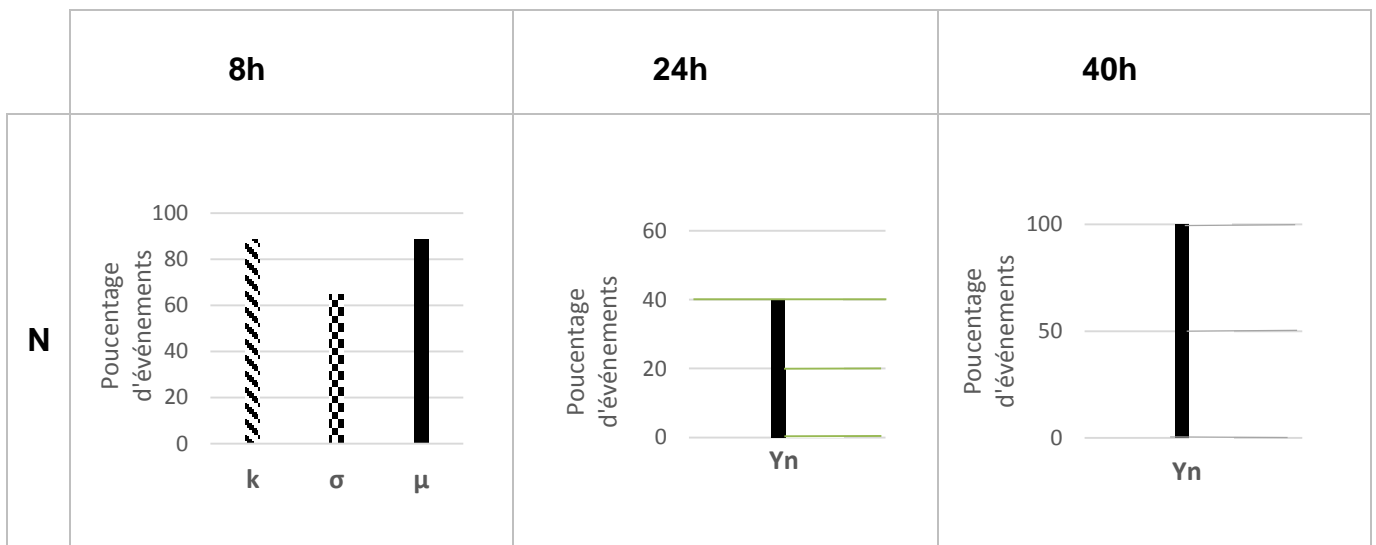
Notablement, les paramètres ( $\mu$ ) et ( $\nu$ ) induisent des changements négativement liés aux paramètres ( $Y_n$ ) ; ( $\delta$ ) et ( $\sigma$ ), puisqu'ils induisent tous des changements en sens opposés au cours du temps. Plus précisément, une diminution de ( $\delta$ ) est associée à une augmentation de ( $\mu$ ), et inversement, une augmentation de ( $\sigma$ ) et ( $Y_n$ ) est associée à une diminution de la sensibilité des paramètres ( $\mu$ ) et ( $\nu$ ) (Figure 3.20).

En conclusion de cette analyse, la variation des paramètres du modèle aux alentours des 10.000 vecteurs a permis de démontrer que le modèle étudié été beaucoup plus sensible à certains paramètres qu'à d'autres. En particulier, aux paramètres associés à la croissance microbienne ( $\mu$ ,  $\nu$ ) ; Quantité des chélats ( $Y_n$ ) et état physique du fer ( $\delta$ ,  $\sigma$ ).

**3.5.3. Analyse de robustesse des variables d'état**

Dans le cadre du test de la robustesse des quatre variables d'état, nous avons procédé à l'analyse des sensibilités des 10 000 vecteurs aléatoires, pour chacun des 41 points temporels de la simulation. Pour ce faire, nous avons calculé le pourcentage de vecteurs auquel les variables d'état ont été au premier, second et troisième rang de sensibilité (Figure 3.21).

Les prévisions du modèle sont données pour le temps 8, 24 et 40 heure de croissance.



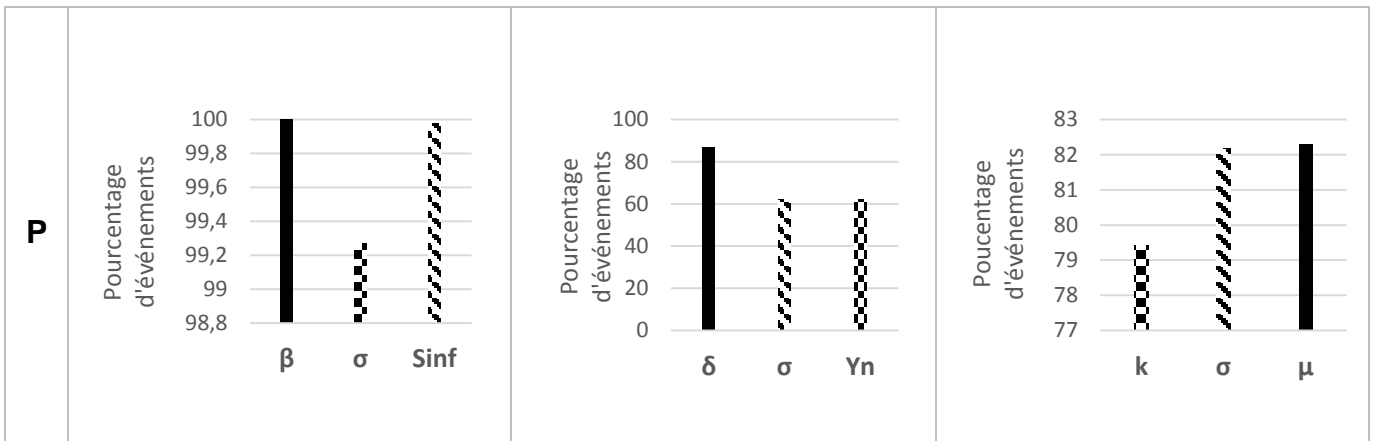


Figure 3.21 : Distribution des trois paramètres d'entrée les mieux classés en fonction du nombre d'événements.

NB : Les pourcentages sont issus de l'ensemble des 10 000 paramètres aléatoires pour lesquels différents paramètres du modèle ont démontré les plus grands changements (barres pleines), deuxième plus grand (barres rayées) et troisième plus grand changements (barres avec carrés).

La présente analyse de modélisation montre que les deux variables d'état (Biomasse et Pyoverdine) peuvent présenter des changements relatifs constants dans leurs concentrations locales par la suite des variations indépendantes des paramètres : ( $Y_n$ ) facteur de rendement substrat-biomasse ou taux de croissance spécifique ( $\mu$ ).

Dans l'ensemble, l'importance des paramètres varie d'un point à l'autre. Par exemple, à l'heure 8 ; 88,8%, 88,79% et 64,56% des 10 000 événements ont classé les paramètres ( $\mu$ ) à la première place, ( $k$ ) à la seconde et ( $\sigma$ ) au troisième rang des paramètres les plus influents, alors qu'à l'heure 40 de croissance virtuelle, le classement était entièrement et exclusivement en faveur du paramètre ( $Y_n$ ).

Cette constatation est plutôt vraie pour la variable (P), où nous observons un changement des sensibilités au fil, du temps donnant ( $\mu$ ), comme paramètre de premier rang suivi de ( $\sigma$ ) puis ( $k$ ) avec des fréquences d'occurrences respectives de 82,31%, 82,17% et 79,4%. Pour le reste des fréquences d'occurrence cela ont été

variablement réparties entre les autres paramètres d'entrée et dépendaient grandement de la combinaison de valeurs constituant, les vecteurs d'entrée.

Globalement, ces résultats confirment que, pour un modèle complexe dans lequel les paramètres d'entrée interagissent les uns avec les autres, la sensibilité du modèle à ses paramètres respectifs pouvant varier considérablement d'un point à l'autre du domaine de définition des paramètres (Figure 3.21).

Concernant la variable d'état (S), celle-ci peut être considérée comme étant l'indicateur le plus sensible des changements locaux des deux paramètres ( $\mu$ ) et ( $Y_n$ ). Ce résultat n'est pas surprenant puisqu'ils ( $\mu$ ) et ( $Y_n$ ) sont tous deux des paramètres liés à la croissance bactérienne et au niveau d'utilisation du substrat, (tous deux fonction de la quantité de fer libre disponible dans le milieu). Ainsi, il existe une relation positive (Dans une certaine mesure) entre la disponibilité du fer, la croissance microbienne et la quantité des chélats produits dans le milieu.

### **3.5.4. Discussion**

Globalement, le modèle de calcul a capturé les caractéristiques cinétiques essentielles de l'ensemble des phénomènes étudiés, en prédisant avec succès les comportements clés de toutes les variables d'état (forme globale des courbes, maximas et minimas, points de déflexion, résolution temporelle).

Le modèle de calcul que nous avons analysé dans cette étude de simulation, prend en considération la phase biotique d'adaptation de la population microbienne à son nouvel environnement en calculant cette dernière de manière générique exprimée par le terme  $\alpha(t)$  lui-même fonction du niveau de récupération de la population donné par le paramètre  $v$ .

Cette caractéristique structurelle du modèle est aux antipodes des bases théoriques sur lesquels est construit le modèle d'assimilation de Monod qui définit la constante d'affinité pour le substrat à l'échelle du microorganisme et relie algébriquement la vitesse d'assimilation à la concentration interfaciale, supposant une adaptation instantanée du microorganisme aux variations de concentration à son interface et qui considère que le rendement de croissance de biomasse, n'est pas constant et varie avec le taux de croissance dans les cultures.

Cette représentation est compréhensible étant donné la nature non structurée et macroscopique du modèle qui considère l'évolution et la composition interne des microorganismes (Cellule) comme une boîte noire en ne rendant compte que, du comportement d'ensemble des entités mise en jeu qui ont été dans notre cas approximés de manière très exacte [216].

De plus, et étant donné que le phénomène d'adaptation demeure être encore mal connu (prédiction exacte impossible), en raison de la diversité des mécanismes complexes qui interviennent durant cette phase ainsi qu'à la grande variabilité des résultats obtenus d'une étude à l'autre. Le temps caractéristique d'adaptation d'une cellule microbienne reste tributaire d'un grand nombre de facteurs tel que le type d'espèce que l'on considère, le milieu de culture utilisé, l'état physiologique initiale de la population et la constante d'affinité pour le substrat (ici : la peptone et le glycérol) [216].

Biologiquement, tout micro-organisme soumis à une contrainte (mécanique ou énergétique ; persistance de l'état de manque ou déplétion total du substrat) ou nouvellement introduit dans un nouveau milieu va s'adapter en changeant de métabolisme et en régulant différemment son matériel génétique dédié de façon à résister à la contrainte (ex. Recombinase site spécifique). Toutefois, cette réponse modifie en retour l'environnement direct comme dans le cas de l'activation du métabolisme overflow (excès de source de carbone) ou la production et l'excrétion de métabolites vers le milieu extérieur entraîne une diminution du pH qui modifie au passage les propriétés physico-chimique du fluide environnant [44 , 281] . Ceci est d'autant plus valable que la présente expérimentation s'est déroulée dans des erlenmeyers d'une contenance de 250 ml ou la baisse du niveau du pH survient assez vite. Cependant et malgré toutes les contraintes liés à l'environnement de croissance (limitation par la phase abiotique, conditions de croissance ou de nutrition limitantes), la souche de *Pseudomonas fluorescens* pf-10 que nous avons étudié a pu s'adapter et se multiplier de manière active dans son nouvel environnement ( $2,04 \cdot 10^{-2}$  et  $1,35 \cdot 10^{-2}$  g/l de pyoverdine).



Aussi, il est connu que l'exposition répétée d'une population de micro-organismes à des fluctuations de concentration de plus ou moins grande amplitude peut également entraîner une ségrégation au sein-même de la population en terme d'état physiologique, montrant ainsi la capacité des cellules à s'adapter à leur milieu environnant [282]. Cependant, et étant donné la nature déterministe du système à équations différentielles, que nous avons étudié, ce dernier présuppose que toutes les molécules ont le comportement de la molécule moyenne et ne peut être donc capturé les effets souvent très importants des concentrations locales élevées de certains réactants alors que leur concentration globale est quasi-nulle ou faire la différence entre une molécule et zéro molécule, passant potentiellement devant des événements clefs du système. Dans ce contexte, il est recommandé d'utiliser des modèles à dérivées partielles qui restent néanmoins beaucoup plus compliqués à mettre en œuvre et à intégrer [207].

D'un autre côté, le phénomène d'adaptation dont il est question peut s'expliquer par le fait les micro-organismes, en tant qu'usine cellulaire, doivent gérer des flux de matière et d'énergie en maximisant la production des éléments nécessaires à la croissance lorsque l'énergie est abondante. Ceci se traduit dans notre étude par la grande sensibilité du système étudié à la variation des paramètres ( $\mu$  et  $v$ ), représentant respectivement la vitesse de croissance spécifique et l'état physiologique de la population.

Dans ce cas le rendement de conversion de substrat en biomasse est fort, mais le rendement énergétique est faible et à l'inverse, lorsque l'énergie est limitante, l'ensemble des réactions est menée avec un rendement énergétique maximal, parfois au détriment du rendement de conversion du substrat [283].

En fin, tous les paramètres du modèle ont montré une déviation typiquement inférieure à 10%. Ceci peut être considéré comme étant un résultat très satisfaisant puisque ces paramètres décrivent des systèmes biologiques complexes mettant en jeu un très grand nombre de réactions prenant place entre le microorganisme et leur environnement direct. De plus, ces résultats suggèrent, une possible utilisation des différents paramètres sensibles pouvant être aisément mesurés dans l'environnement local du milieu de culture, comme indicateurs prédictifs des trois paramètres essentiels du modèle qui sont le taux de biomasse microbien, le taux de production de pyoverdine et le niveau de fer bio disponible.

# **DISCUSSION GENERALE**

## 4. DISCUSSION GENERALE

Devant le problème de la pollution des écosystèmes terrestre et l'exploitation massive des sols agricoles arables, il apparait clairement que l'utilisation excessive des molécules chimiques dans la fertilisation et la protection des cultures soit aujourd'hui considérée comme une menace sérieuse pour l'environnement et la santé humaine et animale. Ainsi, depuis près d'un demi-siècle un intérêt grandissant s'est porté sur l'exploitation des ressources microbiennes bénéfiques qui semblent offrir des avantages considérables dans le domaine de la phytostimulation et la bio protection des cultures.

Les *Pseudomonas spp fluoescentes* appartenant au groupe des rhizobactéries bénéfiques du sol, connaissent actuellement un intérêt grandissant du fait de leurs polyvalences nutritionnelles et de leurs grandes compétitivités dans les sols [54, 56]. D'énormes progrès dans la compréhension des processus régissant la colonisation des racines et de caractérisation des facteurs biotiques et abiotiques affectant la colonisation et la compétence de ces souches ont été obtenus au cours des 30 dernières années. Divers mécanismes de suppression des maladies telluriques ont été élucidés et de nombreuses associations entre différents agents de lutte ont été testées afin de satisfaire aux exigences d'une agriculture durable menée sous serre ou en plein champ [284].

Les résultats obtenus à l'issu de l'étude de la compétence rhizosphérique montrent un haut potentiel de colonisation rhizosphérique des souches bactériennes étudiés se traduisant par des niveaux de colonisation de l'ordre de  $10^{11}$  CFU / g de sol, niveaux largement supérieur aux inoculum initiaux, confirmant la forte compétence rhizosphérique de ces bactéries. Ces résultats sont encourageants et constituent une première étape dans le processus de sélection des souches à haut potentiel colonisateur, pré requis pour une bonne compétence rhizosphérique.

Des niveaux de population remarquables ont été atteints par plusieurs souches à l'instar de la souche S20. Cependant, la souche CHAO a montré le plus grand taux de croissance. Cette fluctuation peut s'expliquer par l'origine écologique de cette souche bactérienne qui est une caractéristique déterminante de l'expression, et la stabilité dans le temps des effets bénéfiques des souches bactériennes appartenants au groupe des PGPR [285-287].

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent solubiliser plusieurs éléments minéraux mineurs tels que le fer, le phosphore et le manganèse, grâce à des agents chélateurs [67, 89, 230, 288, 289]. Une fois ces éléments captés, ces derniers sont utilisés comme une source supplémentaire de nutriments pour les organismes émetteurs et les plantes [67, 288-291].

La synthèse de ces métabolites est dépendante de plusieurs facteurs qui peuvent varier en intensité et en significativité en fonction, du contexte changeant et variable, or les fonctions des composantes biologiques sont variables et dépendent du contexte [292 , 293]. Dans les systèmes vivants, les événements dictent aux contextes comment ils doivent se déformer, les contextes dictent aux composantes comment elles doivent se comporter et les composantes dictent aux événements comment ils doivent naître [215].

De ce fait, la modélisation biomathématique apporte une contribution effective dans les processus de prise de décision, statuant sur des problèmes biotechnologiques multidimensionnels telle que la sélection des souches selon leur compétence rhizosphérique ainsi que pour leurs aptitudes nutritionnelles qui assurent le meilleur taux de colonisation possible ainsi que la viabilité la plus longue après application.

Dans ce contexte la calibration de modèle et l'analyse de sensibilité offrent un cadre rigoureux pour l'ajustement et validation des données expérimentales au données théoriques ainsi que la mise en évidence des facteurs prépondérants capables de conditionner des processus biologiques complexes.

De ce fait, les résultats de l'analyse de sensibilité indiquent quels sont les composants du système qui doivent être mesurés avec plus de précision et de fiabilité, si l'on veut obtenir de meilleures prédictions mais aussi ceux qui doivent être optimisés pour de meilleurs rendements. Aussi et dans un contexte de production à grande échelle, le paramètre ( $\mu$ ) est le facteur clé à optimiser, si une augmentation de la biomasse microbienne est souhaitée en premier lieu, en association avec le paramètre ( $Y_n$ ).

Il est à noter cependant que malgré la mise en évidence de l'importance des paramètres ( $\mu$ ) et ( $Y_n$ ), il n'en demeure pas moins que parmi l'une des problématiques majeures que l'on rencontre dans le domaine de l'industrie des bioprocédés on cite : la complexité inhérente au processus d'extrapolation des entités biologiques vers une plus grande échelle (Scale up), ou on observe généralement des écarts de rendement en biomasse et en bioproduits, ainsi que la formation de sous-produits que nous ne rencontrons pas à l'échelle du laboratoire (potentiellement indésirable).

Cet état de fait peut s'expliquer par la grande complexité des phénomènes biologiques à l'échelle cellulaire ainsi que notre capacité limitée de suivi et de prédiction des effets d'échelles, issues des interactions de la biomasse avec le milieu de culture. Tout cela constitue autant d'obstacles à la définition de critères objectifs garantissant le maintien des performances lors du changement d'échelle.

Ainsi, la montée en échelle d'un procédé biologique est donc toujours une démarche complexe mêlant empirisme, savoir-faire (expérience et tradition de travail) et incertitudes [207].

De plus, L'analyse de sensibilité des paramètres du modèle a souligné l'importance que donnait le modèle étudié aux paramètres de croissance bactérienne par rapport à ceux associés à l'utilisation du substrat ; ceci est une caractéristique structurelle du modèle qui a pour essence les hypothèses sur le quel ce dernier a été construit.

En outre, les variations des concentrations de biomasse suite à la variation du taux de croissance spécifique maximale ( $\mu$ ) et ( $Y_n$ ), suivie de ( $v$ ), en ordre d'effet décroissant ont montré que ces derniers être supérieures à ceux obtenus à partir des

paramètres associés à la biodisponibilité et utilisation du substrat représenté par les paramètres ( $\delta$  et  $\sigma$ ) ; pour le reste des paramètres ( $k$ ,  $\beta$  et  $S^\infty$ ), la sensibilité était plutôt faible.

Paradoxalement, certains paramètres ont eu le même effet cumulatif tout en ayant un comportement dynamique opposé. Par conséquent, les couples de paramètres ( $\mu$ ,  $k$ ) et ( $\beta$ ,  $S^\infty$ ) ont eu à peu près les mêmes effets cumulatifs et les mêmes rangs, associés à des profils de sensibilité plus ou moins identiques (Figure 3.26).

En somme et dans un souci de simplification, les paramètres insensibles doivent être fixés à leur valeur respective par défaut ou simplement être supprimés ou substitués par d'autres paramètres qui soient plus pertinents dans la description des phénomènes étudiés. Cependant, il faut garder à l'esprit que plus on augmente le nombre de paramètres plus la complexité du modèle se verra grandie, engendrant ainsi une diminution de notre compréhension et capacité à tester le modèle de façon critique et objective [20 , 294].

Au final et comme pour tout travail de modélisation biomathématique, il est conseillé d'être prudent sur la portée pratique des résultats et de leurs précisions étant donné que la valeur intrinsèque d'une information n'est que relative et que la valeur de cette dernière peut être profondément modifiée tant par les contextes auxquels elle peut être associée que par d'autres informations qui ne lui sont pas directement liées.

Aussi, une grande partie de l'information recueillie peut avoir été la résultante de l'adoption d'approches réductionnistes qui ne concernent que des aspects très restreints du phénomène biologique étudié ; de plus, les approches *in vitro* se font dans des conditions très hétérogènes, à partir de sources hétérogènes de matériel biologique, dans des conditions très éloignées de la réalité physiologique *in vivo* [215].

De fait, Toute information est toujours (i) incomplète, mais nul ne sait jusqu'à quel point ; (ii) biaisée, mais nul ne sait ni comment ni jusqu'à quel point, et (iii) erronée, mais nul ne sait jusqu'à quel point [215]. Il en résulte des conséquences majeures ou le vivant est un exemple type de « système hypercomplexe » et les faits démontrent que non seulement nos connaissances, en termes de variables impliquées, sont

extrêmement limitées, mais la linéarité fonctionnelle n'y est que très rarement présente [215].

Aussi, il est nécessaire de procéder à la validation expérimentale des résultats de la présente étude avec d'autres issues de travaux complémentaires ou confirmatoire, comme ce fut le cas de la présente étude par rapport aux résultats obtenus par [244].

Ceci est d'autant plus recommandé, que, dans le cas de notre modèle il existe des paramètres, qui ne sont pas identifiables (paramètres ne pouvant être expérimentalement mesurés de manière directe et aisée) et que l'approche de modélisation adoptée ici pour la section de l'analyse de sensibilité, s'est uniquement focalisée sur la variation d'un seul paramètre à la fois, négligeant ainsi les éventuels effets d'interaction qui pourrait exister entre un paramètre donné et un autre paramètre, ou plus (existence de corrélations partielles).

# **CONCLUSION**



## CONCLUSION

Le développement d'inocula microbien à usage pratique dans les techniques de conduite agricole est soumis au préalable de l'efficacité des souches microbiennes, sélectionnées dans des conditions très variables en termes de contraintes biotiques et abiotiques au niveau des rhizosphères. Les publications, très nombreuses, ont mis en évidence l'implication de nombreux facteurs conditionnant la compétence rhizosphérique de ces rhizobactéries.

La première partie de notre travail expérimental, relative à la mise en évidence de la compétence rhizosphérique des souches de *Pseudomonas fluorescens*, a révélé une interaction positive des souches (D1, D2 et S20) avec les espèces végétales (tomate, blé et lin), caractérisée par une nette évolution des populations bactériennes dans les différentes rhizosphères, estimée à une moyenne de  $10^{11}$ CFU /g de sol. Ceci explique que ces plantes exercent un effet rhizosphérique notable, qui témoigne d'une bonne adaptation des souches bactériennes dans les rhizosphères de ces plantes.

L'utilisation des souches CHAO, CK4 et S20 dans l'essai de synthèse des pyoverdines, a permis d'observer une efficacité dans la colonisation rhizosphérique, en dépit d'une carence ou une abondance du fer dans les microcosmes. L'apport du chélateur de fer, EDTA, dans certains microcosmes a permis de mettre en évidence l'implication relative des facultés génotypiques en terme de production de pyoverdines des souches étudiées. L'utilisation de la souche CK4, mutant de la souche CHAO déficient en synthèse de pyoverdines, a montré une bonne colonisation des rhizosphères, en dépit de son incapacité à synthétiser les pyoverdines. Ceci est révélateur d'une existence d'autres types de sidérophores que les pyoverdines et/ou d'autres métabolites secondaires analogues qui entrent en jeu, en état de carence en fer.

L'efficacité de la colonisation racinaire semble être liée à la souche bactérienne et à la plante hôte, sans omettre par ailleurs les facteurs biotiques et abiotiques qui peuvent influencer la distribution et la survie des bactéries dans la rhizosphère.

Devant la multiplicité des facteurs inhérent à l'efficacité de la colonisation racinaire, il devient pratiquement difficile, voire impossible, de sélectionner des souches de *Pseudomonas* hautement compétentes, tant il est nécessaire de procéder à un grand nombre de tentatives d'échantillonnages sur terrain lesquelles sont très souvent : (i) très coûteuse en terme de temps (ii) matériel et main d'œuvre (iii) analyses complexes au laboratoire, effectuées sur des paramètres imparfaitement connus, très difficiles à mesurer et qui générant des données expérimentales incomplètes et hétérogènes, dont l'interprétation n'est pas toujours chose facile.

L'ensemble de ces difficultés associées aux enjeux économiques prépondérant qui s'y affèrent, font que les résultats obtenus d'une étude à l'autre des souches bactériennes potentiellement rhizocompétentes, soient non reproductibles (difficultés de détermination de la variabilité des phénomènes étudiés). Pour ce faire, il est nécessaire d'élaborer et de mettre en œuvre des méthodologies contemporaines, d'études des systèmes complexes, permettant une modélisation prédictive qui soit de nature à être cohérente, fiable et précise.

Dans ce contexte, la modélisation dynamique fournit un cadre systématique pour la compréhension et la mise en évidence des interrelations et autres fonctions pouvant régir les systèmes biologiques. L'estimation des paramètres dans les modèles dynamiques non linéaires demeure cependant être très difficile lorsqu'il s'agit du traitement de problématiques biologiques inverses, en raison, de la non convexité et autres mauvais conditionnement des modèles qui engendrent des résultats le sur-ajustés des paramètres, convergeants vers des solutions locales.

Dans les études de modélisation, si c'est le comportement à long terme de la population bactérienne qui présente un intérêt, la phase de latence peut souvent être négligée, comme c'est le cas avec la plupart des applications en biomathématique qui se concentrent uniquement sur la persistance et la survie.

Dans la présente étude, nous avons utilisé une approche de modélisation computationnelle pour comprendre les mécanismes régissant un modèle de croissance de type Lag-phase, prenant en compte la période de latence bactérienne et décrivant la dynamique de croissance et de production de métabolite secondaire

(Pyoverdine) dans un milieu déficient en fer. Pour cela, nous avons utilisé nos propres données expérimentales pour la validation croisée du modèle

Aussi, nous avons supposé la même structure du modèle et considéré des conditions expérimentales différentes, en adoptant une approche axée sur la simulation pour évaluer la validité du modèle et vérifier le niveau d'ajustement, avec les données expérimentales obtenues au laboratoire.

En définitif, nos résultats de simulation théorique sont en accord avec les données expérimentales existantes et suggèrent que les paramètres dynamiques clés de la production de biomasse et de métabolites secondaires (pyoverdine) peuvent être expliquées et prédites en utilisant une approche parcimonieuse de modélisation computationnelle comme celle utilisée dans la présente étude.

Les prédictions du modèle ont montré des niveaux d'ajustements très satisfaisants lors de leurs comparaisons aux données expérimentales obtenues à partir des mesures faites au laboratoire de la quantité et teneur respective de la biomasse et pyoverdine. Ainsi, nous pouvons confirmer que le système d'équations différentielles que nous avons étudié permet de prédire avec succès les caractéristiques cinétiques clés de toutes les variables d'état prises en charge par le modèle, tout en donnant, des prédictions en temps réel de la dynamique du fer pour lesquelles aucune donnée expérimentale n'était disponible.

En outre, nous avons effectué une analyse de sensibilité locale et utilisé la méthode d'échantillonnage dite de l'hyper cube latin pour la génération de vecteurs aléatoires, ce qui nous a permis de couvrir une grande partie du domaine de définition de chacun des paramètres et d'obtenir des informations sur l'importance relative de chacun d'eux et tester infini la sensibilité des variables d'état.

Cependant, il est toujours recommandé d'être prudent dans la manière d'utilisation de ce genre de résultats vu que les solutions numériques de ce type de problématique supposent que tous les paramètres soient des variables aléatoires indépendantes. Aussi, et même si le concept d'analyse de sensibilité locale est simple et efficace dans les résultats qu'il génère (si toutefois la sensibilité locale est d'intérêt), il n'existe pas de méthode d'analyse de sensibilité absolue pour tous les types de

modèles biologiques, du fait que, la plupart des méthodes ont toutes leurs avantages et leurs inconvénients.

Des études ultérieures, devraient considérer l'analyse de la matrice de covariance des erreurs, du vecteur de paramètres optimaux afin de déterminer : (i) Les paramètres mal bornés, (ii) Les paramètres corrélés et partiellement corrélés, (iii) Comment est que le processus de sous-détermination est traitée par le programme d'optimisation, (iv) Le nombre exact de paramètres qui pourraient être bornés et contraint par les données disponibles et enfin (v) une analyse de sensibilité traitant les interactions entre plus d'un paramètre, si des informations sur l'effet global que pourrait avoir un facteur d'entrée sur le modèle devenait nécessaires.

La limitation de cette méthode basée sur la dérivation de variables est évidente, car elle ne peut représenter l'indice de sensibilité global pour la plupart des modèles numériques qui impliquent généralement la mise en jeu de fortes interrelations de type non linéaires. Par conséquent, une étude plus poussée sur le modèle étudié devrait se concentrer sur l'utilisation d'une approche d'optimisation globale afin de confirmer les présentes conclusions et apporter la preuve que nous n'avons pas convergé vers une solution locale.

En association et étant donné qu'il est admis que l'erreur est une composante qui se propage à travers les modèles et affecte leurs prédictions, il serait opportun de conduire une étude d'incertitude basée sur les paramètres sus étudiés, ou plus généralement une étude d'incertitude conceptuelle ou de scénarios spécifiques.

Il est à noter également, que comme pour toutes les approches de modélisation qui présentent des points forts et des points faibles dans la description des phénomènes qu'ils essayent de reproduire, le présent modèle est d'un certain point de vue statiques, en ce sens où, il nous est impossible d'ajouter de nouveaux éléments au modèle en cours de simulation, ou de le faire évoluer dans un environnement dynamique.

Ceci est en porte-à-faux avec la caractéristique intrinsèque d'adaptation dont font part les organismes vivants, même les plus simples (bactéries, protistes, virus, etc...) lorsque ils sont soumis à un stress ou qu'ils interagissent en temps réel avec la multitude de stimuli qu'ils reçoivent continuellement, de leur environnement immédiat.

Par conséquent, il serait nécessaire de reconduire la même étude de suivi de la culture en temps réel en association avec une technique de modélisation qui soit capable de refléter les données expérimentales ainsi que les valeurs respectives de chacun des différents paramètres constitutifs du modèle de manière instantané.

Cette caractéristique d'adaptation contextuelle, devra passer initialement par une phase d'apprentissage sur toute, ou, une partie des données recueillies, dont une fois la structure du modèle validée et considérée comme étant stable, celle-ci devra être capable de déconnecter cette capacité d'auto-construction et donner des résultats aussi fiables que possible sur d'autres données issues d'expérimentations analogues (Modélisation individu-centrée et systèmes multi-agents).

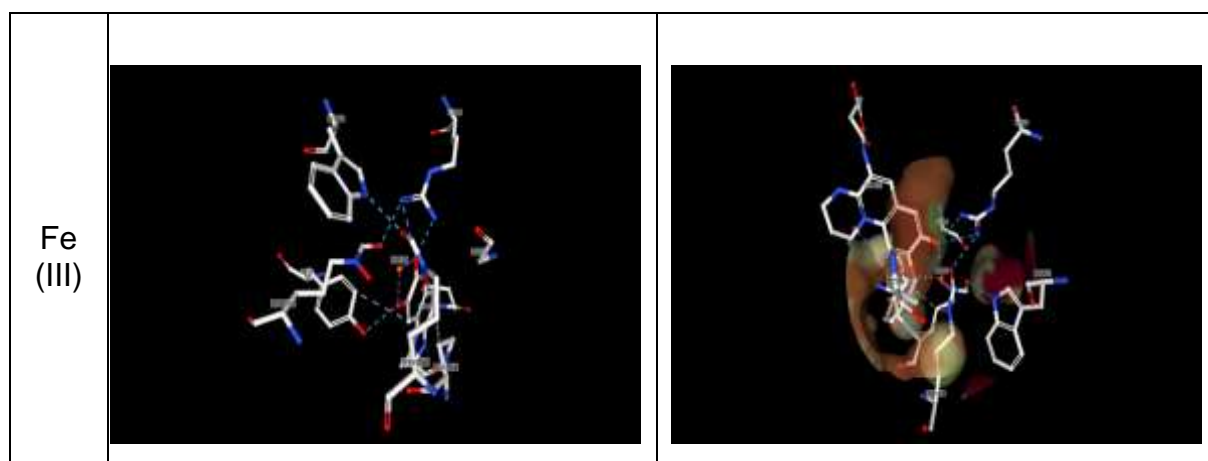
Enfin, le modèle présenté ainsi que l'approche utilisé dans ce travail pour traiter de ce genre de problématique biologique pourrait être non seulement utile comme outil indirect d'expérimentations pour l'évaluation de théories empiriques basées sur les données expérimentales recueillies sur terrain, ou au, laboratoire, mais aussi comme base pour la prédiction de la quantité de biomasse microbienne et de métabolites secondaires, comme ce fut le cas dans notre expérimentation.

Ceci, réduirait ou éliminerait le besoin de procéder à des analyses coûteuses au laboratoire sur des paramètres trop compliqués ou trop fastidieux à mesurée ou à quantifier. D'un autre côté, l'approche utilisée peut aider à la conception et à l'optimisation de plans de travail visant spécifiquement les paramètres ayants un effet significatif sur le fonctionnement des systèmes de production d'inoculum microbiens à grande échelle et à élaborer des critères pratiques pour la sélection des PGPRs, qui rappelons le sont connus pour assurer une colonisation efficace de la rhizosphères.

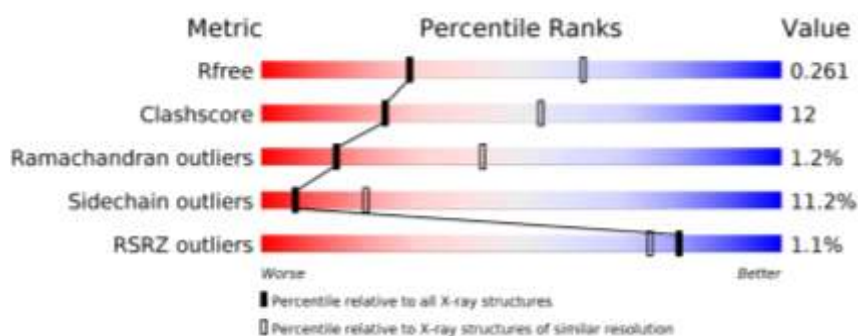
En perspective, d'autres études de ce type devraient se concentrer sur un autre volet important de la croissance bactérienne portant sur la modélisation des biofilms puisque, il est aujourd'hui admis, que les populations de *Pseudomonas* interagissent avec d'autres populations d'antagonistes pour former des biofilms naturels impliquant une dynamique différente de la modélisation des ressources nutritives comme celle rencontré dans les milieux en suspension.

## Appendice A

Structure tridimensionnelle du récepteur membranaire FpvA de *Pseudomonas aeruginosa* liée à une molécule de pyoverdines hétérologue chargée en fer [complexe FpvA-Pvd(Pa6)-Fe] obtenu par cristallographie par rayons X à diffraction utilisant une résolution de 2.80 Å.

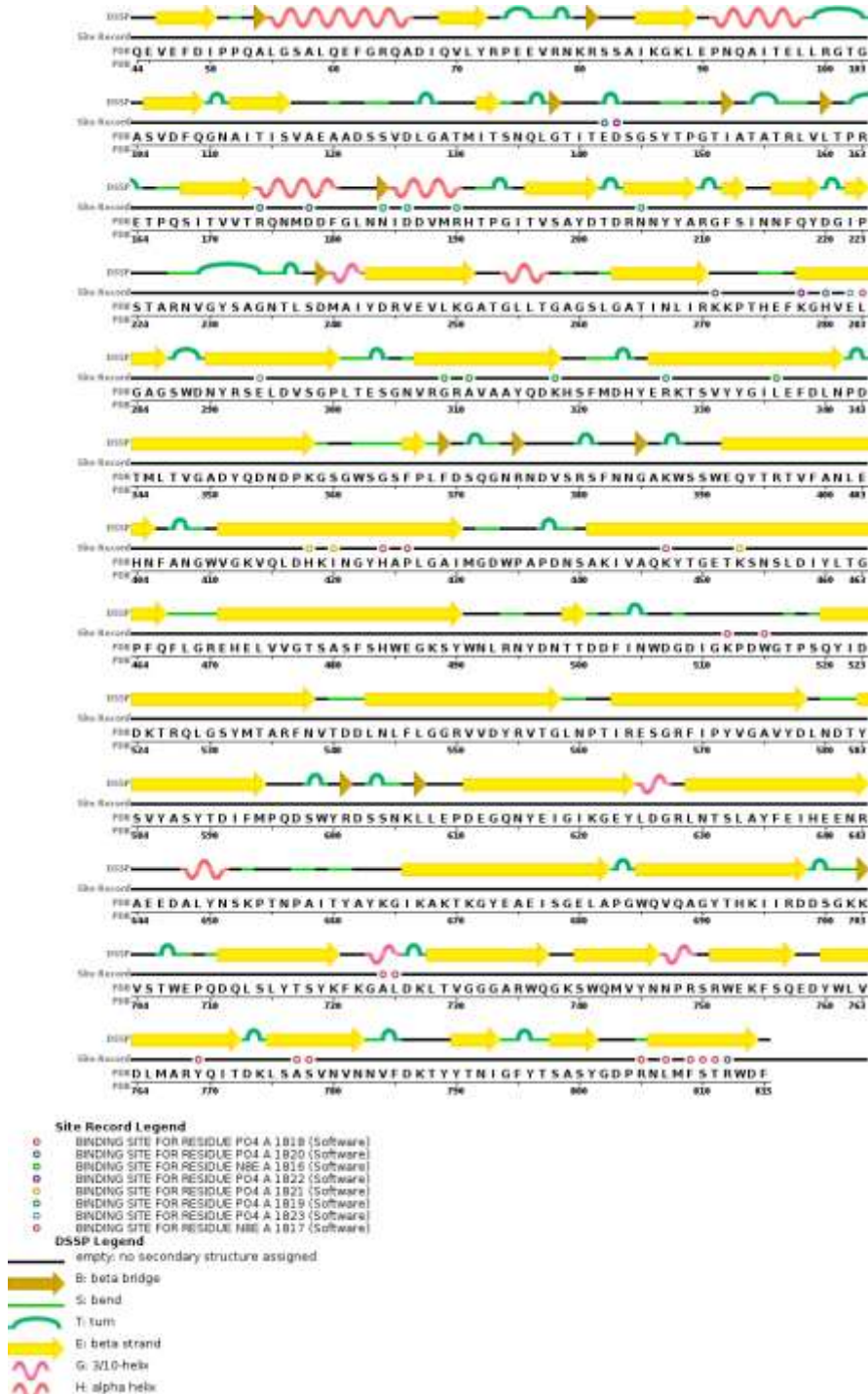


La validation de la structure protéique représentant le complexe [FpvA-Pvd(Pa6)-Fe], est donné par les mesures globales de la qualité de représentation résumés dans le graphique suivant donnant les scores en percentiles (entre 0 - 100).



Metric	Whole archive (#Entries)	Similar resolution (#Entries, resolution range(Å))
R <sub>free</sub>	111664	2792 (2.80-2.80)
Clashscore	122126	3209 (2.80-2.80)
Ramachandran outliers	120053	3158 (2.80-2.80)
Sidechain outliers	120020	3160 (2.80-2.80)
RSRZ outliers	108989	2726 (2.80-2.80)

Représentation schématique des peptides rentrant dans la constitution de la pyoverdine.



## Appendice B

Caractéristiques physico-chimiques du sol utilisé [228].

Caractéristiques	Taux (%)
pH <sub>eau</sub>	6.9
pH <sub>kcl</sub>	6.7
K <sup>+</sup>	0.63%
Na <sup>+</sup>	2.63%
Ca <sup>+2</sup> + Mg <sup>+2</sup>	9.65%
S <sup>+</sup>	0.44
C.E	12.5
C.E.C Capacité d'échange cationique (meq / 100 g de sol)	77.2
V (Taux de saturation)	189.33
P <sup>2</sup> O <sup>5</sup> Phosphore assimilable (ppm)	0
Ca CO <sub>3</sub>	1.89
Matière organique	10.45
H <sub>cc</sub> (Humidité pondérale a la capacité au champ)	16.36%
Argile	24.12%
L (Limon)	16.22%
LG (Limon grossier)	14.28%
SF (Sable fin)	14.28%
SG (Sable grossier)	28.98%

## APPENDICE C

### Milieux de culture

Milieu B de King (KB) King *et al.*, [301].

Peptone (Difco) 20 g ; Glycerole (Prolabo) 15 ml ; K<sub>2</sub> Hpo<sub>4</sub> (Sigma) 1,5 g ; MgSO<sub>4</sub> (Sigma) 1,5 g ; Agar (Sigma) 15 g ; Eau distillée 1000 ml ; pH = 7,2 autoclavage 20 minutes à 120° C.



## APPENDICE D

Tableau 1 : Dénombrements de la souche CHAO dans les microcosmes après 15 jours  
(Première période) de croissance.

Traitements	Dilutions	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	MOY	MOY G	E. type
<b>CHAO 1</b>	-5	5.06E+08	ND	5.57E+08	<b>1.06E+09</b>	<b>9.36E+10</b>	<b>1.02E+02</b>
	-6	2.54E+09	4.22E+09	4.17E+09	<b>3.64E+09</b>		
	-7	ND	5.75E+10	ND	<b>5.75E+10</b>		
<b>CHAO 2</b>	-8	2.35E+11	3.64E+11	1.25E+11	<b>2.41E+11</b>		
	-5	ND	ND	ND	<b>ND</b>		
	-6	5.60E+09	ND	5.40E+09	<b>1.10E+10</b>		
<b>CHAO 3</b>	-7	ND	ND	4.20E+09	<b>4.20E+09</b>		
	-8	3.63E+11	3.43E+11	3.60E+11	<b>3.55E+11</b>		
	-5	ND	ND	4.63E+08	<b>4.63E+08</b>		
<b>CHAO 4</b>	-6	4.30E+08	7.00E+08	4.50E+08	<b>5.27E+08</b>		
	-7	4.84E+10	4.40E+10	1.91E+10	<b>3.72E+10</b>		
	-8	2.58E+11	1.77E+11	2.08E+11	<b>2.14E+11</b>		
<b>CHAO 1 Fe</b>	-5	5.18E+08	5.58E+08	ND	<b>5.38E+08</b>	<b>9.64E+10</b>	<b>1.82E+02</b>
	-6	ND	ND	5.33E+09	<b>5.33E+09</b>		
	-7	ND	5.57E+10	ND	<b>5.57E+10</b>		
<b>CHAO 2 Fe</b>	-8	ND	5.20E+11	5.80E+11	<b>5.50E+11</b>		
	-5	5.93E+08	ND	ND	<b>5.93E+08</b>		
	-6	5.90E+08	3.70E+08	2.31E+09	<b>1.09E+09</b>		
<b>CHAO 3 Fe</b>	-7	3.33E+10	ND	4.46E+10	<b>3.90E+10</b>		
	-8	ND	2.36E+11	ND	<b>2.36E+11</b>		
	-5	3.27E+08	5.14E+08	4.30E+08	<b>4.24E+08</b>		
<b>CHAO 4 Fe</b>	-6	2.56E+09	2.47E+09	1.36E+09	<b>2.13E+09</b>		
	-7	ND	1.37E+10	3.90E+09	<b>8.80E+09</b>		
	-8	4.70E+10	7.70E+10	4.40E+10	<b>5.60E+10</b>		
<b>CHAO 1 -EDTA</b>	-5	5.65E+08	ND	5.80E+08	<b>5.73E+08</b>		
	-6	3.25E+09	5.75E+09	5.95E+09	<b>4.98E+09</b>		
	-7	ND	5.38E+10	5.92E+10	<b>5.65E+10</b>		
<b>CHAO 2 EDTA</b>	-8	5.96E+11	5.56E+11	4.20E+11	<b>5.24E+11</b>		
	-6	ND	ND	ND	<b>ND</b>		
	-7	ND	ND	ND	<b>ND</b>		
<b>CHAO 2 EDTA</b>	-8	ND	ND	ND	<b>ND</b>		
	-6	3.80E+08	4.10E+08	ND	<b>3.95E+08</b>	<b>6.17E+10</b>	<b>8.60E+02</b>
	-7	ND	ND	ND	<b>ND</b>		
-8	ND	1.23E+11	ND	<b>1.23E+11</b>			

MOY : moyenne des trois répétitions. MOYG : moyenne générale de la totalité des dilutions  
E type : écart type des différentes répétitions. ND : non donné.

APPENDICE D (suite) :

Tableau 2 : Dénombrements de la souche CHAO dans les microcosmes après 32 jours (deuxième période) de croissance.

Traitements	Dilutions	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	MOY	MOY G	E. type
<b>CHAO 1</b>	-6	2.17E+09	1.03E+09	ND	1.60E+09	2.41E+10	1.85E+02
	-7	9.20E+09	8.40E+09	ND	8.80E+09		
	-8	8.10E+10	7.40E+10	ND	7.75E+10		
<b>CHAO 2</b>	-6	1.00E+09	1.01E+09	ND	1.01E+09		
	-7	ND	3.00E+09	ND	3.00E+09		
	-8	5.10E+10	5.70E+10	ND	5.40E+10		
<b>CHAO 3</b>	-6	ND	1.70E+09	ND	1.70E+09		
	-7	6.90E+09	8.40E+09	ND	7.65E+09		
	-8	8.20E+10	4.10E+10	ND	6.15E+10		
<b>CHAO 1 EDTA</b>	-6	2.88E+09	2.80E+09	ND	2.84E+09	6.66E+10	1.38E+02
	-7	1.45E+10	1.07E+10	ND	1.26E+10		
	-8	6.50E+10	3.90E+10	ND	5.20E+10		
<b>CHAO 2-EDTA</b>	-6	ND	9.60E+08	ND	9.60E+08		
	-7	ND	ND	ND	ND		
	-8	ND	9.80E+08	ND	9.80E+08		
<b>CHAO 2 EDTA</b>	-6	ND	ND	ND	ND		
	-7	1.73E+10	2.10E+10	ND	1.92E+10		
	-8	4.30E+11	3.25E+11	ND	3.78E+11		

MOY : moyenne des trois répétitions. MOYG : moyenne générale de la totalité des dilutions  
E type : écart type des différentes répétitions. ND : non donné.

APPENDICE D(suite) :

Tableau 3 : Dénombrements de la souche CK4 dans les microcosmes après 15 jours (Première période) de croissance.

Traitements	Dilutions	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	MOY	MOY G	E. type
<b>PVD- 1</b>	-5	5.95E+08	ND	ND	5.95E+08	1.32E+11	2.12E+02
	-6	5.78E+09	ND	ND	5.78E+09		
	-7	4.74E+10	5.75E+10	4.41E+10	4.97E+10		
	-8	5.86E+11	4.29E+11	3.92E+11	4.69E+11		
<b>PVD- 2</b>	-5	ND	ND	5.45E+08	5.45E+08		
	-6	ND	ND	5.61E+09	5.61E+09		
	-7	ND	5.97E+10	5.87E+10	5.92E+10		
	-8	3.20E+10	3.58E+11	3.86E+11	2.59E+11		
<b>PVD- 3</b>	-5	5.81E+08	ND	5.76E+08	5.79E+08		
	-6	ND	ND	5.98E+09	5.98E+09		
	-7	ND	ND	5.96E+10	5.96E+10		
	-8	ND	5.95E+11	5.98E+11	5.97E+11		
<b>PVD- 4</b>	-5	ND	5.94E+08	ND	5.94E+08		
	-6	ND	ND	5.60E+09	5.60E+09		

	-7	ND	5.76E+10	5.97E+10	<b>5.87E+10</b>		
	-8	5.68E+11	5.08E+11		<b>5.38E+11</b>		
<b>PVD- 1 Fe</b>	-6	6.60E+08	4.80E+08	ND	5.70E+08	<b>1.09E+10</b>	<b>1.89E+02</b>
	-7	1.28E+10	7.60E+09	ND	1.02E+10		
	-8	ND	3.00E+10	ND	3.00E+10		
<b>PVD- 2 Fe</b>	-6	2.03E+09	ND	ND	2.03E+09		
	-7	ND	ND	ND	ND		
	-8	ND	5.51E+11	ND	5.51E+11		
<b>PVD- 3 Fe</b>	-6	ND	5.17E+09	ND	5.17E+09		
	-7	1.69E+10	5.62E+10	ND	3.66E+10		
	-8	3.40E+10	ND	ND	3.40E+10		
<b>PVD- 1 -EDTA</b>	-6	ND	1.30E+09	ND	1.30E+09	<b>1.83E+09</b>	<b>7.09E+03</b>
	-7	3.42E+10	ND	ND	3.42E+10		
	-8	6.70E+10	2.54E+11	ND	1.61E+11		
<b>PVD- 2 EDTA</b>	-6	2.35E+09	ND	ND	2.35E+09		
	-7	3.80E+10	2.12E+10	ND	2.96E+10		
	-8	1.84E+11	1.00E+11	ND	1.42E+11		
<b>PVD-3 EDTA</b>	-6	ND	ND	ND	ND		
	-7	ND	ND	ND	ND		
	-8	ND	ND	ND	ND		

MOY : moyenne des trois répétitions. MOYG : moyenne générale de la totalité des dilutions  
E type : écart type des différentes répétitions. ND : non donné.

#### APPENDICE D (suite) :

Tableau 4 : Dénombrements de la souche CK4 dans les microcosmes après 32 jours  
(deuxième période) de croissance.

Traitements	Dilutions	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	MOY	MOY G	E. type
<b>PVD- 1</b>	-6	8.10E+08	5.06E+09	ND	<b>2.94E+09</b>	<b>1.29E+10</b>	<b>1.26E+02</b>
	-7	6.70E+09	4.40E+09	ND	<b>5.55E+09</b>		
	-8	ND	ND	ND			
<b>PVD- 2</b>	-6	2.34E+09	1.09E+09	ND	<b>1.72E+09</b>		
	-7	1.95E+10	7.50E+09	ND	<b>1.35E+10</b>		
	-8	3.20E+10	ND	ND	<b>3.20E+10</b>		
<b>PVD- 3</b>	-6	8.30E+08	5.50E+08	ND	<b>6.90E+08</b>		
	-7	1.53E+10	1.89E+10	ND	<b>1.71E+10</b>		
	-8	ND	3.00E+10	ND	<b>3.00E+10</b>		
<b>PVD- 1 -EDTA</b>	-6	ND	2.80E+09	ND	2.80E+09	<b>1.62E+10</b>	<b>2.80E+02</b>
	-7	1.37E+10	2.05E+10	ND	1.71E+10		
	-8	ND	9.10E+10	ND	9.10E+10		
<b>PVD- 2 EDTA</b>	-6	1.29E+09	1.70E+09	ND	1.50E+09		
	-7	1.82E+10	5.65E+10	ND	3.74E+10		
	-8	5.57E+11	5.12E+11	ND	5.35E+11		
<b>PVD-3 EDTA</b>	-6	3.62E+09	3.45E+09	ND	3.54E+09		
	-7	3.52E+10	ND	ND	3.52E+10		
	-8	5.13E+11	2.17E+11	ND	3.65E+11		

MOY : moyenne des trois répétitions. MOYG : moyenne générale de la totalité des dilutions  
E type : écart type des différentes répétitions. ND : non donné.

APPENDICE D (suite) :

Tableau 5 : Dénombrements de la souche S20 dans les microcosmes après 15 jours (Première période) de croissance.

Traitements	Dilutions	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	MOY	MOY G	E.type		
<b>S20 1</b>	-6	1.40E+09	3.16E+09	ND	<b>2.28E+09</b>	<b>1.66E+10</b>	<b>1.47E+02</b>		
	-7	3.10E+09	2.50E+10	ND	<b>1.41E+10</b>				
	-8	3.30E+10	ND	ND	<b>3.30E+10</b>				
<b>S20 2</b>	-6	4.90E+09	4.64E+09	ND	<b>4.77E+09</b>				
	-7	9.50E+09	4.76E+10	ND	<b>2.86E+10</b>				
	-8	4.50E+10	3.20E+10	ND	<b>3.85E+10</b>				
<b>S20 3</b>	-6	3.03E+09	3.60E+08	ND	<b>1.70E+09</b>				
	-7	1.00E+10	ND	ND	<b>1.00E+10</b>				
	-8	ND	ND	ND	<b>ND</b>				
<b>S20 1 Fe</b>	-6	2.33E+09	4.86E+09	ND	<b>3.60E+09</b>	<b>6.74E+10</b>	<b>1.02E+02</b>		
	-7	9.60E+09	2.15E+10	ND	<b>1.56E+10</b>				
	-8	9.70E+10	2.19E+10	ND	<b>5.95E+10</b>				
<b>S20 2 Fe</b>	-6	2.49E+09	2.74E+09	ND	<b>2.62E+09</b>				
	-7	ND	6.90E+09	ND	<b>6.90E+09</b>				
	-8	1.49E+11	ND	ND	<b>1.49E+11</b>				
<b>S20 3 Fe</b>	-6	4.70E+08	7.60E+08	ND	<b>6.15E+08</b>				
	-7	ND	6.40E+09	ND	<b>6.40E+09</b>				
	-8	2.11E+11	3.91E+11	ND	<b>3.01E+11</b>				
<b>S20 1 EDTA</b>	-5	ND	ND	ND	<b>ND</b>				
	-6	ND	ND	ND	<b>ND</b>				
	-7	5.09E+10	ND	5.92E+10	<b>5.51E+10</b>			<b>1.26E+11</b>	<b>1.89E+02</b>
	-8	ND	5.91E+11	5.87E+11	<b>5.89E+11</b>				
<b>S20 2 EDTA</b>	-5	ND	ND	ND	<b>ND</b>				
	-6	4.49E+09	ND	3.86E+09	<b>4.18E+09</b>				
	-7	3.26E+10	5.32E+10	4.48E+10	<b>4.35E+10</b>				
	-8	3.86E+11	2.99E+11	ND	<b>3.43E+11</b>				
<b>S20 3 EDTA</b>	-5	2.64E+08	ND	ND	<b>2.64E+08</b>				
	-6	1.55E+09	1.75E+09	8.90E+08	<b>1.40E+09</b>				
	-7	ND	3.75E+10	3.33E+10	<b>3.54E+10</b>				
	-8	7.30E+10	2.34E+11	ND	<b>1.54E+11</b>				
<b>S20 4 EDTA</b>	-5	ND	ND	5.00E+08	<b>5.00E+08</b>				
	-6	3.49E+09	2.52E+09	4.92E+09	<b>3.64E+09</b>				
	-7	1.32E+10	3.98E+10	4.11E+10	<b>3.14E+10</b>				
	-8	4.57E+11	2.88E+11	ND	<b>3.73E+11</b>				

MOY : moyenne des trois répétitions. MOYG : moyenne générale de la totalité des dilutions  
E type : écart type des différentes répétitions. ND : non donné.

APPENDICE D (suite) :

Tableau 6 : Dénombrements de la souche S20 dans les microcosmes après 32 jours (deuxième période) de croissance.

Traitements	Dilutions	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	MOY	MOY G	E.type
<b>S20 1</b>	-6	2.52E+09	1.99E+09	ND	<b>2.26E+09</b>	<b>5.66E+10</b>	<b>1.30E+02</b>
	-7	4.04E+10	1.04E+10	ND	<b>2.54E+10</b>		
	-8	1.10E+11	1.31E+10	ND	<b>6.16E+10</b>		
<b>S20 2</b>	-6	4.80E+08	3.00E+08	ND	<b>3.90E+08</b>		
	-7	5.32E+10	5.30E+09	ND	<b>2.93E+10</b>		
	-8	4.40E+10	ND	ND	<b>4.40E+10</b>		
<b>S20 3</b>	-6	5.89E+09	ND	ND	<b>5.89E+09</b>		
	-7	ND	ND	ND	<b>ND</b>		
	-8	5.91E+11	1.83E+11	ND	<b>3.87E+11</b>		
<b>S20 1 Fe</b>	-6	5.37E+09	4.28E+09	ND	<b>4.83E+09</b>	<b>5.81E+10</b>	<b>9.21E+02</b>
	-7	2.50E+10	7.90E+09	ND	<b>1.65E+10</b>		
	-8	3.92E+11	9.30E+10	ND	<b>2.43E+11</b>		
<b>S20 2 Fe</b>	-6	2.64E+09	ND	ND	<b>2.64E+09</b>		
	-7	5.10E+10	1.03E+10	ND	<b>3.07E+10</b>		
	-8	5.50E+10	4.80E+10	ND	<b>5.15E+10</b>		
<b>S20 1 EDTA</b>	-6	1.79E+09	6.90E+08	ND	<b>1.24E+09</b>	<b>6.36E+10</b>	<b>4.53E+02</b>
	-7	ND	1.63E+10	ND	<b>1.63E+10</b>		
	-8	1.81E+11	5.80E+11	ND	<b>3.81E+11</b>		
<b>S20 2 EDTA</b>	-6	ND	3.00E+09	ND	<b>3.00E+09</b>		
	-7	2.41E+10	8.20E+09	ND	<b>1.62E+10</b>		
	-8	7.30E+10	4.10E+10	ND	<b>5.70E+10</b>		
<b>S20 3 EDTA</b>	-6	1.60E+09	1.80E+09	ND	<b>1.70E+09</b>		
	-7	5.90E+10	6.90E+09	ND	<b>3.30E+10</b>		
	-8	ND	ND	ND	<b>ND</b>		

MOY : moyenne des trois répétitions. MOYG : moyenne générale de la totalité des dilutions  
E type : écart type des différentes répétitions. ND : non donné.

APPENDICE D (suite) :

Tableau 7 : Dénombrements bactérien réalisé dans les trois microcosmes (blé, lin et tomate) bactérisé avec la souche D1 de *Pseudomonas fluorescens*, après 15 jours de croissance.

Traitements	Dilutions	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	MOY	MOY G	E. type
<b>D1BLE 1</b>	-5	ND	ND	ND	<b>ND</b>	<b>2.53E+09</b>	<b>7.93E+02</b>
	-6	1.08E+09	8.00E+08	9.50E+08	<b>9.43E+08</b>		
	-7	2.29E+10	1.52E+10	> 30	<b>ND</b>		
<b>D1 BLE 2</b>	-8	> 30	3.44E+11	1.50E+11	<b>ND</b>		
	-5	ND	ND	ND	<b>ND</b>		
	-6	4.20E+08	5.10E+08	5.05E+09	<b>1.99E+09</b>		

	-7	ND	4.70E+09	ND	4.70E+09		
	-8	> 600	> 600	ND	ND		
<b>D1BLE 3</b>	-5	> 600	> 600	> 600			
	-6	1.30E+09	5.08E+09	1.55E+09	2.64E+09		
	-7	< 30	< 30	< 30	ND		
	-8	< 30	< 30	< 30	ND		
<b>D1BLE 4</b>	-5	2.37E+08	1.73E+08	1.53E+08	1.88E+08		
	-6	ND	6.60E+08	8.74E+09	4.70E+09		
	-7	2.43E+10	> 30	> 30	ND		
	-8	3.30E+10	>30	1.53E+11	ND		
<b>D1 LIN 1</b>	-6	3.11E+09	1.28E+09		2.20E+09	2.09E+10	1.63E+02
	-7	5.28E+10	ND		5.28E+10		
	-8	ND	ND		ND		
<b>D1 LIN 2</b>	-6	3.49E+09	3.20E+08		1.91E+09		
	-7	ND	ND		ND		
	-8	< 30	4.19E+11		ND		
<b>D1 LIN 3</b>	-6	2.02E+09	3.72E+09		2.87E+09		
	-7	ND	ND				
	-8	4.60E+10	1.13E+11		7.95E+10		
<b>D1 TOMATE 1</b>	-6	ND	ND	ND	ND		
	-7	ND	ND	ND	ND	1.22E+11	1.96E+02
	-8	ND	3.84E+11	1.48E+11	2.66E+11		
<b>D1 TOMATE 2</b>	-5	8.70E+07	3.16E+08	3.96E+08	2.66E+08		
	-6	ND	ND	1.20E+09	1.20E+09		
	-7	ND	3.50E+09	2.68E+10	1.52E+10		
	-8	1.07E+11	6.70E+10	5.60E+11	2.45E+11		
<b>D1 TOMATE3</b>	-5	ND	ND	5.86E+08	5.86E+08		
	-6	5.01E+09	ND	5.62E+09	5.32E+09		
	-7	ND	ND	ND	ND		
	-8	ND	5.84E+11	ND	5.84E+11		
<b>D1 TOMATE 4</b>	-5	ND	ND	ND	ND		
	-6	1.86E+09	5.60E+08	ND	1.21E+09		
	-7	9.80E+09	7.20E+09	ND	8.50E+09		
	-8	4.40E+10	5.07E+11	4.12E+11	3.21E+11		

MOY : moyenne des trois répétitions. MOYG : moyenne générale de la totalité des dilutions  
E type : écart type des différentes répétitions. ND : non donné.

#### APPENDICE D (suite) :

Tableau 8 : Dénombrements bactérien réalisé dans les trois microcosmes (blé, lin et tomate) bactérisé avec la souche D1 de *Pseudomonas fluorescens*, après 32 jours de croissance.

Traitements	Dilutions	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	MOY	MOY G	E. type
<b>D1 BLE 1</b>	-6	5.98E+09	4.06E+09		5.02E+09	7.64E+09	1.73E+02
	-7	1.51E+10	2.76E+10		2.14E+10		
	-8	> 30	7.40E+10		ND		
<b>D 1BLE 2</b>	-6	2.95E+09	2.92E+09		2.94E+09		
	-7	9.60E+09	4.40E+09		7.00E+09		

	-8	5.09E+11	> 30		<b>ND</b>		
<b>D1 BLE 3</b>	-6	2.16E+09	1.66E+09		<b>1.91E+09</b>		
	-7	> 30	< 30		<b>ND</b>		
	-8	6.40E+10	> 30		<b>ND</b>		
<b>D1 LIN 1</b>	-6	1.90E+09	2.03E+09		<b>1.97E+09</b>	<b>1.01E+10</b>	<b>1.16E+02</b>
	-7	ND	4.90E+09		<b>4.90E+09</b>		
	-8	ND	ND		<b>ND</b>		
<b>D1 LIN 2</b>	-6	ND	1.12E+09		<b>1.12E+09</b>		
	-7	ND	ND		<b>ND</b>		
	-8	3.00E+10	4.00E+10		<b>3.50E+10</b>		
<b>D1 LIN 3</b>	-6	4.27E+09			<b>4.27E+09</b>		
	-7	2.24E+10	4.60E+09		<b>1.35E+10</b>		
	-8	5.00E+10	<30		<b>ND</b>		
<b>D1 TOMATE 1</b>	-6	ND	ND	ND	<b>ND</b>	<b>6.27E+10</b>	<b>9.71E+02</b>
	-7	5.88E+10	ND	ND	<b>5.88E+10</b>		
	-8	8.30E+10	ND	ND	<b>8.30E+10</b>		
<b>D1 TOMATE 2</b>	-6	ND	2.26E+09	ND	<b>2.26E+09</b>		
	-7	1.65E+10	2.19E+10	ND	<b>1.92E+10</b>		
	-8	4.30E+10	3.90E+10	ND	<b>4.10E+10</b>		
<b>D1 TOMATE 3</b>	-6	5.28E+09	1.56E+09	ND	<b>3.42E+09</b>		
	-7	3.60E+09	9.00E+08	ND	<b>2.25E+09</b>		
	-8	4.42E+11	1.41E+11	ND	<b>2.92E+11</b>		

MOY : moyenne des trois répétitions. MOYG : moyenne générale de la totalité des dilutions  
E type : écart type des différentes répétitions. ND : non donné.

#### APPENDICE D (suite) :

Tableau 9 : Dénombrements bactérien réalisé dans les trois microcosmes (blé, lin et tomate) bactérisé avec la souche D2 de *Pseudomonas fluorescens*, après 15 jours de croissance.

Traitements	Dilutions	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	MOY	MOY G	E. type
<b>D2 BLE1</b>	-5	2.48E+08	2.95E+08	4.67E+08	<b>3.37E+08</b>	<b>2.39E+09</b>	<b>1.55E+02</b>
	-6	4.50E+08	ND	1.91E+09	<b>1.18E+09</b>		
	-7	3.80E+09	> 30	ND	<b>3.80E+09</b>		
	-8	ND	ND	ND	<b>ND</b>		
<b>D2 BLE2</b>	-5	4.38E+08	ND	4.89E+08	<b>4.64E+08</b>		
	-6	2.25E+09	4.89E+09	ND	<b>3.57E+09</b>		
	-7	ND	ND	3.60E+09	<b>3.60E+09</b>		
	-8	ND	ND	ND			
<b>D2 BLE3</b>	-5	4.67E+08	ND	ND	<b>4.67E+08</b>		
	-6	ND	2.71E+09	4.56E+09	<b>3.64E+09</b>		
	-7	3.60E+09	ND	ND	<b>3.60E+09</b>		
	-8	ND	ND	ND	<b>ND</b>		
<b>D2 BLE4</b>	-5	ND	ND	ND	<b>ND</b>		
	-6	ND	ND	ND	<b>ND</b>		
	-7	5.98E+09	4.20E+08		<b>3.20E+09</b>		
	-8	ND	ND	ND	<b>ND</b>		

<b>D2 LIN1</b>	-6	1.90E+09	2.43E+09		<b>2.17E+09</b>	<b>1.10E+11</b>	<b>2.14E+02</b>
	-7	ND	ND		<b>ND</b>		
	-8	ND	6.30E+10		<b>6.30E+10</b>		
<b>D2 LIN2</b>	-6	5.92E+09	5.97E+09		<b>5.95E+09</b>		
	-7	5.84E+10	5.82E+10		<b>5.83E+10</b>		
	-8	5.93E+11	ND		<b>5.93E+11</b>		
<b>D2 LIN3</b>	-6	ND	5.62E+09		<b>5.62E+09</b>		
	-7	4.41E+10	ND		<b>4.41E+10</b>		
	-8	ND	ND		<b>ND</b>		
<b>D2 TOMATE1</b>	-5	ND	ND	ND	<b>ND</b>	<b>9.97E+09</b>	<b>7.57E+02</b>
	-6	3.90E+08		3.08E+09	<b>1.74E+09</b>		
	-7	ND	ND	3.16E+10	<b>3.16E+10</b>		
	-8	3.38E+11	< 30	5.40E+10	<b>ND</b>		
<b>D2 TOMATE2</b>	-5	3.46E+08	5.16E+08	ND	<b>4.31E+08</b>		
	-6	1.37E+09	1.57E+09	ND	<b>1.47E+09</b>		
	-7	1.61E+10	1.71E+10	4.13E+10	<b>2.48E+10</b>		
	-8	< 30	1.14E+11	2.36E+11	<b>ND</b>		
<b>D2 TOMATE3</b>	-5	ND	ND	5.59E+08	<b>5.59E+08</b>		
	-6	5.59E+09	5.76E+09	4.26E+09	<b>5.20E+09</b>		
	-7	ND		1.16E+10	<b>1.16E+10</b>		
	-8	ND	1.36E+11	> 30	<b>ND</b>		
<b>D2 TOMATE4</b>	-5	3.12E+08	3.47E+08	5.87E+08	<b>4.15E+08</b>		
	-6	ND	ND	2.88E+09	<b>2.88E+09</b>		
	-7	ND	ND	3.10E+09	<b>3.10E+09</b>		
	-8	5.00E+10	4.50E+09	5.30E+10	<b>3.58E+10</b>		

MOY : moyenne des trois répétitions. MOYG : moyenne générale de la totalité des dilutions  
E type : écart type des différentes répétitions. ND : non donné.

#### APPENDICE D (suite) :

Tableau 10 : Dénombrements bactérien réalisé dans les trois microcosmes (blé, lin et tomate) bactérisé avec la souche D1 de *Pseudomonas fluorescens*, après 32 jours de croissance.

Traitements	Dilutions	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	MOY	MOY G	E. type
<b>D2 BLE1</b>	-6	2.42E+09	8.90E+08		<b>1.66E+09</b>	<b>3.21E+10</b>	<b>4.21E+02</b>
	-7	1.68E+10	2.10E+10		<b>1.89E+10</b>		
	-8	1.14E+11	6.50E+10		<b>8.95E+10</b>		
<b>D2 BLE2</b>	-6	5.99E+09			<b>5.99E+09</b>		
	-7	7.70E+09	7.50E+09		<b>7.60E+09</b>		
	-8	1.69E+11	6.40E+10		<b>1.17E+11</b>		
<b>D2 BLE3</b>	-6	2.99E+09	1.66E+09		<b>2.33E+09</b>		
	-7	1.25E+10	7.00E+09		<b>9.75E+09</b>		
	-8	3.70E+10	ND		<b>3.70E+10</b>		
<b>D2 LIN1</b>	-6	1.34E+09	3.42E+09		<b>2.38E+09</b>	<b>5.73E+10</b>	<b>1.10E+02</b>
	-7	5.25E+10	6.20E+09		<b>2.94E+10</b>		
	-8	4.60E+11	4.50E+10		<b>2.53E+11</b>		
<b>D2 LIN2</b>	-6	4.50E+08	8.20E+08		<b>6.35E+08</b>		
	-7	ND	ND		<b>ND</b>		



	-8	ND	ND		ND		
<b>D2 LIN3</b>	-6	2.67E+09	4.40E+08		1.56E+09		
	-7	ND			ND		
	-8	ND	ND		ND		
<b>D2 TOMATE1</b>	-6	3.20E+09	3.14E+09		3.17E+09	7.68E+10	1.22E+02
	-7	3.10E+09	4.70E+09		3.90E+09		
	-8	ND	9.90E+10		9.90E+10		
<b>D2 TOMATE2</b>	-6	3.50E+08	1.92E+09		1.14E+09		
	-7	3.39E+10	1.09E+10		2.24E+10		
	-8	9.30E+10	1.02E+11		9.75E+10		
<b>D2 TOMATE 3</b>	-6	ND	ND		ND		
	-7	5.98E+10	4.21E+10		5.10E+10		
	-8	ND	3.36E+11		3.36E+11		

MOY : moyenne des trois répétitions. MOYG : moyenne générale de la totalité des dilutions  
E type : écart type des différentes répétitions. ND : non donné.

#### APPENDICE D (suite) :

Tableau 11 : Dénombrements bactérien réalisé dans les trois microcosmes (blé, lin et tomate) bactérisé avec la souche S20 de *Pseudomonas fluorescens*, après 15 jours de croissance.

Traitements	Dilutions	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	MOY	MOY G	E. type
<b>S20 BLE1</b>	-6	1.57E+09	5.58E+09		3.58E+09	7.64E+10	1.53E+02
	-7	1.47E+10	4.86E+10		3.17E+10		
	-8	3.00E+10	1.16E+11		7.30E+10		
<b>S20 BLE2</b>	-6	5.69E+09	3.51E+09		4.60E+09		
	-7	3.70E+09	4.80E+09		4.25E+09		
	-8	ND	ND		ND		
<b>S20 BLE3</b>	-6	5.28E+09	5.74E+09		5.51E+09		
	-7	3.20E+10	4.74E+10		3.97E+10		
	-8	ND	4.49E+11		4.49E+11		
<b>S20 LIN1</b>	-6	3.12E+09	4.91E+09		4.02E+09	1.12E+11	7.65E+02
	-7	3.10E+09	6.10E+09		4.60E+09		
	-8	ND	ND		ND		
<b>S20 LIN2</b>	-6	ND	ND		ND		
	-7	4.52E+10	ND		4.52E+10		
	-8	4.72E+11	5.38E+11		5.05E+11		
<b>S20 LIN3</b>	-6	2.01E+09	ND		2.01E+09		
	-7	ND	ND		ND		
	-8	ND	ND		ND		
<b>S20 TOMATE1</b>	-5	ND	ND	ND	ND	1.27E+10	1.95E+02
	-6	ND	ND	5.82E+09	5.82E+09		
	-7	ND	ND	ND	ND		
	-8	4.10E+09	ND	ND	4.10E+09		
<b>S20 TOMATE2</b>	-5	1.43E+08	ND	ND	1.43E+08		
	-6	2.90E+09	ND	ND	2.90E+09		
	-7	ND	ND	4.00E+09	4.00E+09		
	-8	ND	3.30E+10	ND	3.30E+10		

<b>S20 TOMATE3</b>	-5	2.73E+08	2.49E+08	ND	<b>2.61E+08</b>		
	-6	2.63E+09	2.09E+09	1.16E+09	<b>2.36E+09</b>		
	-7	ND	ND	ND	<b>ND</b>		
	-8	ND	ND	ND	<b>ND</b>		
<b>S20 TOMATE4</b>	-5	ND	ND	ND	<b>ND</b>		
	-6	3.81E+09	ND		<b>3.81E+09</b>		
	-7	ND	2.07E+10	4.98E+09	<b>2.07E+10</b>		
	-8	ND	6.30E+10	1.92E+11	<b>6.30E+10</b>		

MOY : moyenne des trois répétitions. MOYG : moyenne générale de la totalité des dilutions  
E type : écart type des différentes répétitions. ND : non donné.

#### APPENDICE D (suite) :

Tableau 12 : Dénombrements bactérien réalisé dans les trois microcosmes (blé, lin et tomate) bactérisé avec la souche D1 de *Pseudomonas fluorescens*, après 32 jours de croissance.

Traitements	Dilutions	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	MOY	MOY G	E. type
<b>S20 BLE1</b>	-6	5.21E+09	2.12E+09		<b>3.67E+09</b>	<b>2.13E+10</b>	<b>1.24E+02</b>
	-7	1.47E+10	ND		<b>1.47E+10</b>		
	-8	ND	3.20E+10		<b>3.20E+10</b>		
<b>S20 BLE2</b>	-6	5.56E+09	4.68E+09		<b>5.12E+09</b>		
	-7	5.22E+10	6.10E+09		<b>2.92E+10</b>		
	-8						
<b>S20 BLE3</b>	-6	ND	4.68E+09		<b>4.68E+09</b>		
	-7	ND	5.95E+10		<b>5.95E+10</b>		
	-8	ND	ND		<b>ND</b>		
<b>S20 LIN1</b>	-6	4.76E+09	ND		<b>4.76E+09</b>	<b>5.82E+10</b>	<b>3.78E+02</b>
	-7	7.00E+09	3.00E+09		<b>5.00E+09</b>		
	-8	9.20E+10	ND		<b>9.20E+10</b>		
<b>S20 LIN2</b>	-6	3.77E+09	3.68E+09		<b>3.73E+09</b>		
	-7	ND	4.02E+10		<b>4.02E+10</b>		
	-8	1.33E+11	4.91E+11		<b>3.12E+11</b>		
<b>S20 LIN3</b>	-6	3.88E+09	2.01E+09		<b>2.95E+09</b>		
	-7	6.60E+09	3.70E+09		<b>5.15E+09</b>		
	-8	ND	ND		<b>ND</b>		
<b>S20 TOMATE1</b>	-6	2.73E+09	1.65E+09		<b>2.19E+09</b>	<b>4.88E+10</b>	<b>3.29E+02</b>
	-7	1.94E+10	9.40E+09		<b>1.44E+10</b>		
	-8	1.32E+11	3.25E+11		<b>2.29E+11</b>		
<b>S20 TOMATE2</b>	-6	1.56E+09	1.41E+09		<b>1.49E+09</b>		
	-7	1.84E+10	1.54E+10		<b>1.69E+10</b>		
	-8	6.70E+10	5.60E+10		<b>6.15E+10</b>		
<b>S20 TOMATE3</b>	-6	3.45E+09	2.71E+09		<b>3.08E+09</b>		
	-7	1.31E+11	9.50E+09		<b>7.03E+10</b>		
	-8	5.10E+10	3.00E+10		<b>4.05E+10</b>		

MOY : moyenne des trois répétitions. MOYG : moyenne générale de la totalité des dilutions E type : écart type des différentes répétitions. ND : non donné.

## Appendice E

Données expérimentales avant et après interpolation linéaire.

Temps	Biomasse	Pyoverdine
0	0,05	0,01
1	0,05	0,01
2	0,05	0,01
3	0,05	0,01
4	0,06	0,01
5	0,06	0,01
6	0,06	0,01
7	0,07	0,01
8	0,08	0,01
9	NaN	NaN
10	NaN	NaN
11	0,15	0,01
12	NaN	NaN
13	0,22	0,01
15	0,3	0,01
16	0,35	0,02
17	NaN	NaN
18	0,57	0,02
19	0,63	0,03
20	0,73	0,04
21	NaN	NaN
22	0,77	0,05
23	NaN	NaN
24	0,81	0,07
25	0,88	0,1
26	NaN	NaN
27	0,98	0,14
28	NaN	NaN
29	1,03	0,19
31	1,07	0,22
33	1,11	0,23
34	NaN	NaN
35	NaN	NaN
36	1,1	0,24
37	NaN	NaN
38	NaN	NaN
39	NaN	NaN
40	1,11	0,24

Temps	Biomasse	Pyoverdine
0	0,05	0,01
1	0,05	0,01
2	0,05	0,01
3	0,05	0,01
4	0,06	0,01
5	0,06	0,01
6	0,06	0,01
7	0,07	0,01
8	0,08	0,01
9	0,103333	0,01
10	0,126667	0,01
11	0,15	0,01
12	0,185	0,01
13	0,22	0,01
15	0,3	0,01
16	0,35	0,02
17	0,46	0,02
18	0,57	0,02
19	0,63	0,03
20	0,73	0,04
21	0,75	0,045
22	0,77	0,05
23	0,79	0,06
24	0,81	0,07
25	0,88	0,1
26	0,93	0,12
27	0,98	0,14
28	1,005	0,165
29	1,03	0,19
31	1,07	0,22
33	1,11	0,23
34	1,106667	0,233333
35	1,103333	0,236667
36	1,1	0,24
37	1,1025	0,24
38	1,105	0,24
39	1,1075	0,24
40	1,11	0,24

## Appendice F

Fonctions et scripts utilisés dans cette étude.

```
function Parameter_Optimisation&local_Sensitivity_Analysis

% Ordres et déclarations préalables

warning off all
tic
clc
close all
clear all

global K Beta Delta Sigma Yn Mu Sinf v N S P Q A w Biomass_all
Pyoverdine_all Chelated_all Free_all Yest KingB

for R = 1

% Chargement des données expérimentales.

load(fullfile(Mettre le chemin d'emplacement des données expérimentales)%
Exemple (('Desktop','KingB')) % Colonne 1: Temps; Colonne 2: Do 600 pour la
Biomasse; Colonne 3: Do 400 pour le contenu en Pyoverdine.

Data = KingB; % 31 X 3 Lignes et colonnes.

T = Data(:,1); % Temps de l'expérience.
ExpN = Data(:,2); % Données de la biomasse.
Exp_N = 1*ExpN;

ExpP= Data(:,3); % Données de la pyoverdine.
Exp_P = 1*ExpP;

sp3N = spapi(2,T,Exp_N); fnplt(sp3N,2,'k--'), set(gca,'FontSize',16),hold
on % Graphique.
plot(T,Exp_N,'o')
xlabel('Time (h)', 'FontSize',13),
ylabel('Biomass', 'FontSize',13),
title('Experimental data', 'FontSize',14)

figure
sp3P = spapi(2,T,Exp_P); fnplt(sp3P,2,'k--'), set(gca,'FontSize',16),hold
on % Graphique.
plot(T,Exp_P,'o')
xlabel('Time (h)', 'FontSize',13),
ylabel('Pyoverdine', 'FontSize',13),
title('Experimental data', 'FontSize',14)

% Mettre en valeur NaN toutes les entrées vide de x
% (assumer qu'il n'y pas de valeurs NaNs dans t)
nanN = isnan(Exp_N);
nanP = isnan(Exp_P);

% replace toutes les valeurs en NaNs le vecteur x avec les valeurs
% lineaires interpolés.
Exp_N(nanN) = interp1(T(~nanN), Exp_N(~nanN), T(nanN));
```

```

Exp_P(nanP) = interp1(T(~nanP), Exp_P(~nanP), T(nanP));

% Valeur fixée à 0.5 du facteur variable de la fonction objective.
W = 0.5;

%% Echantillonnage en carré latin.

% Prélocation de variables

V_0 = (); Y = (); Yest = (); goodness_P = (); goodness_N = (); bestresults
= (); Optimality = ();

project = mbcmodel.CreateProject('ModelCalibrationSampling');

% Définition des entrées du plan expérimentale.

localInputs = mbcmodel.modelinput('Symbol', ('N','S','P','Q','A'), 'Name',
('Biomass';'Free_iron';'Pyoverdine';'Chelated_iron';'Physiological_state'),
'Range', ((0 1.201), (0 201), (0 0.301), (0 2.01), (0 1.00001)));
globalInputs = mbcmodel.modelinput(...
'Symbol', ('K','Beta','Delta','Sigma','Yn','Mu','Sinf','v'),...
'Name', ('K','Beta','Delta','Sigma','Yn','Mu','Sinf','v'),...
'Range', ((0.01 4.01), (0.01 1.01), (0.01 0.1301), (0.01 0.91), (0.01
1.01), (0.01 0.501), (0.01 0.701), (0.01 0.501)));

% Création du plan d'expérimentation.

TP = CreateTestplan( project, (localInputs,globalInputs) );
sfDesign = CreateDesign(TP, 'Type', 'Latin Hypercube Sampling', 'Name',
'Space Filling');

sfDesign = ConstrainedGenerate( sfDesign, 1000, 'UnconstrainedSize', 800,
'MaxIter',10 );

designPoints = sfDesign.Points;
inputs = sfDesign.Inputs;

% Graphiques

figure()
subplot(2,1,1)
Scatter2D( sfDesign, 1, 2 );
subplot(2,1,2)
Scatter2D( sfDesign, 3, 4 );

for i = 1:length(designPoints) % nombre de simulations a réaliser.

    N    = .05;           % "N" Densité de population.
    S    = log10(100);   % "S" Fer libre.
    P    = 0.001;       % "P" Quantité de siderophores.
    Q    = 0;           % "Q" Fer chélaté.
    A    = 0.1;         % "A" Physiological state.

    % Création de vecteur pour la simulation.

K = designPoints(i,1); Beta = designPoints(i,2); Delta = designPoints(i,3);
Sigma = designPoints(i,4); Yn = designPoints(i,5); Mu = designPoints(i,6);
Sinf = designPoints(i,7); v = designPoints(i,8);

```

```

Vtr = (K Beta Delta Sigma Yn Mu Sinf v N S P Q A); % Concaténation du
vecteur.

% Ecriture de données sur l'interface graphique.

formatSpec = 'Simulation N ° %g.\n\n les valeurs respectives de nos
paramètres dans cette simulation sont :\n';
fprintf(formatSpec, i)

Par = ('K', 'Beta', 'Delta', 'Sigma', 'Yn', 'Mu', 'Sinf', 'v'; K, Beta,
Delta, Sigma, Yn, Mu, Sinf, v);
disp(Par)

%      K   beta   delta   sigma   yn   mu   sinf   v   N   S   P
Q   A
ub = ( 4   1           .13     0.9     1     0.5     .7     .5   1.2   2   .3
2   1);
lb = ( 0.01  0.01           .01     0.01     0.01     0.01     0.01     .01   0.01
0.01     0.01     0.01     0.01     0.01);

% Processus d'optimisation.

options = optimset('Algorithm','sqp','LargeScale','off','DiffMinChange',1E-
2,'TolCon',1E3,'Display','iter','PlotFcns',(@optimplotfval,@optimplotstepsi
ze,@optimplotfunccount,@optimplotx),'MaxFunEvals',3000,'MaxIter',1000,'TolF
un',1e-6,'TolX',1e-5);

(OptParN,Yest)=fmincon(@(X)objfun(X),Vtr,(),(),(),(),lb,ub,(),options); %
OptParN est la meilleur estimation de paramètres.
% yest est le prix de la fonction objective le moins important.

legend(('Parameters ( K Beta Delta Sigma Yn Mu Sinf v ) ; States ( N S P
Q A)'), 'location','BestOutside','Orientation','Horizontal') % Légende

% Concaténation des meilleures valeurs.

Optimality = (Optimality; OptParN);

OptParN = num2cell(OptParN);

(K1, Beta1, Delta1, Sigma1, Yn1, Mu1, Sinf1, v1, N1, S1, P1, Q1, A1) =
deal(OptParN(:));

Best_States = (N1, S1, P1, Q1, A1);

OptPar = ('K', 'Beta', 'Delta', 'Sigma', 'Yn', 'Mu', 'Sinf', 'v';...
K1, Beta1, Delta1, Sigma1, Yn1, Mu1, Sinf1, v1);

% Calcul du système dynamique représentant nos données expérimentales en
utilisant le vecteur optimal de paramètres obtenu au terme des simulations.

(T,Y_opt) = ode23s(@(T,y)updateStates(T, y, K1, Beta1,Delta1,
Sigma1, Yn1, Mu1, Sinf1, v1),(1:1:length(Data)),Best_States);

% Concatenation des résultats avec leurs paramètres respectives.

bestresults = (bestresults; Y_opt);
opt_pa = reshape(bestresults,(length(Data),5,i));

```

```

% Concaténation des coefficients de détermination pour la biomasse N.

gof_N = goodnessOfFit(Y_opt(:,1),Exp_N, 'nrmse');
goodness_N = (goodness_N; gof_N);
N_fit = reshape(goodness_N, (),1);

% Concaténation des coefficients de détermination pour la pyoverdine P.

gof_P = goodnessOfFit( Exp_P,Y_opt(:,3), 'nrmse');
goodness_P = (goodness_P; gof_P);
P_fit = reshape(goodness_P, (),1);

% Table des coefficients d'ajustement pour N & P.

N_fit_header = ('N');
Goodness_of_fit_N = (N_fit_header; num2cell(N_fit));

P_fit_header = ('P');
Goodness_of_fit_P = (P_fit_header; num2cell(P_fit));

end

% Classement des observations en fonction des deux variables N & P.

% Concaténation des meilleurs coefficients d'ajustement pour N & P.

Fit = horzcat(N_fit,P_fit);

% Recherche des coefficients d'ajustement supérieur à 0.5.

E=gt(Fit(:,1:2),.7);

% Trouver les Coefficients d'ajustement pour N & P qui sont tous deux
% supérieur à 0.5

p=find(E(:,1) == 1 & E(:,2) == 1);

n1=Fit(p(:,1),1); % Meilleurs ajustements positives pour N.
n2=Fit(p(:,2),2); % Meilleurs ajustements positives pour P.
par=Optimality(p,:); % Paramètre associés au meilleurs ajustements pour
% N & P.
init=designPoints(p,:);
% Obtention des meilleurs coefficients d'ajustement

Fit = horzcat(n1,n2);
(Optimal_Fit,bv) = sortrows[302];

% Concaténation des ajustements avec leurs paramètres optimaux
respectives et valeurs initiales.
Fit1 = horzcat(n1,n2,par,init);

% Table des meilleurs ajustements positive avec leurs paramètres
optimaux respectives.

last_opt = Fit1(bv(end),3:15);
last_init = Fit1(bv(end),16:end);

% Calcule de la meilleur dynamique de système de toutes les simulations

```

```

(T,Optimal) = ode23s(@(T,y)updateStates(T, y, last_opt(:,1),...
    last_opt(:,2),last_opt(:,3), last_opt(:,4),...
    last_opt(:,5), last_opt(:,6), last_opt(:,7),...
    last_opt(:,8)),(1:1:length(Data)),(last_opt(:,9),...
    last_opt(:,10),last_opt(:,11),last_opt(:,12),last_opt(:,13)));

%Figures
figure
plot(Exp_N, 'k*');
hold on
plot(Optimal(:,1), 'kd', 'LineWidth',1, 'MarkerEdgeColor', 'k',...
    'MarkerFaceColor', 'w', 'MarkerSize',10)
xlabel('Time(h) ')
ylabel('Biomass Od " 600 ".')
title('Comparison of model predictions with experimental data');

figure
plot(Exp_P, 'k*');
hold on
plot(Optimal(:,3), 'kd', 'LineWidth',1, 'MarkerEdgeColor', 'k',...
    'MarkerFaceColor', 'w', 'MarkerSize',10)
xlabel('Time(h) ')
ylabel('Pyoverdine content " OD 400 ". ')
title('Comparison of model predictions with experimental data');

Fac=log(100)/((max(Optimal(:,4)))*log(10));
Optimal(:,4) = 10.^(Optimal(:,4)*Fac);

figure
plot(Optimal(:,4), 'kd-', 'LineWidth',1, 'MarkerEdgeColor', 'k',...
    'MarkerFaceColor', 'w', 'MarkerSize',10)
xlabel('Time(h) ')
ylabel('Chelated iron "µg". ')
title(' model predictions ');

figure
plot(10.^Optimal(:,2), 'kd-', 'LineWidth',1, 'MarkerEdgeColor', 'k',...
    'MarkerFaceColor', 'w', 'MarkerSize',10)
    xlabel('Time(h) ')
ylabel('Free available iron "µg". ')
title(' model predictions ');

%% Calcul de l'intervalle de confiance à 95%

ybar = mean(par);
s = std(par);

ci = 0.95;
alpha = 1 - ci;

n = length(par); %nombre d'éléments dans le vecteur des données.
T_multiplier = tinv(1-alpha/2, n-1);

ci95 = (T_multiplier*s/sqrt(n));

Mean = ybar';
CI = ci95';
ci_low = ();
ci_hig = ();

```



```

for j = 1:13

low = Mean(j) - CI(j);
    ci_low = (ci_low, low); %#ok

hight = Mean(j) + CI(j);
    ci_hig = (ci_hig, hight); %#ok

end

CI_low = ci_low';
CI_hight = ci_hig';

yo=('Mean', 'CI', 'CI_low', 'CI_hight');
CI_Calc = (Mean, CI, CI_low, CI_hight);

% Résultats de l'intervalle de confiance.

Confidence_interval = (yo; num2cell(CI_Calc))

%% Calcul de l'intervalle de confiance à 99%

ybar99 = mean(par);
s = std(par);

ci99 = 0.99;
alpha99 = 1 - ci99;

n = length(par); %nombre d'éléments dans le vecteur de données.
T_multiplier99 = tinv(1-alpha99/2, n-1);

ci99 = (T_multiplier99*s/sqrt(n));

Mean99 = ybar99';
CI99 = ci99';
ci_low99 = ();
ci_hig99 = ();

for ss = 1:13

low99 = Mean(ss) - CI(ss);
    ci_low99 = (ci_low99, low99); %#ok

hight99 = Mean(ss) + CI(ss);
    ci_hig99 = (ci_hig99, hight99); %#ok

end

CI_low99 = ci_low99';
CI_hight99 = ci_hig99';

yO=('Mean', 'CI', 'CI_low', 'CI_hight');
CI_Calc99 = (Mean99, CI99, CI_low99, CI_hight99);

% Table des résultats de l'intervalle de confiance.

Confidence_interval99 = (yO; num2cell(CI_Calc99))

```

```

% Calcul des résiduelles pour la Biomasse N.

figure
clf
plot(T,0,'--',T,(Exp_N - Optimal(:,1)), 'ko')
xlabel('Time (h)', 'FontSize',13)
ylabel('Residuals', 'FontSize',13)
title('Residual Plot For Biomass Production', 'FontSize',14)
print -depsc nonlinresiduals

Out_R2n = ('\n * the determination coefficient for the Biomass is equals
to: %.2f.\n');
fprintf(Out_R2n, Optimal_Fit(end,1));

% Calcul des résiduelles pour P

figure
clf
plot(T,0,'--',T,(Exp_P - Optimal(:,3)), 'ko')
xlabel('Time (h)', 'FontSize',13)
ylabel('Residuals', 'FontSize',13)
title('Residual Plot For Pyoverdine Production', 'FontSize',14)

Out_R2p = ('\n * The determination coefficient for the Pyoverdine
production is equals to: %.2f. \n\n');
fprintf(Out_R2p, Optimal_Fit(end,2));

%% Analyse de sensibilité locale "Méthode OAT".

mtx = (last_opt(:,1); last_opt(:,2);last_opt(:,3); last_opt(:,4);...
last_opt(:,5); last_opt(:,6); last_opt(:,7); last_opt(:,8); last_opt(:,9);
last_opt(:,10);last_opt(:,11);last_opt(:,12)); %#ok

tmp = ();

for f = 1:length(mtx)-4

% Calcule des valeurs de -20%, -10%, valeur nominale, +10%, +20% pour les
paramètres.

val = (mtx(f,1)-100*(0.2)*mtx(f,1)/100  mtx(f,1)-100*(0.1)*mtx(f,1)/100
mtx(f,1)  mtx(f,1)+100*(0.1)*mtx(f,1)/100  mtx(f,1)+100*(.2)*mtx(f,1)/100);

tmp = (tmp; val); %#ok

end

(m,n) = size(tmp); %#ok

% Préallocation.

K2 = (); Beta2 = (); Delta2 = (); Sigma2 = (); Yn2 = (); Mu2 = (); Sinf2 =
(); v2 = ();

% Création de 5 vecteurs, ou on varie un paramètre de -20%,-10%,value,+10%,+20
et fixation du reste de valeurs à leurs valeur optimale.

for j = 1:1:n
    A(j) = tmp(1,j); %#ok

```

```

B = tmp(2:end,3);
K_all = vertcat(A(j),B);
K2 = (K2,K_all); %#ok

A(j) = tmp(2,j); %#ok
B = (tmp(3:end,3)); %#ok
Beta_all = (tmp(1);vertcat(A(j),B));
Beta2 = (Beta2,Beta_all); %#ok

A(j) = tmp(3,j); %#ok
B = tmp(4:end,3);
Delta_all = (tmp(1:2,1); vertcat(A(j),B));
Delta2 = (Delta2,Delta_all); %#ok

A(j) = tmp(4,j); %#ok
B = (tmp(5:end,3)); %#ok
Sigma_all = (tmp(1:3,1);vertcat(A(j),B));
Sigma2 = (Sigma2,Sigma_all); %#ok

A(j) = tmp(5,j); %#ok
B = (tmp(6:end,3)); %#ok
Yn_all = (tmp(1:4,1);vertcat(A(j),B));
Yn2 = (Yn2,Yn_all); %#ok

A(j) = tmp(6,j); %#ok
B = (tmp(7:end,3)); %#ok
Mu_all = (tmp(1:5,1);vertcat(A(j),B));
Mu2 = (Mu2,Mu_all); %#ok

A(j) = tmp(7,j); %#ok
B = (tmp(end,3)); %#ok
Sinf_all = (tmp(1:6,1);vertcat(A(j),B));
Sinf2 = (Sinf2,Sinf_all); %#ok

A(j) = tmp(8,j); %#ok
B = (tmp(1:7,3)); %#ok
v_all = vertcat(B,A(j));
v2 = (v2,v_all); %#ok

all = cat(3, K2, Beta2, Delta2, Sigma2, Yn2, Mu2, Sinf2, v2);

end

for g = 1:1:8
    for o = 1:1:5

        Vec = all(:,o,g);

K3 = Vec(1); Beta3 = Vec(2); Delta3 = Vec(3); Sigma3 = Vec(4); Yn3 =
Vec(5); Mu3 = Vec(6); Sinf3 = Vec(7); v3 = Vec(8);

(T,Ye1) = ode23s(@(t,y)updateStates(t,y, K3, Beta3, Delta3, Sigma3, Yn3,
Mu3, Sinf3,
v3),(1:1:length(Data)),(last_opt(:,9);last_opt(:,10);last_opt(:,11);last_op
t(:,12);last_opt(:,13))); %#ok

Ye2=10.^Ye1(:,2);

C=log(100)/((max(Ye1(:,4)))*log(10));
Ye4 = 10.^(Ye1(:,4)*C);

```

```

Ye = (Ye1(:,1),Ye2,Ye1(:,3),Ye4,Ye1(:,5));

simResults(j-4,1) = ('Sim N°', num2str(j-4)); % enregistrement des noms
dans la colonne 1.
simResults(j-4,2) = Ye; % enregistrement des noms dans la colonne 2.

j = j+1;

    end
end
end
for n = 1:length(simResults)

    Biomass = simResults(n,2)(:,1);
    Biomass_all(n,1) = ('Sim N° ', num2str(n));
    Biomass_all(n,2) = Biomass;

    Free = simResults(n,2)(:,2);
    Free_all(n,1) = ('Sim N° ', num2str(n));
    Free_all(n,2) = Free;

    Pyoverdine = simResults(n,2)(:,3);
    Pyoverdine_all(n,1) = ('Sim N° ', num2str(n));
    Pyoverdine_all(n,2) = Pyoverdine;

    Chelated = simResults(n,2)(:,4);
    Chelated_all(n,1) = ('Sim N° ', num2str(n));
    Chelated_all(n,2) = Chelated;
end
Chelated_ll=10.^(Chelated_all(n,2).*58.04);

N_five = reshape(Biomass_all(:,2),5,());
S_five = reshape(Free_all(:,2),5,());
P_five = reshape(Pyoverdine_all(:,2),5,());
Q_five = reshape(Chelated_all(:,2),5,());

for g = 1:1:8

    Par = ('K ', 'Beta', 'Delta', 'Sigma', 'Yn', 'Mu', 'Sinf', 'v');

    Pos = ((9,410,450,300), (910,410,450,300), (910,50,450,320),...
           (10,50,450,322), (9,410,450,300), (910,410,450,300),...
           (910,50,450,320), (10,50,450,322)...
           );

figure('NumberTitle','off','Name',('Parameter ', Par(g), ' variation
'),'Units','pixels','Position',Pos(g));

    for o = 1:1:5

        subplot(2,2,1)
        plot(N_five(o,g));
hold all
        xlabel('Temps')
        ylabel('N')
        legend((' +20', '+10', 'Nominal', '-10', '-20'),'location','SouthEast')
        grid on

        subplot(2,2,2)
        plot(S_five(o,g));

```

```

hold all
    xlabel('Temps')
    ylabel('S')
    legend(('+20', '+10', 'Nominal', '-10', '-20'))
    grid on

    subplot(2,2,3)
    plot(P_five(o,g));
hold all
    xlabel('Temps')
    ylabel('P')
    legend(('+20', '+10', 'Nominal', '-10', '-20'), 'location', 'SouthEast')
    grid on

    subplot(2,2,4)
    plot(Q_five(o,g));
hold all
    xlabel('Temps')
    ylabel('Q')
    legend(('+20', '+10', 'Nominal', '-10', '-20'))
    grid on

    end
end

%% Fonction cout.

function f = objfun(X)
    X = num2cell(X);

(K, Beta, Delta, Sigma, Yn, Mu, Sinf, v, N, S, P, Q, A) = deal(X(:));

    (T,Y) = ode23s(@ (T,y)updateStates(T, y, K, Beta, Delta,
Sigma, Yn, Mu, Sinf, v), (1:1:length(Data)), (N;S;P;Q;A));

    f = sum(w*(Exp_N-Y(:,1)).^2./numel(Y(:,1))+(1-w)*(Exp_P-
Y(:,3)).^2./numel(Y(:,3)));
end

%Equation du système dynamique.

function Y0 = updateStates(~, y, K, Beta, Delta, Sigma, Yn, Mu, Sinf, v)

Y0 = ((y(5)*Mu*(y(2)/K+y(2)))*y(1)+(y(5)*y(1)*Sigma*y(4));%Biomasse.
    -(Mu/Yn)*y(5)*y(1)*(y(2)/K+y(2))-(Beta*y(2)*y(3));%Fer libre.
    (Delta*y(5)*(y(1)/Sinf+y(2)))*y(5)*Mu*(y(2)/K+y(2))*y(1)+(y(5)*y(1)
    *Sigma*y(4));% Contenu en pyoverdine
    (Beta*y(2)*y(3))-(Sigma/Yn)*y(5)*y(1)*y(4); % Fer Chelaté.
    (v*y(5)*(1-y(5)))% Etat physiologique e la population.
    );
end

disp('=====CONCLUSION:=====' )
disp(' Over all simulations ')

Out0 = ('\n * The simulation N° %d is the best one \n');
fprintf(Out0, p(bv(end)));

Out1 = ('\n * The goodness of fit for the state variables N. & P. ; are
equals to: \n\n %.2f %.2f \n');

```

```

fprintf(Out1, Optimal_Fit(end,1), Optimal_Fit(end,2));

Out2 = ('\n * The initial parameter set: \n\n K, Beta, Delta, Sigma, Yn,
Mu, Sinf, v \n\n are equals to: \n\n  %.3f %.3f %.3f %.3f %.3f %.3f %.3f
%.3f \n\n * After optimization, the best parameter values ended up with
values equals to: \n\n  %.2f %.2f %.2f %.2f %.2f %.2f %.2f %.2f \n');
fprintf(Out2, last_init(1,1:8), last_opt(1,1:8));

Out3 = ('\n * Optimal state values are equals to: \n\n -   %.3e Cfu/ml For
the bacterial population size. \n\n -   %.2e µM For the freely available
iron which is equivalent to %.2e g/mole. \n\n -   %.1e Cfu/ml. For the
Pyoverdine content. \n\n -   %.2e µM For the chelated iron wich is
equivalent to : %.2e g/mole.\n');

fprintf(Out3, last_opt(:,9)*10^6, last_opt(:,10),last_opt(:,10)/55.847,
last_opt(:,11)*10^6,last_opt(:,12),last_opt(:,12)/55.847 );

savefile = 'Cost.mat';
d=p(bv(end));
Y1=Y(:,1);
Y2=Y(:,2);
Y3=Y(:,3);
Y4=Y(:,4);
save(savefile, 'V_0', 'd', 'T', 'Exp_N', 'Exp_P', 'Y1', 'Y2', 'Y3', 'Y4')

toc
end

% Simulation routine for extended sensitivity analysis (in the vicinities
of 10,000 random parameter sets)
% Author: Sridevi Nagaraja, , Adjusted by Berdja rafik for the purpose of
the current study.
% Last modified: Mai 02, 2015
% This file contains code for the extended sensitivity analysis.
% This routine initializes parameters values and initial conditions and
generates 'iter' number of random parameter sets
% It performs local sensitivity analysis on the 'iter' number of parameter
sets using function Param_var_local.m
clear all
close all
clc
warning off

%*** CHANGE HERE TO SPECIFY NUMBER OF GENERATED PARAMETER SETS ***
iter = 20000; % NUMBER OF RANDOM PARAMETER SETS TO BE GENERATED

Parameters;%Initializes parameters and initial conditions

rangefactor = 1.5; % Limit for uniform distribution variation for creation
of random parameter sets

Param1 = Latinhypercube(Param,rangefactor,iter); % function to create
'iter' number of random parameters sets using Latin Hypercube Sampling
technique

% Time span
tinit = 1;
tday = 41;
tstep = 1;

```

```

tmax = tday; % hours
tspan = (tinit:tstep:tmax);
tstart = tic;

% Function to calculate the raw and logarithmic sensitivities for 'iter'
number of parameter sets and extract the critical triggers of chronic
inflammation
matlabpool open 4
parfor i = 1:iter
%for i=1:iter
    i
    (Gsen(i) O_r(i) O_v(i) O_b(i))=
    Param_var_local(tmax,tspan,yinit,Param1(i,:));
end
matlabpool close
runtime = toc(tstart)/60;

%%-----Plotting the critical trigger of chronic inflammation -----
-*** CHANGE P_param TO CHECK FOR OTHER OUTPUTS ***
rnk = 3; % User defined number of most sensitizing mechanisms to plot;
Currently the program plots the top three mechanisms as Rank 1, Rank 2 and
Rank3 at every simulation time point
% P_param = (1 2 3 4); % The output identifying numbers for TNF-alpha, IL-
1beta and IL-6; For a complete list of all molecular mediator output
identifying numbers,check 'inflammation_delay.m'
% analysis(O_b,P_param,Param,tspan,iter,rnk)

% %-----Plotting the most sensitive molecular mediators of chronic
inflammation -----%*** CHANGE P_var TO CHECK FOR OTHER PARAMETERS ***
rnk = 3; % User defined number of most sensitive molecular indicators to
plot; Currently the program plots the top three molecular mediators as Rank
1, Rank 2 and Rank3 at every simulation time point
% P_var = (7 8); % The parameter numbers in the model for macrophage influx
and efflux rates respectively.(for all parameter numbers check
'Parameters.m')
% sens_var(Gsen,rnk,P_var,iter,tspan)

% Function comprising model equations, as well as chemotaxis and cytokine
feedback functions
function dYout = inflammation_delay(t,yin,Param)

% Created on 05/29/2012
% Author: Sridevi Nagaraja, Adjusted by Berdja rafik for the purpose of the
current study.

% Last modified on 02/05/2015
% Function with ODE description for the 5 variables.

% Assigning initial values; Comments show the identifying number assigned
to each output variable
N = yin(1);%4
S = yin(2);%5
P = yin(3);%6
Q = yin(4);%7
A = yin(5);%8

% Outputs identifying number 1 and 2 are used to identify the total
neutrophils and total macrophage concentrations calculated in the main

```

```

% file by adding the concentration of their respective individual
phenotypes

%Intializing the output matrix
dYout = zeros(5,1);

% Calculation of differentials

dNdt = (A*Param(6)*(S/Param(1)+S))*N+(A*N*Param(4)*Q);
dSdt = -(Param(6)/Param(5))*A*N*(S/Param(1)+S)-(Param(3)*S*P);
dPdt =
(Param(2)*A*(A/Param(7)+S))*(A*Param(6)*(S/Param(1)+S))*N+(A*N*Param(4)*Q);
dQdt = (Param(3)*S*P)-(Param(4)/Param(5))*A*N*Q;
dAdt = (Param(8)*A*(1-A));

%Assigning output values in the differential matrix dYout

dYout(1) = dNdt;
dYout(2) = dSdt;
dYout(3) = dPdt;
dYout(4) = dQdt;
dYout(5) = dAdt;

% Function that generates a user-defined number of random parameter sets
function P = Latinhypercube(Param,rangefactor,iter)

%Assigning parameter range
% Minimum values
k_min = Param./rangefactor;
% Maximum values
k_max = Param.*rangefactor;

%Creating Latin hypercube sampling matrix using Matlab function lhsdesign
X1 = lhsdesign(iter,size(Param,2));

%Creating randomized parameter sets using LHS
for i = 1:size(Param,2)
P(:,i) = (X1(:,i).*(k_max(i)-k_min(i)))+k_min(i);
End

%-----

% Function for plotting the results of parameter sensitivity analysis
function analysis(O_b,P,Param,tspan,iter,rnk)

% Function for generating graphs for the most sensitive parameters
% Author: Sridevi Nagaraja, Adjusted by Berdja rafik for the purpose of the
current study.
% Last modified: 03, 05, 2015
% Inputs:O_b:Matrix containing the parameter identifying numbers of
parameters inducing the top 3 highest sensitivity values
%         rnk:Number of most sensitive parameter to be determined (default
ranks generated is 3; can be changed by user by changing parameter 'rnk' in
'Global_local.m'
%         P: Matrix containing the corresponding output variable identifying
numbers of parameters in the model
%         iter: Number of random parameter sets generated

```



```

% Param: Vector with the 'iter' number of randomly generated
parameter sets
% tspan: vector with the simulation time points
% Outputs:plotted results

tm = tspan./24;

%Counting the frequency of occurrence of parameters for a given rank in
10,000 parameter sets
for l=1:rnk
    b1 = zeros(size(P,2),size(tm,2));
    b3 = zeros(size(P,2),size(tm,2));
    for j = 1:size(P,2)
        for i=1:iter
            F = O_b(i);
            F1=F(1,:);
            F2(i,:) = F1(j,:);
            clear F F1 D D1
        end
        (M(j,:) Fr(j,:) C(j,:)) = mode(F2);
        b1 = zeros(size(P,2),size(M,2));
        b3 = zeros(size(P,2),size(M,2));
        for k=1:size(M,2)
            if (M(j,k)==0)
                Fr(j,k)=0;
            end
            a1 = C(j,k);
            a2 = size(a1);
            if a2(1)>1
                b1(j,k) = k;
                b3(j,k) = a1(2);
            end
        end
    end
end
B2(l) = b3;

% Graph for each rank
str=sprintf('Rank = %d',l);
figure(1)
suptitle(str)
for j=1:size(P,2)
    Var_names = ('Biomass (N)', 'Free Iron (P)', 'Pyoverdine (P)', 'Chelated
Iron (Q)');
    subplot(1,size(P,2),j)
    (AX,H1,H2) = plotyy(tspan,M(j,:),tspan,Fr(j,:),@bar,@line);
    set(get(AX(1), 'Ylabel'), 'String', 'Parameter')
    set(get(AX(2), 'Ylabel'), 'String', 'Frequency')
    set(H1, 'EdgeColor', 'none', 'BarWidth', 0.5)
    set(H1, 'facecolor', (.6 .6 .6))
    set(H2, 'LineWidth', 2, 'Marker', 'diamond', 'MarkerEdgeColor', 'k', 'MarkerFaceCo
lor', 'g', 'MarkerSize', 6)
    set(H2, 'Color', 'r')
    set(AX, ('ycolor'), ((0.6 0.6 0.6); 'b'))
    set(AX(1), 'xlim', (-1 41));
    set(AX(2), 'xlim', (-1 41));
    set(AX(1), 'ylim', (0 size(Param,2)));
    set(AX(2), 'ylim', (0 iter));
    set(AX(1), 'YTick', (0:5:size(Param,2)));
    set(AX(2), 'YTick', (0:iter/10:iter));

```

```

box off
xlabel('Time (days)')
title(Var_names(j))
end
end

% Function for calculating the logarithmic local sensitivity values for a
given parameter set
function (Gsen_local O_rank_l O_val_l O_bar_l)=
Param_var_local(tmax,tspan,y0,Param)

% Function for calculation of local sensitivity indices by implementing
finite difference formula
% Author: Sridevi Nagaraja, Adjusted by Berdja rafik for the purpose of the
current study.
% August 03, 05, 2012

%Inputs: tmax: maximum time of simulation
%         tspan: simulation time steps
%         Yinit: initial value vector of model variables for each iteration
%         Param: array of N default parameter sets created by Latin
Hypercube Sampling
%         N: number of random parameter sets
%

%Outputs: O_rank_l: Ranked parameter identifying numbers for outputs
%         O_val_l: Sensitivity values of top 5 most sensitive parameters for
outputs
%         Gsen_local: Matrix containing the logarithmic sensitivity values
for all outputs for the given parameter set
%         O_bar_l: Matrix with parameter identifying numbers of highest
sensitivity parameters

% Defining the simulation time points

rnk =2; % The number of ranks stored as output

P = (1,2,3,4,5); %Output identifying numbers

delta_param = Param.*0.01; %Calculate 1% of every parameter value

% Calling DDE with default parameters
y = ode23(@inflammation_delay,tspan,y0,(),Param);
sol1 = deval(y,tspan); % calculating solution at particular time points
%Saving outputs

Ymain_default = (sol1(1,:); sol1(2,:); sol1(3,:); sol1(4,:); sol1(5,:));

% Calculating outputs with kj+delta_kj for each parameter
for j = 1:size(Param,2)
Param_new_add = Param;
Param_new_add(j) = Param_new_add(j)+delta_param(j);
y = ode23(@inflammation_delay,tspan,y0,(),Param_new_add);
sol1 = deval(y,tspan); % calculating solution at particular time points
(per day)

```

```

Ymain_add(j)= (sol1(1,:); sol1(2,:); sol1(3,:); sol1(4,:); sol1(5,:));
clear sol sol1 Param_new_add

% Calculating outputs with kj-delta_kj for each parameter
Param_new_subs = Param;
Param_new_subs(j) = Param_new_subs(j)-delta_param(j);
y = ode23(@inflammation_delay,tspan,y0,(),Param_new_subs);
sol1 = deval(y,tspan); % calculating solution at particular time points
(per day)
Ymain_subs(j)= (sol1(1,:); sol1(2,:); sol1(3,:); sol1(4,:); sol1(5,:));
clear sol sol1 Param_new_subs
end

% Applying the central finite difference formula to calculate logarithmic
sensitivities
for j = 1:size(Param,2)
    g1 = Ymain_add(j);
    g2 = Ymain_subs(j);
    G_num= (g1-g2);
    G_num(abs(G_num)<1e-10)=0;
    G_final(j)= (G_num./Ymain_default)./2e-2;% calculate the relative
sensitivities by dividing with default values
    G_final(j)(isnan(G_final(j))) = 0; % remove any non-numbers
    clear g1 g2 G_num
end
Gsen_local= G_final;
(O_rank_l O_val_l O_bar_l) = sens_param(G_final,rnk,P,Param); %function
that extracts and ranks the sensitivity values of outputs to all parameter
variations

% Function for calculating and plotting the most sensitive output variables
function (R_M R_Fr)=sens_var(Gsen,rnk,P_var,iter,tspan)

% Author: Sridevi Nagaraja, Adjusted by Berdja rafik for the purpose of the
current study.
% Last modified: 04, 05, 2012
% Inputs:Gsen:Matrix containing the logarithmic sensitivity values of all
model outputs to all model parameters at all simulation time points for
10,000 random parameter sets
%     rnk:Number of most sensitive molecular mediators to be determined
(default ranks generated is 3; can be changed by user by changing
parameter'rnk' in 'Global_local.m'
%     P_var:Matrix containing the corresponding parameter identifying
numbers of 'kM_in' and 'kd_M'
%     iter: Number of random parameter sets generated
%     tspan:Simulation time points
% Outputs:R_M:Number identifying a particular output variable for a given
rank at a given time point
%     R_Fr: Fraction of 10,000 sets for which the corresponding output
variable from R_M has a particular rank at a given time point

tm=tspan./24;
P_rank = ();
P_val = ();
% Extracting sensitivity matrix of parameters 7 and 10 from Gsen
F2 = cell((),(),iter,size(P_var,2));
for j = 1:size(P_var,2)
    for i = 1:iter
        F = Gsen(i);

```

```

        F1(i) = F(1,P_var(j));
        clear F
    end
    F2(j) = F1;
    clear F1
end

% Arranging the output sensitivities of only molecular mediators (not
cells) in descending order
for j = 1:size(P_var,2)
    A = F2(j);
    for i = 1:iter
        F = A(i);
        g1 = size(F,1);
        F=F(1:g1,:); % Only molecular mediators (and not cells), (output
numbers 8 to 18) are included in output sensitivity analysis
        g=1;
        for k=1:size(F,2) % Checking for zero sensitivity columns
            D = nonzeros(F(:,k));
            s3 = isempty(D);
            if s3==1
                s4(g) =k;
                g=g+1;
            end
        end
        end
        (s1 s2) = sort(abs(F), 'descend');

        % If all sensitivity values are zero, the frequency column is set to
zero
        if isempty(s4)~=0
            for k = 1:size(s4,2)
                s2(:,s4(k))=0;
            end
        end

        % Assigning the actual output numbers to the molecular mediator examined
s2copy=s2;
        for m = 1:size(s2,1)
            s2(s2copy == m) = m;
        end

        P_rank(i) = s2(1:rnk,:);
        P_val(i) =s1(1:rnk,:);
        clear F
    end
    P_r(j) = P_rank;
    save('P_r(j)') % i've added it to get fig 6 and 7 with the whole
frequencies and not only the MODE, to be transformed and erased after each
run for the 2 by 2 respective parameters.
    P_v(j)= P_val;
    clear A
end

%Counting the frequency of occurrence of outputs for top 5 highest
sensitivity
b1 = zeros(rnk,size(tm,2));
b3 = zeros(rnk,size(tm,2));
for j = 1:size(P_var,2)
    F = P_r(j);

```

```

for l=1:rnk
for i=1:iter
    G1=F(i);
    G2(i,:) = G1(l,:);
    clear G1
end
(M(l,:) Fr(l,:) C(l,:)) = mode(G2);
for k=1:size(M,2)
    if (M(l,k)==0)
        Fr(l,k)=0;
    end
    a1 = C(l,k);
    a2 = size(a1);
    if a2(1)>1
        b1(l,k) = k;
        b3(l,k) = a1(2);
    end
end
end
end
R_M(j) = M;
R_Fr(j) = Fr;
clear F
B2(j) =b3;
end

% Plotting the top 3 sensitive parameters
for l=1:rnk
str=sprintf('Rank = %d',l);
figure(l)
suptitle(str)
for j=1:size(P_var,2)
Var_names = ('Yn','Mu'); % to be modified for each 2 parameters.
P1= R_M(j);
P2 = R_Fr(j);
subplot(1,size(P_var,2),j)
(AX,H1,H2) = plotyy(tspan,P1(l,:),tspan,P2(l,:),@bar,@line);
set(get(AX(1),'Ylabel'),'String','Output variable')
set(get(AX(2),'Ylabel'),'String','Frequency')
set(H1,'EdgeColor','none','BarWidth',0.5)
set(H1,'facecolor',(0.6 0.6 0.6))
set(H2,'LineWidth',2,'Marker','diamond','MarkerEdgeColor','k','MarkerFaceCo
lor','c','MarkerSize',6)
set(H2,'Color','r')
set(AX,('ycolor'),((0.6 0.6 0.6);'b'))
set(AX(1),'xlim',(-1 41));
set(AX(2),'xlim',(-1 41));
set(AX(1),'ylim',(0 8));
set(AX(2),'ylim',(0 iter));
set(AX(1),'YTick',(0:1:8));
set(AX(2),'YTick',(0:iter/10:iter));
box off
xlabel('Time (days)')
title(Var_names(j))
end
end

% Script containing parameter values and initial conditions (also contains
the program's main INPUT)

```

```

% This file initializes all the parameter values and initial conditions of
the model.
% Last modified: 05/05/2013
% Author: Sridevi Nagaraja, Adjusted by Berdja rafik for the purpose of the
current study.

% Assignment of parameter values as well as parameter identifying number(as
comments)

% DEFAULT PARAMETER VALUES.
k = 2.3326;      % unité : "µM".
beta = 0.4109;  % unité : "h^-1/µM".
delta = 0.0412; % unité : "h^-1/OD".
sigma = 0.0534; % unité : "µM".
yn = 0.4952;    % unité : "OD/h^-1".
mu = 0.1115;    % unité : h^-1 ex01: 20 min=2.08; ex02: 60 min=0.693.
Sinf = 0.6857; % unité : µM.
v = 0.3831;

Param =(k delta beta sigma yn mu Sinf v);

% Initial conditions
N_init = 0.0896;
S_init = log10(100);
P_init = 0.01;
Q_init = 0.0617;
A_init = 0.1;
yinit=(N_init S_init P_init Q_init A_init);

```

## REFERENCES

1. Altieri, M.A. and C.I. Nicholls, *Soil fertility management and insect pests: harmonizing soil and plant health in agroecosystems*. Soil and Tillage Research, 2003. **72**(2): p. 203-211.
2. Carvalho, F.P., *Agriculture, pesticides, food security and food safety*. Environmental science & policy, 2006. **9**(7): p. 685-692.
3. Adesemoye, A., H. Torbert, and J. Kloepper, *Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers*. Microbial ecology, 2009. **58**(4): p. 921-929.
4. Parke, J., *Root colonization by indigenous and introduced microorganisms, in The rhizosphere and plant growth*. 1991, Springer. p. 33-42.
5. Walsh, U.F., J.P. Morrissey, and F. O'Gara, *Pseudomonas for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation*. Current Opinion in Biotechnology, 2001. **12**(3): p. 289-295.
6. O Callaghan, M., et al., *Seed coating with biocontrol strain Pseudomonas fluorescens F113*. New Zealand Plant Protection, 2006. **59**: p. 80-85.
7. Fang, G., et al. *A broad-spectrum antagonistic activity of the biocontrol agent Pseudomonas synxantha BG33R*. in *American Phytopathological Society Abstracts*. 2007.
8. Someya, N., et al., *Encapsulation of cabbage seeds in alginate polymer containing the biocontrol bacterium Pseudomonas fluorescens strain LRB3W1 for the control of cabbage soilborne diseases*. Seed Science and Technology, 2007. **35**(2): p. 371-379.
9. Yan, Q., et al., *Secondary Metabolism and Interspecific Competition Affect Accumulation of Spontaneous Mutants in the GacS-GacA Regulatory System in Pseudomonas protegens*. mBio, 2018. **9**(1): p. e01845-17.
10. Leeman, M., et al., *Iron availability affects induction of systemic resistance to Fusarium wilt of radish by Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology, 1996. **86**: p. 149-155.
11. Meziane, H., et al., *Determinants of Pseudomonas putida WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants*. Mol Plant Pathol, 2005. **6**(2): p. 177-185.
12. Mavrodi, O.V., et al., *Suppression of Rhizoctonia and Pythium root rot of wheat by new strains of Pseudomonas*. Biological control, 2012. **62**(2): p. 93-102.

13. Rashid, S., T.C. Charles, and B.R. Glick, *Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes*. Applied soil ecology, 2012. **61**: p. 217-224.
14. Yanes, M.L., et al., *Characterization of native fluorescent Pseudomonas isolates associated with alfalfa roots in Uruguayan agroecosystems*. Biological Control, 2012. **63**(3): p. 287-295.
15. Guiñazú, L.B., et al., *Evaluation of rhizobacterial isolates from Argentina, Uruguay and Chile for plant growth-promoting characteristics and antagonistic activity towards Rhizoctonia sp. and Macrophomina sp. in vitro*. European journal of soil biology, 2013. **54**: p. 69-77.
16. Kvasov, D.E. and Y.D. Sergeyev, *Deterministic approaches for solving practical black-box global optimization problems*. Advances in Engineering Software, 2015. **80**: p. 58-66.
17. Banga, J.R. and E. Balsa-Canto, *Parameter estimation and optimal experimental design*. Essays Biochem, 2008. **45**: p. 195-210.
18. Saltelli, A., S. Tarantola, and F. Campolongo, *Sensitivity analysis as an ingredient of modeling*. Statistical Science, 2000: p. 377-395.
19. Bentele, M., et al., *Mathematical modeling reveals threshold mechanism in CD95-induced apoptosis*. The Journal of cell biology, 2004. **166**(6): p. 839-851.
20. Raue, A., et al., *Addressing parameter identifiability by model-based experimentation*. IET systems biology, 2011. **5**(2): p. 120-130.
21. Biessy, A., et al., *Diversity of phytobeneficial traits revealed by whole-genome analysis of worldwide-isolated phenazine-producing Pseudomonas spp.* Environmental microbiology, 2018.
22. Kejela, T., V.R. Thakkar, and R.R. Patel, *A novel strain of Pseudomonas inhibits Colletotrichum gloeosporioides and Fusarium oxysporum infections and promotes germination of coffee*. Rhizosphere, 2017. **4**: p. 9-15.
23. Caballo-Ponce, E., et al., *Quorum sensing in Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi and Erwinia toletana: role in virulence and interspecies interactions in the olive knot*. Appl. Environ. Microbiol., 2018. **84**(18): p. e00950-18.
24. Noirot-Gros, M.-F., et al., *Dynamics of Aspen Roots Colonization by Pseudomonads Reveals Strain-Specific and Mycorrhizal-Specific Patterns of Biofilm Formation*. Frontiers in microbiology, 2018. **9**.
25. Bossis, E., et al., *The taxonomy of Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida: current status and need for revision*. Agronomie, 2000. **20**(1): p. 51-63.
26. Antoun, H. and J. Kloepper, *Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)*. 2001.



27. Doudoroff, M., *Gram-negative aerobic rods and cocci. Family I: Pseudomonaceae. Genus I: Pseudomonas*. Bergey's manual of determinative microbiology, 1974.
28. Delorme, S., et al., *Pseudomonas lini sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils*. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2002. **52**(2): p. 513-523.
29. Verhille, S., et al., *Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: proposal of Pseudomonas jessenii sp. nov. and Pseudomonas mandelii sp. nov.* Systematic and applied microbiology, 1999. **22**(1): p. 45-58.
30. Migula, W., *Arbeiten aus dem bakteriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe*. 1897.
31. Palleroni, N., *Genus I Pseudomonas Migula 1894, 237*. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2005: p. 323-378.
32. Koehorst, J.J., et al., *Comparison of 432 Pseudomonas strains through integration of genomic, functional, metabolic and expression data*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 38699.
33. Peix, A., M.-H. Ramirez-Bahena, and E. Velazquez, *The current status on the taxonomy of Pseudomonas revisited: an update*. Infection, Genetics and Evolution, 2017.
34. Fenton, A., et al., *Exploitation of gene (s) involved in 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a Pseudomonas strain*. Applied and Environmental Microbiology, 1992. **58**(12): p. 3873-3878.
35. Chin-A-Woeng, T.F., et al., *Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium Pseudomonas chlororaphis PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot*. Molecular plant-microbe interactions, 2000. **13**(12): p. 1340-1345.
36. Chin-A-Woeng, T.F., et al., *Introduction of the phzH gene of Pseudomonas chlororaphis PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing Pseudomonas spp. strains*. Molecular plant-microbe interactions, 2001. **14**(8): p. 1006-1015.
37. Dubuis, C., C. Keel, and D. Haas, *Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads*. European Journal of Plant Pathology, 2007. **119**(3): p. 311-328.
38. Mirleau, P., *Role de la pyoverdine et de la nitrate reductase dans la competence rhizospherique et tellurique de la souche de pseudomonas fluorescens c7r12*. 2000, Dijon.
39. Timmis, K.N., *Pseudomonas putida: a cosmopolitan opportunist par excellence*. Environmental Microbiology, 2002. **4**(12): p. 779-781.

40. Leahy, J.G., K.D. Tracy, and M.H. Eley, *Degradation of mixtures of aromatic and chloroaliphatic hydrocarbons by aromatic hydrocarbon-degrading bacteria*. FEMS microbiology ecology, 2003. **43**(2): p. 271-276.
41. Guo, H. and J.R. Ecker, *The ethylene signaling pathway: new insights*. Current opinion in plant biology, 2004. **7**(1): p. 40-49.
42. Ma, Y., et al., *Serpentine endophytic bacterium Pseudomonas azotoformans ASS1 accelerates phytoremediation of soil metals under drought stress*. Chemosphere, 2017. **185**: p. 75-85.
43. Suslow, T. and M. Schroth, *Rhizobacteria of sugarbeets: effects of seed application and root colonization on yield [Fungal and bacterial phytopathogens]*. Phytopathology (USA), 1982.
44. Xu, G. and D. Gross, *Field evaluations of the interactions among fluorescent pseudomonads*. Erwinia carotovora, 1986: p. 423-430.
45. Kloepper, J., et al., *Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapeseed)*. Plant Dis, 1988. **72**(1): p. 42-46.
46. Soussou, S., et al., *Rhizobacterial Pseudomonas spp. strains harbouring acdS gene could enhance metalcolous legume nodulation in Zn/Pb/Cd mine tailings*. Water, Air, & Soil Pollution, 2017. **228**(4): p. 142.
47. Kloepper, J.W., et al., *Pseudomonas siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils*. Current microbiology, 1980. **4**(5): p. 317-320.
48. Scher, F.M. and R. Baker, *Effect of Pseudomonas putida and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens*. Phytopathology, 1982. **72**(12): p. 1567-1573.
49. Cook, R.J., *Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens*. Annual review of phytopathology, 1993. **31**(1): p. 53-80.
50. Waxlin, F., *Contribution à l'étude de l'action des Pseudomonas fluorescents: action sur la croissance et le développement de plantes horticoles*. Mémoire ENITH Angers, 1982: p. 195.
51. Mordukhova, E., et al., *Synthesis of the phytohormone indole-3-acetic acid by rhizosphere bacteria of the genus Pseudomonas*. Microbiology (USA), 1991.
52. Mahmoud, S., et al., *Production of plant growth promoting substances by rhizosphere microorganisms*. Zentralblatt für Mikrobiologie, 1984. **139**(4): p. 227-232.
53. Glick, B.R., *The enhancement of plant growth by free-living bacteria*. Canadian journal of microbiology, 1995. **41**(2): p. 109-117.

54. Grayston, S., J. Stephens, and L. Nelson, *Field and greenhouse studies on growth promotion of spring wheat inoculated with co-existent rhizobacteria*. Bulletin OILB SROP (France), 1991.
55. Frankenberger Jr, W.T. and A. Muhammad, *Phytohormones in soils: microbial production and function*. 1995: Marcel Dekker Inc.
56. Rodelas, B., et al., *Production of vitamins by Azospirillum brasilense in chemically-defined media*. Plant and Soil, 1993. **153**(1): p. 97-101.
57. Orhan, E., et al., *Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry*. Scientia Horticulturae, 2006. **111**(1): p. 38-43.
58. Burd, G.I., D.G. Dixon, and B.R. Glick, *A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(10): p. 3663-3668.
59. Whipps, J.M., *Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere*. Journal of experimental Botany, 2001. **52**(suppl\_1): p. 487-511.
60. Van Peer, R., G. Niemann, and B. Schippers, *Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by Pseudomonas sp. strain WCS 417 r*. Phytopathology, 1991. **81**(7): p. 728-734.
61. Lemanceau, P., et al., *Effect of pseudobactin 358 production by Pseudomonas putida WCS358 on suppression of fusarium wilt of carnations by nonpathogenic Fusarium oxysporum Fo47*. Applied and Environmental Microbiology, 1992. **58**(9): p. 2978-2982.
62. Van Loon, L., P. Bakker, and C. Pieterse, *Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria*. Annual review of phytopathology, 1998. **36**(1): p. 453-483.
63. AbuQamar, S., K. Moustafa, and L.S. Tran, *Mechanisms and strategies of plant defense against Botrytis cinerea*. Critical reviews in biotechnology, 2017. **37**(2): p. 262-274.
64. Ramamoorthy, V., et al., *Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases*. Crop protection, 2001. **20**(1): p. 1-11.
65. Bent, E., *Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF)*, in *Multigenic and induced systemic resistance in plants*. 2006, Springer. p. 225-258.
66. Howell, C. and Y. Okon. *Recent results of greenhouse and field trials on bacterial-induced plant growth promotion with no obvious symptoms of plant disease In: FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, 1., 1987, Orillia*. in *Proceedings of the First International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*. Orillia: Kloepper, J. 1987.

67. Weller, D.M., et al., *Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens*. Annual review of phytopathology, 2002. **40**(1): p. 309-348.
68. Remans, R., et al., *Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of Phaseolus vulgaris L. are dependent on plant P nutrition*. European Journal of Plant Pathology, 2007. **119**(3): p. 341-351.
69. Marschner, H., *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 2011: Academic press.
70. Raaijmakers, J.M., et al., *Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by Pseudomonas spp.* Phytopathology, 1995. **85**(10): p. 1075-1080.
71. Harman, G.E., et al., *Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts*. Nature reviews microbiology, 2004. **2**(1): p. 43.
72. Fallath, T., et al., *Toward Plant Defense Mechanisms Against Root Pathogens*, in *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*. 2017, Springer. p. 293-313.
73. Raupach, G.S., et al., *Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)*. Plant Disease, 1996. **80**(8): p. 891-894.
74. Yan, Z., et al., *Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria*. Phytopathology, 2002. **92**(12): p. 1329-1333.
75. Bais, H.P., et al., *The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms*. Annu. Rev. Plant Biol., 2006. **57**: p. 233-266.
76. Liu, K., et al., *Mixtures of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Biological Control of Multiple Plant Diseases and Plant-Growth Promotion in the Presence of Pathogens*. Plant Disease, 2018. **102**(1): p. 67-72.
77. Schroth, M.N. and J.G. Hancock, *Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria*. Science, 1982. **216**(4553): p. 1376-1381.
78. Leong, J., *Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens*. Annual Review of Phytopathology, 1986. **24**(1): p. 187-209.
79. Neilands, J. and S.A. Leong, *Siderophores in relation to plant growth and disease*. Annual Review of Plant Physiology, 1986. **37**(1): p. 187-208.
80. Gutterson, N., *Microbial fungicides: recent approaches to elucidating mechanisms*. Critical Reviews in Biotechnology, 1990. **10**(1): p. 69-91.

81. Cook, R.J., et al., *Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(10): p. 4197-4201.
82. Lugtenberg, B.J. and L.C. Dekkers, *What makes Pseudomonas bacteria rhizosphere competent?* Environmental microbiology, 1999. **1**(1): p. 9-13.
83. Tombolini, R., et al., *Colonization Pattern of the Biocontrol Strain Pseudomonas chlororaphis MA 342 on Barley Seeds Visualized by Using Green Fluorescent Protein*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(8): p. 3674-3680.
84. Becker, J. and R.J. Cook, *Role of siderophores in suppression of Pythium species and production of increased-growth response of wheat by fluorescent pseudomonads*. Phytopathology, 1988. **78**(6): p. 778-782.
85. Kraus, J. and J.E. Loper, *Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by Pseudomonas fluorescens Pf-5 in biological control of Pythium damping-off of cucumber*. Phytopathology, 1992. **82**(3): p. 264-271.
86. De La Fuente, L., et al., *Pseudomonas fluorescens UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity*. European Journal of Plant Pathology, 2004. **110**(7): p. 671-681.
87. Lamichhane, J.R., et al., *Integrated management of damping-off diseases. A review*. Agronomy for sustainable development, 2017. **37**(2): p. 10.
88. Sneh, B., et al., *Chlamyospore germination of Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum as affected by fluorescent and lytic bacteria from a Fusarium-suppressive soil*. Phytopathology, 1984. **74**(9): p. 1115-1124.
89. Lemanceau, P. and C. Alabouvette, *Suppression of Fusarium wilts by fluorescent pseudomonads: mechanisms and applications*. Biocontrol Science and Technology, 1993. **3**(3): p. 219-234.
90. Benchabane, M., et al., *Mise en évidence de l'effet antagoniste de Pseudomonas fluorescens vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate*. EPPO Bulletin, 2000. **30**(2): p. 243-246.
91. Benchabane, M., *Caractérisation des effets d'antagonisme microbien et de promotion de la croissance végétale de souches de Pseudomonas spp. fluorescents*. Doctoral Thesis. 2005, FSB-UTHB: Algeria. p. 235.
92. Singh, H., et al., *Studies on Pseudomonas and Trichoderma-Mediated Root Exudation Pattern in Chickpea against Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris*. 2018.
93. Dybvig, K., *DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes*. Molecular microbiology, 1993. **10**(3): p. 465-471.

94. Nash, H.A., *Site-specific recombination: integration, excision, resolution, and inversion of defined DNA segments*. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 1996. **2**: p. 2363-2376.
95. Kolb, A.F., *Genome engineering using site-specific recombinases*. *Cloning & Stem Cells*, 2002. **4**(1): p. 65-80.
96. Coates, C.J., et al., *Site-directed genome modification: derivatives of DNA-modifying enzymes as targeting tools*. *TRENDS in Biotechnology*, 2005. **23**(8): p. 407-419.
97. Zeig, J., et al., *Recombinational switching for gene expression*. *Science*, 1977. **196**: p. 170-175.
98. Anraku, Y. and R.B. Gennis, *The aerobic respiratory chain of Escherichia coli*. *Trends in Biochemical Sciences*, 1987. **12**: p. 262-266.
99. Camacho Carvajal, M.M., et al., *Characterization of NADH dehydrogenases of Pseudomonas fluorescens WCS365 and their role in competitive root colonization*. *Molecular plant-microbe interactions*, 2002. **15**(7): p. 662-671.
100. Mirleau, P., et al., *Fitness in soil and rhizosphere of Pseudomonas fluorescens C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000. **34**(1): p. 35-44.
101. Bystrova, O.V., et al., *Structure of the biological repeating unit of the O-antigen of Pseudomonas aeruginosa immunotype 4 containing both 2-acetamido-2, 6-dideoxy-D-glucose and 2-acetamido-2, 6-dideoxy-D-galactose*. *Carbohydrate research*, 2003. **338**(17): p. 1801-1806.
102. de Weger, L.A., et al., *Pseudomonas spp. with mutational changes in the O-antigenic side chain of their lipopolysaccharide are affected in their ability to colonize potato roots*, in *Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions*. 1989, Springer. p. 197-202.
103. Raaijmakers, J.M., M. Vlami, and J.T. De Souza, *Antibiotic production by bacterial biocontrol agents*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002. **81**(1-4): p. 537.
104. McGowan, S.J., et al., *Carbapenem antibiotic biosynthesis in Erwinia carotovora is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway*. *Molecular microbiology*, 2005. **55**(2): p. 526-545.
105. Jaaffar, A.K.M., et al., *Sensitivity of Rhizoctonia isolates to phenazine-1-carboxylic acid and biological control by phenazine-producing Pseudomonas spp.* *Phytopathology*, 2017. **107**(6): p. 692-703.
106. Corbell, N. and J. Loper, *A global regulator of secondary metabolite production in Pseudomonas fluorescens Pf-5*. *Journal of Bacteriology*, 1995. **177**(21): p. 6230-6236.

107. Bender, C., V. Rangaswamy, and J. Loper, *Polyketide production by plant-associated pseudomonads*. Annual review of phytopathology, 1999. **37**(1): p. 175-196.
108. Dwivedi, D. and B. Johri, *Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation*. Current Science, 2003: p. 1693-1703.
109. Mavrodi, D.V., et al., *A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by Pseudomonas fluorescens 2-79*. Journal of bacteriology, 1998. **180**(9): p. 2541-2548.
110. Delaney, S.M., et al., *phzO, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in Pseudomonas aureofaciens 30-84*. Journal of Bacteriology, 2001. **183**(1): p. 318-327.
111. El-Banna, N. and G. Winkelmann, *Pyrrrolnitrin from Burkholderia cepacia: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes*. Journal of Applied Microbiology, 1998. **85**(1): p. 69-78.
112. Hammer, P.E., et al., *Conservation of the pyrrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrrolnitrin-producing strains*. FEMS Microbiology Letters, 1999. **180**(1): p. 39-44.
113. Sarniguet, A., et al., *The sigma factor sigma s affects antibiotic production and biological control activity of Pseudomonas fluorescens Pf-5*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(26): p. 12255-12259.
114. Ramette, A., et al., *Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2003. **16**(6): p. 525-535.
115. Keel, C., *Suppression of root diseases by Pseudomonas fluorescens CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol*. Mol Plant Microbe Interact, 1992. **5**: p. 4-13.
116. Chin-A-Woeng, T.F., et al., *Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing Pseudomonas chlororaphis PCL1391 of tomato root rot caused by Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998. **11**(11): p. 1069-1077.
117. Nielsen, T., et al., *Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by Pseudomonas fluorescens DR54*. Journal of Applied Microbiology, 1999. **87**(1): p. 80-90.
118. Nowak-Thompson, B., et al., *Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of Pseudomonas fluorescens Pf-5*. Journal of bacteriology, 1999. **181**(7): p. 2166-2174.

119. Haas, D. and C. Keel, *Regulation of antibiotic production in root-colonizing Pseudomonas spp. and relevance for biological control of plant disease*. Annual review of phytopathology, 2003. **41**(1): p. 117-153.
120. Haas, D. and G. Défago, *Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads*. Nat. Rev. Microbiol 2005. **3**(4): p. 307-319.
121. Bergsma-Vlami, M., M.E. Prins, and J.M. Raaijmakers, *Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous Pseudomonas spp.* FEMS Microbiology Ecology, 2005. **52**(1): p. 59-69.
122. Adam, A., *Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes Elicitation of induced systemic resistance in tomato and cucumber and activation of the lipoxigenase pathway by non-pathogenic rhizobacteria*. 2008.
123. Laville, J., et al., *Global control in Pseudomonas fluorescens mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(5): p. 1562-1566.
124. Gaffney, T.D., et al., *Global regulation of expression of antifungal factors by a Pseudomonas fluorescens biological control strain*. MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions, 1994. **7**(4): p. 455-463.
125. Schnider, U., et al., *Amplification of the housekeeping sigma factor in Pseudomonas fluorescens CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities*. Journal of Bacteriology, 1995. **177**(18): p. 5387-5392.
126. Raaijmakers, J.M., D.M. Weller, and L.S. Thomashow, *Frequency of antibiotic-producing Pseudomonas spp. in natural environments*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(3): p. 881-887.
127. Li, Y., et al., *Optimization of nutrient components for enhanced phenazine-1-carboxylic acid production by gacA-inactivated Pseudomonas sp. M18G using response surface method*. Applied microbiology and biotechnology, 2008. **77**(6): p. 1207-1217.
128. Shipton, P. *Take-all decline during cereal monoculture*. in *Biology and Control of Soil Borne Plant Pathogens International Symposium*. 1975.
129. Smiley, R.W., *Wheat-rhizoplane pseudomonads as antagonists of Gaeumannomyces graminis*. Soil Biology and Biochemistry, 1979. **11**(4): p. 371-376.
130. Pierson III, L.S., et al., *N-acyl-homoserine lactone-mediated gene regulation in biological control by fluorescent pseudomonads: Current knowledge and future work*. European Journal of Plant Pathology, 1998. **104**(1): p. 1-9.



131. Défago, G., 2, 4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant pathology*, 1993. **42**(3): p. 311-312.
132. Banger, M.G. and L.S. Thomashow, *Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2, 4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent Pseudomonas fluorescens Q2-87*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 1996. **9**(2): p. 83-90.
133. de Souza, J.T., *Distribution, diversity, and activity of antibiotic-producing Pseudomonas spp.* 2002: sn].
134. Ramette, A., Y. Moënne-Loccoz, and G. Défago, *Prevalence of fluorescent pseudomonads producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot*. *FEMS microbiology ecology*, 2003. **44**(1): p. 35-43.
135. Thrane, C., et al., *Vital fluorescent stains for detection of stress in Pythium ultimum and Rhizoctonia solani challenged with viscosinamide from Pseudomonas fluorescens DR54*. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999. **30**(1): p. 11-23.
136. Nielsen, T., et al., *Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin—a new antifungal cyclic lipopeptide from Pseudomonas fluorescens strain 96.578*. *Journal of applied microbiology*, 2000. **89**(6): p. 992-1001.
137. Compant, S., et al., *Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects*. *Applied and environmental microbiology*, 2005. **71**(9): p. 4951-4959.
138. Kaur, R., et al., *Gluconic acid: An antifungal agent produced by Pseudomonas species in biological control of take-all*. *Phytochemistry*, 2006. **67**(6): p. 595-604.
139. O'sullivan, D.J. and F. O'Gara, *Traits of fluorescent Pseudomonas spp. involved in suppression of plant root pathogens*. *Microbiological reviews*, 1992. **56**(4): p. 662-676.
140. De Lorenzo, V., et al., *Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria*. *Journal of bacteriology*, 1990. **172**(11): p. 6568-6572.
141. Lugtenberg, B.J., L.V. Kravchenko, and M. Simons, *Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by Pseudomonas biocontrol strains and role in rhizosphere colonization*. *Environmental Microbiology*, 1999. **1**(5): p. 439-446.
142. Simons, M., et al., *Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting Pseudomonas bacteria*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 1996. **9**(7): p. 600-607.

143. Vílchez, S., et al., *Proline catabolism by Pseudomonas putida: cloning, characterization, and expression of the put genes in the presence of root exudates*. Journal of bacteriology, 2000. **182**(1): p. 91-99.
144. Teppo, A., et al., *Colonization efficiency of Pseudomonas putida is influenced by Fis-controlled transcription of nuoA-N operon*. PloS one, 2018. **13**(8): p. e0201841.
145. Teale, W.D., I.A. Paponov, and K. Palme, *Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006. **7**(11): p. 847.
146. Sergeeva, E., D.L. Hirkala, and L.M. Nelson, *Production of indole-3-acetic acid, aromatic amino acid aminotransferase activities and plant growth promotion by Pantoea agglomerans rhizosphere isolates*. Plant and Soil, 2007. **297**(1-2): p. 1-13.
147. Ali, B., et al., *A comparative effect of IAA and 4-Cl-IAA on growth, nodulation and nitrogen fixation in Vigna radiata (L.) Wilczek*. Acta Physiologiae Plantarum, 2008. **30**(1): p. 35-41.
148. Lawongsa, P., et al., *Molecular and phenotypic characterization of potential plant growth-promoting Pseudomonas from rice and maize rhizospheres*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008. **24**(9): p. 1877-1884.
149. Meliani, A., et al., *Plant growth-promotion and IAA secretion with Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida*. Res Rev. J. Bot. Sci, 2017. **6**(2): p. 16-24.
150. Kampert, M., E. Strzelczyk, and A. Pokojska, *Production of auxins by bacteria isolated from the roots of pine seedlings (Pinus silvestris L.)*. Acta microbiologica Polonica. Series B: Microbiologia applicata, 1975. **7**(2): p. 135-143.
151. Loper, J. and M. Schroth, *Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet*. Phytopathology, 1986. **76**(4): p. 386-389.
152. Arshad, M. and W.T. Frankenberger Jr, *Ethylene: agricultural sources and applications*. 2012: Springer Science & Business Media.
153. Wang, S., C. Wang, and A. Wellburn, *Role of ethylene under stress conditions*. Plant biology (USA), 1990.
154. Morgan, P.W. and M.C. Drew, *Ethylene and plant responses to stress*. Physiologia Plantarum, 1997. **100**(3): p. 620-630.
155. Zhang, Z., et al., *Structural and stereoelectronic insights into oxygenase-catalyzed formation of ethylene from 2-oxoglutarate*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017. **114**(18): p. 4667-4672.

156. Grichko, V.P. and B.R. Glick, *Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria*. Plant Physiology and Biochemistry, 2001. **39**(1): p. 11-17.
157. Grichko, V.P., B. Filby, and B.R. Glick, *Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn*. Journal of Biotechnology, 2000. **81**(1): p. 45-53.
158. Wang, C., et al., *Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into Pseudomonas fluorescens strain CHA0 and its gac A derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities*. Canadian Journal of Microbiology, 2000. **46**(10): p. 898-907.
159. Mayak, S., T. Tirosh, and B.R. Glick, *Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress*. Plant Physiology and Biochemistry, 2004. **42**(6): p. 565-572.
160. Saravanakumar, D. and R. Samiyappan, *ACC deaminase from Pseudomonas fluorescens mediated saline resistance in groundnut (Arachis hypogea) plants*. Journal of Applied Microbiology, 2007. **102**(5): p. 1283-1292.
161. Ma, W., F.C. Guinel, and B.R. Glick, *Rhizobium leguminosarum biovar viciae 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(8): p. 4396-4402.
162. Kong, Z., et al., *A nodule endophytic plant growth-promoting Pseudomonas and its effects on growth, nodulation and metal uptake in Medicago lupulina under copper stress*. Annals of Microbiology, 2017. **67**(1): p. 49-58.
163. Belimov, A.A., et al., *Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase*. Canadian Journal of Microbiology, 2001. **47**(7): p. 642-652.
164. Harrison, M.J., *Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Annu. Rev. Microbiol., 2005. **59**: p. 19-42.
165. Dortet, L., et al., *Pore-forming activity of the Pseudomonas aeruginosa type III secretion system translocon alters the host epigenome*. Nature microbiology, 2018. **3**(3): p. 378.
166. Warmink, J.A. and J.D. Van Elsas, *Selection of bacterial populations in the mycosphere of Laccaria proxima: is type III secretion involved?* The ISME journal, 2008. **2**(8): p. 887.
167. Viollet, A., *Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plante-Pseudomonas spp. fluorescents non pathogènes*. 2010, Université de Bourgogne.
168. Gamalero, E., et al., *Morphogenetic modifications induced by Pseudomonas fluorescens A6RI and Glomus mosseae BEG12 in the root system of tomato*

- differ according to plant growth conditions. *New phytologist*, 2002. **155**(2): p. 293-300.
169. Viollet, A., et al., *Pseudomonas fluorescens C7R12 type III secretion system impacts mycorrhization of Medicago truncatula and associated microbial communities*. *Mycorrhiza*, 2017. **27**(1): p. 23-33.
  170. Bonnot-Uzureau, S., *Quorum Sensing chez Brucella melitensis: caractérisation du régulateur transcriptionnel VjbR et de son régulon*. 2007.
  171. Chhabra, S.R., et al., *Extracellular communication in bacteria*, in *The chemistry of pheromones and other semiochemicals II*. 2005, Springer. p. 279-315.
  172. Williams, P., et al., *Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2007. **362**(1483): p. 1119-1134.
  173. Diggle, S.P., S.A. Crusz, and M. Cámara, *Quorum sensing*. *Current Biology*, 2007. **17**(21): p. R907-R910.
  174. Fuqua, C. and E.P. Greenberg, *Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones*. *Current opinion in microbiology*, 1998. **1**(2): p. 183-189.
  175. Whitehead, N.A., et al., *Quorum-sensing in Gram-negative bacteria*. *FEMS microbiology reviews*, 2001. **25**(4): p. 365-404.
  176. Bassler, B.L., *Small talk: cell-to-cell communication in bacteria*. *Cell*, 2002. **109**(4): p. 421-424.
  177. Saitou, N. and M. Nei, *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Molecular biology and evolution*, 1987. **4**(4): p. 406-425.
  178. Pieterse, C., et al., *Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression*. *The Plant Cell*, 1996. **8**(8): p. 1225-1237.
  179. Subramoni, S. and V. Venturi, *LuxR-family 'solos': bachelor sensors/regulators of signalling molecules*. *Microbiology*, 2009. **155**(5): p. 1377-1385.
  180. Redfield, R.J., *Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing?* *Trends in microbiology*, 2002. **10**(8): p. 365-370.
  181. Bordeleau, E., *Biofilm Formation and Quorum Sensing in Pseudomonas fluorescens Pf0-1*. 2017.
  182. Venturi, V., *Regulation of quorum sensing in Pseudomonas*. *FEMS microbiology reviews*, 2006. **30**(2): p. 274-291.

183. Lade, H., D. Paul, and J.H. Kweon, *N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing with special reference to use of quorum quenching bacteria in membrane biofouling control*. BioMed research international, 2014. **2014**.
184. Jacques, P., et al., *Les mécanismes biochimiques développés par les "Pseudomonas" fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol*. Cahiers Agricultures, 1993. **2**(5): p. 301-307 (1).
185. Subramanian, J. and K. Satyan, *Isolation and selection of fluorescent pseudomonads based on multiple plant growth promotion traits and siderotyping*. Chilean journal of agricultural research, 2014. **74**(3): p. 319-325.
186. Repeta, D., et al. *Microbes adapt to iron scarcity through siderophore production across the eastern tropical Pacific*. in *American Geophysical Union, Ocean Sciences Meeting 2016, abstract# CT41A-08*. 2016.
187. Barash, I., *Iron, siderophores and plant-pathogen interactions*. Phytoparasitica, 1990. **18**(3): p. 183-188.
188. Folschweiller, N., et al., *The pyoverdinin receptor FpvA, a TonB-dependent receptor involved in iron uptake by Pseudomonas aeruginosa*. Molecular membrane biology, 2000. **17**(3): p. 123-133.
189. Kodani, S., et al., *Isolation and structure determination of new siderophore albachelin from Amycolatopsis alba*. Biometals, 2015. **28**(2): p. 381-389.
190. Fuchs, R., et al., *Siderotyping a powerful tool for the characterization of pyoverdines*. Current topics in medicinal chemistry, 2001. **1**(1): p. 31-57.
191. Budzikiewicz, H., *Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent Pseudomonas spp.)*, in *Progress in the chemistry of organic natural products*. 2004, Springer. p. 81-237.
192. Johnstone, T.C. and E.M. Nolan, *Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores*. Dalton Transactions, 2015. **44**(14): p. 6320-6339.
193. Ongena, M., et al., *Unusual traits of the pyoverdinin-mediated iron acquisition system in Pseudomonas putida strain BTP1*. Biometals, 2002. **15**(1): p. 1-13.
194. Hannauer, M., et al., *Biosynthesis of the pyoverdinin siderophore of Pseudomonas aeruginosa involves precursors with a myristic or a myristoleic acid chain*. FEBS letters, 2012. **586**(1): p. 96-101.
195. Neilands, J., *Methodology of siderophores*, in *Siderophores from microorganisms and plants*. 1984, Springer. p. 1-24.
196. Cox, C.D., et al., *Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1981. **78**(7): p. 4256-4260.

197. Duffy, B.K. and G. Défago, *Controlling Instability in gacS-gacARegulatory Genes during Inoculant Production of Pseudomonas fluorescens Biocontrol Strains*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(8): p. 3142-3150.
198. Ran, L., et al., *Induction of systemic resistance against bacterial wilt in Eucalyptus urophylla by fluorescent Pseudomonas spp.* European Journal of Plant Pathology, 2005. **113**(1): p. 59-70.
199. Moores, J., et al., *Cloning of genes involved in the biosynthesis of pseudobactin, a high-affinity iron transport agent of a plant growth-promoting Pseudomonas strain*. Journal of bacteriology, 1984. **157**(1): p. 53-58.
200. Loper, J.E. and C.A. Ishimaru, *Factors influencing siderophore-mediated biocontrol activity of rhizosphere Pseudomonas spp*, in *The Rhizosphere and Plant Growth*. 1991, Springer. p. 253-261.
201. Rossbach, S., et al., *Elevated zinc induces siderophore biosynthesis genes and a zntA-like gene in Pseudomonas fluorescens*. FEMS microbiology letters, 2000. **191**(1): p. 61-70.
202. Baysse, C., et al., *Vanadium interferes with siderophore-mediated iron uptake in Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology, 2000. **146**(10): p. 2425-2434.
203. Ringel, M.T. and T. Brüser, *The biosynthesis of pyoverdines*. Microbial Cell, 2018. **5**(10): p. 424.
204. Nouvel, P., *Modèles et métaphores*. Enquête sur le concept de modèle, 2002: p. 189-202.
205. Dzotsi, A., *Le Modèle CERES-Maize de DSSAT pour l'Analyse de Stratégie de Semis chez le Mais*. Mémoire d'Ingénieur Agronome, IFDC Afrique/ESA-UL, 103p, 2002.
206. Amar, P., *Contributions à l'étude de la dynamique des systèmes biologiques et aux systèmes de calcul en biologie synthétique*. 2013, Université Paris Sud-Paris XI. p. 132.
207. Weuster-Botz, D., *Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search?* J Biosci Bioeng, 2000. **90**(5): p. 473-483.
208. Bazi, M., et al., *Les modOles de simulation comme outils de gestion des sols et de developpement agricole: exemple du modOle" Cultures Pluviales du Burkina Faso"*, in *Les modOles de simulation de la crossance végétale comme outils de recherche developpement. Compte rendu d'un séminaire tenu A Bamako, Mali, du 7 an 8 novembre 1994. Rapports PSS no 11, IER, Bamako, DAN-AUW, Wageningen, AB-DLO, Haren/Wageningen*. 1995. p. 53-66.
209. Pahlow, M. and A. Oschlies, *Chain model of phytoplankton P, N and light colimitation*. Mar. Ecol. Prog. Ser 2009. **376**: p. 69-83.

210. Brochot, C., *Paramétrisation des modèles physiologiques toxico/pharmacocinétiques*. 2004, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
211. Beven, K.J., *Uniqueness of place and process representations in hydrological modelling*. Hydrology and Earth System Sciences Discussions, 2000. **4**(2): p. 203-213.
212. Haverkamp, R., et al., *Soil properties and moisture movement in the unsaturated zone*. The handbook of groundwater engineering, 1998.
213. Iris, F., et al., *Modélisation intégrative prédictive et biologie expérimentale-Un processus synergique remarquablement efficace au service de la recherche médicale*. médecine/sciences, 2009. **25**(6-7): p. 608-616.
214. Linkes, M., *Simulation numérique et modélisation de l'assimilation de substrat par des microorganismes dans un écoulement turbulent*. 2012, INPT.
215. Merz, B., A. Bárdossy, and G.R. Schiffler, *Different methods for modelling the areal infiltration of a grass field under heavy precipitation*. Hydrological Processes, 2002. **16**(7): p. 1383-1402.
216. Chahinian, N., *Paramétrisation multi-critère et multi-échelle d'un modèle hydrologique spatialisé de crue en milieu agricole*. 2004.
217. Jacques, J., *Pratique de l'analyse de sensibilité: comment évaluer l'impact des entrées aléatoires sur la sortie d'un modèle mathématique*. Lille: sn, 2011.
218. Turányi, T., *Sensitivity analysis of complex kinetic systems. Tools and applications*. Journal of mathematical chemistry, 1990. **5**(3): p. 203-248.
219. Borgonovo, E. and E. Plischke, *Sensitivity analysis: a review of recent advances*. European Journal of Operational Research, 2016. **248**(3): p. 869-887.
220. Iooss, B., *Revue sur l'analyse de sensibilité globale de modèles numériques*. Journal de la Société Française de Statistique, 2011. **152**(1): p. 3-25.
221. Pannell, D.J., *Sensitivity analysis of normative economic models: theoretical framework and practical strategies*. Agricultural economics, 1997. **16**(2): p. 139-152.
222. Bahremand, A. and F. De Smedt, *Distributed hydrological modeling and sensitivity analysis in Torysa Watershed, Slovakia*. Water Resources Management, 2008. **22**(3): p. 393-408.
223. Hill, M.C. and C.R. Tiedeman, *Effective groundwater model calibration: with analysis of data, sensitivities, predictions, and uncertainty*. 2006: John Wiley & Sons.
224. Hill, M.C., et al., *Practical use of computationally frugal model analysis methods*. Groundwater, 2016. **54**(2): p. 159-170.

225. Boukerma, L., et al., *Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) in the Biocontrol of Tomato Fusarium Wilt*. Plant Protection Science, 2017. **53**(2).
226. Journet, E.-P., et al., *Medicago truncatula ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001. **14**(6): p. 737-748.
227. Lemanceau, P., *Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des Pseudomonas spp fluorescents*. Agronomie, 1992. **12**(6): p. 413-437.
228. Keel, C., et al., *Suppression of soil-borne pathogens by Pseudomonas fluorescens, a multifactorial mechanism*. Bulletin OILB SROP (France), 1991.
229. Youard, Z.A., et al., *Pseudomonas fluorescens CHA0 produces enantio-pyochelin, the optical antipode of the Pseudomonas aeruginosa siderophore pyochelin*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(49): p. 35546-35553.
230. Toua, D., et al., *Evaluation of Pseudomonas fluorescens for the biocontrol of fusarium wilt in tomato and flax*. African Journal of Microbiology Research, 2013. **7**(48): p. 5449-5458.
231. King, E.O., M.K. Ward, and D.E. Raney, *Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin*. Translational Research, 1954. **44**(2): p. 301-307.
232. Castro, N., *The role of the insular cortex in chemosensory responses to ethanol*. 1912, Sciences.
233. Meyer, J.a. and M. Abdallah, *The fluorescent pigment of Pseudomonas fluorescens: biosynthesis, purification and physicochemical properties*. Microbiology, 1978. **107**(2): p. 319-328.
234. Bultreys, A., et al., *High-performance liquid chromatography analyses of pyoverdin siderophores differentiate among phytopathogenic fluorescent Pseudomonas species*. Applied and environmental microbiology, 2003. **69**(2): p. 1143-1153.
235. Goljat, L., et al., *Highly Sensitive Determination of Pyoverdine in Cloud Water by HPLC-Thermal Lens Spectrometry*. 2016, Univerza v Novi Gorici.
236. Tagu, D. and J.-L. Risler, *Bio-informatique: Principes d'utilisation des outils*. 2010: Editions Quae.
237. Tamura, K., et al., *MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0*. Molecular biology and evolution, 2013. **30**(12): p. 2725-2729.
238. Nei, M. and W.-H. Li, *Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979. **76**(10): p. 5269-5273.



239. Saitou, N. and M. Nei, *The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees*<sup>1</sup> Naruya Saitou<sup>2</sup> and Masatoshi Nei. 1987.
240. Van Impe, J., et al., *Towards a novel class of predictive microbial growth models*. Int J Food Microbiol, 2005. **100**(1): p. 97-105.
241. Fgaier, H., et al., *Predictive modeling of siderophore production by Pseudomonas fluorescens under iron limitation*. J. Theor Biol, 2008. **251**(2): p. 348-362.
242. Freund, R.W., G.H. Golub, and N.M. Nachtigal, *Iterative solution of linear systems*. Acta numerica, 1992. **1**: p. 57-100.
243. Gregg, W.W., et al., *Skill assessment in ocean biological data assimilation*. Journal of Marine Systems, 2009. **76**(1-2): p. 16-33.
244. Gosset, E., *Another differences calculus based on standar desviation and confidence interval*. Statistical References, 1917. **26**: p. 66-72.
245. Nagaraja, S., et al., *Computational approach to characterize causative factors and molecular indicators of chronic wound inflammation*. The Journal of Immunology, 2014. **192**(4): p. 1824-1834.
246. Loper, J.E., C. Haack, and M.N. Schroth, *Population dynamics of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato (Solanum tuberosum L.)*. Applied and Environmental Microbiology, 1985. **49**(2): p. 416-422.
247. Howie, W.J., N.I. Gutterson, and T.V. Suslow, *Osmotolerance-minus mutants of Pseudomonas putida strain MK280 are not impaired in cotton spermosphere and rhizosphere colonization*. Soil Biology and Biochemistry, 1990. **22**(6): p. 839-844.
248. Katsuwon, J. and A. Anderson, *Characterization of catalase activities in a root-colonizing isolate of Pseudomonas putida*. Canadian journal of microbiology, 1992. **38**(10): p. 1026-1032.
249. Mascher, F., et al., *The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent Pseudomonas fluorescens CHA0 does not promote strain persistence in soil*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(4): p. 1662-1667.
250. Gu, Y.-H. and M. Mazzola, *Impact of carbon starvation on stress resistance, survival in soil habitats and biocontrol ability of Pseudomonas putida strain 2C8*. Soil Biology and Biochemistry, 2001. **33**(9): p. 1155-1162.
251. Kuiper, I., et al., *Increased uptake of putrescine in the rhizosphere inhibits competitive root colonization by Pseudomonas fluorescens strain WCS365*. Molecular plant-microbe interactions, 2001. **14**(9): p. 1096-1104.
252. Weller, D.M., *Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years*. Phytopathology, 2007. **97**(2): p. 250-256.

253. Benizri, E., et al., *Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure*. Applied Soil Ecology, 2002. **21**(3): p. 261-265.
254. Wardle, D.A., *Communities and ecosystems: linking the aboveground and belowground components*. Vol. 34. 2002: Princeton University Press.
255. Warembourg, F., C. Roumet, and F. Lafont, *Differences in rhizosphere carbon-partitioning among plant species of different families*. Plant and Soil, 2003. **256**(2): p. 347-357.
256. Kinscherf, T.G. and D.K. Willis, *Global regulation by gidA in Pseudomonas syringae*. Journal of bacteriology, 2002. **184**(8): p. 2281-2286.
257. Morot-Gaudry, J., *Assimilation de l'azote chez les plantes*. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. INRA, Paris, 1997.
258. Weber, M., et al., *The structure of a pyoverdine from Pseudomonas sp. CFML 96.188 and its relation to other pyoverdines with a cyclic C-terminus*. BioMetals, 2000. **13**(4): p. 301-309.
259. Kallova, J., et al., *Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa serotype 011 isolates to aminoglycoside and b-lactam antibiotics and mechanisms of resistance*. Biologia, Bratislava, 1996. **51**(3): p. 237-242.
260. Visca, P., A. Ciervo, and N. Orsi, *Cloning and nucleotide sequence of the pvdA gene encoding the pyoverdine biosynthetic enzyme L-ornithine N5-oxygenase in Pseudomonas aeruginosa*. Journal of bacteriology, 1994. **176**(4): p. 1128-1140.
261. Mehri, I., et al., *Genetic and functional heterogeneities among fluorescent Pseudomonas isolated from environmental samples*. The Journal of general and applied microbiology, 2011. **57**(2): p. 101-114.
262. Nozoye, T., et al., *Bioenergy grass [Erianthus ravennae (L.) Beauv.] secretes two members of mugineic acid family phytosiderophores which involved in their tolerance to Fe deficiency*. Soil Science and Plant Nutrition, 2017. **63**(6): p. 543-552.
263. Ahmed, E. and S.J. Holmström, *Siderophores in environmental research: roles and applications*. Microbial biotechnology, 2014. **7**(3): p. 196-208.
264. Bultreys, A. and I. Gheysen, *Production and comparison of peptide siderophores from strains of distantly related pathovars of Pseudomonas syringae and Pseudomonas viridiflava LMG 2352*. Applied and environmental microbiology, 2000. **66**(1): p. 325-331.
265. Ringel, M.T., G. Dräger, and T. Brüser, *PvdN catalyzes a periplasmic pyoverdine modification*. Journal of Biological Chemistry, 2016: p. jbc. M116. 755611.

266. Friedrichs, M.A., et al., *Assessment of skill and portability in regional marine biogeochemical models: Role of multiple planktonic groups*. Journal of Geophysical Research: Oceans (1978–2012), 2007. **112**(C8).
267. Friedrichs, M.A., R.R. Hood, and J.D. Wiggert, *Ecosystem model complexity versus physical forcing: Quantification of their relative impact with assimilated Arabian Sea data*. Deep Sea Res Part 2 Top Stud Oceanogr., 2006. **53**(5): p. 576-600.
268. Kravaris, C., J. Hahn, and Y. Chu, *Advances and selected recent developments in state and parameter estimation*. Comput Chem Eng, 2013. **51**: p. 111-123.
269. Groetsch, C.W. and C. Groetsch, *Inverse problems in the mathematical sciences*. Vol. 52. 1993: Springer.
270. Gábor, A. and J.R. Banga, *Robust and efficient parameter estimation in dynamic models of biological systems*. BMC Syst. Biol, 2015. **9**(1): p. 74.
271. McKay, M.D., R.J. Beckman, and W.J. Conover, *Comparison of three methods for selecting values of input variables in the analysis of output from a computer code*. Technometrics, 1979. **21**(2): p. 239-245.
272. Schartau, M. and A. Oschlies, *Simultaneous data-based optimization of a 1D-ecosystem model at three locations in the North Atlantic: Part I—Method and parameter estimates*. Journal of Marine Research, 2003. **61**(6): p. 765-793.
273. Liu, G., M.T. Swihart, and S. Neelamegham, *Sensitivity, principal component and flux analysis applied to signal transduction: the case of epidermal growth factor mediated signaling*. Bioinformatics, 2005. **21**(7): p. 1194-1202.
274. Morris, M.D., *Factorial sampling plans for preliminary computational experiments*. Technometrics, 1991. **33**(2): p. 161-174.
275. Saltelli, A., et al., *Variance based sensitivity analysis of model output. Design and estimator for the total sensitivity index*. Computer Physics Communications, 2010. **181**(2): p. 259-270.
276. Wu, H., et al., *Parameter identifiability and estimation of HIV/AIDS dynamic models*. Bulletin of mathematical biology, 2008. **70**(3): p. 785-799.
277. Swinnen, I., et al., *Predictive modelling of the microbial lag phase: a review*. Int J Food Microbiol, 2004. **94**(2): p. 137-159.
278. Lin, H., et al., *Determination of the maximum specific uptake capacities for glucose and oxygen in glucose-limited fed-batch cultivations of Escherichia coli*. Biotechnology and bioengineering, 2001. **73**(5): p. 347-357.
279. Ferenci, T., *Regulation by nutrient limitation*. Current opinion in microbiology, 1999. **2**(2): p. 208-213.

280. Bylund, F., et al., *Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation*. *Bioprocess Engineering*, 1998. **18**(3): p. 171-180.
281. Lindstrom, K., *Rhizobium galegae, a new species of legume root nodule bacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1989. **39**(3): p. 365-367.
282. Digat, B., *Les bactéries stimulatrices de la croissance des plantes: le cas des Pseudomonas*. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, 1994. **80**(2): p. 113-122.
283. Esashi, Y., *Ethylene and seed germination*, in *The plant hormone ethylene*. 2017, CRC press. p. 133-157.
284. Wang, F.Q., et al., *Mesorhizobium albiziae sp. nov., a novel bacterium that nodulates Albizia kalkora in a subtropical region of China*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2007. **57**(6): p. 1192-1199.
285. Whitelaw, M.A., *Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi*, in *Advances in Agronomy*. 1999, Elsevier. p. 99-151.
286. Khan, M.R. and S.M. Khan, *Effects of root-dip treatment with certain phosphate solubilizing microorganisms on the fusarial wilt of tomato*. *Bioresource technology*, 2002. **85**(2): p. 213-215.
287. Briat, J.-F. and G. Vert, *Acquisition et gestion du fer par les plantes*. *Cahiers agricultures*, 2004. **13**(2): p. 183-201 (1).
288. Osorio Vega, N.W., *A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake*. *Revista Facultad Nacional de Agronomia, Medellin*, 2007. **60**(1): p. 3621-3643.
289. Oliver, S.G., *From genomes to systems: the path with yeast*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2006. **361**(1467): p. 477-482.
290. Mete, M., et al. *A structural approach for finding functional modules from large biological networks*. in *Bmc Bioinformatics*. 2008. BioMed Central.
291. Scott, E.M., et al., *A mathematical model for dispersal of bacterial inoculants colonizing the wheat rhizosphere*. *Soil Biology and Biochemistry*, 1995. **27**(10): p. 1307-1318.
292. Ljung, L. and T. Chen. *Convexity issues in system identification*. in *Control and Automation (ICCA), 2013 10th IEEE International Conference on*. 2013. IEEE.
293. Zi, Z. and E. Klipp, *Constraint-based modeling and kinetic analysis of the Smad dependent TGF- $\beta$  signaling pathway*. *PloS one*, 2007. **2**(9): p. e936.

294. Pereira, A. and R. Broed, *Methods for uncertainty and sensitivity analysis: review and recommendations for implementation in ecologo*. 2006.
295. Suslow, T. and M. Schroth, *Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth*. *Phytopathology*, 1982. **72**(1): p. 111-115.
296. Sung, K., et al., *A simple approach to modeling microbial biomass in the rhizosphere*. *Ecol Modell*, 2006. **190**(3): p. 277-286.
297. Eberl, H.J. and S. Collinson, *A modeling and simulation study of siderophore mediated antagonism in dual-species biofilms*. *Theor Biol Med Model.* , 2009. **6**(1): p. 30.
298. King, J.V., J.J. Campbell, and B.A. Eagles, *The mineral requirements for fluorescin production*. *Can J. Res B*, 1948. **26**(6): p. 514-519.
299. Dekkers, L.C., et al., *A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(12): p. 7051-7056.