amU
Aix Marseille Université

NNT : 2025AIXM0014

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 21 janvier 2025 par

Louis DELECOURT

Décryptage des interactions au sein d'un consortium bactérien :

Mécanismes moléculaires mis en jeu au sein du consortium *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough et *Clostridium acetobutylicum*.

Discipline
Biologie santé

Spécialité
Microbiologie

École doctorale

ED 62 – Sciences de la vie et de la Santé

Laboratoire/Partenaires de recherche
Laboratoire Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP)
Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (LISM)

Composition du jury

Jean-Marc BERJEAUD Pr, Université de Poitiers	Rapporteur
Tristan ROSSIGNOL DR, INRAE, Laboratoire MICALIS	Rapporteur
Maëlle MOLMERET Pr, Université de Toulon	Présidente
François TALFOURNIER Pr, Université de Lorraine	Examinateur
Marie-Thérèse GIUDICI-ORTICONI DR, CNRS-Marseille	Directrice de thèse
Christophe BORDI Pr, CNRS-Marseille	Co-directeur de thèse
Magali ROGER CRCN, CNRS-Marseille	Membre invitée

Bioénergétique et Ingénierie des Protéines

LISM Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires

A*Midex Initiative d'excellence Aix-Marseille

Affidavit

Je soussigné, DELECOURT Louis, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Marie-Thérèse GIUDICI-ORTICONI, Christophe BORDI, et Magali ROGER, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 08/11/2024



Productions scientifiques

Article publié :

- Combining metabolic flux analysis with proteomics to shed light on the metabolic flexibility: the case of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Frontiers in Microbiology). DOI : 10.3389/fmicb.2024.1336360

Actes de publication :

- Unraveling the molecular basis of metabolic interactions in synthetic consortia dedicated to bio-H2 production. (Biochimica et Biophysica Acta (BBA), first author). DOI : 10.1016/j.bbabio.2022.148825
- Deciphering nutrient cross-feeding interaction network in an artificial bacterial consortium (Biochimica et Biophysica Acta (BBA)). DOI : 10.1016/j.bbabio.2022.148824

Articles soumis :

- From syntrophy to protection, how microbial interactions control the metabolism community (International Society for Microbial Ecology (ISME Journal), Collaboration).
- Absolute bacterial quantification in mixed populations by Crystal PCR (first author)

Communications orales :

- Congrès 2023 Association Francophone d'Ecologie Microbienne (18 - 20 octobre 2023) Université de Toulon
- Visite Insolite du CNRS (10 octobre 2023) CNRS Marseille

Communication par affiche :

- Congrès European Bioenergetics Conference 2022 (22 - 25 aout 2022) Aix en Provence, Aix-Marseille University
- Congrès Junior Scientists Microbiology Meeting of Marseille (23-24 mai 2024)

Résumé

Les microorganismes vivent dans des communautés complexes, perçoivent leur environnement et y répondent en échangent des signaux et des ressources. Cette complexité et interconnexion confèrent à l'ensemble de nouvelles fonctions et des performances accrues non prévisibles par la simple analyse des génomes des espèces présentes. Les consortia synthétiques, inspirés des écosystèmes naturels, offrent un modèle précieux pour explorer, décrypter et contrôler en vue d'applications potentielles les interactions inter-espèce en conditions simplifiées. Ce travail se concentre sur un consortium modèle associant *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*Nv*H) et *Clostridium acetobutylicum*. Au sein de ce système, en condition de stress nutritionnel des interactions métaboliques et physiques se mettent en place conduisant à une production de bio-hydrogène plus importante. Si la nécessaire présence de molécules de quorum-sensing de type AI-2 a été démontrée dans la mise en place des interactions, l'objectif de la thèse a été de décrypter les bases moléculaires de cette interaction. Une approche *in silico* a été définie et mise en place afin d'identifier les acteurs des acteurs potentiels du QS AI-2 chez *C. acetobutylicum* et *Nv*H. Les résultats ont permis de proposer des voies de QS de type Lsr non canonique et jusqu'alors non caractérisées chez ces bactéries. Des approches *in vitro* ont elles démontré la fonction des protéines LsrK-like et LsrR-like chez *Nv*H et donc leur rôle dans la signalisation de type AI-2. Ainsi LsrK-like est une kinase présentant la double fonction de phosphoryler l'AI-2 et le glycérol et LsrR-like, un régulateur se fixant sur l'ADN et répondant au signal de l'AI-2 phosphorylé. Par la suite, *via* des approches de transcriptomique les gènes de *Nv*H régulés par AI-2 ont été identifiés. Ainsi, en culture pure, nous avons mis en évidence des systèmes de réponse au signal AI-2 chez *Nv*H tel qu'un transporteur pouvant être impliqué dans l'import d'AI-2 ou encore la voie de synthèse de la thiamine. En parallèle, une analyse méta-transcriptomique a permis d'étudier les gènes régulés au sein du consortium pointant des voies métaboliques significativement impactées par l'interaction entre les deux bactéries. Ainsi les résultats pointent des modifications dans les voies de production de certains amino-acides ou encore dans d'autres voies de quorum sensing chez *C. acetobutylicum*. Ces travaux ont nécessité la mise au point d'une nouvelle méthode de quantification absolue par digital droplet PCR pour évaluer le ratio cellulaire au sein d'un consortium synthétique. Ces travaux soulignent l'importance des systèmes de communication intra- et interspécifiques dans la régulation des interactions au sein du consortium, et ouvrent des pistes pour de futures études sur le contrôle des systèmes microbiens.

Mots clés : Consortium, Interactions métaboliques, Quorum sensing, Transcriptome, Biohydrogène

Abstract

Microorganisms live in complex communities, perceiving and responding to their environment by exchanging signals and resources. This complexity and interconnectedness endow the whole community with new functions and enhanced performance that cannot be predicted by simply analyzing the genomes of the individual species present. Synthetic consortia, inspired by natural ecosystems, offer a valuable model to explore, decipher, and potentially control inter-species interactions in simplified conditions for various applications. This work focuses on a model consortium combining *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*Nv*H) and *Clostridium acetobutylicum*. Within this system, under nutritional stress, metabolic and physical interactions are established, leading to increased biohydrogen production. While the essential role of quorum-sensing molecules, specifically AI-2, has been demonstrated in facilitating these interactions, the thesis aims to unravel the molecular basis of this interaction.

An *in silico* approach was developed and implemented to identify potential QS AI-2 actors in *C. acetobutylicum* and *Nv*H. The results suggest the presence of previously uncharacterized, non-canonical Lsr-type QS pathways in these bacteria. *In vitro* approaches confirmed the function of LsrK-like and LsrR-like proteins in *Nv*H and their role in AI-2-type signalling. Specifically, LsrK-like is a kinase with the dual function of phosphorylating both AI-2 and glycerol, while LsrR-like is a DNA-binding regulator that responds to phosphorylated AI-2. Subsequently, transcriptomic approaches allowed for the identification of *Nv*H genes regulated by AI-2. In pure culture, we identified AI-2-responsive systems in *Nv*H, such as a transporter potentially involved in AI-2 import and the thiamine synthesis pathway. Additionally, a meta-transcriptomic analysis was conducted to study genes regulated within the consortium, highlighting metabolic pathways significantly impacted by the interaction between the two bacteria. The results indicate alterations in pathways for the production of certain amino acids and other quorum sensing pathways in *C. acetobutylicum*. This research required the development of a new absolute quantification method using digital droplet PCR to assess the cellular ratio within a synthetic consortium. These findings underscore the importance of intra- and interspecific communication systems in regulating interactions within the consortium and open avenues for future studies on microbial system control.

Keywords: Consortium, metabolic interactions, quorum sensing, transcriptome, biohydrogen

Remerciements :

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury, Jean-Marc BERJEAUD, Tristan ROSSIGNOL, Maëlle MOLMERET et François TALFOURNIER pour avoir accepté d'évaluer l'aboutissement de mon travail de thèse.

Je remercie l'Institut Microbiologie, Bioénergies et Biotechnologie – IM2B, pour m'avoir accordé une bourse qui m'a permis de réaliser cette thèse.

Je tiens à remercier mes encadrants de thèse, Marie-Thérèse GIUDICI-ORTICONI, Christophe BORDI, et Magali ROGER qui m'ont permis de grandement m'améliorer professionnellement mais aussi personnellement. La personnalité propre à chacun d'entre vous a été une réelle force pour la réalisation de cette thèse et je pense sincèrement que je n'aurais pas pu avoir d'encadrement me correspondant plus que cette combinaison de compétences mais aussi de personnalités et c'est avec grand plaisir qu'à l'encontre de mes habitudes je ne rajouterai pas de "mais" à cette phrase !

Je tiens également à remercier les membres de mon équipe du BIP ainsi que du LISM. Il est difficile de vous remercier pour une raison particulière tant l'aide de chacun a été présente sur de nombreux aspects tant professionnels que sur la bonne ambiance au sein des équipes. Un grand merci donc à Pascale INFOSSI, Marianne GUIRAL, Cécile JOURLIN-CASTELLI, Chantal IOBBI-NIVOL (grand grand merci pour la correction du manuscrit, conseils, et discussions au cours de cette rédaction), Sandra ANGELINI, Michel FONS, Olivier GENEST, Marianne ILBERT, Sébastien DEMENTIN, Amine ALI-CHAOUCHE, Corinne KREUZER, Moly BA, Marie CORTEGGIANI, Martin DURRMEYER (force à toi pour la suite le MARSEILLAIS), Lucas DUPUIS, Alison FRATACCI, Ludovic DUBARD, Amélie VIGNERON-BOUQUET et Mila RESET.

Bien sûr, cette thèse est aussi le reflet des membres scientifiques de l'IMM mais aussi des services techniques et de direction avec qui j'ai pu partager ces trois années de thèse et que je tiens à remercier pour les échanges que j'ai pu avoir avec eux dans cette atmosphère de convivialité quotidienne. Ces discussions m'ont permis d'apprendre mais aussi de développer mes idées pour la réalisation de mes expériences et de mon projet professionnel.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi individuel, Alain DOLLA, Nicolas VITA, Killian ZUCHAN et Nil GAUDU pour leurs nombreux conseils et chaleureux encouragements.

Je tiens à remercier les nombreux étudiants avec qui j'ai pu échanger, notamment les membres du comité du JSM3 dans lequel j'ai eu l'opportunité d'être pendant trois ans.

Je tiens à remercier Nicolas TERRAPON et Denis PUTHIER pour leurs nombreux conseils et échanges au cours des enseignements.

Je tiens à remercier Yann DENIS et Lionel BERTAUX pour les nombreuses discussions et conseils que vous avez pu me donner à la plateforme transcriptomique de l'IMM.

Je tiens également à remercier plus particulièrement la team insolite Amélie, Marie et Ludovic pour nos nombreux moments d'échanges que ce soit Amélie partant dans de grands discours, Ludo écoutant que d'une oreille et Marie qui s'endort, ou autour d'une belotte dont Marie ne s'est toujours pas remise (team Ludo/Louis toujours invaincue à ce jour). Ces moments resteront pour moi de très bons souvenirs !

Je tiens à remercier ma famille, ma belle-famille (dont Mr Pwet) et mes proches (Rose, Louis, Momo, Aurel, Ben, JL) qui m'ont soutenu dans mes décisions et m'ont permis d'être qui je suis aujourd'hui.

Pour finir, je tiens tout particulièrement à remercier celle avec qui je partage mes joies et mes tristesses, ma fiancée Emmeline PAOLI, qui partage mon quotidien avec mes réussites mais aussi beaucoup d'échecs, mais qui m'a toujours soutenu et encouragé quelle que soit la situation. Si j'ai pu avancer aussi sereinement, c'est grâce à ta présence, merci !

Sommaire :

Introduction générale 1

I. Ecosystèmes et interactions écologiques 2

1. Diversité du vivant 3

2. Construction de consortia microbiens synthétiques 9

3. Défis et complexité des interactions dans les consortia microbiens synthétiques 13

II. Quorum Sensing – Un mécanisme de communication inter cellulaire 16

1. Introduction au quorum sensing 17

2. Découverte du quorum sensing 17

3. Quorum sensing : Mécanisme de communication intra-espèces 19

A. Diversité des molécules de quorum sensing 19

B. Mécanismes de perception des MQS 20

C. Le quorum sensing chez les bactéries à Gram positif 22

a. Le système Agr (Accessory Gene Regulator) de *Staphylococcus aureus* 22

b. Le système Com et Rap-Phr de l'organisme *Bacillus subtilis* 24

D. Le quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif 25

a. Système AHL de *A. fischeri* 26

b. Système CAI-1 de *Vibrio cholerae* 27

c. Le système Las, Rhl et Pqs de *Pseudomonas aeruginosa* 28

4. Mécanisme de communication inter-espèces 30

A. Mécanisme de production de l'AI-2 31

B. Mécanisme de perception de l'AI-2 32

a. Perception de l'AI-2 par le système Lux 33

b. Perception de l'AI-2 par le système Lsr 34

C. Autres molécules du QS inter-espèces 34

5. Quorum sensing : Mécanismes et systèmes non-conventionnels 35

6. Mécanismes anti-QS : Quorum sensing inhibiteurs et quorum quencher 38

A. Inhibition de la synthèse des MQS 40

B. Inhibition de la réponse au MQS 41

7. Conclusion et évolution du concept de quorum sensing 45

III. Modèle d'étude 48

1. Clostridium acetobutylicum ATCC 824 49

A. Historique 49

B. Métabolisme du carbone chez *Clostridium acetobutylicum* 49

C. Cycle de vie de C. acetobutylicum 51

D. Mécanismes de communication chez *Clostridium acetobutylicum* 53

2. Nitratidesulfovibrio vulgaris Hildenborough 55
A. Historique 55
B. Enjeux économiques de l'étude de *Nv*H 56
C. Métabolisme énergétique des bactéries sulfato réductrices, l'exemple *Nv*H 57
D. Quorum sensing de *Nv*H 61
3. Etude du consortium microbien synthétique modèle *Clostridium acetobutylicum* et *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough 62
IV. Objectifs de l'étude 66
Matériels et méthodes 69
I. Microbiologie 70
1. Les souches bactériennes utilisées 71
2. Milieux de culture utilisés 71
A. Milieu de culture utilisé pour *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough 71
a. Solution d'oligoéléments Starkey (STE) 71
b. Milieux de conservation de *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough 71
B. Milieu de culture utilisé pour *Clostridium acetobutylicum* 72
C. Milieu de culture utilisé pour le consortium *Clostridium acetobutylicum* et *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough 72
D. Milieu de culture utilisé pour *Escherichia coli* 72
E. Milieu de culture pour *Vibrio harveyi* BB170 72
3. Croissance des souches bactériennes 72
A. Préparation de l'inoculum des bactéries anaérobies 73
B. Préparation de *E. coli* 73
C. Préparation de *V. harveyi* BB170 73
D. Inoculation du consortium 73
II. Méthodes de biologie moléculaire 74
1. Extraction d'ADN plasmidique 75
2. Extraction d'ADN génomique 75
3. Préparation et extraction des ARN totaux 75
A. Préparation des échantillons *Nv*H et *C. acetobutylicum* en culture pure et consortium 75
B. Préparation des échantillons *Nv*H en présence et en absence d'AI-2 76
C. Extraction et purification des ARN totaux 76
4. Réaction de polymérase en chaîne (PCR) 76
5. Réaction de polymérase en chaîne quantitative (qPCR) 77
6. Réaction de polymérase en chaîne Digitale en gouttelettes (ddPCR) 78
7. Rétrotranscription des ARN 78

8. Conception et listes des amorces 79
9. Quantification et contrôle de la qualité des acides nucléiques 80
10. Clonage des gènes *DVU_3131* et *DVU_3134* 80
A. Amplification des gènes pour clonage 80
B. Digestion par les enzymes de restriction et ligation 80
C. Préparation des cellules compétentes 81
D. Transformation des cellules compétentes 82
III. Méthodes de biochimie 83
1. Techniques de chromatographie pour l'analyse des métabolites 84
2. Test de bioluminescence 84
3. Méthodes de production et de purification de protéine 85
A. Production des protéines LsrK-like et LsrR-like 85
B. Dosage protéique 85
C. Purification protéique par chromatographie d'affinité nickel 85
D. Renaturation de la protéine LsrR-like 86
E. Analyse des protéines par électrophorèse 86
F. Analyse protéomique 87
G. Analyse par dichroïsme circulaire 87
H. Gel retard 88
I. Test d'activité kinase 88
IV. Outils bio-informatiques 90
1. Transcriptomique 91
2. Recherche par homologie de séquence des acteurs du QS chez *Nv*H et *C. acetobutylicum* à partir de la base de données KEGG 91
3. Prédiction et alignement des structures protéiques 92
Résultats 93
I. Détermination du mécanisme moléculaire de communication au sein du consortium *C. acetobutylicum* et *Nv*H 94
1. Identification des acteurs de quorum sensing chez *C. acetobutylicum* et *Nv*H 95
A. Recherche des acteurs potentiels du QS de type AI-2 par une approche *in silico* 95
B. Organisation génétique des gènes potentiellement impliqués dans le QS 98
2. Etude des protéines du système de régulation Lsr chez *Nv*H par une approche *in vitro* 101
A. Production et purification des protéines chez l'hôte hétérologue *E. coli* 101
a. Purification de LsrR-like 102
b. Production et purification de LsrK-like 106
B. Test de fonctionnalité des protéines LsrR et LsrK-like 107

a. Activité kinase de la protéine LsrK-like de *Nv*H 107
b. Etude fonctionnelle du régulateur transcriptionnel de la protéine LsrR-like de *Nv*H 114
c. Identification de la réponse génétique de *Nv*H au signal AI-2 116
d. Régulation des unités transcriptomiques régulées en présence d'AI-2 par le régulateur LsrR 123
3. Conclusion 124
II. Développement et application de la Digital Droplet PCR pour la quantification absolue des cellules dans le consortium synthétique *C. acetobutylicum* et *Nv*H 128
1. Introduction 129
2. Stratégie de conception et de vérification des amorces pour quantification par ddPCR 130
3. Test de sélectivité des amorces 132
A. Validation par PCR conventionnelle 132
B. Validation par qPCR 133
C. Validation par ddPCR 134
D. Validation de la fragmentation de l'ADN 136
4. Limite de détection par ddPCR en présence ou en absence du partenaire bactérien 140
5. Détermination du nombre de copies de génome en condition de consortium contrôlé 142
A. Quantification par ddPCR d'un consortium contrôlé *C. acetobutylicum* 0,1:*Nv*H 0,1 142
B. Détermination du seuil de détection par ddPCR de *Nv*H dans un consortium contrôlé 144
6. Détermination du ratio bactérien au sein d'un consortium synthétique 146
7. Test sur cellules entières 147
8. Conclusion 149
III. Analyses transcriptomiques par RNA-seq du consortium bactérien *C. acetobutylicum* et *Nv*H en vue d'étudier l'impact des interactions inter-espèces sur la physiologie des bactéries 151
1. Standardisation des conditions de croissance en vue d'une étude métatranscriptomique ... 152
A. Impact du choix des inocula 153
B. Test de restauration du profil de type synergie à partir d'inocula issus de la phase exponentielle 156
2. Analyse transcriptomique du consortium bactérien par séquençage nouvelle génération (NGS) 159
A. Analyse différentielle de l'expression des gènes de *Nv*H 161
B. Analyse différentielle de l'expression des gènes de *C. acetobutylicum* 167
3. Conclusion 171
Discussion générale et perspectives 174
Références bibliographiques 183
Annexes 197

Liste des abréviations :

°C : degré Celsius

AB : “Autoinducer Bioassay”

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique

ADP : Adénosine diphosphate

ARN : Acide ribonucléique

ATP : adénosine-5-triphosphate

AI : Autoinducteur

AI-2 : Autoinducteur type 2

AI-2-P : Autoinducteur type 2 phosphorylé

AIP : Autoinducteur peptide

AHL : Acyl homoserine lactones

BCA : Acide bicinchonique

BET : Bromure d’Ethidium

BLAST : “Basis Local Alignment Search Tool”

BME : β-mercaptoéthanol

BSA : Albumine Sérum Bovin

CoA : coenzyme A

COG : “Clusters of Orthologous Genes”

ddPCR : Digital Droplet Polymerase Chain Reaction

dNTP : désoxyribonucléotides 5’-triphosphate

DO : Densité optique

DPD : 4,5-dihydroxy 2,3-pentanedione

EDTA : “Ethylene Diamine Tetraacetique Acid”

EMSA : “Electrophoretic Mobility Shift Assay”

Gly-P : glycérol-3-phosphate

HEPES : Acide N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-(2-éthanesulfonique)

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

Kb : Kilobases

kDa : kiloDaltons

KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LB : Luria-Bertani

mA : milliampère

MQS : Molécule de Quorum Sensing

MT : Marqueur de taille

NAD+ : nicotinamide adénine dinucléotide oxydé

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NGS : séquençage nouvelle génération

PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

pb : Paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFAM : Protein Families Database

pH : Potentiel Hydrogène

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

QQ : Quorum Quencher

QS : Quorum Sensing

QSI : Quorum Sensing Inhibiteur

RLU : Unités Relatives de Lumière

RMSD : Root Mean Square Deviation

RPM : Rotation par minute

RSG : RedoxSensor Green

SAM : S-adénosyl méthionine

SAH : S-adenosyl-homocysteine

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SKY : Starkey medium

SLY : Milieu du consortium

SRM : Microorganisme Réducteur du Sulfate

SRB : Bactérie Réductrice du Sulfate

STE : Starkey Trace Element

TAE : Tris, Acetate, EDTA

TRIS : Tris[hydroxylméthyl]amino-méthane

UV : ultraviolets

v/v : volume / volume

w/v : weight / volume

Introduction générale

I. Ecosystèmes et interactions écologiques

1. Diversité du vivant

L'étude du vivant et de sa diversité nécessite la caractérisation des différentes espèces présentes à un endroit et à un moment donné, autrement dit, de définir les propriétés de l'écosystème. Un écosystème est la résultante de deux composantes : la biocénose et le biotope. Le terme biocénose a été introduit par le biologiste Karl August Möbius en 1877 et provient du grec ancien "bios" (vie) et "koinos" (commun). Il est utilisé pour décrire une communauté d'organismes vivants. Peu après, le terme biotope a été introduit par le zoologiste allemand Friedrich Dahl en 1908. Ce terme trouve son origine dans les mots du grec ancien "bios" (vie) et "topos" (lieu), signifiant littéralement "lieu de vie". Il regroupe ainsi l'ensemble des conditions environnementales abiotiques (non-vivantes) auxquelles sont soumises les espèces présentes. Il prend en compte de nombreux facteurs physico-chimiques tels que le pH, la pression, la composition du sol, de l'air et de l'eau, l'exposition au soleil ou encore la température. La biocénose et le biotope réunis peuvent alors être définis selon des paramètres spatiaux-temporels, décrivant ainsi un écosystème spécifique. Les êtres vivants composant la biocénose sont en relation étroite avec le biotope, et en conséquence, également avec les autres organismes vivants qui impactent ce biotope. Par exemple, les vers de terre qui impactent les propriétés du sol (décomposition de la litière et la filtration de l'eau), permettent la formation d'habitats pour d'autres organismes (Medina-Sauza *et al.*, 2019).

Les interactions au sein du vivant, notamment les bactéries, sur lesquelles mon projet de thèse s'est concentré, ainsi que les eucaryotes, archées et virus permettent la formation d'un réseau dynamique reliant le biotope et la biocénose.

Les microorganismes ont été décrits pour la première fois par Antoni van Leeuwenhoek en 1674, nommés alors "animalcules" puis renommés en 1860 "microorganismes" par le biologiste français Louis Pasteur. Ubiquitaires et généralement unicellulaires, les microorganismes, qui ne peuvent pas être vus à l'œil nu, incluent une grande diversité de formes de vie telles que les bactéries, les archées, les champignons microscopiques (comme les levures et les moisissures), les protozoaires, ainsi que certaines algues (Gest, 2004). Longtemps associés à la terminologie médicale, les microorganismes sont en fait essentiels au fonctionnement des écosystèmes et plus largement aux grands cycles géochimiques. Jouant des rôles variés et interconnectés, ils assurent la survie et le développement de la plupart des formes de vie sur Terre. En santé humaine, la vision du rôle et de l'impact des microorganismes a été renouvelée avec la découverte du microbiote et de son impact positif sur le développement et le maintien en bonne santé (Hu *et al.*, 2022).

Afin d'étudier cette association de microorganismes (également appelés consortia microbiens) qui coexistent et interagissent dans un même environnement, deux stratégies convergentes d'écologie microbienne ont été développées au fil du temps. En effet, si l'étude de cette diversité microbienne et la description de sa composition ont longtemps été l'apanage de l'écologie, depuis une dizaine d'années, les approches plus moléculaires issues des recherches visant à comprendre le comportement microbien en culture pure ont conduit à l'émergence d'un nouveau champ au sein de l'écologie microbienne.

Une population microbienne n'est pas la simple somme de plusieurs entités, de ce fait son fonctionnement ne peut être expliqué par la somme des capacités individuelles. Pour être analysées, des approches dites "Top-down" ou des approches dites "Bottom-up" (figure 1) ont été développées.

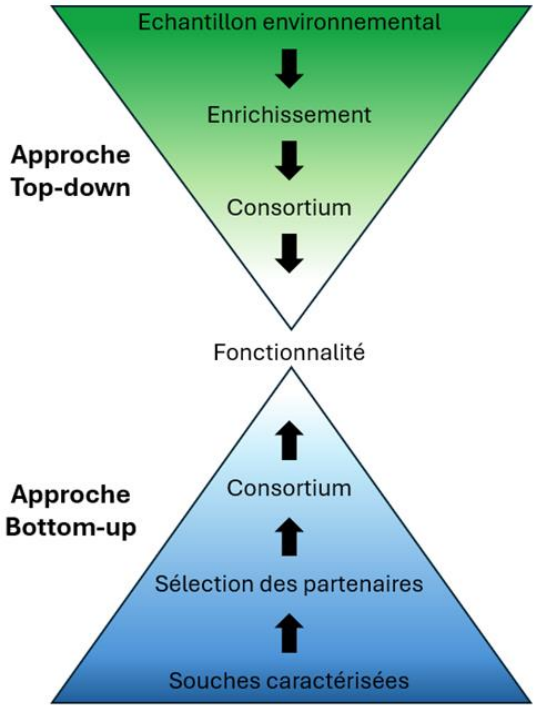


Figure 1 : Représentation simplifiée des stratégies d'études de la diversité microbienne. Les approches "Top-down" et "Bottom-up" pour la conception d'un consortium synthétique sont représentées en vert et bleu, respectivement. Figure adaptée de (Chakankar and Hong, 2022).

L'approche de type "Top-down" se concentre sur l'étude, la simplification et la manipulation de la diversité des communautés microbiennes naturelles et de leur évolution au cours du temps. Grâce à cette approche, de nombreux écosystèmes ont pu être étudiés et mieux caractérisés. Par exemple, dans le cas de l'étude d'échantillons environnementaux, Ping-Fu Hou *et al*. ont pu, en 2018, montrer l'impact de différents traitements sur la diversité des

microorganismes dans des cultures de riz et de maïs par analyse métagénomique (Hou *et al.*, 2018). Cette étude a mis en avant l'intérêt des rotations rizière-terres arables comme alternative pour maintenir une grande diversité écologique sans l'utilisation d'engrais. Bien que cette étude n'ait pas abouti à la mise en place d'un bioprocédé, l'étude d'échantillons environnementaux ouvre la voie au développement de modèle d'étude simplifié permettant l'approfondissement de notre compréhension pour une potentielle utilisation dans l'agriculture.

Un autre exemple d'étude d'échantillons environnementaux qui a émergé avec les approches métagénomiques est l'analyse globale des eaux usées comme méthode de surveillance du développement potentiel d'agents pathogènes. Les travaux de Rene S. Hendriksen *et al*. de 2019, réalisés au Kenya sur différents points d'eau, démontrent le potentiel de cette méthode (Hendriksen *et al.*, 2019). Ces analyses pourraient, si elles sont développées, permettre la mise en place de systèmes préventifs pour la population en cas de présence de pathogènes dans les eaux usées au Kenya tel que mis en place en France pour les contrôles des piscines public, bord de mer, ou plus récemment des eaux usées pour la détection du SARS-CoV 2. Une meilleure analyse des cooccurrences de différentes espèces ou organismes dans le même écosystème permet de générer des consortia modèles pour l'étude de leur fonctionnalité (Li *et al.*, 2023). Pour finir avec l'étude des échantillons environnementaux, on peut également citer la collecte globale d'échantillons organisée par la Fondation Tara Océan. Celle-ci permet l'accumulation de nombreuses données offrant la possibilité d'identifier la diversité écologique de nombreux écosystèmes à travers le monde, ainsi que la mise en relation des microorganismes retrouvés dans un même écosystème (Gregory *et al.*, 2019; Chaffron *et al.*, 2021).

L'analyse de la diversité, comme présenté précédemment, peut être couplée à une étape d'enrichissement afin d'isoler une sous-population appelée alors consortium naturel. L'objectif est de générer un modèle d'étude ayant une fonctionnalité spécifique recherchée tout en simplifiant le système biologique. Pour cela, un enrichissement par dilution critique peut être employé afin d'isoler physiquement les organismes présents. De plus, une contrainte abiotique peut être ajoutée pour réduire la diversité, par exemple *via* des méthodes de sélectivité (telles qu'une source de carbone restrictive, une température basse ou élevée, ou encore l'utilisation d'antibiotiques). Par exemple, les travaux de Dingrong Kang *et al*. (2020) ont, à partir d'échantillons de sol, généré des consortia naturels par dilution, puis les ont sélectionnés en fonction de leur capacité à dégrader des matériaux kératiniques. Comme discuté dans l'article, cette approche présente néanmoins certaines limitations à prendre en considération, telles que :

- Le risque de la perte des propriétés d'intérêt,
- L'induction d'un effet négatif après l'enrichissement de certaines espèces,
- La présence d'organismes dits "tricheurs" (organismes profitant d'un écosystème mis en place en utilisant les ressources ou produits communautaires sans participer à leur production) dont la présence n'est pas nécessaire pour la propriété d'intérêt souhaitée,
- Les risques en termes de sécurité avec la présence potentielle de pathogènes connus ou inconnus.

À cela, il peut être ajouté le risque de la perte de la stabilité de la communauté, ce qui soulève également la question du rôle écologique des organismes opportunistes dits "tricheurs" dans le maintien de la diversité. De plus, la simplification d'un système biologique peut entrainer la rupture des interactions écologiques parfois nécessaires à la fonctionnalité recherchée. Malgré cela, de nombreux travaux ont démontré le fort potentiel de cette approche, tant pour la caractérisation fine des écosystèmes que pour l'application des processus naturels dans des bioprocédés technologiques (Grimalt-Alemany *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2020).

Des enrichissements sans dilutions sont également utilisés pour la réalisation de consortia naturels. Cette méthode se base généralement sur la fonctionnalité recherchée comme critère de sélection. Un exemple récent est l'étude de Zhuo-Ning Xian *et al*. (2023). Les auteurs ont réalisé un enrichissement d'échantillons environnementaux provenant de l'océan ainsi que de l'intestin des larves de *Tenebrio molitor*. Pour cela, les échantillons environnementaux ont été cultivés pendant 30 jours avec pour seule source de carbone du polypropylène sans additif. Cette méthode permet de sélectionner les espèces capables de croître dans des conditions spécifiques tout en conservant la fonctionnalité du consortium naturel désirée, ici, la dégradation du plastique (Xian *et al.*, 2023).

D'autres méthodes suivant l'approche "Top-down" permettent également d'investiguer le rôle écologique d'une communauté. C'est par exemple le cas des travaux réalisés par Sarah Huet *et al*. en 2023, où une communauté microbienne du sol a été analysée puis déplétée de certains taxons afin de mieux comprendre leurs rôles au sein du consortium. Cependant, cette approche présente certaines limitations, notamment la difficulté de cibler précisément les interactions complexes et les effets en cascade qui peuvent survenir lorsque des taxons spécifiques sont supprimés. De plus, la déplétion de certains membres de la communauté peut altérer les conditions environnementales locales, modifiant ainsi les interactions entre les autres micro-organismes et rendant plus difficile l'interprétation des résultats obtenus. Néanmoins, cette méthode reste une stratégie permettant d'explorer les fonctions spécifiques et les rôles écologiques des micro-organismes dans des consortia naturels (Huet *et al.*, 2023). L'utilisation

d'échantillon naturel présente l'avantage de s'affranchir de la problématique liée à l'étude de la diversité des espèces encore non cultivables seules. Cependant, même si un point de vue global de la diversité spatio-temporelle écologique d'un écosystème peut être apporté, l'analyse des mécanismes communautaires sous-jacents reste encore limitée par la présence de nombreux facteurs.

À travers ces quelques exemples, l'approche "Top-down" démontre le potentiel lié à l'étude de la diversité des échantillons environnementaux et à leur simplification par enrichissement pour l'analyse des phénotypes observables au sein des communautés bactériennes naturelles. De plus, bien que l'étude de la diversité des échantillons environnementaux ait longtemps consisté à dresser un état des lieux des espèces présentes et à examiner l'impact des variations environnementales sur le comportement global de la communauté ou d'une sous-population, la mise en place d'approches globales, telles que la métagénomique a permis d'éclairer le fonctionnement de ces écosystèmes, notamment à travers la reconstitution des voies métaboliques potentiellement présentes à partir des génomes (Jiménez-Volkerink *et al.*, 2024). Du côté du développement biotechnologique, l'approche "Top-down" a aussi été largement utilisée. Basée sur un principe de simplification du système, c'est à dire sélectionner spécifiquement les espèces capables de réaliser la fonction souhaitée, elle a permis la mise au point de consortia ciblés comme dans les exemples cités précédemment. Toutefois, l'optimisation de ces systèmes reste globalement empirique. Pour aller plus loin, il convient de se questionner sur les mécanismes moléculaires impliqués tels que ceux permettant l'interaction de chacune des espèces présentes mais aussi les processus métaboliques individuels impactés par la présence des autres espèces. Il est également clair que la seule révélation de la diversité microbienne, ne permet pas de décrire précisément les interactions et le rôle de chacune des espèces au sein de la communauté. Ainsi, pour comprendre les mécanismes sous-jacents à une fonction souhaitée, il est nécessaire de contrôler les variables en utilisant un modèle simplifié, tel qu'un consortium naturel et, si nécessaire et réalisable, d'isoler chaque espèce individuellement. Ce contrôle des variables permet une meilleure compréhension des interactions spécifiques et des effets de chaque composant sur la fonction étudiée.

En parallèle de l'approche "Top-down", l'approche "Bottom-up" vise elle à reconstituer, pas à pas, un système écologique en se basant sur les connaissances acquises par les approches microbiologiques traditionnelles en culture pure. La conception de cultures pluri-espèces non génétiquement modifiées pour la reconstitution, par exemple, d'un écosystème conduit alors à des "consortia synthétiques", tandis que les cultures pluri-espèces

génétiquement modifiées sont appelées “consortia artificiels” et ont, quant à elles, une visée plus industrielle (figure 2).

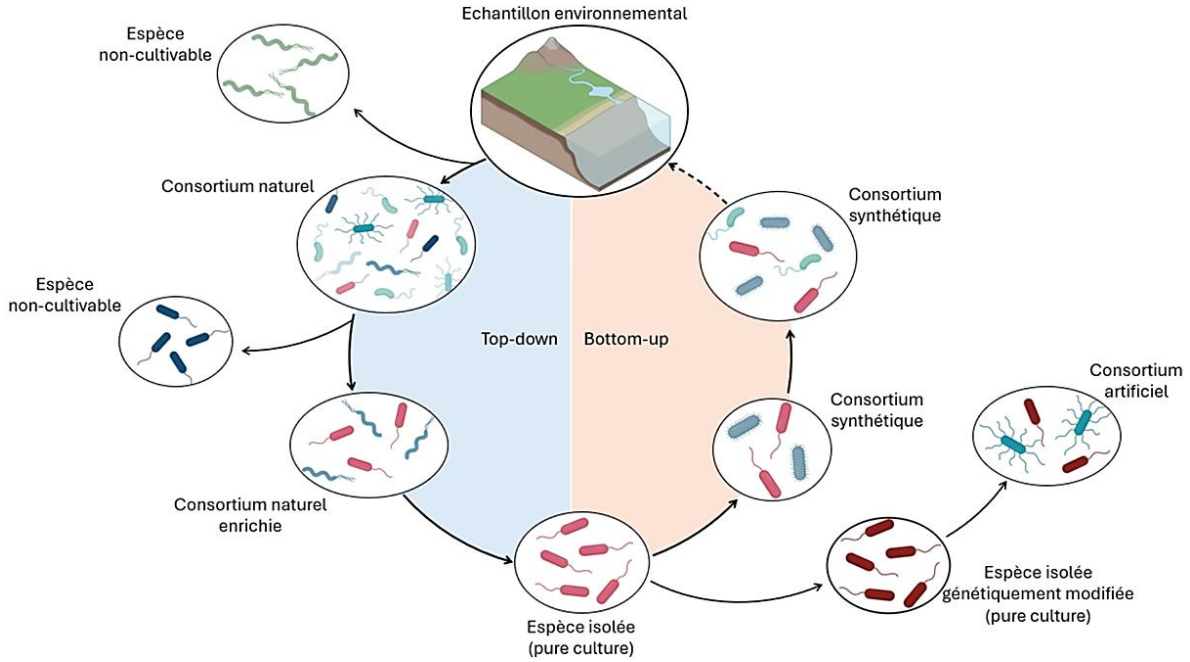


Figure 2 : Représentation de la conception des consortia naturels, synthétiques et artificiels.

L’approche “Bottom-up” a dans un premier temps été largement utilisée dans les processus biotechnologiques afin d’optimiser les processus de bio-production. Cette approche a conduit à associer différentes espèces n’ayant pas forcément de lien écologique entre elles, en général en s’appuyant sur le principe de cascade de transformation (figure 3).

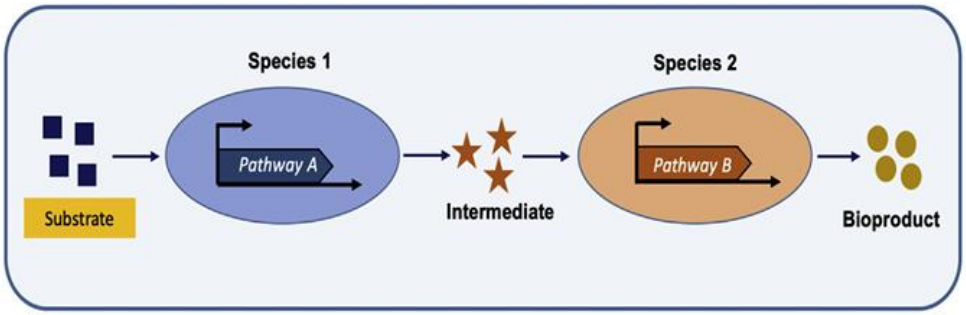


Figure 3 : Schéma illustrant le principe de cascade de transformation. Création d’un consortium synthétique basé sur les capacités métaboliques des espèces 1 et 2. L’espèce 1 prend en charge le substrat initial et le transforme en un produit intermédiaire. Ce produit intermédiaire est ensuite pris en charge par l’espèce 2, qui le convertit en produit final d’intérêt. Figure adaptée de (Jawed *et al.*, 2019).

Un exemple d'utilisation industriel est la réalisation de Whisky, faisant intervenir des bactéries lactiques permettant la transformation de la moût de céréales en sucre (saccharification) couplée aux propriétés fermentatives des levures transformant alors le sucre en alcool (Liu *et al.*, 2023). Le principe de fermentation, qui était encore peu compris lors de la découverte du Whisky, est un exemple des nombreux processus utilisant le couplage entre microorganismes pour la transformation de produit par l'Homme.

Cette stratégie permet également à travers l'étude de l'ensemble des composantes d'un écosystème de mieux comprendre ce dernier *via* le contrôle des paramètres physico-chimiques. Au fil des années, la microbiologie traditionnelle a permis d'isoler et de cultiver, en dehors de leur communauté, de nombreux organismes, et mettre ainsi en évidence le fonctionnement de la cellule à l'échelle moléculaire. Grace à ces études, les dogmes centraux ont alors été établis tels que le dogme du support de l'information génétique ADN-ARN-protéine par Francis Crick en 1957 (Cobb, 2017). Ces travaux ont souvent utilisé des microorganismes modèles comme *Escherichia coli* pour comprendre et décrypter les bases moléculaires du vivant ne reflétant cependant pas forcément les propriétés d'une communauté voire de toutes les bactéries.

Dans les communautés, les interactions écologiques entre les différents membres et les interactions de chaque composant avec leur environnement abiotique génèrent des caractéristiques collectives. Ces propriétés peuvent, par exemple, améliorer les performances globales de la communauté en matière de croissance, de persistance ou encore de résilience vis-à-vis de stress, dépassant ainsi les contributions individuelles de chaque membre (Oña *et al.*, 2021). Afin de décrypter à l'échelle moléculaire l'impact d'une espèce sur une autre (bénéfique, neutre ou néfaste), des systèmes comprenant plusieurs espèces dans des conditions contrôlées, appelés consortia synthétiques ont été développés. Le contrôle des conditions abiotiques de culture, telles que le substrat, le pH ou encore la température, permet de limiter les facteurs variables au cours de l'étude, contrairement aux études environnementales.

2. Construction de consortia microbiens synthétiques

À l'interface entre l'étude environnementale et l'étude indépendante de ses composantes biotique et abiotique, la conception de consortia synthétiques s'impose comme l'outil de choix pour comprendre les mécanismes impliqués dans la conservation de la diversité microbienne, sa dynamique et sa fonctionnalité au sein d'un écosystème donné.

La conception de consortia synthétiques peut alors être perçue comme la simplification d'un écosystème donné ("Top-down") ou comme la complexification d'un système mono-espèce ("Bottom-up"). La complexification d'un système mono-espèce vers un consortium

synthétique peut avoir pour objectif la caractérisation comportementale entre plusieurs espèces et/ou avoir une visée fonctionnelle avec un intérêt industriel potentiel. En fonction des objectifs de l'étude, la conception d'un consortium synthétique repose à la fois sur des approches rationnelles et empiriques. Cela inclut la prise en compte de facteurs écologiques, comme les niches écologiques des organismes ou leur réseau d'interactions, ainsi que des aspects mécanistiques, tels que leur capacité à dégrader un substrat spécifique.

Dans leurs travaux de 2024, Yixu Wang *et al*. ont exploré l'utilisation des consortia synthétiques comme alternative aux produits chimiques en agriculture. Ils ont mis en avant leurs réflexions sur la conception de différents consortia en partant de 23 souches bactériennes endophytes du riz déjà décrites, ainsi que les différentes étapes réalisées pour tester leur compatibilité. L'un des critères de sélection décrit dans cette étude est le choix de consortia présentant des interactions bénéfiques de type mutualiste entre les bactéries permettant une co-cultivation de celles-ci *in vitro* et *in planta*. Au cours de cette étude, ils ont pu mettre en avant le potentiel de l'utilisation de consortia bactériens tels que celui composé de bactéries de genre différent (*Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* et *Stenotrophomonas*) capable de promouvoir la croissance des plantes même en condition de stress tels que la carence en azote (Wang *et al.*, 2024). Katherine E. Duncker *et al*. ont, quant à eux, publié en 2021 un article discutant des stratégies, applications et avantages des consortia microbiens (Duncker *et al.*, 2021). Parmi les stratégies, il existe l'élaboration de systèmes favorisant la répartition des tâches entre les différentes bactéries. Ainsi un système pluri-espèces favorisant la répartition des tâches permet de distribuer la charge subie contrairement aux procédés utilisant des cultures mono-espèces (figure 4). A ce strict intérêt de répartition, il convient d'ajouter celui de pipeline industriel permettant la production optimisée d'un produit donné par un processus biologique.

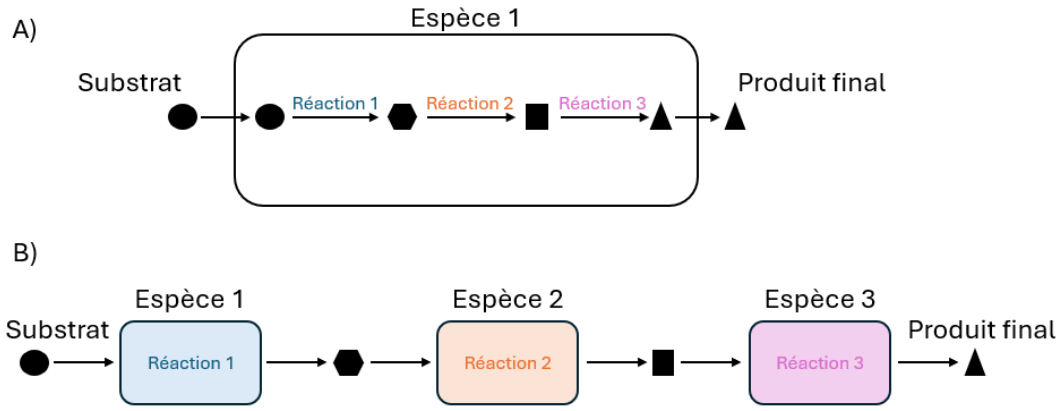


Figure 4 : Représentation simplifiée de la conception de consortia synthétiques basés sur la répartition des tâches. A) Système mono-espèce réalisant l'ensemble des réactions

nécessaires à la transformation du substrat en produit final. B) Système pluri-espèce permettant la répartition des charges par la transformation successive du substrat en produit intermédiaire jusqu'à l'obtention du produit final. Adaptée de (Duncker *et al.*, 2021).

Cette approche basée sur la répartition des tâches est cependant discutée en raison de la nécessité, dans le cadre de la dégradation d'un substrat, de rejeter le(s) produit(s) intermédiaire(s) dans l'environnement impactant alors le rendement global du processus. Il est de plus souligné dans ce travail que la mise en place d'interactions écologiques au sein des consortia synthétiques est cruciale pour assurer leur stabilité. Dans ce contexte, l'un des enjeux majeurs dans la conception des consortia synthétiques est d'utiliser les connaissances accumulées sur les interactions écologiques entre les micro-organismes, et d'approfondir notre compréhension des mécanismes impliqués dans ces interactions, tels que la communication bactérienne et leur impact sur le fonctionnement du système en terme métabolique ou encore de résilience.

Les nombreux travaux d'écologie microbienne portant sur les interactions écologiques ont conduit à leur classification selon leurs effets négatifs (-), neutres (0) ou positifs (+) d'un organisme sur un autre. Ces effets prennent en compte l'ensemble des facteurs influencés, tels que l'accès aux ressources, la modification physico-chimique de l'environnement, la croissance, la survie ou encore la fonction écologique.

Ces trois effets (positif, négatif ou neutre) ont permis la classification des interactions écologiques selon six types distincts (figure 5) :

- Une interaction écologique de type neutralisme (0/0) permet de classifier la relation entre organismes qui n'ont aucun effet l'un sur l'autre et ne tirent ni profit ni inconvénient de la présence des autres organismes.
- Les interactions écologiques de type amensalisme (-/0) et commensalisme (+/0) permettent de classifier les relations entre organismes ayant un effet négatif (amensalisme) ou un effet positif (commensalisme) sur d'autres organismes sans en être pour autant impactés.
- Les interactions écologiques de type prédation (+/-) permettent de classifier les relations entre organismes tirant avantage de la présence d'un autre organisme au détriment de ce dernier. Le terme de prédation comprend plusieurs nomenclatures selon les contextes d'étude, telles que le parasitisme, la tricherie ou l'exploitation, qui correspondent toutes à un effet positif pour un organisme au détriment d'un autre.

- Les interactions écologiques de type compétition (-/-) et mutualisme (+/+) permettent de classifier les relations entre organismes qui subissent un impact négatif (compétition) ou positif (mutualisme) lorsqu'ils sont présents ensemble dans le même écosystème.

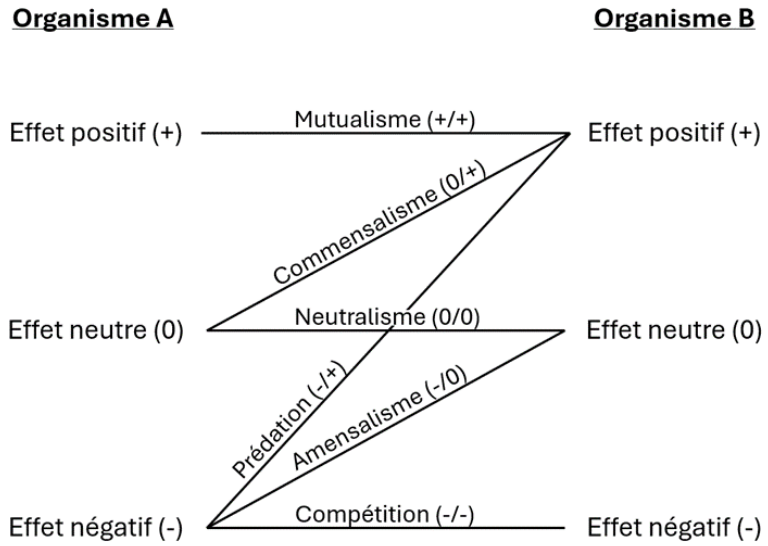


Figure 5 : Classification des interactions entre deux organismes selon leur impact. Représentation des interactions écologiques positive (+), neutre (0) ou négative (-) entre deux organismes A et B. Adaptée de (Le Roux *et al.*, 2020).

Peu de connaissances sont acquises sur les mécanismes impliqués dans les interactions écologiques entre micro-organismes et ce verrou reste encore un goulot d'étranglement pour la réalisation de modèles prédictifs pour la conception de consortia synthétiques. A ce jour, en dépit de l'augmentation du nombre de publications scientifiques témoignant des avancées technologiques et conceptuelles sur les consortia synthétiques (multipliées par 4,5 en 10 ans) (figure 6), les facteurs et mécanismes régissant l'établissement des interactions au sein de ces consortia restent encore peu compris en raison de leur complexité.

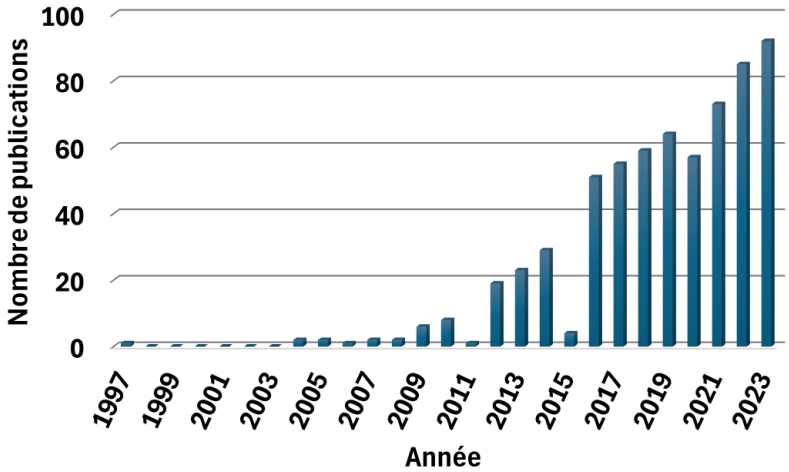


Figure 6 : Nombre de publications par année pour la recherche "synthetic microbial consortia" entre 1997 et 2023. Données extraites de PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/ Dernier accès le 1 août 2024).

3. Défis et complexité des interactions dans les consortia microbiens synthétiques

Comme décrit précédemment, les interactions écologiques entre les différents membres d'un consortium, ainsi qu'entre ces membres et leur environnement abiotique, génèrent des caractéristiques spécifiques à la communauté. Afin de mieux comprendre les règles régissant le comportement d'une communauté microbienne au sein d'un écosystème, il est crucial d'étudier le comportement individuel qui se met en place au sein de la communauté. Ce comportement va dépendre de la variabilité des nombreux facteurs abiotiques (biotope) et biotiques (biocénose). La complexité induite par ces facteurs abiotiques et biotiques nécessite la prise en compte de nombreux éléments tels que les paramètres physico-chimiques, les espèces présentes et leur état métabolique, l'organisation structurale de la population (planctonique ou biofilm) ou encore la disponibilité spatio-temporelle des ressources.

À titre d'exemple, en ce qui concerne les ressources, l'évolution de leur abondance dans un environnement donné peut être induite par l'activité individuelle des microorganismes (telle que la diminution d'un substrat et l'accumulation d'un produit au cours du temps), mais aussi par l'activité des autres organismes de la communauté. Cette modification temporelle impacte la disponibilité des ressources qui peut alors induire l'appauvrissement ou l'enrichissement pour une molécule donnée, ou encore une discontinuité spatiale des ressources (telle que la formation d'un gradient de concentration). La disponibilité et la stabilité des ressources peuvent donc grandement impacter le comportement microbien individuel, la diversité présente ainsi que les potentielles interactions écologiques.

En 2023, Michael Daniels *et al*. ont publié leurs travaux sur un consortium synthétique bactérien composé de *Vibrio natriegens* et *Alteromonas macleodii* permettant d'alimenter la réflexion sur la dynamique des interactions écologiques (Daniels *et al.*, 2023). Dans cette étude, ils ont démontré, à l'aide d'une approche de micro fluidique, l'évolution du type d'interaction écologique entre les deux organismes. En effet, *V. natriegens* dégrade la chitine oligomérique en monomères et dimères, produisant ainsi au cours de ce processus des sous-produits métaboliques disponibles pour *A. macleodii*. Cela conduit à une interaction écologique de type mutualisme, car *V. natriegens* produit des ressources utilisables par *A. macleodii et A. macleodii* en contrepartie favorise la croissance ainsi que l'activité de dégradation de la chitine de *V. natriegens*. Cependant, une fois la chitine entièrement utilisée par *V. natriegens*, le type d'interaction évolue, passant du mutualisme à une compétition entre les deux organismes pour les sous-produits présents. Cette étude souligne la complexité à étudier l'évolution des

interactions écologiques d'un système relativement simple et la nécessité de mieux comprendre cette dynamique afin de développer des consortia synthétiques stables.

D'autres études, telles que celle de Shiladitya Ghosh *et al.* en 2016, montrent la complexité de l'étude des consortia microbiens en raison de la coexistence d'interactions simultanées entre plusieurs organismes et du manque d'information sur les mécanismes favorisant ou contrôlant ces interactions. Un exemple présenté dans cet article est le changement de type d'interaction écologique de *Candida albicans* engendré par la variation de la concentration en fer chez l'homme induisant le passage d'une interaction commensale à une interaction de prédation. Ainsi, la complexité de la compréhension et du contrôle d'un consortium repose aussi dans la difficulté de l'analyse de l'ensemble des facteurs impactant la mise en place et la stabilité d'une interaction écologique. Ces travaux soulignent également l'importance des différents rôles et niveaux d'interactions écologiques joués par les réseaux d'interactions dans la conception des consortia synthétiques (Ghosh *et al.*, 2016). Le choix d'organismes présentant des interactions écologiques dites positives, telles que le mutualisme et le commensalisme, est d'ailleurs suggéré pour améliorer la stabilité des consortia et favoriser les effets synergiques. Cette réflexion est notamment développée autour de la conception de consortia multi-espèces, où il est essentiel de prendre en considération le réseau d'interactions formé entre les différentes espèces. Toutefois, l'augmentation des facteurs biotiques, ajout d'espèces supplémentaires, permettant la mise en place de systèmes plus proches des conditions environnementales se fait au prix d'une diminution du contrôle de ces systèmes en raison des changements comportementaux multifactoriels chez les microorganismes, dont la compréhension demeure incomplète (Hays *et al.*, 2017).

Au-delà de la difficulté de la caractérisation des réseaux d'interactions et de leur dynamique, il faut également prendre en considération la nécessité d'étudier l'hétérogénéité au sein d'une même espèce. Les études visant la compréhension de l'hétérogénéité au sein d'une population (expression différentielle, adaptation aux stress environnementaux, état et activité métabolique, ou encore permettant la résistance aux antibiotiques) sont relativement récentes, principalement réalisées sur des cultures "mono-espèce" (figure 7) et encore peu évoquées dans le cadre des consortia synthétiques en raison de la difficulté d'analyse des systèmes multi espèces (Evans and Zhang, 2020; Reyes Ruiz *et al.*, 2020).

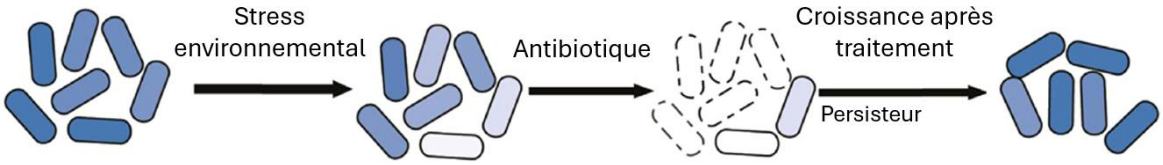


Figure 7 : Représentation schématique de l'hétérogénéité bactérienne comme facteur de persistance. La sélectivité induite par la pression de sélection permet le développement des souches, alors appelées "persisteurs", présentant les critères d'adaptation les plus adéquates. Adaptée de (Evans and Zhang, 2020).

L'étude des consortia synthétiques microbiens met donc en lumière une complexité considérable qui découle de plusieurs facteurs interdépendants. D'une part, cette complexité réside dans la caractérisation précise des interactions écologiques multiples et variées entre les micro-organismes. Ces interactions peuvent être de nature synergique, compétitive, ou neutre, et sont influencées par une multitude de variables environnementales, telles que la disponibilité des nutriments, la température, le pH, et la présence de molécules signalétiques. D'autre part, les interactions sont régulées par des mécanismes moléculaires complexes, comme la communication bactérienne, les échanges métaboliques et les réponses aux stress qui restent encore largement méconnus et difficiles à modéliser.

Pour mieux appréhender cette complexité, il est nécessaire de combiner les approches "Top-down" et "Bottom-up" c'est à dire simplification et contrôle du système tout en ayant conscience que plusieurs limites subsistent : la difficulté de reproduire les conditions naturelles de l'écosystème dans un environnement contrôlé, la prédictibilité limitée des modèles synthétiques et le manque d'outils précis pour mesurer et manipuler les interactions moléculaires en temps réel (Gilmore *et al.*, 2019).

Ainsi, la complexité de l'étude des consortia synthétiques microbiens inclut non seulement la diversité des interactions biologiques et des facteurs environnementaux, mais également les défis techniques liés à leur étude et à leur modélisation. Surmonter ces limites est crucial pour une meilleure compréhension et une optimisation du développement de consortia multi-espèces, tant pour les applications fondamentales qu'industrielles.

II. Quorum Sensing – Un mécanisme de communication inter cellulaire

1. Introduction au quorum sensing

Les nombreuses études sur les interactions écologiques ont conduit à leur classification en fonction de leurs effets (négatif, neutre ou positif) d'un organisme sur un autre. Afin de comprendre comment ces interactions se mettent en place, il est crucial de mieux appréhender les facteurs et processus impliqués dans leur établissement. L'un de ces processus, basé sur l'échange de molécules signal, est appelé "quorum sensing" (QS). Le QS est un mécanisme de communication cellulaire permettant aux bactéries de détecter et de répondre à la densité de leur population en produisant et en libérant des molécules de signalisation. Le QS permet aux bactéries de fonctionner comme une communauté coordonnée, facilitant leur adaptation à l'environnement et améliorant leur survie collective (Waters and Bassler, 2005). Le terme "quorum sensing" intègre également la notion de densité minimale car selon la définition littérale "quorum" signifie "Nombre de membres présents exigé dans une assemblée délibérante pour que le vote soit valable" (Larousse https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/quorum/65800 Dernier accès le 1 juillet 2024). Son application à la communication microbienne invite à la réflexion du nombre minimum d'individus nécessaire pour déclencher les mécanismes sous-jacents induits par le signal.

2. Découverte du quorum sensing

C'est avec les avancées du XXe siècle en microbiologie que la découverte du "comportement multicellulaire" chez les bactéries, telles que la formation de biofilm, la bioluminescence ou encore la sporulation a été faite (Tomasz and Hotchkiss, 1964; Nealson *et al.*, 1970; Engebrecht *et al.*, 1983; Shimkets, 1990; Allison and Hughes, 1991; Kaiser and Losick, 1993). L'une des bactéries étudiées pour déterminer les mécanismes sous-jacents à ce comportement multicellulaire est *Aliivibrio fischeri* (anciennement nommée *Vibrio fischeri*). *A. fischeri* est une bactérie retrouvée dans les organes lumineux encore nommés organes luminescents ou organes électroluminescents de certains animaux marins tels que la seiche *Euprymna scolopes*. Grâce à cette interaction mutualiste, *Euprymna scolopes* échappe à ses prédateurs nocturnes en effaçant son ombre, par la production de luciférase par *A. fischeri*, qui génère de la bioluminescence. Cette lumière, émise sur la face ventrale de la seiche, permet de dissimuler l'ombre créée par les rayons lunaires réfléchis. Ce processus coordonné par *A. fischeri* de production de luciférase a suscité de nombreuses interrogations (Ramesh and Mohanraju, 2019). En 1970, Kenneth H. Nealson et ses collaborateurs ont mis en évidence un phénomène d'"auto-induction" permettant une expression coordonnée de la transcription de l'ARNm codant la luciférase (Nealson *et al.*, 1970). Par la suite, la molécule responsable de cette

auto-induction, initialement appelée AI pour autoinducteur et plus tard généralisée sous le terme de “molécule de quorum sensing” (MQS), a été étudiée. Ceci a permis de corréler l’activation coordonnée de la bioluminescence avec l’accumulation d’une MQS dans le milieu sans que la nature de ce composé ait été identifiée (Eberhard, 1972; Nealson, 1977).

Le terme “quorum sensing” (QS) est lui apparu pour la première fois en 1994, grâce aux travaux de Fuqua et ses collaborateurs sur *A. fischeri* (Fuqua *et al.*, 1994). Dans cette publication, le concept de QS est défini comme un système de détection environnementale qui permet de surveiller la densité de sa propre population (figure 8).

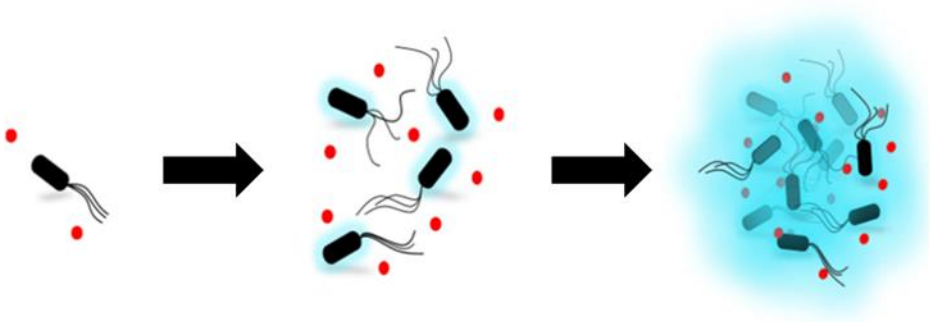


Figure 8 : Schéma décrivant l’induction de la bioluminescence de *A. fischeri* par le QS. L’augmentation du nombre d’individus *A. fischeri* entraine l’accumulation dans l’environnement de la MQS (en rouge). Une fois la concentration nécessaire atteinte la production de la luciférase permet la bioluminescence de la bactérie. Adapté de (Tanet *et al.*, 2019).

Depuis l’introduction de l’appellation “quorum sensing” il y a 30 ans pour désigner la communication dépendante de la densité chez les bactéries, de nombreuses études ont été menées (figure 9).

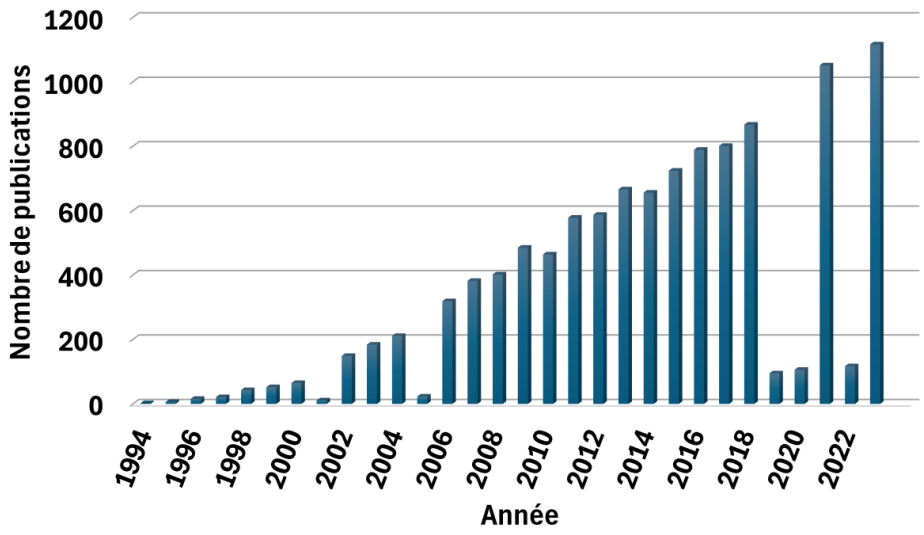


Figure 9 : Nombre de publications par année pour la recherche “quorum sensing” entre 1994 et 2023. Données extraites de PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/ Dernier accès le 1 août 2024).

Grâce à ces diverses études, la description des différents mécanismes de communication et leurs implications dans les comportements bactériens a conduit à une meilleure compréhension des systèmes de QS. Initialement identifié chez les bactéries, le QS a également été observé chez certaines archées et champignons.

À ce jour, de nombreuses MQS impliquées dans le QS ont été identifiées. Cette diversité de MQS permet aux bactéries de communiquer de manière spécifique, non seulement avec les autres membres de l'espèce, mais également dans certain cas avec des organismes d'espèces différentes pouvant même appartenir à d'autres règnes. Dans un mécanisme de quorum sensing intra-espèce, la production de molécules de signalisation MQS permet de coordonner une réponse spécifique entre les membres de l'espèce, sans nécessairement influencer les autres microorganismes présents dans l'environnement. Ainsi, la nature de la MQS produite varie en fonction de l'espèce bactérienne. Les recherches menées sur différents organismes ayant des mécanismes de QS ont conduit à la classification des MQS selon leurs types de communication, permettant ainsi de différencier les communications intra-espèces des communications inter-espèces.

3. Quorum sensing : Mécanisme de communication intra-espèces

A. Diversité des molécules de quorum sensing

La communication cellulaire intra-espèce retrouvée chez les bactéries se classe selon les MQS spécifiques produites et détectées par cette population. De façon générale, on peut classer les MQS en 2 grand types : les plus étudiés qui sont les acyl homosérines lactones (AHL), également appelées autoinducteurs de type 1 (AI-1), et les autoinducteurs peptidiques (AIP). Les AHL, retrouvées uniquement chez les bactéries à Gram négatif, sont généralement composées d'un cycle homosérine lactone (HSL) lié à une chaîne acyle hydrophobe de longueur et de composition variable permettant une grande diversité de molécule comme illustrée par quelques exemples dans la figure 10. C'est cette chaîne acyle hydrophobe qui assure la spécificité de communication.

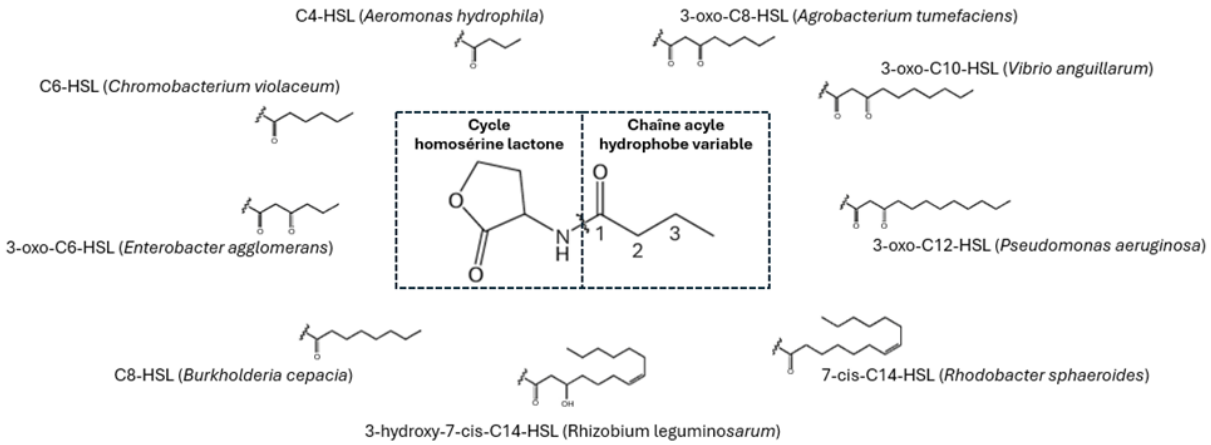


Figure 10 : Exemple d'AHLs produits par les bactéries Gram négatif comme MQS. Adapté de (Konai *et al.*, 2018).

Les AIP sont quant à eux retrouvés uniquement chez les bactéries à Gram positif. Également très diversifiés, les AIP varient par leur séquence peptidique et par les modifications post-traductionnelles dont ils peuvent faire l'objet telles que le clivage, la cyclisation ou en encore l'ajout de groupement comme l'isoprénoïde. Ces modifications permettent une grande diversité de structure, qui assure la spécificité de communication comme illustré par quelques exemples dans la figure 11.

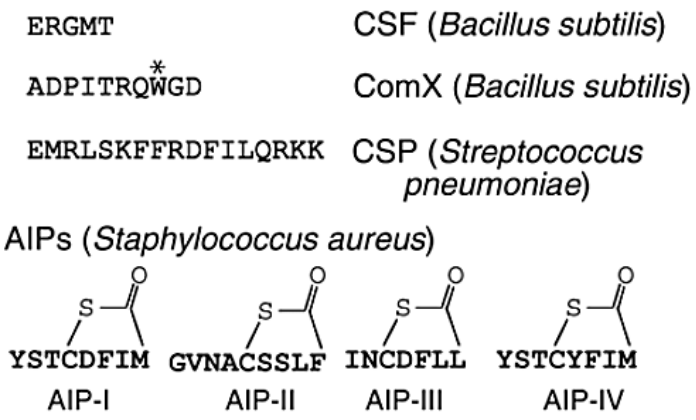


Figure 11 : Exemple d'AIPs retrouvés chez les bactéries à Gram positif. Astérisque représente l'emplacement d'une modification post-transcriptionnelle d'isoprénylation (Federle and Bassler, 2003).

B. Mécanismes de perception des MQS

Le QS est un mécanisme de communication bactérienne basé sur un système de signal-réponse (Waters and Bassler, 2005). Malgré la grande diversité des MQS et des réponses/conséquences possibles, il n'y a que deux modes de perception du signal actuellement décrits (Visick and Fuqua, 2005) (figure 12).

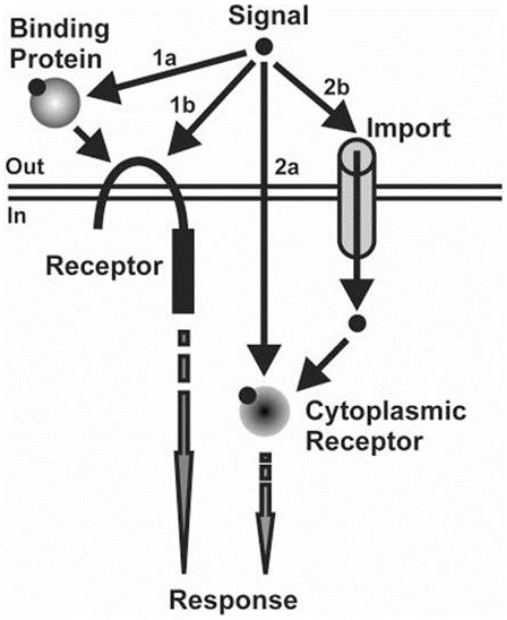


Figure 12 : Mécanismes de perception du signal. Selon le signal (MQS) (cercle plein noir) et la bactérie réceptrice, le MQS peut suivre les voies 1a et 1b pour une perception externe du signal (système à deux composants) : soit par l'intermédiaire d'une protéine de liaison externe qui transmet le signal au récepteur transmembranaire (voie 1a), soit par une interaction directe avec le récepteur transmembranaire (voie 1b). Dans les voies 2a et 2b (système à un composant), le signal est internalisé soit par diffusion passive (voie 2a), soit par des mécanismes d'importation spécifiques (voie 2b) (Visick and Fuqua, 2005).

Quel que soit le type de MQS, les bactéries peuvent percevoir le signal de deux manières. Par une perception externe *via* des protéines membranaires, comme les protéines LuxN et LuxR dans le système lux de *Vibrio*, qui transmettent l'information en activant un régulateur cytoplasmique (voie 1, dans la figure 12). Dans ce système, LuxN, un récepteur de type histidine kinase, détecte l'autoinducteur, et par phosphorylation, active LuxR, un régulateur transcriptionnel qui, une fois activé, stimule l'expression des gènes responsables de la bioluminescence (Anetzberger *et al.*, 2012). Alternativement, le signal peut être perçu par la fixation du MQS à un régulateur cytoplasmique, comme le système las de *Pseudomonas aeruginosa*, après que la MQS ait été importée de manière active (voie 2b, dans la figure 12) ou soit entrée par diffusion passive (voie 2a, dans la figure 12) dans le cytoplasme. Dans le système *las*, la MQS, connue sous le nom de 3-oxo-C12-HSL, se lie à LasR, entraînant un changement de conformation qui permet à LasR de se fixer à des séquences spécifiques sur l'ADN, activant ainsi l'expression des gènes impliqués dans la virulence et la formation de biofilms (Guzzo *et al.*, 2020). Plusieurs systèmes de quorum sensing utilisant ces deux systèmes de perception du signal sont illustrés plus en détail par la suite au cours de cette partie.

C. Le quorum sensing chez les bactéries à Gram positif

Les différents types de peptides utilisés dans le QS chez les bactéries à Gram positif peuvent être classifiés en fonction de leurs structures et de leurs mécanismes d'action. Les deux paragraphes suivants illustrent *via* 2 exemples le processus du QS chez les bactéries à Gram positif.

a. Le système Agr (Accessory Gene Regulator) de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie pathogène pour l'homme, capable de provoquer des septicémies, des infections respiratoires, de la peau et des tissus mous. Les staphylocoques, dont fait partie *S. aureus*, possèdent la capacité de réguler efficacement une grande variété de facteurs de virulence, tels que des toxines, des enzymes dégradatives, des gènes de résistance aux antimicrobiens et des mécanismes d'évasion du système immunitaire. Les recherches portant sur la compréhension de la régulation des facteurs de virulence ont révélé le rôle du système de QS de type Agr (Vuong *et al.*, 2003; Le and Otto, 2015). Ce système, implique un système à deux composants et un peptide relativement court, AgrD. Ce peptide est synthétisé sous forme de précurseurs plus longs qui est maturé et libéré dans l'environnement en traversant la membranes grâce au transporteur AgrB. La MQS produite est accumulée suffisamment dans le milieu avant d'être reconnue par un récepteur spécifique situé sur la membrane, appelé AgrC. Cette protéine est une histidine kinase, un type de récepteur membranaire qui joue un rôle crucial dans la détection des signaux extracellulaires. Lorsque la concentration du peptide atteint un seuil critique, il se lie spécifiquement au domaine de reconnaissance d'AgrC. La liaison du peptide à AgrC déclenche une modification conformationnelle du récepteur, ce qui active sa fonction kinase. AgrC phosphoryle ensuite une protéine régulatrice de type régulateur de réponse, appelée AgrA. AgrA-phosphorylée se lie à des séquences spécifiques de l'ADN qui permettent notamment l'autorégulation de *agrA* conduisant à une auto-induction du système agr ainsi que la régulation de l'expression de gènes associés à la virulence et à la formation de biofilms chez *S. aureus* (figure 13).

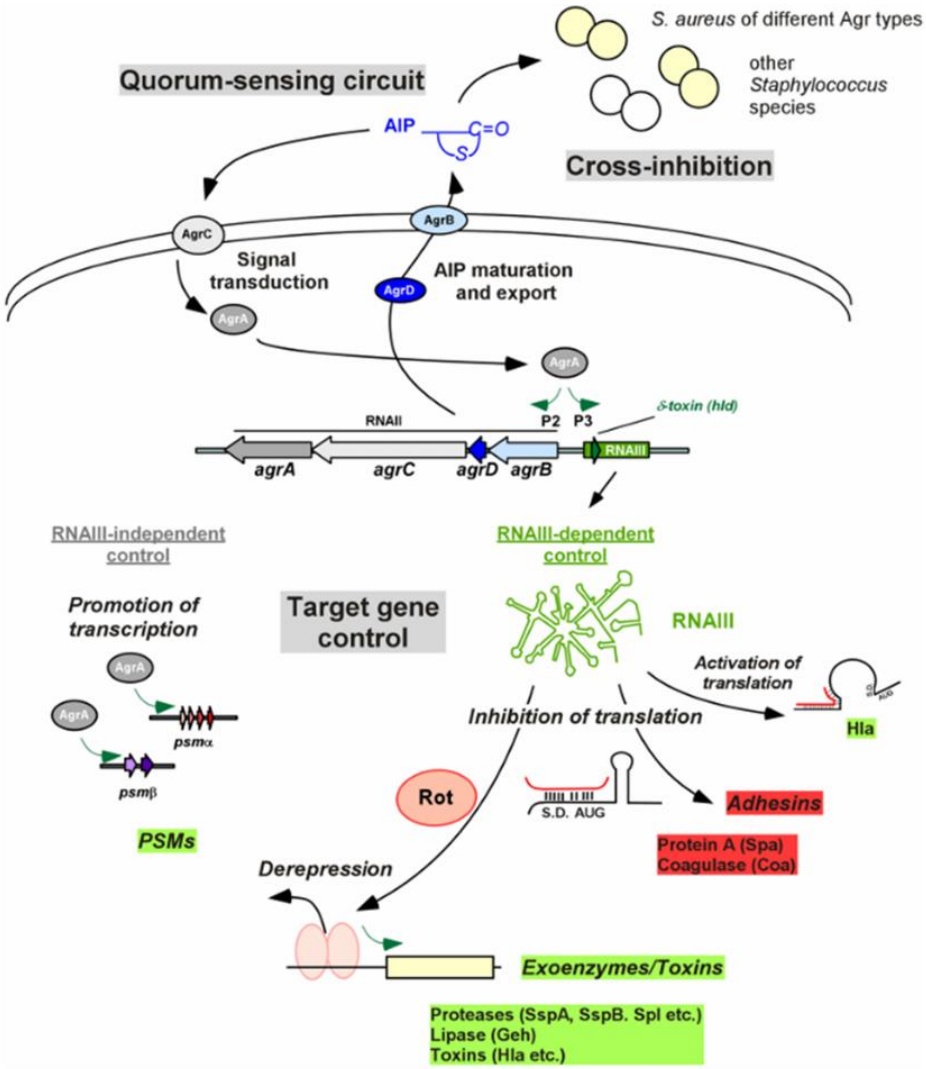


Figure 13 : Représentation du système Agr de *Staphylococcus aureus* (Le and Otto, 2015)**.**

Parmi les gènes régulés par l'activation du système agr, on retrouve l'induction de la transcription de la RNase III. Comme représenté dans le figure 13, cette RNase III est capable de réguler plusieurs mécanismes tels que 1) la production d'alpha-hémolysine (Hla) en activant la traduction de protéine *via* sa fixation sur l'ARNm; 2) la production de protéase et de lipase *via* l'inhibition de traduction du répresseur transcriptionnel Rot; 3) l'inhibition de la traduction de la protéine de surface A (Spa) qui est généralement impliquée dans l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte ou dans d'autres interactions avec le système immunitaire. Les découvertes des mécanismes régulés par le QS chez *S. aureus* ont permis d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles, soulignant ainsi l'importance d'étudier ces mécanismes dépendants du QS.

b. Le système Com et Rap-Phr de l'organisme *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis est l'espèce la plus largement étudiée au sein des bactéries à Gram positif notamment dans le domaine du développement des spores (sporulation) et de la compétence c'est à dire la capacité à incorporer de l'ADN exogène (Waters and Bassler, 2005; Špacapan *et al.*, 2020). Les systèmes de régulation de la sporulation et de la compétence sont antagonistes et montrent un contrôle QS dépendant basé sur deux AIP distinctes, ComX et Rap Pheromone C aussi appelé "competence stimulating peptide" (CSF). La compétence de *B. subtilis* est régulée par un mécanisme de QS qui implique le système à deux composants ComP/CompA et le peptide ComX. Le peptide ComX est un AIP composé de dix acides aminés produit et maturé dans le cytoplasme. Il est ensuite sécrété dans le milieu extracellulaire par ComQ. Une fois le seuil critique en ComX atteint, celui-ci se fixe sur l'histidine kinase ComP. La formation du complexe ComX-ComP entraîne l'autophosphorylation de ComP qui permet l'activation par phosphorylation de ComA, un régulateur de réponse transcriptionnel. En plus de la MQS ComX, la compétence est également sous la régulation d'un deuxième système de QS appelé CSF. Ce système de QS appartient à la famille des RRNPP (Rap-Phr-NprR-PlcR-PrgX) regroupant les phosphatases de réponse régulatrice aspartyl phosphate (Rap) et leurs peptides régulateurs de phosphate correspondants (Phr) (figure 14).

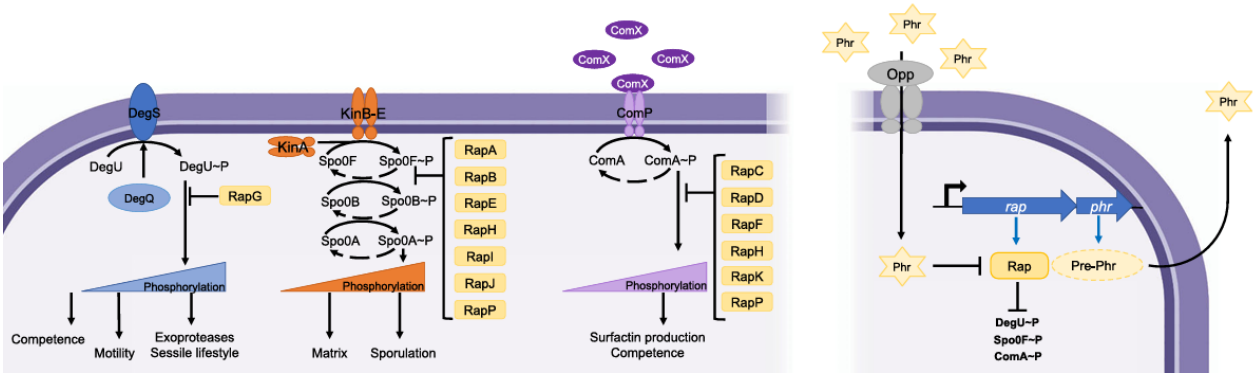


Figure 14: Représentation du QS Com et Rap-Phr de *Bacillus subtilis* (Gallegos-Monterrosa *et al.*, 2021)**.**

Dans ce second système, l'AIP Phr est d'abord synthétisé sous forme de précurseur, pré-Phr, qui est ensuite maturé en un peptide actif, Phr, composé de 5 à 6 acides aminés. Ce peptide est ensuite libéré dans le milieu extracellulaire en tant que molécule MQS. Lorsque sa concentration atteint un seuil critique, le Phr est internalisé par le transporteur membranaire Opp. Une fois à l'intérieur de la cellule, le peptide Phr se lie aux protéines de la famille Rap, induisant un changement conformationnel qui inhibe leur activité. Les protéines Rap sont des phosphatases qui jouent un rôle clé dans la déphosphorylation des régulateurs de transcription dont ComA. Ainsi lorsque les protéines Rap sont actives, elles déphosphorylent ComA, ce qui

empêche l'activation de la compétence bactérienne. En plus de réguler ComA, les protéines Rap modulent également d'autres régulateurs de réponse tels que Spo0B et DegQ, contribuant ainsi à l'antagonisme entre compétence et sporulation chez *B. subtilis* en maintenant un équilibre dynamique entre ces deux processus en fonction des conditions environnementales (Omer Bendori *et al.*, 2015; Hughes *et al.*, 2022). Un couple Rap-Phr peut également être retrouvé contrôlant différents systèmes. Un exemple de couple régulant plusieurs mécanismes est DegS-DegU (figure 14), qui est impliqué dans la régulation post-exponentielle telle que la production d'exo-enzymes et la motilité (Amati *et al.*, 2004).

Ces deux exemples illustrent à la fois la diversité dans ce système de communication du fait de la différence dans les MQS, la présence de modifications post-traductionnelles et aussi les conséquences fonctionnelles des MQS et une similarité générale dans le mode d'action : production de molécule, notion de seuil de concentration, cascade de réactions *via* système à deux composants.

D. Le quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif

À la différence des autoinducteurs peptidiques synthétisés par les bactéries à Gram positif, les AHL (N-acyl homosérines lactones) sont des composés issus du métabolisme bactérien (figure 15).

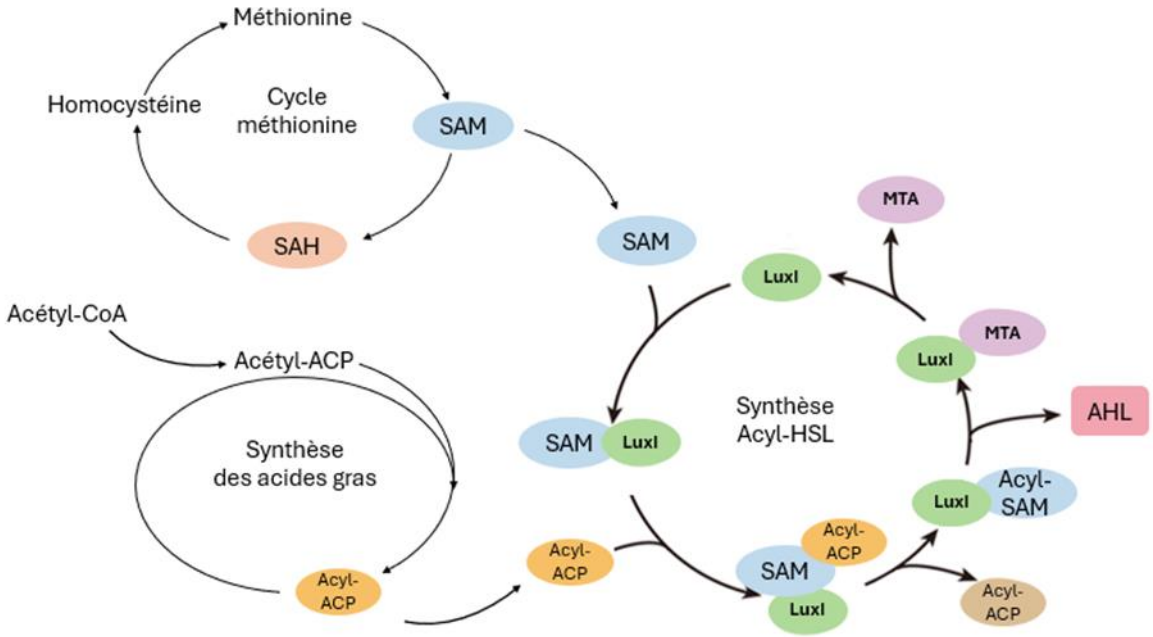


Figure 15 : Étapes de synthèse des AHLs. Abréviation : S-méthylthioadénosine (MTA), S-adénosylméthionine (SAM), S-adénosylhomocystéine (SAH), Acyl Carrier Protein (ACP), Coenzyme A (CoA). Adaptation de (Fuqua and Greenberg, 2002; Fast and Tipton, 2012; Li *et al.*, 2021).

La synthèse des AHL repose sur deux réactions chimiques distinctes : 1) le transfert d'acyle de l'Acyl Carrier Protein (ACP), issue du cycle de synthèse des acides gras, au groupe amino de la S-adénosylméthionine (SAM), issue du cycle de la méthionine, et 2) la lactonisation de la SAM avec l'expulsion concomitante de S-méthylthioadénosine (MTA) (figure 15). Ce processus de synthèse permet la production d'une grande diversité d'AHL propres à chaque espèce. Tout comme il est possible de trouver plusieurs systèmes de QS de type AIP permettant une hiérarchisation dans le contrôle du signal chez les bactéries à Gram positif, il est possible de trouver plusieurs mécanismes de QS de type AHL dans un même organisme. La diversité du type de molécules et des conséquences fonctionnelles est illustrée dans les deux exemples ci-après.

a. Système AHL de *A. fischeri*

A. fischeri est considéré comme le modèle de référence pour l'étude du QS de type AHL, présent chez les bactéries à Gram négatif. Comme mentionné précédemment, le mécanisme de QS de *A. fischeri* régule la production de bioluminescence, permettant à cette bactérie d'interagir avec des espèces marines telles que *Euprymna scolopes*, où elle se retrouve au sein de l'organe lumineux. Chez *A. fischeri*, le mécanisme de QS repose sur la synthèse, par la protéine LuxI, des AHLs N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C6-HSL) (Eberhard *et al.*, 1981; Yan *et al.*, 2007). Par diffusion ou par le passage à travers des pompes à efflux non spécifiques, les AHLs sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. Une fois leur concentration suffisamment élevée, elles sont internalisées par diffusion à travers la membrane. Dans le cytoplasme, les AHL se lient au régulateur transcriptionnel LuxR, permettant un changement conformationnel de ce dernier conduisant à son activation et à la régulation des gènes cibles qu'il contrôle (Fuqua *et al.*, 2001) (figure 16).

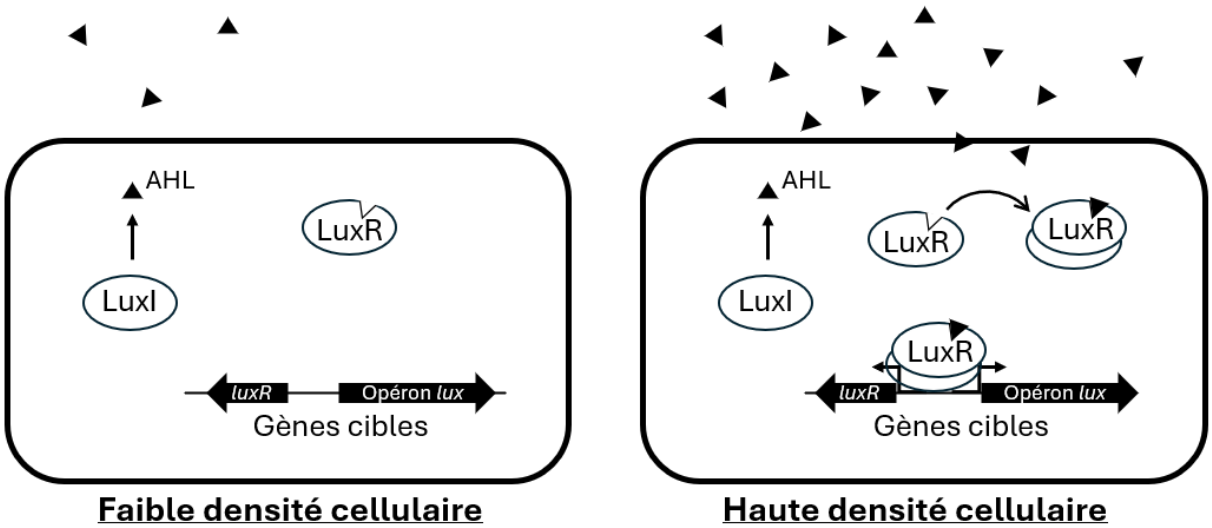


Figure 16 : Mécanisme de QS de type AHL retrouvé chez *A. fischeri*. A faible densité cellulaire, la concentration en AHL dans le milieu n'est pas suffisante pour induire l'internalisation du signal

(figure de gauche). Une fois la concentration en AHL suffisamment élevée, représentatif d'une densité cellulaire plus élevée le signal est internalisé puis reconnu par le régulateur transcriptionnel LuxR qui activera alors la transcription des gènes cibles (figure de droite). Adapté de (Federle and Bassler, 2003).

LuxR-AHL reconnait et se fixe à une séquence spécifique en amont du promoteur de l'opéron *lux* ainsi que de son propre promoteur. La fixation de LuxR-AHL à ces deux promoteurs va alors permettre l'auto-induction de son gène et l'induction de l'opéron *lux*. Ce dernier est constitué de 7 gènes (*luxI*, *luxC*, *luxD*, *luxA*, *luxB*, *luxE*, *luxG*) dont le premier est le gène *luxI*, qui permet la synthèse des AHL tandis que les autres gènes sont impliqués dans la production de la luciférase pour l'émission de la bioluminescence (Elkheloui Raja *et al.*, 2021). Ainsi la détection du signal AHL entraîne une augmentation de sa production, déclenchant une réaction en chaîne au sein de la population, et permettant alors une coordination de l'émission de bioluminescence.

b. Système CAI-1 de *Vibrio cholerae*

Chez *V. cholerae*, une bactérie pathogène de l'Homme et responsable du choléra, un autre type de système de régulation impliquant une AHL a été décrit. En réponse à la concentration à cette AHL dans le milieu, *V. cholerae* est capable de réguler sa virulence ainsi que sa capacité à former du biofilm. Ce système repose toujours sur un mécanisme à deux composants appelé ici CqsS-LuxO, et une AHL qui est appelée dans ce système Cholera Autoinducer-1 (CAI-1) (Ng *et al.*, 2012). Comme pour la synthèse "générale" des AHL, la production de cette AHL implique la transformation de la SAM. Synthétisé par l'enzyme CqsA dont l'expression est constitutive, le CAI-1 diffuse dans l'environnement et est reconnu par le récepteur membranaire CqsS lorsque sa concentration atteint un seuil critique. La liaison de CAI-1 à CqsS inhibe l'activité kinase de CqsS. Cette inhibition entraîne l'arrêt de la phosphorylation de LuxO, un régulateur transcriptionnel des ARN Qrr qui contrôle la stabilité des ARNm codant pour AphA et HapR qui régulent eux les gènes "toxine cholérique". Ainsi, lorsque LuxO est phosphorylé (en absence de signal), les ARN Qrr sont transcrits, tandis que, lorsque LuxO est déphosphorylé (en présence du signal) la transcription des ARN Qrr est réprimée. À faible densité de population, les ARN Qrr induisent la répression du gène *hapR* et la transcription du gène *aphA*. Une fois traduit AphA active la production de toxine cholérique ainsi que la formation de biofilm. À haute densité de population, les ARN Qrr ne sont plus transcrits, ce qui entraîne une inhibition de la transcription de *aphA* et une dérépression de *hapR*. La protéine HapR est un régulateur transcriptionnel qui, une fois produite, réprime la protéine AphA et favorise l'agrégation des bactéries (Gao *et al.*, 2020) (figure 17).

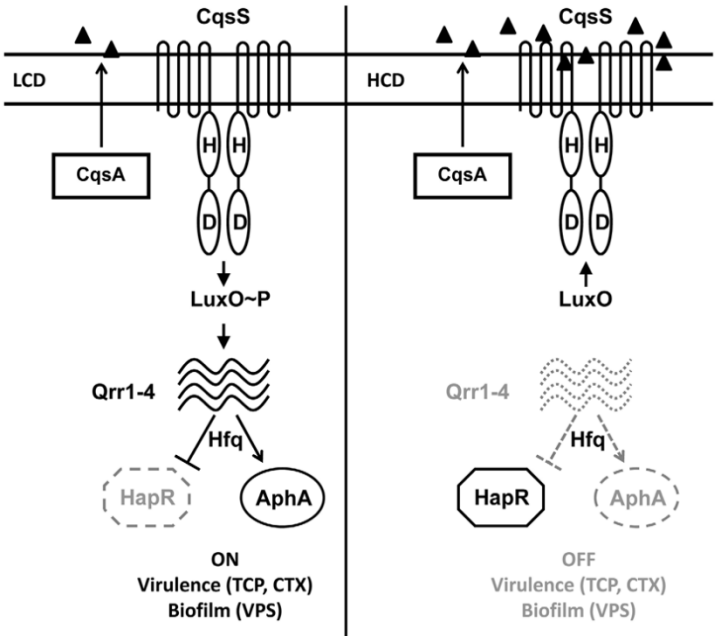


Figure 17 : Représentation du mécanisme de QS chez *V. cholerae* (Ng *et al.*, 2012).

Le QS de type CAI-1 offre une régulation précise des mécanismes de production de toxines, le positionnant comme une cible thérapeutique prometteuse pour le développement de nouveaux traitements

c. Le système Las, Rhl et Pqs de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène pour l'Homme, responsable d'infections nosocomiales. Elle possède dans son génome trois systèmes de régulation de type QS différents lui permettant de coordonner des comportements collectifs en réponse à des changements dans sa densité cellulaire. Les études portant sur la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathogénicité ont permis le déchiffrage des systèmes de régulation sous-jacents faisant intervenir le QS. Ainsi les trois mécanismes de QS LasI/LasR, RhlI/RhlR et Pqs ont été décrits chez *P. aeruginosa* comme étant impliqués dans la motilité, la formation de biofilm et la production de facteurs de virulence (Bijtenhoorn *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2022).

Le système Las repose sur le couple LasI/LasR. LasI permet la synthèse de l'AHL N-3-oxo-dodecanoyl-homosérine lactone (3OC12-HSL) qui est transporté dans le milieu extérieur où il s'accumule. Une fois la concentration seuil atteint la molécule est réinternalisée par diffusion, pour se lier au régulateur transcriptionnel LasR. Le complexe AHL/LasR permet alors l'activation de facteurs de virulence tels que LqsA (protéase), ToxA (Exotoxine A), AprA (protéase alcaline) et LasB (élastase). En plus de l'activation de ces facteurs de virulence, LasR est impliqué dans la

régulation des autres systèmes de QS Rhl et Pqs. De façon similaire au fonctionnement du couple Las, le système Rhl repose sur le couple RhlI/RhlR. Une fois activée par le facteur transcriptionnel LasR, l'AHL C4-HSL est synthétisée puis sécrétée dans l'environnement par diffusion. Une fois la concentration seuil atteinte, le signal est internalisé par diffusion pour venir interagir avec RhlR. Le complexe C4-HSL/RhlR permet l'activation de facteurs de virulence supplémentaires tels que des rhamnolipides et la pyocyaninie. Le troisième mécanisme de QS est le système appelé Pqs (Pseudomonas quinolone signal), contrairement aux deux autres systèmes celui-ci ne forme pas une MQS de type AHL mais Pqs. La synthèse de cette MQS repose sur des modifications enzymatiques successives de l'acide anthranilique, un intermédiaire issu de la voie de biosynthèse du tryptophane. L'activation du QS de type Pqs qui permet la transcription de gènes impliqués dans la formation du biofilm, tels que *lecA*, reste encore controversé entre une activation directe par le système LasR ou indirecte *via* le système Rhl (Malgaonkar and Nair, 2019; Guzzo *et al.*, 2020; Shahab *et al.*, 2023).

L'interconnexion des mécanismes de QS chez *P. aeruginosa* permet une régulation fine des mécanismes et semble indiquer une certaine chronologie dans la mise en place des mécanismes de réponses même si cette dernière est encore peu comprise et controversée (figure 18).

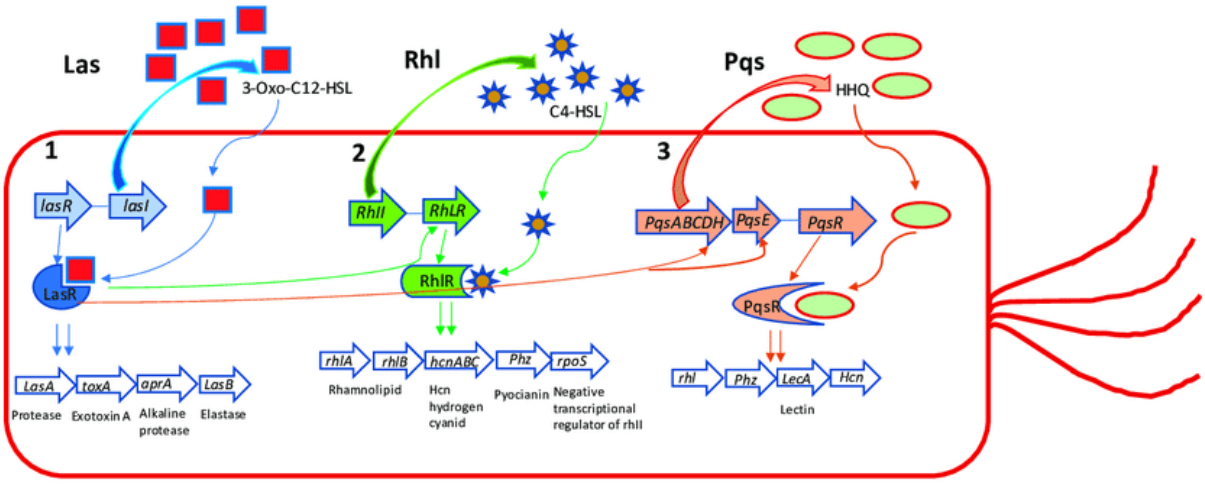


Figure 18 : Représentation schématique des mécanismes de QS chez *Pseudomonas aeruginosa* (Guzzo *et al.*, 2020)**.**

Comme le montrent les différents exemples de cette partie, les mécanismes de QS permettant la régulation au sein d'une même population sont très divers, allant de systèmes simples à des systèmes impliquant plusieurs réseaux de QS interconnectés, tous participant à une régulation comportementale fine au sein d'une communauté. En 2019, les travaux de Samantha Wellington et E. Peter Greenberg ont mis en évidence, dans les génomes bactériens,

la présence de récepteurs très sélectifs de MQS, permettant une communication privative et une réponse limitée aux individus d'une même espèce, ainsi que de récepteurs capables de se lier à des AHL exogènes d'autres espèces permettant une communication "plus large" (Wellington and Greenberg, 2019). Par exemple la présence de récepteurs de MQS de type AHL chez les bactéries à Gram positif et de récepteur AIP chez les bactéries à Gram négatif ouvre la possibilité de communication entre ces bactéries, soulevant des questionnements sur les mécanismes en place dans les communautés mixtes. Cependant, il est intéressant de noter que la production d'AHL chez les bactéries à Gram positif ou d'AIP chez les bactéries à Gram négatif n'a pas été observée, et ce en dépit de transfert de gènes entre ces deux types d'organismes (Virolle *et al.*, 2020). Cette absence de transfert pourrait être le résultat d'une pression de sélection visant à empêcher une communication croisée et à garantir que seules les bactéries d'une même espèce puissent interagir entre elles. Si tel était le cas, on peut supposer que cette restriction dans la communication pourrait ne concerner que certaines cibles/réponses.

4. Mécanisme de communication inter-espèces

Comme décrit précédemment, les mécanismes de QS permettant la régulation au sein d'une même population sont très divers et permettent une régulation très fine de différents processus. La spécificité de certains systèmes est telle que cela soulève des questions concernant des moyens par lesquels des espèces différentes pourraient communiquer entre elles. L'existence de systèmes multi-QS permettant la régulation comportementale fine d'une communauté peut être une réponse mais n'est pas la seule (Wellington and Greenberg, 2019). La découverte d'un QS inter-espèce, médié par l'autoinducteur 2 (AI-2), constitue une avancée majeure dans notre compréhension de la communication bactérienne au sein de communautés mixtes de bactéries. Découverte en 1993 par Bonnie Bassler et ses collègues chez *Vibrio harveyi*, cette molécule de signalisation universelle permet aux bactéries de détecter et de répondre à la densité de population non seulement au sein de leur propre espèce, mais aussi dans des communautés mixtes impliquant différentes espèces (Bassler *et al.*, 1993). En 1999, Surette *et al.*, ont mis en évidence que la présence de ce système n'est pas limitée à *V. harveyi*, mais qu'il peut être retrouvé chez de nombreuses autres bactéries qu'elle soit de type Gram positif ou Gram négatif comme *E. coli ou Salmonella typhimurium* (Surette *et al.*, 1999). Ce système de QS "universel" est désormais connu pour être impliqué dans la régulation de nombreux processus tels que la bioluminescence, la formation de biofilm, ainsi que dans l'expression de facteur de virulence comme présentés en 2013 par Min Guo *et al*. (tableau 1) (Guo *et al.*, 2013).

Tableau 1 : Bactéries régulées par la MQS AI-2 (Guo *et al.*, 2013)**.**

Organism	Signaling molecules	Receptors	Phenotype
E. coli	AI-2	LsrB, LsrR	Motility [33], biofilm formation [34]
S. typhimurium	AI-2	LsrB, LsrR	InvF [35]
S. aeurus	AI-2, AIP	AgrC, AgrA	Biofilm formation [36]
S. anginosus	AI-2	unknown	Susceptibility to antibiotics [37]
M. catarrhalis	AI-2	unknown	Biofilm formation and antibiotic resistance [38]
H. pylori	AI-2	TlpB	Motility [39]
V. cholerae	CAI-1, AI-2	CqsS, LuxP	Biofilm formation, virulence factor production and protease [19,40]
V. harveyi	HAI-1, CAI-1, AI-2	LuxN, CqsS, LuxP	Bioluminescence, biofilm formation, colony morphology, siderophore production, type III secretion and metalloprotease production [12,41,42]
V. fischeri	3-oxo-C_6-HSL, C_8-HSL, AI-2	AinR, LuxP, LuxR	Bioluminescence [43]
Y. pestis	3-oxo-C_8-HSL, 3-oxo-C_6-HSL, AI-2	LuxR homologue	Virulence factor expression [44]
A. actinomycetemcomitans	AI-2	RbsB, LsrB	Optimal growth under iron starvation and biofilm development [45]

Ce système de QS inter-espèce repose essentiellement sur l'enzyme LuxS qui est responsable de la production de l'autoinducteur de type 2 (AI-2). Ainsi, LuxS et AI-2 constituent une sorte de "langage universel" entre bactéries, permettant la communication et la coordination au sein de communautés bactériennes mixtes, et jouant un rôle crucial dans la dynamique des écosystèmes microbiens. La présence du gène *luxS* a été identifiée chez plus de 500 bactéries à Gram positif et négatif démontrant ainsi la grande amplitude de la communication AI-2 dépendante (Pereira *et al.*, 2013).

A. Mécanisme de production de l'AI-2

En 2001, Stephan Schauder *et al.* ont identifié la molécule 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD), précurseur de l'AI-2, ainsi que sa voie de biosynthèse (figure 19) (Schauder and Bassler, 2001; Rezzonico and Duffy, 2008).

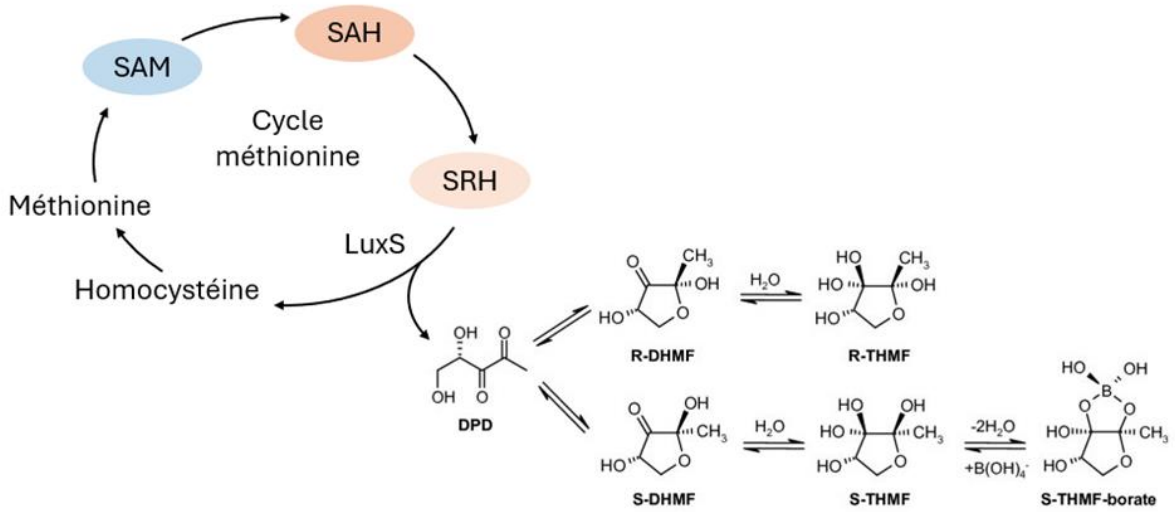


Figure 19 : Synthèse du 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD). Abréviation : S-adénosylméthionine (SAM), S-adénosylhomocystéine (SAH), S-ribosylhomocystéine (SRH), 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD). Adapté de (Rezzonico and Duffy, 2008).

La synthèse de l'autoinducteur 2 (AI-2) est un processus métabolique orchestré par l'enzyme LuxS, présente chez de nombreuses bactéries. Ce processus est intimement couplé au cycle de biosynthèse de la méthionine, allant de la S-adénosylméthionine (SAM) à la méthionine. Ce cycle permet le recyclage de l'adénine et de la méthionine à travers des réactions de méthylation SAM-dépendantes sur de nombreux substrats. La SAM est également un donneur de groupe méthyle essentiel pour la synthèse des polyamines (comme la spermidine), des AHL, et de diverses vitamines (biotine, thiamine, etc.) (Parveen and Cornell, 2011). Pendant ce cycle, la catalyse du S-ribosylhomocystéine (SRH) par l'enzyme LuxS génère de l'homocystéine et du DPD (4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione), qui est le précurseur de l'AI-2. Ce dernier se transforme spontanément et de manière réversible en deux formes distinctes d'AI-2 : la forme (2S,4S)-2-méthyl-2,3,3,4-tétra-hydroxytétra-hydrofurane borate (S-THMF-borate) et la forme (2R,4S)-2-méthyl-2,3,3,4-tétra-hydroxytétra-hydrofurane (R-RHMF) (Miller *et al.*, 2004). Puisque l'AI-2 est un produit dérivé de la voie de biosynthèse de la méthionine, impliquée dans de nombreux processus de méthylation, sa production reflète l'état métabolique global de la cellule. Ce couplage permet ainsi une synthèse peu coûteuse de l'AI-2, tout en fournissant une mesure de l'activité cellulaire.

B. Mécanisme de perception de l'AI-2

Malgré l'existence d'une voie de synthèse d'AI-2 considérée comme 'universelle', il a été prouvé que la perception de ce signal varie entre les organismes, se faisant soit par un

mécanisme à un composant, désigné comme système Lsr, soit par un système à deux composants, connu sous le nom de système Lux (figure 20).

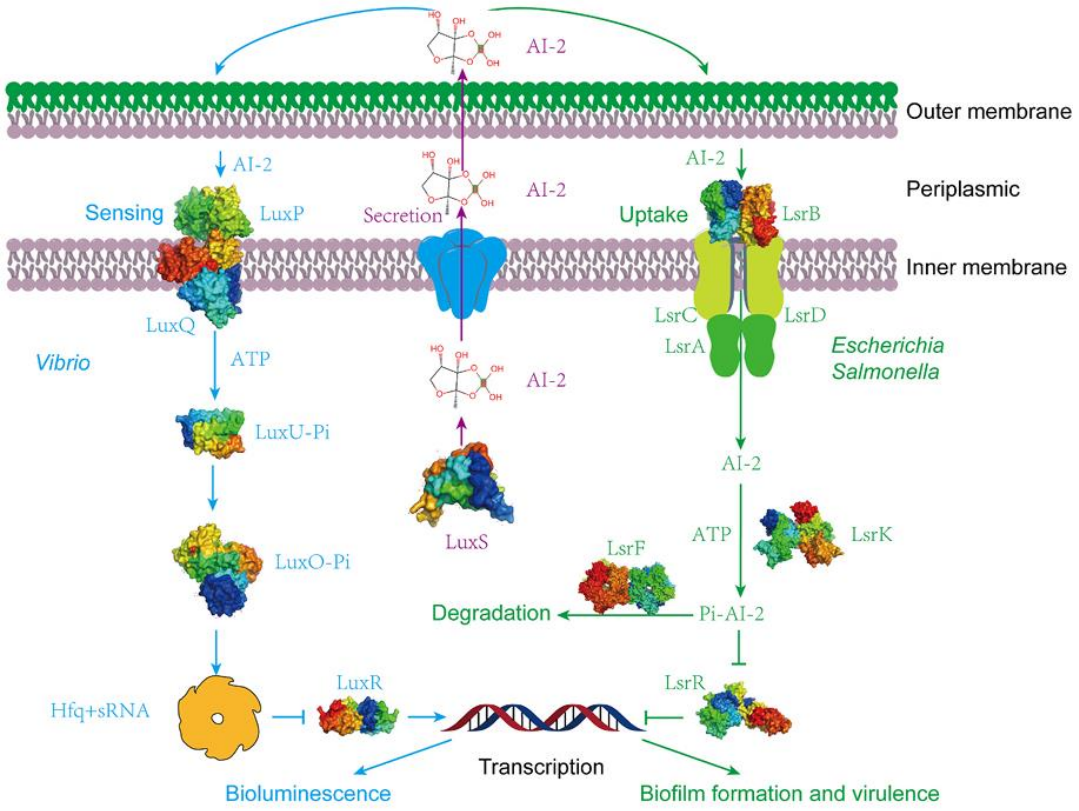


Figure 20 : Schéma des voies de perception du signal AI-2. Les acteurs impliqués dans le système de perception basé sur un système Lsr ou Lux sont indiqués en vert et en bleu, respectivement (Meng *et al.*, 2022).

a. Perception de l'AI-2 par le système Lux

Chez les *Vibrionaceae,* la perception de l'AI-2 est réalisée par le système Lux qui repose sur la reconnaissance de la forme S-THMF-borate de l'AI-2 par le récepteur membranaire LuxP. Une fois liée à l'AI-2, LuxP interagit avec l'histidine kinase LuxQ. À faible densité cellulaire, LuxQ phosphoryle de LuxU qui transfère ensuite le phosphate au régulateur transcriptionnel LuxO qui favorise alors la transcription de l'ARN régulateur Qrr. Qrr a pour rôle, avec la protéine Hfq, de déstabiliser l'ARNm du régulateur transcriptionnel LuxR. À haute densité cellulaire, la concentration AI-2 atteint le seuil critique et celle-ci est reconnue par LuxP. Cette interaction AI-2/LuxP entraine un changement conformationnel du complexe LuxP/LuxQ induisant la déphosphorylation de LuxU qui conduit alors à l'arrêt de la phosphorylation de LuxO, impactant les ARN Qrr. En absence des ARN régulateurs, le régulateur transcriptionnel LuxR est alors traduit induisant la réponse au signal telle que la formation de biofilm ou la bioluminescence (figure 20, en bleu) (Anetzberger *et al.*, 2012).

b. Perception de l'AI-2 par le système Lsr

Le système Lsr repose principalement sur la reconnaissance par la protéine LsrB, récepteur membranaire de la forme R-RHMF de l'AI-2 chez les *enterobacteriacea*, *pasteurellaceae*, *bacillaceae* et les *alphaproteobacteria*. Une fois lié à l'AI-2, LsrB permet l'internalisation du signal *via* LsrACD un transporteur ABC (cassette de liaison à l'adénosine triphosphate). Une fois internalisé, l'AI-2 est reconnu par la kinase LsrK qui le phosphoryle. L'AI-2 phosphorylé se lie alors au régulateur transcriptionnel tétramérique LsrR. En l'absence d'AI-2 phosphorylé, LsrR induit la répression des gènes cibles. La présence d'AI-2 phosphorylé entraîne un changement conformationnel de l'homotétramère LsrR qui a pour conséquence de rompre l'interaction entre LsrR et l'ADN. La levée de la répression par LsrR induit la transcription des gènes cibles impliqués dans différents processus tel que la motilité ou la formation de biofilm qui été jusqu'alors réprimés (figure 20, en vert) (Miller *et al.*, 2004).

En plus de l'entrée *via* LsrB, il a été montré chez *E. coli* par Wang *et al.* que l'AI-2 peut être également internalisé par le système de phosphotransférase du phosphoénolpyruvate (PTS). Les travaux suggèrent que cette internalisation est initiée par un mécanisme dépendant du PTS, et permet une quantité suffisante d'AI-2 intracellulaire pour lever la répression de l'opéron *lsr* et, ainsi, induire l'épuisement de l'AI-2 de l'environnement extracellulaire (Y. Wang *et al.*, 2022).

En parallèle de l'AI-2, plusieurs travaux actuels suggèrent l'existence d'autres molécules de communication universelles, ainsi que la probable présence de récepteurs plus ou moins spécifiques.

C. Autres molécules du QS inter-espèces

Depuis la découverte de l'AI-2 comme MQS universelle d'autres MQS, comme les indoles issus de la dégradation du tryptophane, ont également été identifiées en tant que signaux inter-espèces. Parmi ces molécules, on retrouve l'autoinducteur de type 3 (AI-3), particulièrement important chez certaines bactéries pathogènes, telles que *E. coli* O157 et *Salmonella enterica*, car joue un rôle essentiel dans la régulation de leurs virulences. Contrairement aux autoinducteurs typiques des bactéries à Gram négatif (AHL) ou à Gram positif (AIP), ou même AI-2, l'AI-3 permet non seulement une communication intercellulaire entre bactéries, mais aussi une interaction avec l'hôte eucaryote, notamment par le biais des hormones de stress telles que l'adrénaline et la noradrénaline. Ce mécanisme est détecté par des récepteurs membranaires spécifiques, comme les histidine kinases QseC et QseE, qui activent des cascades de signalisations intracellulaires en réponse à ces signaux. En conséquence, les bactéries peuvent ajuster leurs comportements, augmentant leurs mobilités par la production de flagelles, ou

stimulant la production de toxines, comme la shiga toxine dans le cas d'*E. coli*, ce qui favorise leur virulence (Kim *et al.*, 2020). En parallèle, l'AI-3 est également impliqué dans la formation de biofilms, ces structures collectives résistantes aux traitements, permettant aux bactéries de mieux survivre dans des environnements hostiles. Ce qui rend l'AI-3 particulièrement unique est sa capacité à capter des signaux provenant de l'hôte et à intégrer ces informations pour ajuster les réponses bactériennes, conférant aux pathogènes un avantage adaptatif crucial dans le processus infectieux. Par ailleurs, l'AI-3 peut interagir avec d'autres systèmes de QS, formant un réseau complexe de communication qui coordonne les réponses collectives des bactéries face aux conditions environnementales. Compte tenu de son rôle dans la régulation de la virulence et des réponses bactériennes, le système AI-3 représente une cible thérapeutique prometteuse. En inhibant les récepteurs QseC ou QseE, il serait possible de réduire l'expression des gènes responsables de la virulence, comme ceux impliqués dans la production de toxines et la formation de biofilms, sans affecter la croissance bactérienne. Cette approche pourrait limiter le recours aux antibiotiques traditionnels et combattre l'émergence de la résistance antimicrobienne, un défi majeur en santé publique (Clarke *et al.*, 2006; Wu and Luo, 2021).

5. Quorum sensing : Mécanismes et systèmes non-conventionnels

Comme exposé dans les sections précédentes, les systèmes MQS nécessitent à la fois des voies de production et de perception des molécules de signalisation et ces mécanismes ne fonctionnent pas tous selon le même modèle. Il est possible de classer les organismes en plusieurs catégories en fonction de leurs capacités à produire et/ou percevoir une MQS donnée. Ainsi, certains peuvent à la fois produire et détecter ces signaux, tandis que d'autres ne sont capables que de les percevoir, sans les produire. Pour illustrer ce concept, il est possible de classer les organismes selon leurs capacités à produire et/ou répondre à la molécule "X" une MQS spécifique :

- Les organismes émetteurs et répondeurs : ils sont capables de produire la MQS "X" spécifique et de la détecter pour initier une réponse. Par exemple, *A. fischeri* produit le signal 3-oxo-C6-HSL et est capable de répondre à ce signal.
- Les organismes non émetteurs et non répondeurs : ils sont incapables de produire ou de détecter la MQS "X" donnée. Par exemple, *E. coli* ne produit pas le signal 3-oxo-C12-AHL et n'est pas capable de répondre à ce signal. De ce fait, dans le cas où cette molécule est présente dans l'environnement, elle sera indétectable par la bactérie et elle ne pourra répondre au signal envoyé par son environnement.

- Les organismes partiellement capables : Il s'agit de ceux qui n'ont que l'une des deux fonctions nécessaires pour participer à la communication microbienne, soit la production, soit la détection de la MQS "X", mais pas les deux. Cela signifie qu'ils peuvent interagir de manière limitée dans les réseaux de QS. Par exemple, *E. coli* peut percevoir et répondre à la molécule 3-oxo-C6-homosérine lactone (AHL), une MQS souvent produite par des bactéries à Gram négatif comme *P. aeruginosa*, mais *E. coli* n'est pas capable de la produire. Cette capacité permet à *E. coli* de réagir aux signaux émis par d'autres espèces sans contribuer à leur production, adaptant ainsi son comportement sans participer activement à la communication (Bez *et al.*, 2021). D'autre part, certains organismes peuvent produire une MQS sans pour autant en avoir une utilisation comme mécanisme de communication, du moins décrit jusqu'à présent. Ceci est par ailleurs soutenu par la présence de gène de synthèse de MQS dans de nombreuses souches bactériennes où les mécanismes de détection n'ont pas été identifiés. La présence de gènes tels que *luxS* peut être justifiée de par son importance dans le fonctionnement du métabolisme sans pour autant avoir un rôle supplémentaire tel que dans le QS (Rezzonico and Duffy, 2008).

La combinaison de plusieurs systèmes de communication qu'ils soient complets (émetteur/récepteur) et/ou partiels (partiellement capables) permet une diversification des moyens de perception des organismes présents au sein d'une communauté et illustre la complexité d'un système jusqu'à présent décrit selon un modèle mono espèce et mono QS. De manière intéressante, pour certaines bactéries où plusieurs mécanismes de QS ont été identifiés, l'interconnexion des voies impliquées a été mise en évidence avec soit une régulation commune, soit la présence d'un effet inhibiteur d'un signal sur un autre (Mukherjee and Bassler, 2019). Dans les systèmes de communication partielle, la découverte de bactéries capables de répondre à un signal sans pouvoir le produire a été mise en avant notamment à travers l'étude des AHLs. En effet, de nombreux organismes ne contenant pas la protéine LuxI permettant la synthèse d'AHL ont montré leurs capacités à percevoir le signal et y répondre *via* la présence d'une protéine LuxR alors appelée "orpheline" ou "solo" (Brameyer and Heermann, 2017; Bez *et al.*, 2021). Un exemple représentatif de cette versatilité de réseaux de communication est *E. coli*, qui lui permet une adaptation rapide aux changements de conditions environnementales (figure 21).

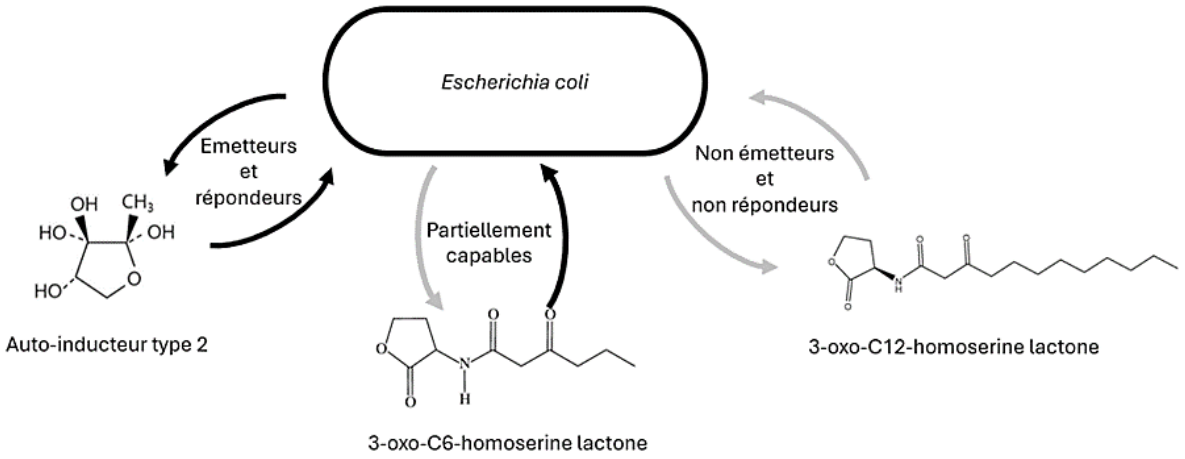


Figure 21 : Représentation schématique du quorum sensing chez *E. coli*. Les flèches représentent selon l'orientation la capacité (en noir) ou non (en gris) d'émettre ou de répondre à un signal donné.

Ce lien entre adaptation aux changements de l'environnement et QS est illustré par les travaux en 2020 de Mashruwala et Bassler. Ces derniers ont mis en avant, la capacité de *V. cholerae* à adapter son mécanisme de communication en fonction des conditions environnementales. En condition anaérobie, *V. cholerae* ne produit plus la MQS CAI-1 mais continue de produire la MQS autoinducteur 3,5-dimethyl-pyrazin-2-ol (DPO) permettant une modulation de sa virulence. La réalisation de délétant de chacun des mécanismes de QS (CAI-1, AI-2, DPO) a permis de déterminer ce lien entre changement de comportement et type de QS (Mashruwala and Bassler, 2020). Cette observation vient appuyer la capacité de *V. cholerae* à détecter les autres organismes et à adapter son comportement en fonction des signaux présents dans son environnement. Ainsi, si *V. cholerae* est minoritaire (majorité de signaux inter-espèces type AI-2), le choix de favoriser la dispersion sera privilégié, tandis que si elle est majoritaire (majorité de signaux intra-espèces), la formation d'un biofilm et l'expression des gènes impliqués dans la virulence seront choisies. Cependant, les mécanismes moléculaires exacts impliqués dans cette régulation restent encore à découvrir (Bridges and Bassler, 2019).

Pour compléter cette complexité de réseaux de communication bactérienne, de nouveaux mécanismes non canoniques ont été mis en évidence chez de nombreux organismes capables de produire ou de répondre à l'AI-2 mais ne possédant ni d'homologue de la protéine LuxP ou LsrB. En 2020, Lei Zhang *et al*. ont, par exemple, mis en évidence l'utilisation du domaine CACHE des protéines PctA et TlpQ deux MCP (Methyl-accepting Chemotaxis Proteins) de *P. aeruginosa* pour la perception de l'AI-2 (Zhang *et al.*, 2020). Les MCP jouent un rôle crucial dans le chimiotactisme des bactéries, c'est-à-dire la capacité de la bactérie à détecter des sources attractives (par exemple, des nutriments) ou répulsives, puis à transmettre l'information pour se

déplacer vers ces sources ou s'en éloigner. Ces récentes découvertes concernant la présence de systèmes analogues soulèvent la question de la capacité de certains organismes, ne possédant pas les systèmes canoniques, à produire ou répondre à une MQS. Cela pose également la question de l'évolution et la transmission de ces systèmes. La capacité à pouvoir produire/répondre à un signal spécifique soulève la question de la coévolution de certaines espèces.

Charles Bernard *et al*. (2023) ont récemment mis en évidence des événements de coévolution potentielle grâce au développement d'un outil bio-informatique permettant l'analyse *in silico* de MQS potentielles. Leur étude a permis l'identification de nouveaux systèmes RRNPP de QS et a permis de détecter non seulement des systèmes de QS déjà connus, mais aussi des fonctionnalités inédites au sein des relations coévolutives entre bactéries, plasmides et virus. L'analyse révèle que la complexité des systèmes de QS, couplée à la diversité considérable des molécules de signalisation, constitue un défi pour ce type d'approches, notamment dans la prédiction et la caractérisation de nouveaux systèmes. Les comparaisons effectuées entre différents systèmes de QS soulignent des similarités mais aussi des différences significatives, suggérant des convergences évolutives dans certaines lignées bactériennes, tout en illustrant des divergences ailleurs. Ces résultats fournissent de nouvelles perspectives sur l'évolution des mécanismes de QS, souvent influencée par les interactions symbiotiques ou parasitiques, et ouvrent la voie à des discussions sur la coévolution bactérienne avec d'autres organismes tels que les virus. L'étude montre ainsi que, malgré les obstacles techniques liés à la diversité des MQS, de nouvelles technologies bio-informatiques comme le RRNPP_Detector sont capables de révéler des modèles évolutifs complexes et contribuent à une meilleure compréhension des trajectoires évolutives de ces systèmes de communication microbienne (Rao *et al.*, 2016; Rutbeek *et al.*, 2021; Bernard *et al.*, 2023).

6. Mécanismes anti-QS : Quorum sensing inhibiteurs et quorum quencher

Dans les paragraphes précédents, nous avons exposé comment les mécanismes de QS jouent un rôle clé dans la régulation des facteurs de virulence et la formation de biofilms chez de nombreuses espèces bactériennes. Ce rôle majeur fait de ce mécanisme une cible de choix pour moduler l'activité microbienne et de nombreux organismes tant procaryotes qu'eucaryotes ont mis en place des stratégies pour bloquer ou interférer avec ce processus. Par exemple, les *Bacillus* produisent des enzymes dégradant les molécules de QS, ce processus appelé "quorum quenching" (QQ), empêche les autres bactéries de coordonner leurs réponses collectives. Chez les eucaryotes, certaines algues produisent également des composés capables d'inhiber les

signaux QS bactériens, perturbant ainsi la communication entre les bactéries pathogènes. Ce mécanisme de QQ permet à ces organismes de se défendre contre des bactéries opportunistes ou de maintenir un équilibre au sein des communautés microbiennes en empêchant des comportements nuisibles tels que la formation de biofilms ou la production de toxines. Ce processus de QQ qui permet de contrôler le fonctionnement microbien à l'échelle de la communauté, représente une stratégie prometteuse tant dans le domaine médical que dans l'industrie, qu'il s'agisse par exemple de combattre la résistance des bactéries aux antibiotiques ou de réduire les impacts économiques liés à la formation de biofilms (Dong *et al.*, 2007; Lewis, 2007; Kalia, 2013). L'inhibition de la communication microbienne a aussi des applications notables dans d'autres secteurs, comme l'industrie pétrolière, le traitement des eaux usées ou encore le secteur maritime. Dans ces domaines, la formation de biofilms indésirables peut entraîner de lourdes pertes économiques (Lade *et al.*, 2014). Par conséquent, l'étude et le développement de nouvelles stratégies anti-QS sont essentielles pour améliorer la gestion des comportements bactériens et optimiser ainsi les processus industriels.

L'étude de Min Guo *et al.* de 2013 regroupe les différentes cibles potentielles des systèmes de QS dépendants de l'AI-2, soulignant les différentes possibilités de blocage des voies de QS (figure 22) (Guo *et al.*, 2013).

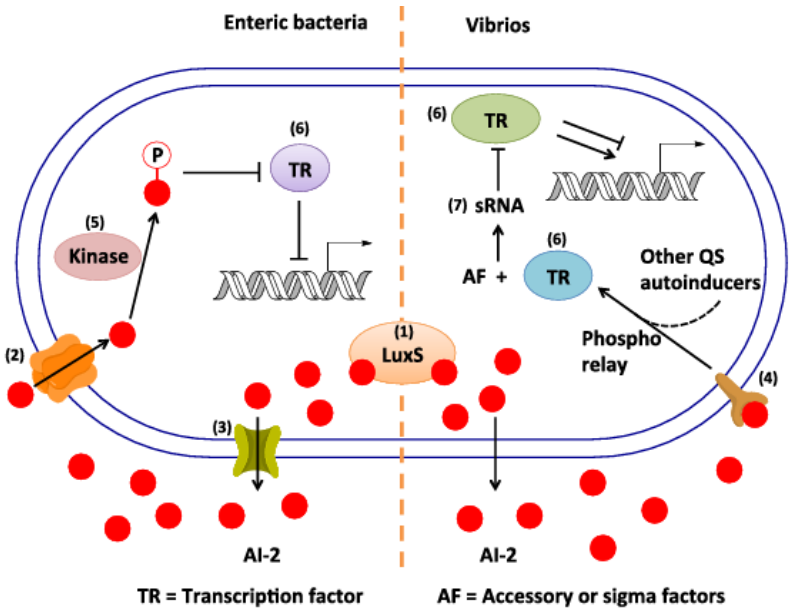


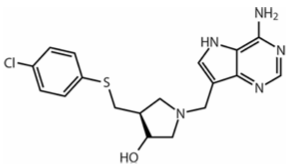
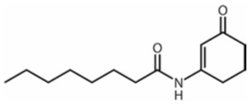
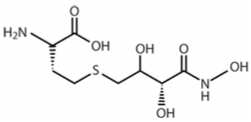
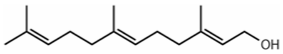
Figure 22 : Représentation des différentes cibles anti-QS possibles des systèmes à un composant et à deux composants. (1) LuxS; (2) AI-2 transporteur ; (3) Pompe à efflux ; (4) Récepteur extracellulaire de l'AI-2 ; (5) récepteur intracellulaire de l'AI-2 ; (6) régulateur transcriptionnel ; (7) ARN régulateur (Guo *et al.*, 2013).

Tout comme les mécanismes de QS, il est possible de classer les stratégies anti-QS en fonction de leurs cibles, allant de l'émission du signal à la réponse au signal.

A. Inhibition de la synthèse des MQS

Afin de contrôler le QS, l'une des stratégies développées a consisté à rechercher/synthétiser des molécules inhibitrices (QSI) des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des MQS telles que LuxS pour la synthèse de l'AI-2 ou LuxI pour la synthèse des AHL. Cette recherche a beaucoup mobilisé les chimistes, en particulier sur les aspects synthèses de différents inhibiteurs, souvent dans un objectif applicatif comme celui de réduire la pathogénicité de certaines souches en développant des molécules inhibitrices des enzymes impliquées dans la synthèse des MQS (Ghosh *et al.*, 2020). Ainsi Breah LaSarre et Michael J. Federleb, ont mis au point l'inhibiteur synthétique J8-C8 qui cible la protéine TofI (LuxR-like) de la bactérie phytopathogène du riz *Burkholderia glumae* (LaSarre and Federle, 2013). L'ajout de cette molécule de synthèse permet l'inhibition de la production du signal AHL en imitant et remplaçant l'acyl-ACP. L'inhibition du QS par ce QSI conduit à la suppression de la production de la toxoflavine qui est un inhibiteur de la germination du riz (Choi *et al.*, 2023). Leurs travaux montrent aussi un exemple d'inhibition du QS de type AI-2, par un analogue de la molécule SHR, le 3,5,6-trideoxy 6-fluorohex-5-enofuranose, qui a une forte affinité pour la protéine LuxS et apparait comme bonne stratégie de QQ AI-2. Ces molécules inhibitrices peuvent aussi être produites par les bactéries ou levures elles même comme cela est le cas chez *C. albicans* qui produit le QSI naturel, appelé farnesol, capable d'inhiber la production de Pqs chez *P. aeruginosa* (tableau 2) (LaSarre and Federle, 2013).

Tableau 2 : Liste de QSI synthétiques et naturels ciblant l'étape de synthèse des MQS (LaSarre and Federle, 2013)**.**

Category	Inhibitor	Structure	Target(s)
Synthase inhibitors			
Synthetic	*p*ClPhT–DADMe–ImmA		MTAN
	JA-C8		TofI (LuxI family, *B. glumae*)
	Compound 10		LuxS
Natural source	Farnesol		PqsA

B. Inhibition de la réponse au MQS

Si l'inhibition des enzymes responsables de la synthèse des MQS constitue une stratégie pour bloquer le QS, cette approche peut engendrer des modifications comportementales au sein des bactéries en raison des relations étroites entre le métabolisme et la synthèse des MQS. Par conséquent, ces modifications pourraient, à terme, compromettre l'efficacité de cette stratégie. Une autre stratégie repose donc sur l'incapacité d'une cellule à percevoir le signal. Pour cela plusieurs approches sont possibles telles que la dégradation/rétention des MQS ou l'inhibition des récepteurs membranaires (ou cytoplasmiques) permettant ainsi d'empêcher l'activation des mécanismes sous-jacents.

C'est en étudiant les mécanismes de QS que les protéines appelées quorum quencher (QQ) ont été retrouvées chez certains organismes. Ces enzymes, découvertes jusqu'à présent dans les systèmes AHL, ont permis de révéler l'existence de mécanismes écologiques compétitifs où le signal d'une espèce est inhibé par une autre (Dong *et al.*, 2007) (figure 23).

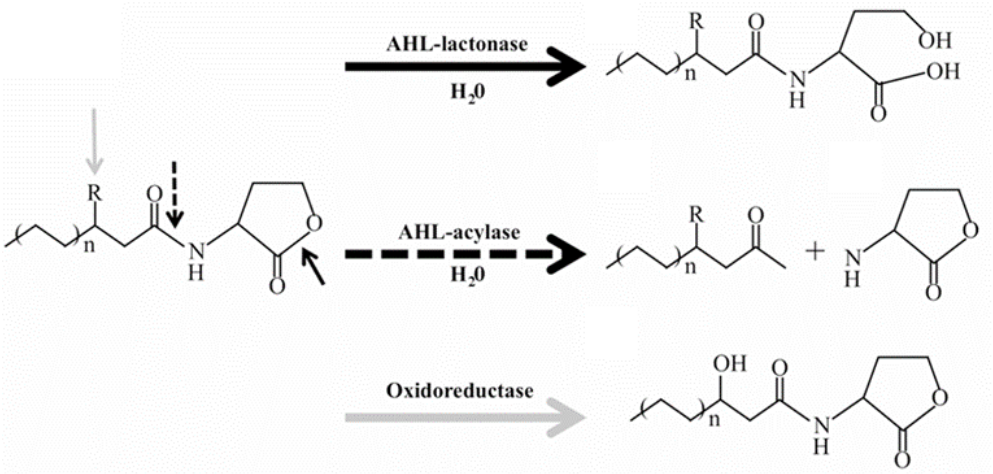


Figure 23 : Activité enzymatique permettant la dégradation des MQS de type AHL. Adapté de (Kimura, 2014).

Dans l'étude de Nobutada Kimura de 2014, la description de QQ de plusieurs bactéries a permis de définir trois groupes en fonction de leurs activités enzymatiques anti-AHL (Kimura, 2014) :

- les AHL-lactonases ; Par exemple *Agrobacterium fabrum* C58 produit les AHL-lactonases BlcC et AiiB. La production de ces QQ permet la régulation des mécanismes QS dépendants tels que le transfert du plasmide Ti porteur des gènes de virulence selon l'environnement (Dessaux and Faure, 2018). À l'inverse, dans le cas de *A. tumefaciens*, la production de la lactonase BlaC dégradant son propre signal 3-O-C8-HSL a été décrite comme n'empêchant pas le transfert du plasmide Ti car la dégradation de la MQS serait induite uniquement lors du passage en phase stationnaire ou en condition de carence nutritionnelle (Zhang *et al.*, 2004).

- les AHL-acylases ; Par exemple, *Actinoplanes utahensis* produit deux QQ appelés aculeacin A acylase (AuAAC) et N-acyl-homosérine lactone acylase (AuAHLA) dont l'utilisation sur une culture de *P. aeruginosa* PAO1 a induit la dégradation de l'AHL 3-oxo-C12-HSL synthétisée permettant une diminution de la formation du biofilm (De Celis *et al.*, 2021).

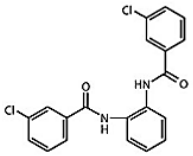
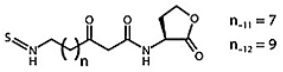
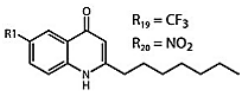
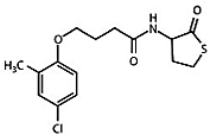
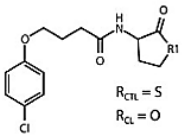
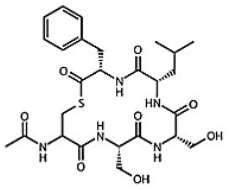
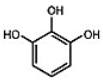
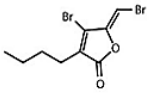
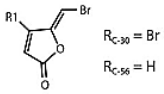
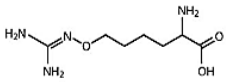
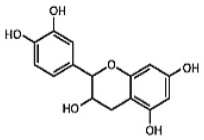
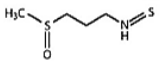
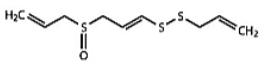
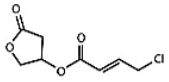
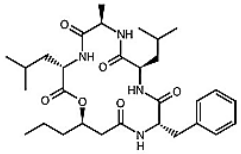
- les oxydoréductases ; Les oxydoréductases constituent une classe de QQ qui jouent un rôle dans la modulation des systèmes de QS chez diverses bactéries. Par exemple, *Bacillus megaterium* produit une protéine appelée CYP102A1, qui est un cytochrome P450. Ce type d'enzyme est bien connu pour sa capacité à catalyser des réactions d'oxydation, et dans le cas de CYP102A1, il est capable d'oxyder la chaîne acyle des AHL.

En oxydant cette chaîne, CYP102A1 modifie la structure des AHL, ce qui inhibe leur fonction en tant que signaux de QS (Chowdhary *et al.*, 2007).

Plus récemment, des travaux ont mis en évidence l'existence d'enzymes telles que les AHL décarboxylases et les désaminases, qui jouent un rôle significatif dans la modulation des systèmes de QS au sein des communautés bactériennes. Les AHL décarboxylases sont des enzymes capables de retirer un groupe carboxyle des AHL, transformant ainsi ces molécules de signalisation en dérivés inactifs. Ainsi, l'AHL décarboxylase AiiA produite par *Bacillus thuringiensis* en inhibant la capacité de communication entre les bactéries *via* ce processus de décarboxylation d'AHL réduit la virulence et de la formation de biofilms chez des souches de *P. aeruginosa*. Les AHL désaminases sont quant à elles des enzymes qui modifient les molécules de N-acyl-homosérine lactone (AHL) en retirant un groupe amine. Ainsi, l'enzyme PvdQ, produite par certaines souches de *P. aeruginosa* peut réduire l'expression de gènes associés à la virulence, à la formation de biofilms et à d'autres comportements dépendants du QS en désaminant les AHL (Kalia, 2013).

La deuxième approche pour bloquer la perception du signal consiste à inhiber les récepteurs membranaires ou cytoplasmiques, qui sont essentiels pour la communication entre bactéries. Cette stratégie qui inhibe la perception du signal permet de bloquer la cascade de réactions se mettant en place après que le signal ait été internalisé dans la cellule. Dans leur étude de 2013, Breah LaSarre *et al*. ont compilé une liste de modulateurs de quorum sensing (QSI) qui peuvent inhiber ces récepteurs, tant parmi les composés synthétiques que naturels. Par exemple, le composé synthétique chloro-thiolactone (CTL) est un antagoniste du récepteur CviR chez *Chromobacterium violaceum*, qui est connu pour sa capacité à bloquer la réponse QS induite par l'AHL C6 HSL (Swem *et al.*, 2009; LaSarre and Federle, 2013). En agissant sur ce récepteur, CTL peut diminuer la production de violacéine, un pigment associé à la virulence et à la formation de biofilms. Des inhibiteurs naturels comme les flavonoïdes, trouvés dans diverses plantes, ont également montré une capacité à interférer avec les voies de signalisation des MQS en inhibant les récepteurs liés à ces peptides. La liste des inhibiteurs et les récepteurs qu'ils visent sont listés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Liste de QSI synthétiques et naturels ciblant l'étape de perception des MQS (LaSarre and Federle, 2013).

Category	Inhibitor	Structure	Target(s)
Synthetic	TP-5		LasR
	Itc-11, -12		LasR (covalent)
	Compounds 19 and 20		PqsR
	4606-4237		LuxN, CviR
	CTL, CL		CviR
	trAIP-II		AgrC
Natural sources	Pyrogallol		AI-2 analog
	Furanone C-2		LuxR family (and possibly LuxS)
	Furanone C-30, -56		LuxR family
	Canavanine		LuxR family
	Catachin		LuxR family
	Iberin		LasR, RhlR
	Ajoene		LuxR family
	Honaucin A		LuxR family
	Solonomide A, B		AgrC

Comme l'illustrent les exemples présentés ci-dessus, les recherches sur les molécules inhibitrices du quorum sensing (QS) ouvrent des perspectives prometteuses pour des applications tant pharmaceutiques qu'industrielles, en proposant des stratégies innovantes pour éliminer les bactéries ou contrôler leur prolifération (Bhargava *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2022).

7. Conclusion et évolution du concept de quorum sensing

Comme on a pu le voir le long de cette partie, depuis l'introduction de la notion de QS par Fuqua *et al*. en 1994, qui a permis de définir la réponse transcriptionnelle à une densité de population *via* des molécules signal, le champ de recherche a connu de nombreuses évolutions (Fuqua *et al.*, 1994). Les travaux de Bassler *et al*. la même année ont élargi le concept en mettant en évidence un second mécanisme de QS, l'AI-2, chez *V. harveyi*, suggérant une communication multilingue chez les bactéries (Bassler *et al.*, 1994).

Le concept a ensuite été "affiné" en 2005 par Waters et Bassler, où la coordination est alors décrite comme dépendante de la capacité d'un organisme à produire, percevoir et répondre à une MQS (Waters and Bassler, 2005). En 2008, Novick *et al*. recentrent la notion de QS sur la capacité bactérienne à produire un signal qui s'accumulera si l'environnement est restreint, tels qu'une fiole de laboratoire, l'organe lumineux d'un animal marin, une seule cellule eucaryote ou une cavité d'abcès (Novick and Geisinger, 2008). Cette notion d'environnement restreint a récemment été modulée par l'inclusion de mécanismes de communication en milieu ouvert, grâce à la présence de microniches qui permettent la formation de gradients de concentration locaux dans des systèmes ouverts (Bihary *et al.*, 2014; Marenda *et al.*, 2016; Urvoy *et al.*, 2022).

En 2010, Carnes *et al*. ont démontré la capacité de *S. aureus* à répondre au QS et ce même si la bactérie est seule par une approche de cellule unique. Cette découverte qui démontre la capacité d'une bactérie à s'affranchir de la présence de partenaire, y compris de sa propre espèce, pour activer une réponse au QS, remet alors en question la notion même du terme "quorum" dans le "quorum sensing". En pointant la capacité pour une bactérie "isolée" à activer les voies régulées par le QS, ces résultats ouvrent vers un potentiel rôle du QS dans l'activation de système à une faible concentration cellulaire comme cela peut être le cas lors d'infections latentes (Carnes *et al.*, 2010). En parallèle à ces avancées et parfois évolution de concept dans le monde bactérien, des études telles que celles de Zhang *et al*. de 2012 et d'Albuquerque et Casadevall, également de 2012, ont mis en avant la présence de MQS chez les archaea et les champignons, démontrant que la notion de QS est commune dans le domaine du vivant (Albuquerque and Casadevall, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

En 2020, les travaux de Heiko Babel *et al.* initient un changement de paradigme en mettant en avant la distinction entre les mécanismes : 1) dépendants du QS (où la réponse dépend de la densité de population), 2) dépendants du ratio de population, appelé ratiométrique (où la réponse nécessite un ratio spécifique, par exemple une majorité d'une espèce au sein d'une communauté), 3) ou dépendants du temps, appelé chronométrique (où le signal est directement perçu mais la réponse engendrée est tardive) (figure 24) (Babel *et al.*, 2020). Cette différenciation entre les mécanismes de communication amène à une réflexion sur la capacité d'un organisme à cumuler la perception de plusieurs signaux et donc à y répondre dans des conditions *in situ* où l'accumulation de signaux peut être limitée par la diffusion des MQS, contrairement à un environnement restreint.

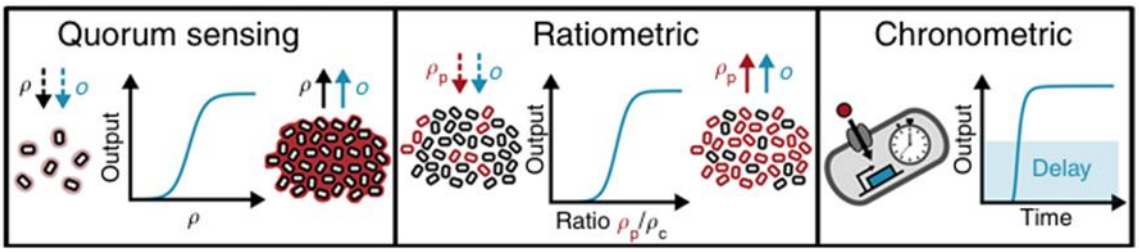


Figure 24 : Différentiation des mécanismes de réponse aux MQS. "ρ", "o", "ρ_p", "ρ_c" représentant, respectivement, la production de signal, la réponse au signal, la population produisant le signal et la population entière (Babel *et al.*, 2020).

En 2021, Jordi van Geste *et al.* ont par leurs travaux démontré l'impact de micro-communications au sein d'une population faisant le lien avec la notion de ratiométrie dans les mécanismes de communication. De plus leurs travaux pointent l'existence de l'hétérogénéité possible au sein d'une communauté (van Gestel *et al.*, 2021). Ainsi, malgré un concept initial voulant le QS comme mécanisme de coordination d'une population, la possibilité d'avoir une réponse hétérogène semble maintenant devoir être prise en considération (Spacapan *et al.*, 2023).

Ces notions d'hétérogénéité de perception et réponse viennent s'ajouter à la complexité déjà propre à la compréhension des mécanismes moléculaires du QS et remettent fondamentalement en question la perception initiale basée uniquement sur un seuil de densité de population. La découverte de nouveaux mécanismes et modes de fonctionnement permettra probablement, à l'avenir, une classification des mécanismes selon différentes sous-classes de QS, voire la mise en place d'une nouvelle terminologie.

Une meilleure compréhension des comportements à l'échelle individuel mais aussi collectif permettra à terme une meilleure compréhension des écosystèmes et l'acquisition

d'outils puissants pour le contrôle des microorganismes. Outre les avancées sur la compréhension d'un processus vital et certainement plus large que ce que l'on imaginait, comprendre et manipuler les mécanismes de communication microbienne ouvrent la voie à des innovations dans la biotechnologie, la médecine et la gestion environnementale.

En dépit des avancées dans la compréhension des mécanismes de QS, de QSI et de QQ, ainsi que l'élargissement de nos connaissances sur la répartition de la diversité microbienne au sein des écosystèmes, la conception de consortia synthétiques optimisés basés sur la communication bactérienne reste complexe, mais envisageable. La réalisation de tels consortia, exploitant le QS et d'autres mécanismes de régulation microbienne comme le QQ, permettrait de mieux contrôler les interactions entre espèces et de moduler leur activité dans divers environnements. Cependant, peu de consortia synthétiques reposent sur cette approche en raison des difficultés persistantes à modéliser les interactions issues de cette communication. De plus, les mécanismes de QS étant souvent spécifiques à une espèce, seuls les systèmes plus généraux ou universels, tels que l'AI-2, peuvent être pris en compte pour un éventail plus large d'organismes, ce qui peut s'avérer trop restrictif pour certaines études. Néanmoins, la conception de consortia artificiels, où les bactéries partenaires sont génétiquement modifiées pour émettre ou répondre spécifiquement à des signaux de communication, représente une voie prometteuse (Kylilis *et al.*, 2018; Alnahhas *et al.*, 2020; Stephens and Bentley, 2020).

III. Modèle d'étude

1. Clostridium acetobutylicum ATCC 824

A. Historique

L'histoire de la bactérie *Clostridium acetobutylicum*, a débuté en 1912, lorsque le biochimiste Chaim Weizmann l'a isolée pour la première fois, mettant en lumière son grand potentiel pour la production d'acétone et de butanol. Dans le contexte de l'essor technologique de la fin du 19ème siècle et du début du 20ème siècle, la demande en caoutchouc avait considérablement augmenté et l'acétone et le butanol étaient alors utilisés dans la production d'isoprène et de butadiène, des monomères clés pour la fabrication du caoutchouc synthétique. Ce besoin en acétone a augmenté lors de la Première Guerre Mondiale, celui-ci entrant dans la composition de la cordite (un explosif à base de nitroglycérine). C'est à cette période, qu'en dépit d'un manque de connaissance sur le métabolisme de *C. acetobutylicum*, que le développement de cultures à grande échelle de *C. acetobutylicum* a débuté, avec la mise en place du procédé de Weizmann. Ce procédé permettait la production d'acétone *via* la fermentation du maïs par la bactérie dans des fermenteurs de gros volume. Cependant, la découverte de procédés pétrochimiques, plus rentables a conduit à une diminution de l'utilisation de ces fermenteurs et de ce mode de production (Gabriel, 1928; Jones and Woods, 1986). C'est à la fin du 20ème siècle que la demande croissante pour des bioproduits tels que les biocarburants et le biogaz, utilisant des ressources à faibles valeurs ajoutées, a ravivé l'intérêt pour *C. acetobutylicum*.

B. Métabolisme du carbone chez *Clostridium acetobutylicum*

C. acetobutylicum est une bactérie à Gram positif anaérobie stricte en forme de bâtonnet droit de 0,5-0,9 µm de largeur et de 1,5-6 µm de longueur (Janssen *et al.*, 2014). Principalement retrouvée dans le sol, *C. acetobutylicum* a également été isolée dans divers types d'environnements comme les boues de caves à alcool (He *et al.*, 2017), les déchets agricoles (Al-Shorgani *et al.*, 2016), le papier usagé ou encore la mélasse de canne à sucre (Owuna *et al.*, 2018). Ce biotope est en lien avec le rôle clé de cette bactérie dans la dégradation de sucres complexes tels que l'amidon et la cellulose (Hermann *et al.*, 1985). Mise en avant pour sa capacité à produire de l'acétone et du butanol à travers la fermentation du maïs, *C. acetobutylicum* est également capable d'utiliser plusieurs substrats comme source de carbone et d'énergie tels que le glucose, la cellobiose ou le xylose (Gabriel, 1928; López-Contreras *et al.*, 2004). Dans le cas de la consommation de glucose, l'étape de glycolyse permet la conversion d'une mole de glucose en deux moles de pyruvate à travers une série de réactions enzymatiques permettant la formation de deux moles d'adénosines triphosphates (ATPs) et de nicotinamides adénines dinucléotides

hydrogénés (NADHs). Le pool de pyruvate généré est pris en charge par la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (Pfor) qui catalyse la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA). Lors de cette réaction, deux moles de ferrédoxine par mole de pyruvate utilisée sont produites par la Pfor. Les deux moles de ferrédoxine réduites sont ensuite réoxydées par la ferrédoxine-hydrogénase (Hyd), libérant deux moles d'hydrogène (H_2). Une partie du pool de pyruvate produit peut également être utilisée pour la production de lactate *via* la lactate déshydrogénase (Ldh), ce qui engendre la consommation d'une mole de NADH (nicotinamide adénine dinucléotide). Le pyruvate peut également être utilisé pour produire de l'acétoïne dont la synthèse n'est pas encore totalement décryptée mais dont les premiers travaux pointent vers la présence d'une acétolactate synthase (ALS) transformant le pyruvate en acétolactate qui est transformé par une acétoacétate décarboxylase (Aldh) (Foulquier *et al.*, 2022). Lors de l'acidogénèse, l'acétyl-CoA formé par la Pfor va être transformé en acides organiques, d'une part en acétate et d'autre part en butyrate (Qi *et al.*, 2018). L'export de l'acétate et du butyrate, alors produits finaux du métabolisme, se fait par diffusion passive à travers la membrane vers le milieu extracellulaire et entraine l'acidification du milieu (Terracciano and Kashket, 1986; Michel-Savin *et al.*, 1990). L'accumulation toxique de l'acétate et du butyrate associée à la diminution du pH conduit à un métabolisme de solvantogénèse où ces derniers, l'acétate et le butyrate, seront réinternalisés toujours par diffusion passive dû à l'effet de gradient pH engendré, ils seront alors convertis en butanol, acétone et éthanol (Jones and Woods, 1986; Terracciano and Kashket, 1986). Les avancées dans la compréhension de son métabolisme, son intérêt biotechnologique ainsi que le développement d'outils génétiques chez *C. acetobutylicum* ont conduit à l'élaboration de stratégies visant à canaliser le flux métabolique dans une direction spécifique (figure 25) (Jang *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2019).

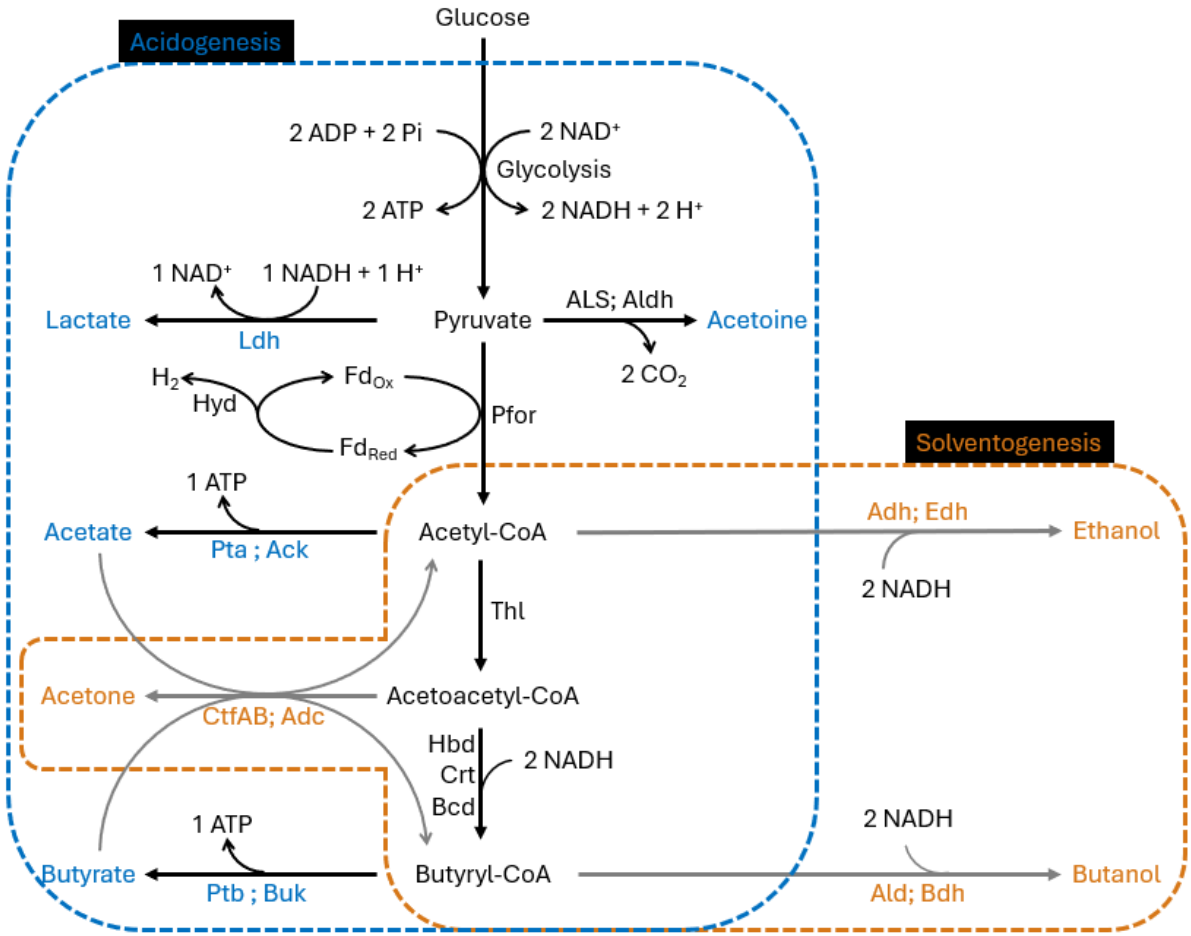


Figure 25 : Métabolisme central simplifié de *C. acetobutylicum*. Les abréviations en noir représentent les enzymes communes aux voies de solvantagénèse (orange) et acidogénèse (bleu) : Pfor (pyruvate ferrédoxine oxydoréductase), Hyd (hydrogenase), Thl (thiolase), Hbd (3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase), Crt (crotonase), et Bcd (butyryl-CoA déshydrogénase). Les abréviations en bleu indiquent les enzymes spécifiques à l'acidogénèse : Ldh (lactate déshydrogénase), Pta (phosphotransacétylase), Ack (acétate kinase), Ptb (phosphotransbutyrylase), et Buk (butyrate kinase). Les abréviations en orange sont pour les enzymes impliquées dans la solvantogénèse : Adh (aldéhyde/alcool-déshydrogénase), CtfAB (acétoacétyl-CoA : acétate/butyrate-coenzyme A transférase), ALS (acétolactate synthase), Aldh (Acétoacétate décarboxylase) ; Adc (acétoacétate décarboxylase), Ald (butyraldéhyde déhydrogénase), et Bdh (butanol déshydrogénase). Autres abréviations : CoA (Coenzyme-A), $Fd_{OX/Red}$ (ferrédoxine oxydée (OX) ou réduite (Red)). Adaptée de (Diallo *et al.*, 2021; Jang *et al.*, 2021).

C. Cycle de vie de C. acetobutylicum

Selon les conditions environnementales, *C. acetobutylicum* peut se trouver sous forme végétative (active) planctonique ou en biofilm lui permettant la multiplication cellulaire, ou sous forme de spore (dormante) pour se protéger dans des conditions environnementales défavorables (figure 26) (Lütke-Eversloh and Bahl, 2011).

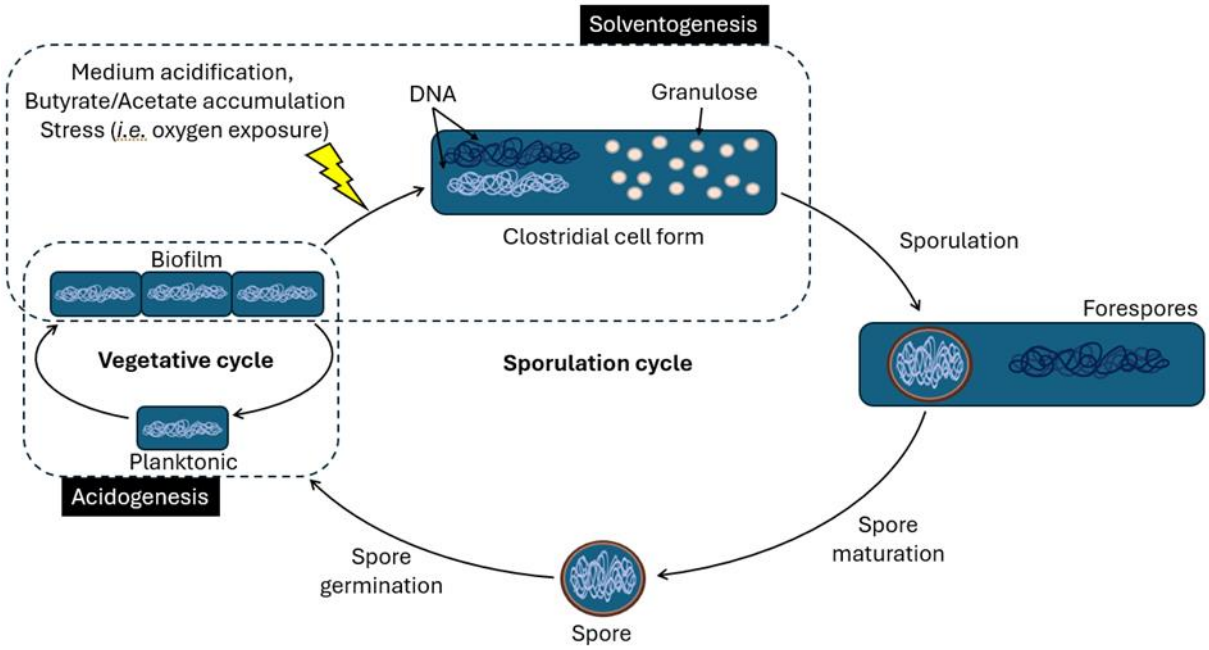


Figure 26 : Cycle de vie de *C. acetobutylicum*. Adaptée de (Lütke-Eversloh and Bahl, 2011; Al-Hinai *et al.*, 2015).

Sous forme planctonique *C. acetobutylicum* est capable de se mouvoir grâce à ses flagelles péritriches (Biebl, 1999). L'étude comparative menée par Carlos J. Paredes *et al.* de 2005 met en lumière dans le génome des *Clostridies* des gènes codant pour des protéines de chimiotaxie et d'assemblage de flagelles similaires à celles de *Bacillus* et *Listeria* (Paredes *et al.*, 2005). Les gènes codant les protéines CheY, CheA, CheB, CheC, CheD, CheR, CheV, et CheW, ainsi que des protéines flagellaires comme Hag, FliD et FliY, ont été identifiés chez *C. acetobutylicum* et *C. tetani*. C'est la phosphorylation, *via* CheA, de CheY qui permet l'interaction avec FliY, modifiant ainsi la direction du flagelle, et permet à la bactérie de nager vers ou à l'opposé des stimuli (Wadhams and Armitage, 2004). *C. acetobutylicum* est également capable de former un biofilm en se structurant en chainettes non motiles et en produisant des substances polymères extracellulaires (EPS) (Liu *et al.*, 2018). Les gènes impliqués dans la formation de biofilm ont été étudiés (Yang *et al.*, 2020). L'implication de la protéine Spo0A (connue comme étant un facteur régulateur majeur) a été discutée pour son rôle dans la formation du biofilm et des structures filaires (également appelée "wire-like") (Engel *et al.*, 2020) et la possibilité que ces structures filaires permettent la connexion entres les cellules et ainsi favoriseraient la structuration du biofilm a été faite. Le rôle, dans la régulation du biofilm chez *C. acetobutylicum,* d'un homologue de la protéine SinR connue comme étant un antagoniste pour la formation du biofilm chez *B. subtilis*, est également envisagé par Dong Liu en 2018 et Huifang Zhang en 2021 (Liu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021). En terme métabolique, la formation du biofilm a également été étudiée comme alternative pour une meilleure production de bio-butanol (Liu *et al.*, 2014).

De façon intéressante la formation de biofilm semble aussi liée à la sporulation chez *C. acetobutylicum*. En effet, la protéine Spo0A précédemment citée a également été étudiée pour son rôle important dans le passage de l'acidogénèse à la solvantogénèse et la sporulation. (Harris *et al.*, 2002; Alsaker *et al.*, 2004). Le passage de l'acidogénèse à la solvantogénèse a souvent été discuté comme étant étroitement lié au passage en phase stationnaire avec une forte dépendance à la composition du milieu (pH, accumulation d'acétate/butyrate ou encore présence d'oxygène) (Jones and Woods, 1986). Tout comme le passage en solvantogénèse, la formation des granules initiant la sporulation semble débuter lors du passage en phase stationnaire (figure 26) (Lütke-Eversloh and Bahl, 2011). Néanmoins, les études de Shawn W. Jones 2011 et plus récemment celles de Dong Liu de 2018 mettent en avant la capacité de passer en solvantogénèse tout en restant à l'état végétatif démontrant ainsi une possible régulation supplémentaire nécessaire pour l'initiation de la sporulation (Jones *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2018).

Ainsi, le mécanisme moléculaire exact permettant la régulation du passage à un métabolisme de solvantogénèse et à la formation de spore reste encore obscur. Dans la publication de Mamou Diallo de 2021, les grandes étapes connues ainsi que celles encore à déchiffrer y sont discutées. Le rôle du mégaplasmide pSol1 (192kb) de *C. acetobutylicum* dans ces processus est également questionné de part la présence des gènes codants des protéines impliquées dans la solvantogénèse (opéron *sol*) et dans la sporulation. Les auteurs soulignent cependant la difficulté à proposer un mécanisme généralisable à l'ensemble du genre *Clostridie* du fait de la grande variabilité existant au sein de ce dernier (Diallo *et al.*, 2021).

D. Mécanismes de communication chez *Clostridium acetobutylicum*

Depuis le séquençage de la souche *C. acetobutylicum* ATCC 824 en 2001 par Jörg Nölling et ses collaborateurs (Nölling *et al.*, 2001), de nombreuses études *in silico* ont été réalisées pour décrypter le mécanisme de communication de *C. acetobutylicum*. Trois mécanismes de quorum sensing ont ainsi été mis en évidence. Tout d'abord, des recherches *in silico* ont permis la découverte de gènes homologues à ceux du système de quorum sensing RRNPP en 2003 (Lazazzera, 2003), puis de gènes homologues à ceux du système AI-2 en 2004 (Sun *et al.*, 2004), et enfin des homologues au système Agr en 2008 (Wuster and Babu, 2008). Des approches expérimentales sont venues confirmer l'existence et la fonctionnalité de ces différents systèmes de QS et en relever d'autres. Ainsi, c'est à la suite des travaux conduits sous la direction de Klaus Winzer, qu'en 2012 le quorum sensing de type AIP, avec un système homologue Agr, a été décrit pour la première fois chez *C. acetobutylicum* (Steiner *et al.*, 2012). Ces travaux ont conduit à la mise en évidence du rôle joué par le cluster de gènes *agrBCDA* (*agrB* (*CA_C0078*), *agrD*

(*CA_C0079*), *agrC* (*CA_C0080*) et *agrA* (*CA_C0081*)) dans la régulation de la formation (directe ou indirecte) des granules. En 2023, l'étude de Jonathan R. Humphreys a permis la mise en évidence de l'implication de la protéine CA_C0082, sous la régulation du système Agr, dans la formation des granules, qui impacte alors indirectement la formation des endospores (Humphreys *et al.*, 2023).

C'est également dans l'équipe de Klaus Winzer que le mécanisme de quorum sensing de type RRNPP a été mis en évidence en 2020. Il comprend 8 gènes (*qsrA, qsrB, qsrC, qsrD, qsrE, qsrF, qsrG et qsrH*) identifiés comme régulateur et précurseur du peptide signal (figure 27) (Kotte *et al.*, 2020). Contrairement au système Agr qui ne semble pas impacter directement le métabolisme, le système RRNPP a un impact sur la solvantogénèse de *C. acetobutylicum*. Ainsi, grâce à ces travaux, les mécanismes de QS impliqués dans les étapes de solvantogénèse et de sporulation ont pu être mis en lumière. De plus, la présence de plusieurs systèmes de QS ainsi que la redondance de systèmes de communication tels que RRNPP suggèrent une régulation fine des mécanismes moléculaires retrouvés chez *C. acetobutylicum*. Comme discuté dans le partie 2, l'existence de plusieurs systèmes QS au sein d'un organisme, permettant certainement une meilleure adaptation aux conditions abiotiques et biotiques pose de nombreuses interrogations quant à leur rôle exact, leur acquisition et leur interconnexion.

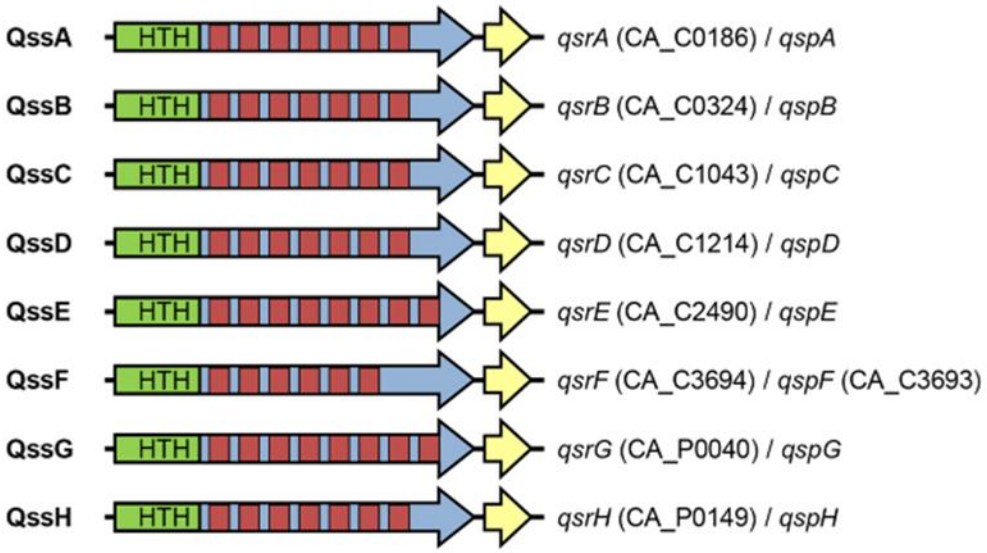


Figure 27 : Représentation des 8 gènes du quorum sensing de type RRNPP chez *C. acetobutylicum*. Huit clusters de gènes de quorum sensing de type RRNPP ont été identifiés (QssA à QssH), chacun comprenant un régulateur de type RRNPP (QsrA à QsrH, représenté par de grandes flèches) et un précurseur de peptide signal (QspA à QspH, représenté par de petites flèches jaunes). Les régions codant pour un motif hélice-coude-hélice (HTH, en vert) ainsi que les domaines à répétitions tétratricopeptidiques (en rouge) sont également indiqué (Kotte *et al.*, 2020).

C'est 17 ans après l'analyse *in silico* montrant la présence d'un homologue du gène *luxS* chez *C. acetobutylicum* qu'au laboratoire, David Ranava a mis en évidence pour la première fois la capacité de *C. acetobutylicum* ATCC 824 à produire la MQS de type AI-2 (Ranava *et al.*, 2021), et a soulevé son implication dans l'établissement de l'interaction avec *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough lors de l'étude d'un consortium synthétique associant ces deux bactéries (voir partie 3 Modèles d'études). En 2022, Dong Liu et ses collaborateurs ont démontré que le gène *luxS* n'était pas associé à la formation du biofilm pour la souche *C. acetobutylicum* CGMCC 5234 mais la production d'AI-2 chez d'autres bactéries du genre Clostridie a permis la mise en évidence la régulation d'autres mécanismes tels que la régulation de la production de toxine chez *Clostridium perfringens* (Ohtani *et al.*, 2002; Vidal *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2022).

2. Nitratidesulfovibrio vulgaris Hildenborough

A. Historique

Les bactéries du genre *Desulfovibrio* ont été décrites pour la première fois en 1895 aux Pays-Bas par W. M. Beyerinck (Beyerinck, 1895; Voordouw, 1995). La souche *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*Dv*H), récemment renommée *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*Nv*H), a été isolée pour la première fois en 1946 dans un sol argileux à Hildenborough (Royaume-Uni) (Waite *et al.*, 2020). Mais ce n'est qu'en 1966, à la suite des travaux de John R. Postgate, que cette bactérie a été classée comme *Dv*H grâce aux différents tests de classification des bactéries sulfacto-réductrices (test de désulforidine, résistance à l'hibitane, phénotype, etc.) (Postgate and Campbell, 1966).

Depuis, les bactéries du genre *Desulfovibrio* ont été retrouvées dans de nombreux environnements tels que les sédiments (souterrains profonds, lacustres et océaniques), les rizières, les égouts et les oléoducs, ainsi que dans les intestins d'insectes, d'animaux et de l'Homme (Mukhopadhyay *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2019). *Nv*H a été isolée dans différents endroits tels que des sources thermales, des sédiments marins et des étangs de culture de crevettes (George *et al.*, 2008; Van and Thu, 2023).

*Nv*H est une bactérie à Gram négatif, de 0.5 à 1 µm de large et 3 à 5 µm de long, en forme de bacille incurvée capable de motilité grâce à la présence de son flagelle polaire (Postgate and Campbell, 1966).

B. Enjeux économiques de l'étude de *Nv*H

*Nv*H fait partie des microorganismes réducteurs de sulfate (MRS) capables d'utiliser le sulfate comme accepteur final d'électrons et de produire de l'H_2S. En parallèle des travaux pour comprendre leur processus énergétique et leur rôle écologique, les MRS dont *Nv*H sont très étudiés pour leurs implications néfastes notamment dans l'industrie du pétrole et du gaz où ils sont les acteurs majoritaires impliqués dans la corrosion.

Pour comprendre leurs implications, il est important de noter que l'extraction *via* les plateformes pétrolières offshore se fait en deux étapes. La première étape d'un puit de production est basée sur l'écoulement du pétrole vers la surface grâce à la pression naturelle présente dans le réservoir. Une fois cette étape réalisée et la pression insuffisante pour permettre une remontée, de l'eau de mer est ajoutée dans le puit pour augmenter la pression et permettre le passage à la production secondaire. Néanmoins, l'eau de mer contenant en moyenne une concentration de 28 mM de sulfate, l'augmentation de la disponibilité en sulfate favorise la prolifération des MRS entraînant l'altération du pétrole et la corrosion des pipelines par l'H_2S (Marietou, 2021). Dans le rapport de la « National Association of Corrosion Engineers » (NACE) de 2016, l'étude « International Measures of Prevention, Application, and Economics of Corrosion Technologies » (IMPACT) a mis en avant l'estimation de près de 2,5 milliards de dollars pour le coût annuel induit par la corrosion générale à l'échelle mondiale. Dans ce même rapport, la perte induite par la corrosion aux États-Unis dans le secteur pétrolier et du gaz naturel, basée sur une étude de 1998, était estimée à 1,4 milliard de dollars par an (Koch *et al.*, 2016). De ce fait, l'étude de *Nv*H et son implication dans la bio-corrosion est un enjeu économique fort depuis la fin du 20ème siècle.

Plus récemment, certaines bactéries du genre *Desulfovibrio* ont été recensées comme pathogènes opportunistes (Bisson-Boutelliez *et al.*, 2010; Carbonero *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2019; R *et al.*, 2020). C'est en 1977 que le premier cas d'infection par une bactérie du genre *Desulfovibrio* a été documenté mais ce n'est qu'en 2008, que Teruo Urata *et al*. ont traité au Japon un patient souffrant de bactériémie (présence de bactérie dans le sang) causée par *Desulfovibrio fairfieldensis* (Porschen and Chan, 1977; Urata *et al.*, 2008). Enfin, en 2023, Sudha B. Singh *et al*. ont publié une revue traitant de la place des bactéries du genre *Desulfovibrio* dans le tractus gastro-intestinal humain et leurs rôles potentiels dans diverse maladies telles que le cancer, Parkinson, l'autisme, la bactériémie ou encore dans des maladies auto-immunes (Singh *et al.*, 2023).

L'implication de la production de sulfure d'hydrogène, de lipopolysaccharides, de vésicules extracellulaires ainsi que la production d'enzymes mucolytiques dégradant les mucopolysaccharides sont mises en avant comme des facteurs potentiels pouvant expliquer la pathogénicité des bactéries du genre *Desulfovibrio*. Cependant, le rôle exact de ces bactéries dans les maladies résultant d'une dysbiose, un déséquilibre du microbiote intestinal, telles que les maladies inflammatoires de l'intestin, l'anxiété et la dépression reste encore à déchiffrer (Humbel *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2023). Les facteurs induisant la croissance des *Desulfovibrio* normalement minoritaires dans l'intestin ainsi que l'impact de leur prolifération soulèvent de nombreuses questions mais ouvrent aussi de nombreuses perspectives sur de potentiels traitements. D'un point de vue écologique, les bactéries sulfato-réductrices (BSR) jouent un rôle crucial dans les écosystèmes en participant activement au cycle du soufre. Leur fonction principale est la réduction du sulfate en sulfure d'hydrogène (H_2S), un processus essentiel à la dégradation de la matière organique dans les environnements anoxiques. Cependant, l'accumulation excessive de H_2S peut avoir des effets toxiques, entraînant la mortalité des organismes environnants et perturbant l'équilibre écologique. Ainsi, la régulation des populations de BSR est essentielle pour maintenir les écosystèmes, en évitant des niveaux de H_2S nuisibles et en favorisant une interaction équilibrée avec d'autres organismes. Comprendre les mécanismes de régulation présents dans la nature permettrait également d'approfondir notre compréhension des processus impliqués dans les dysbioses intestinales impliquant des bactéries du genre *Desulfovibrio*.

Ainsi, que ce soit pour des applications écologiques, industrielles ou médicales, approfondir nos connaissances fonctionnelles et communautaires des *Desulfovibrio*, dont *Nv*H fait partie, ouvrira de nouveaux champs d'application.

C. Métabolisme énergétique des bactéries sulfato réductrices, l'exemple *Nv*H

Les bactéries réductrices de sulfate (BRS) dont *Nv*H fait partie, ont un métabolisme versatile leur permettant de s'adapter à diverses conditions environnementales dont des variations de substrats. En effet, si l'on examine l'implication des BRS dans l'environnement, en particulier leur rôle dans la dégradation de la matière organique, on peut constater leurs positions multiples entre les bactéries fermentaires, telles que *C. acetobutylicum* présentée précédemment, les bactéries acétogènes, telles que *Acetobacterium woodii*, et les méthanogènes, telles que *Methanococcus maripaludis* (figure 28) (Walker *et al.*, 2009; Mand *et al.*, 2014). Cette flexibilité métabolique permet aux BRS de jouer un rôle crucial dans les cycles

biogéochimiques et d'interagir avec divers micro-organismes, contribuant ainsi à la dynamique et à la stabilité des écosystèmes.

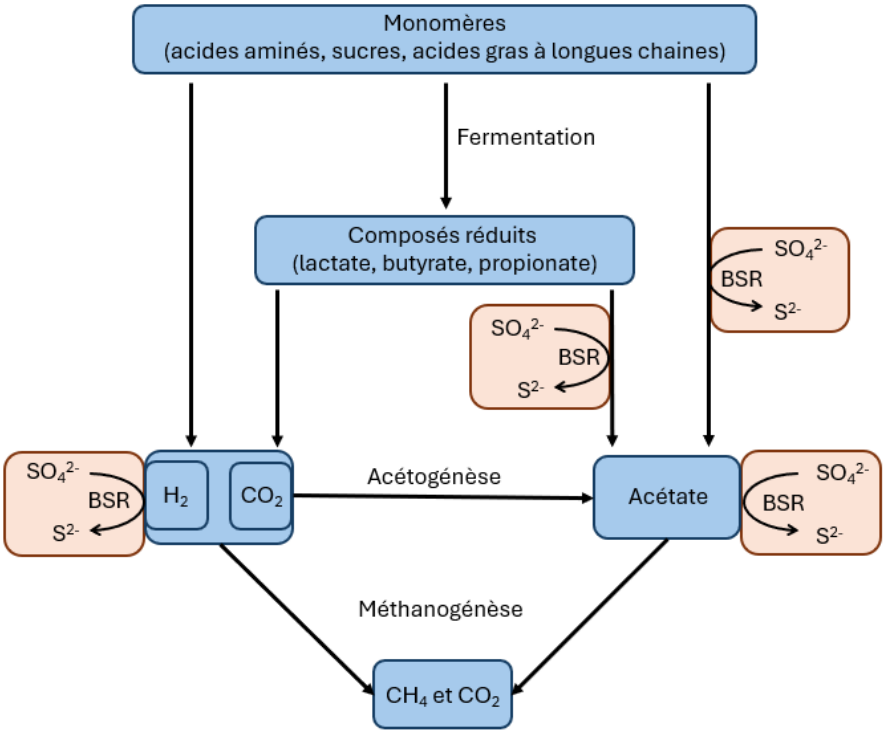


Figure 28 : Représentation schématique du rôle des bactéries sulfato-réductrices dans la dégradation de la matière organique. En présence de sulfate les BSR peuvent être impliquées dans la dégradation des monomères, des composés réduits, de l'acétate et de l'H_2/CO_2 (encadré orange). Adapté de (Muyzer and Stams, 2008).

*Nv*H, comme de nombreuses autres BRS, est principalement caractérisée par sa capacité à réaliser la respiration anaérobie en utilisant le sulfate (SO_4^{2-}) comme accepteur final d'électrons. Lors de cette respiration, *NvH* réduit le sulfate en sulfure d'hydrogène (H_2S). Ce processus est couplé à l'oxydation de donneurs d'électrons tels que le lactate, le pyruvate, le formiate, l'éthanol ou encore l'hydrogène moléculaire (H_2) en présence d'une source de carbone telle que le CO_2 (Haveman *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2013).

Dans le cas du lactate comme source de carbone et d'électrons les enzymes clés impliquées dans son oxydation sont présentes dans le cluster de gènes appelé "*luo*" (*DVU_3025-3033*) contenant les gènes codants pour la pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase (PFOR) (*DVU_3025*), la L-lactate perméase (*DVU_3026*), les deux sous-unités A et B de la D et L-lactate déshydrogénase (Ldh) (*DVU_3027-3028* et *DVU_3032-3033*, respectivement), la phosphate acétyltransférase (Pta) (*DVU_3029*) et l'acétate kinase (Ack) (*DVU_3030*). Ainsi, le lactate est internalisé par la L-lactate perméase, puis la Ldh, située au niveau de la membrane

cytoplasmique, permet la conversion du lactate en pyruvate *via* la réduction du cytochrome c_{-553} présent dans le périplasme (Ogata and Arihara, 1981). Une fois le lactate oxydé en pyruvate, il est converti en acétyl-CoA par la PFOR. Cette réaction est couplée à la réduction d'une ferrédoxine. Deux étapes successives transforment l'acétyl-CoA en acétate (produit final), la seconde catalyse étant couplée à la production d'une molécule d'ATP. Le pouvoir réducteur issu de cette voie d'oxydation du lactate en acétate, permet la réduction de protons (H^+) en H_2 *via* les hydrogénases membranaires Ech (*DVU_0429-0434*) et Coo (*DVU_2286-2291*) entrainant la formation d'un gradient de protons permettant la régénération du pool ATP *via* l'ATP synthase. Les molécules d'H_2 produites par les hydrogénases membranaires vont diffuser à travers la membrane cytoplasmique et être prises en charge par les hydrogénases périplasmiques Hyn1 (*DVU_1921-1922*) ou HysAB (*DVU_1917-1918*) qui par l'oxydation des molécules H_2 généreront des protons et électrons. L'internalisation du lactate peut également conduire à son oxydation par la pyruvate formate-lyase (Pfl) qui le transforme en formiate et en acétyl-CoA. Le formiate ainsi produit est ensuite converti en CO_2 et $2H^+$ par les formiate déshydrogénases (Fdh) FdhM et FdhABC3 dans l'espace périplasmique.

Les protons issus de ces deux voies (hydrogénase et formiate déshydrogénase) participent alors au gradient de protons tandis que les électrons, *via* le réseau de transporteurs d'électrons périplasmiques (cytochrome c_3), vont être transmis au complexe quinone réductase (QrcDCBA) (*DVU_0692-DVU0695*) (Tmc et Hmc) permettant la régénération du pool de quinones qui avait été préalablement oxydé lors de l'étape de réduction dissimilatrice du sulfate (Duarte *et al.*, 2018). En effet, une fois l'internalisation du sulfate par la sulfate perméase (SulP) (*DVU_0279, DVU_0053*) réalisée, ce dernier est pris en charge par la sulfate adénylyltransférase (Sat) (*DVU_1295*) et nécessite la consommation d'une molécule d'ATP pour la réduction du sulfate en adénosine-5'-phosphosulfate (APS) qui sera lui réduit en sulfite ($SO3^{2-}$) par l'adénylyl-sulfate réductase (AprAB) (*DVU_0846-DVU_0847*). Pour finir, le sulfite est réduit en sulfure d'hydrogène (H_2S) *via* le complexe sulfite réductase (DsrABC) (*DVU_0402-DVU_0403, DVU_2776*). Une fois cette étape réalisée l'H_2S diffusera dans le milieu extracellulaire et DsrC alors sous forme oxydée sera réduit par le complexe DsrMJKOP (*DVU_1286-DVU_1290*) pour être régénéré (figure 29) (Zhou *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2023; Marbehan *et al.*, 2024).

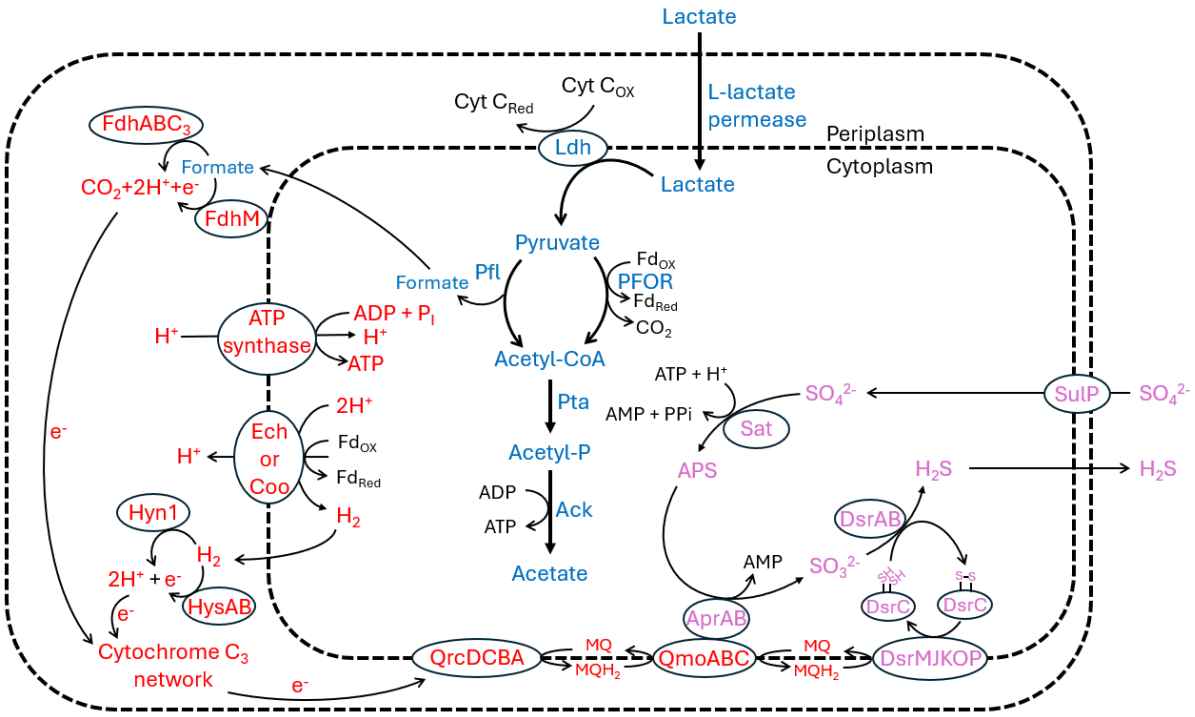


Figure 29 : Respiration anaérobique de *Nv*H. Représentation du métabolisme de *Nv*H de la voie d'oxydation du lactate (en bleu) à la voie de réduction du sulfate dissimilatoire (rose). Abréviation : Ack, acétate kinase ; APS, adénosine-5'-phosphosulfate ; Apr, adénylyl-sulfate réductase ; Coo, monoxyde de carbone déshydrogénase ; Cyt $C_{OX/Red}$, Cytochrome C oxydé/réduit ; Dsr, Réductase dissimilatrice du sulfite; Ech, Hydrogénase conservant l'énergie ; $Fd_{OX/Red}$, Ferrédoxine oxydée/réduite ; Fdh, Formiate déshydrogénase ; Hyn1, Hydrogénase 1 ; HysAB, Hydrogénase AB ; Ldh, lactate déshydrogénase ; Pfl, Pyruvate formiate-lyase ; PFOR, pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase ; Pta, Phosphate acétyltransférase ; Qmo, Oxydoréductase membranaire interagissant avec la quinone ; Qrc, Complexe réductase de la quinone ; Sat, sulfate adénylyltransférase ; SulP, sulfate perméase. Adapté de (Marbehan *et al.*, 2024).

*Nv*H, comme d'autres BSR, peut utiliser d'autres donneurs et accepteurs d'électrons comme les couples lactate/thiosulfate, pyruvate/sulfate et H_2/CO_2/acétate/sulfate, formiate/sulfate dans le cadre de la respiration anaérobie. Un métabolisme fermentaire est également possible en absence de composés soufrés (accepteurs d'électrons). Ce métabolisme utilise dans ce cas du lactate, pyruvate, ou formiate et affiche un rendement énergétique plus faible (2.5 moles d'ATP produites pendant la respiration anaérobie tandis que 1 mole d'ATP uniquement est produite pendant la fermentation (Pereira *et al.*, 2008; Martins and Pereira, 2013; Marbehan *et al.*, 2024). Ce métabolisme fermentaire qui conduit à la production d'acétate à partir de lactate est associé à la production de ferrédoxine réduite, à la production d'une mole d'ATP et à la production d'H_2 par les BSR.

Le lien entre efficacité du métabolisme fermentaire des BSR et la pression en hydrogène est connu depuis de nombreuses années. Des études thermodynamiques menées par Christopher B. Walker *et al.* en 2009 ont démontré la faisabilité thermodynamique de l'oxydation du lactate et l'importance de la concentration en hydrogène qui en cas d'accumulation inhibe

l'hydrogénase membranaire Coo et *via* un processus de feed-back inhibe le processus de fermentation (Walker *et al.*, 2009). Dans la Nature, la concentration en hydrogène est régulée par la présence ou non d'organismes consommateurs méthanogènes. Afin de mieux comprendre ce couplage où les BSR produisent de l'acétate, du CO_2 et de l'H_2, pouvant potentiellement être utilisés par les méthanogènes pour produire du méthane, différentes études ont été menées *via* la mise en place de consortia synthétiques mais aussi sur des écosystèmes naturels (Qi *et al.*, 2014). D'un point de vue écologique, on peut souligner le rôle de l'environnement dans ce couplage. En effet dans le cas où des composés soufrés sont présents dans l'environnement, les BSR basculent vers un métabolisme de type respiratoire, produisent de l'H_2S, délétère pour les organismes méthanogènes et arrêtent de produire de l'H_2, substrat de ces mêmes organismes. On bascule donc d'un processus mutualiste à un processus de compétition (Walker *et al.*, 2009; Sela-Adler *et al.*, 2017). Les travaux récents de Shiling Zheng et collaborateurs, ont mis en avant la possibilité d'un échange d'électrons direct inter-espèces (DIET) entre *Desulfovibrio* sp. strain JY et *Methanothrix harundinacea*, soulevant la question des mécanismes réellement impliqués dans cette interaction écologique (Zheng *et al.*, 2021).

*Nv*H, que la versatilité du métabolisme place entre les bactéries fermentaires et méthanogènes, est encore peu étudié et les interactions écologiques mises en place et les mécanismes sous-jacents sont encore mal compris (Benomar *et al.*, 2015; Batmanghelich *et al.*, 2017; Ranava *et al.*, 2021). En 2023, Dongyu Wang *et al*. ont réalisé l'étude d'un consortium composé d'une bactérie cellulolytique (*Ruminiclostridium cellulolyticum*), un méthanogène hydrogénotrophe (*Methanospirillum hungatei*), un méthanogène acétoclaste (M*ethanosaeta concilii*) et *Nv*H, révèlent par une approches de métaprotéomique et de modélisation des flux métaboliques l'impact de la présence du sulfate dans les transferts métaboliques entre *Nv*H et ses partenaires ainsi que la mise en place d'une compétition a pu être identifié entre *Nv*H et *Methanospirillum hungatei* (Wang *et al.*, 2023).

D. Quorum sensing de *Nv*H

En 2008, Tomohiro Kawaguchi *et al*. ont mis en évidence pour la première fois la production d'AHL par une bactérie du genre *Desulfovibrio* spp. (GenBank numéro : DQ822786) sans pouvoir identifier le mécanisme moléculaire impliqué (Kawaguchi *et al.*, 2008). Ce n'est que 11 ans plus tard, en 2019, que Krishnakumar Sivakumar *et al*. ont démontré la production de MQS de type AHL cette fois-ci chez *Nv*H (Sivakumar *et al.*, 2019). En 2019, Giantommaso Scarascia *et al.*, par différentes approches, notamment par l'analyse du transcriptome de *Nv*H après ajout d'AHLs ou d'un inhibiteur d'AHL, se sont fixés comme objectif de rechercher les voies

potentiellement impacter par le QS de type AHL chez cette bactérie. Les résultats pointent l'implication du QS de type AHL dans de très nombreux processus comme dans la régulation de la production d'ATP, des protéines transcriptionnelles (sous-unités ribosomales), des transporteurs membranaires, de l'oxydation du lactate, de la réduction du sulfate, de la formation de biofilm ainsi que dans la biocorrosion de *Nv*H (Scarascia *et al.*, 2019).

C'est seulement en 2021, à la suite d'une étude *in silico*, que des gènes potentiellement impliqués dans le QS de type AHL et celui d'une potentielle AHL synthase ont été identifiés chez *Nv*H (DVU_2486) (Tripathi *et al.*, 2021, 2023). Ces découvertes récentes donnent de nombreuses possibilités pour obtenir une caractérisation plus fine des mécanismes moléculaires impliqués dans la communication cellulaire de type AHL chez *Nv*H.

Également en 2021, David Ranava *et al*. lors de leurs travaux sur le consortium synthétique *Nv*H /*C. acetobutylic*um démontrent la capacité de *Nv*H à répondre à un signal de type AI-2 sans toutefois mettre en évidence le mécanisme moléculaire de *Nv*H permettant la perception et la réponse au signal. Ils démontrent également la capacité de *Nv*H à produire un QSI de l'AI-2 en milieu riche (lactate/sulfate) (Ranava *et al.*, 2021).

3. Etude du consortium microbien synthétique modèle *Clostridium acetobutylicum* et *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough

C'est au sein du laboratoire de bioénergétique et ingénierie des protéines (BIP) que le consortium synthétique composé de *C. acetobutylicum* et *Nv*H a été développé comme modèle d'étude pour la production d'H_2. Au cours des dix dernières années, de nombreuses avancées ont été réalisées pour obtenir une meilleure compréhension de ce système bactérien et en améliorer le contrôle. Faisant de ce dernier un bon modèle d'étude pour comprendre le fonctionnement de consortia microbiens ainsi que leur régulation afin de développer des outils pour la conception mais aussi de contrôle de population microbienne mixte. Parmi ces avancées, plusieurs points ont initié la réflexion et le développement du projet de thèse actuel.

Tout d'abord, la mise en culture des deux bactéries a été conçue pour simuler un environnement défavorable pour *Nv*H avec une carence nutritionnelle (sans lactate/sulfate) pour favoriser sa dépendance à *C. acetobutylicum,* lui-même restreint par une limitation en glucose, vitamines et acides aminés. Pour cela, le milieu SLY contenant du glucose (uniquement utilisable par *C. acetobutylicum* car non métabolisé par *Nv*H) a été utilisé. Lorsque les deux bactéries ont été cultivées ensemble, un effet synergique sur la croissance a pu être observé (figure 30 (A)). Cet impact sur la croissance (taux de croissance, DO_{600nm} max, temps de latence) pouvant être le reflet de l'établissement d'une interaction écologique, la question de la capacité de *Nv*H à

pouvoir croitre dans ces conditions de carence nutritionnelle a été investiguée. Si le suivi du nombre de copie de génome de *Nv*H dans le consortium comparé à celui en culture pure démontre qu'il y a bien croissance de *Nv*H uniquement en consortium (figure 30 (B)), le même type expériences réalisées dans des conditions où les bactéries sont dans le même environnement mais sans contact physique possible (séparation par une membrane de dialyse) démontrent qu'il ne s'agit pas d'un processus coopératif simple où *Nv*H utiliserait les produits du métabolisme de *C. acetobutylicum* (Benomar *et al.*, 2015).

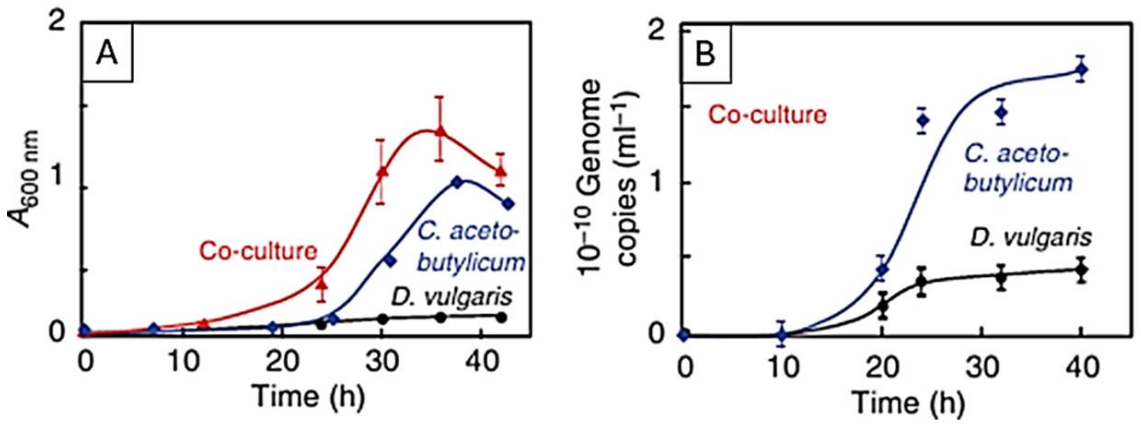


Figure 30 : Croissance de *C. acetobutylicum* et *Nv*H suivie par spectrophotométrie et PCR quantitative. (A) Croissance de *Nv*H en culture pure (noir) ou en présence *C. acetobutylicum* (rouge), et de *C. acetobutylicum* en culture pure (bleu) suivie par spectrophotométrie à 600 nm. (B) Croissance de *Nv*H (noir) et de *C. acetobutylicum* (en bleu) en consortia suivie par PCR quantitative (Benomar *et al.*, 2015).

Des expériences de marquage isotopique ("Stable Isotope Probing", SIP) ont par la suite démontré l'existence d'un échange de molécules carbonées entre les deux bactéries sans que ces dernières ne soient identifiées (Ranava *et al.*, 2021).

Des expériences d'imagerie sont venues corroborées ces résultats. Ainsi par microscopie électronique à balayage, une interaction physique similaire à celle observée dans les travaux de Benomar *et al*. est mise en évidence (Benomar *et al.*, 2015). L'utilisation de la microscopie confocale à fluorescence et le marquage différentiel de chacune des deux bactéries a permis de mettre en évidence un échange bidirectionnel de molécules cytoplasmiques. Ainsi comme illustré dans la figure 31, où *C. acetobutylicum* est marquée à la calcéine et *Nv*H exprime la protéine mCherry, après 24 heures de cultures à 37 °C dans le milieu SLY, les bactéries se retrouvent avec les 2 marqueurs fluorescents, démontrant ainsi l'échange. L'utilisation d'un marqueur fluorescent (RedoxSensor Green (RSG)) sensible à l'état énergétique de la cellule vient confirmer le résultat mais démontre de plus que cette interaction conduit à une "énergétisation" de *Nv*H, suggérant la mise en place d'un potentiel de membrane et/ou production d'ATP (Ranava *et al.*, 2021).

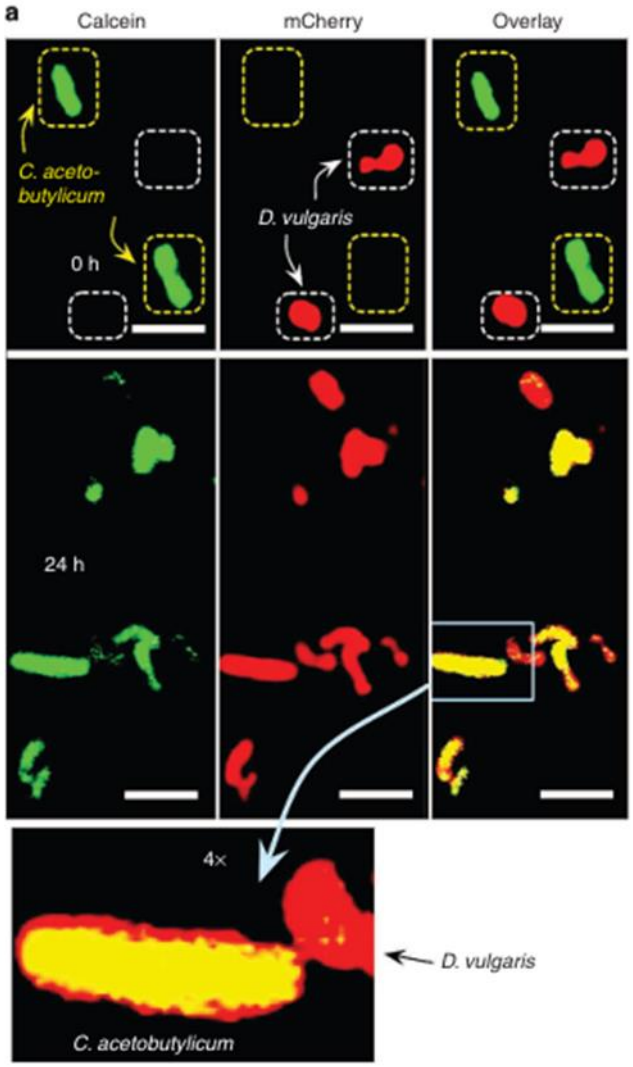


Figure 31 : Echange bidirectionnel mis en place au cours du consortium bactérien *C. acetobutylicum* et *Nv*H (Ranava *et al.*, 2021).

Ainsi que précisé dans la partie détaillant les processus de communication, c'est au cours de cette étude qu'a été mis en évidence la capacité de *C. acetobutylicum* à produire une MQS de type AI-2. Le gène codant pour la protéine impliquée dans la production d'AI-2 a été identifié et des expériences de complémentation dans un mutant de *E. coli*, déficient en LuxS ont confirmé la fonction de ce gène. En parallèle, l'absence de production de molécule de type AI-2 chez *Nv*H était également démontrée (figure 32 (A)). Afin d'étudier si l'AI-2 jouait un rôle dans l'interaction, et devant l'absence d'outils pour développer une approche génétique chez *C. acetobutylicum,* l'équipe a dans un premier temps valider que cette notion d'interaction pouvait être générique c'est à dire que dans le cas où *Nv*H se trouvait en stress nutritionnel, elle pourrait interagir avec d'autres bactéries. Les expériences de microscopie réalisées sur le consortium *E. coli*/*Nv*H ont démontré qu'une interaction similaire à celle observée avec *C. acetobutylicum* était mise en place en cas de stress nutritionnel. Par la suite l'équipe a capitalisé sur l'existence de

mutant d'AI-2 chez *E. coli* pour tester le rôle de cette MQS dans l'interaction. Par cette approche, le rôle d'AI-2 dans la mise en place de l'interaction a été démontré comme illustré dans la figure 32 (B). En effet, l'utilisation de la souche *E. coli* DH5α (*luxS*-) conduit à la perte de l'interaction entre les deux bactéries. Ceci a permis de montrer la perte de l'interaction en l'absence du gène *luxS* dans le consortium bactérien *Nv*H : *E. coli*, interaction qui a pu être restaurée par l'ajout d'un vecteur contenant le gène *luxS* de *C. acetobutylicum* chez *E. coli* DH5α (figure 32 (B)).

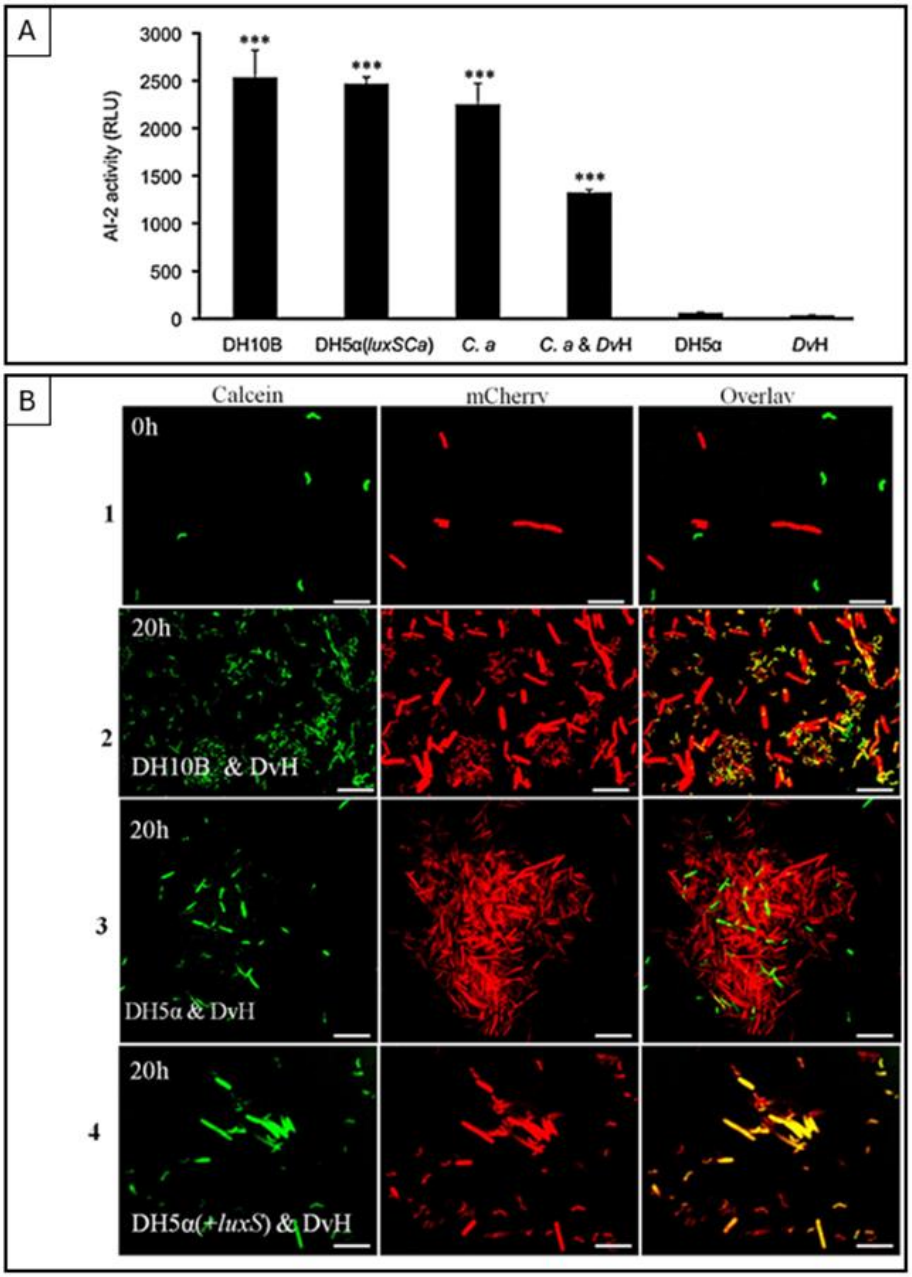


Figure 32 : Quantification et importance de l'AI-2 au sein du consortium *Nv*H/*E. coli*. Mesure de l'activité extracellulaire AI-2 (A) et observation de la dépendance à la présence d'AI-2 pour la mise en place de l'interaction *Nv*H/*E. coli* (B) (Ranava *et al.*, 2021).

Ces résultats obtenus au sein du laboratoire ont permis une meilleure compréhension des facteurs impliqués dans la mise en place du consortium bactérien *C. acetobutylicum*/*Nv*H.

IV. Objectifs de l'étude

Dans cette introduction, nous avons exploré diverses stratégies pour étudier la diversité écologique et les interactions entre espèces, en soulignant l'importance et l'apport des consortia synthétiques comme modèles pour comprendre le fonctionnement des écosystèmes. Ces modèles simplifiés sont en effet des outils précieux pour approfondir notre compréhension des systèmes multi-espèces en conditions contrôlées, facilitant ainsi l'analyse des mécanismes sous-jacents à leurs interactions. Par la suite, dans la deuxième partie, nous avons examiné les voies de signalisation de type quorum sensing impliquées dans la communication bactérienne, ainsi que leurs inhibiteurs. Le quorum sensing joue un rôle central dans la coordination des activités bactériennes en fonction de la densité cellulaire mais son rôle dans le contrôle général du comportement de l'écosystème n'a été que peu abordé et son inhibition constitue une approche prometteuse pour moduler les propriétés du système.

Enfin, la troisième partie s'est focalisée sur la présentation des modèles d'étude utilisés lors de mon travail de thèse ; les bactéries *Clostridium acetobutylicum* et *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*Nv*H), ainsi que sur leur association dans un consortium bactérien synthétique dédié à la production d'hydrogène. Cette partie a également mis en lumière une interaction syntrophique dépendante de l'autoinducteur AI-2 entre ces deux bactéries, conduisant à un effet synergique sur leur croissance et à une surproduction d'hydrogène. Cependant, malgré les avancées actuelles, plusieurs questions restent sans réponse, notamment concernant les mécanismes spécifiques contrôlant cette interaction et ses conséquences fonctionnelles. En particulier, en dépit des études réalisées, aucun mécanisme moléculaire de cette interaction ou encore l'impact du QS sur le métabolisme de la bactérie cible n'ont encore été clairement identifié.

C'est donc dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse, structuré autour de trois axes de recherche principaux.

Le premier axe est focalisé sur l'identification des acteurs du quorum sensing et des voies de régulation associées. Cette étape a inclus la mise en évidence des mécanismes de production et de réponse au signal chez *C. acetobutylicum* et *Nv*H, ainsi que l'exploration des processus de perception du signal par *Nv*H à l'aide d'approches *in silico*, *in vitro*, et *in vivo*.

Le deuxième axe vise à étudier l'évolution des populations de *C. acetobutylicum* et de *Nv*H au sein d'un consortium au fil du temps, afin de mieux comprendre leur dynamique de croissance et, en particulier, de déterminer l'évolution du ratio cellulaire entre *Nv*H et *C. acetobutylicum*. Pour ce faire, une méthode de quantification absolue par digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) a été mise en place.

Enfin, le troisième axe porte sur l'analyse des mécanismes impliqués dans l'établissement de l'interaction, en utilisant une approche métatranscriptomique. Cette méthode permet d'examiner l'ensemble des ARN messagers produits par ces deux espèces au sein de la communauté microbienne, élargissant ainsi notre compréhension des interactions fonctionnelles entre les espèces au sein du consortium.

Matériels et méthodes

I. Microbiologie

1. Les souches bactériennes utilisées

La liste des souches bactériennes utilisées dans cette étude est répertoriée dans le tableau 4.

Tableau 4 : Souches bactériennes utilisées au cours du projet.

Souches	Génotypes	Origine
C. acetobutylicum ATCC 824	souche sauvage	Chantal Tardif (Laboratoire de Chimie Bactérienne, Marseille)
Escherichia coli BL21	F–ompT hsdSB (rB–, mB–) gal dcm (DE3)	Collection du laboratoire
Escherichia coli C600	thr-1, leuB6, lacY1, supE44, rfbD1, thi-1, mcrA1, cyn-1, F-, λ-	Collection du laboratoire
Escherichia coli DH5a sauvage	F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17 (rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96	Invitrogen
Nitratidesulfovibrio vulgaris Hildenborough	souche sauvage	Collection du laboratoire
Vibrio harveyi BB-170	luxN::tn5kan, souche dérivée de *Vibrio harveyi* BB120, New jersey, United States, 1993	ATCC BAA-1117

2. Milieux de culture utilisés

A. Milieu de culture utilisé pour *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough

Le milieu anaérobie Starkey (SKY) est le milieu permettant la croissance de *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough *via* la respiration des sulfates. Il se compose de 2,87 mM de K_2HPO_4 ; 37,4 mM de NH_4Cl ; 8,11 mM de $MgSO_4$, $7H_2O$; 28,2 mM de Na_2SO_4 ; 1 $g.L^{-1}$ d'extrait de levure ; 6 $mL.L^{-1}$ de lactate de sodium 60% et de 1 $mL.L^{-1}$ d'oligoéléments Starkey. Le pH est ajusté à 7,2 à l'aide d'une solution de NaOH 0,1 M (Traore *et al.*, 1981).

a. Solution d'oligoéléments Starkey (STE)

Afin de fournir les éléments complémentaires et nécessaires à la croissance de *Nv*H une solution concentrée (1000X) est réalisée. La composition de cette solution est la suivante pour un litre de solution : $MgCl_2$, $6H_2O$ 0.27 M; $FeSO_4$ $(NH_4)_2SO_4$, $6H_2O$ 17.8 mM; $ZnCl_2$, $2H_2O$ 5.8 mM; $MnCl_2$, $4H_2O$ 6 mM; $CuSO_4$, $5H_2O$ 1.6 mM; $CoSO_4$, $7H_2O$ 4.6 mM; BO_3H_3 1.62; Ni $(NO_3)_3$, $6H_2O$ 0.15 mM; Na_2SeO_3, $5H_2O$ 38 µM; Na_2WO_4, $2H_2O$ 30.3 µM; $CaCl_2$, $2H_2O$ 0.41 M et 51 mL de HCl 11 N.

b. Milieux de conservation de *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough

La souche *Nv*H est stockée à partir de cellules récoltées en phase stationnaire de croissance en milieu SKY. Les cellules sont ensuite transférées dans la solution de conservation contenant 20 % glycérol (v/v), 25 mM de $MgSO_4$, $7H_2O$ et 10 mM de HEPES (pH 6,5) préalablement dégazée. Les cellules sont finalement congelées dans de l'azote liquide puis stockées à -80 °C.

B. Milieu de culture utilisé pour *Clostridium acetobutylicum*

Le milieu anaérobie 2xYT est le milieu permettant la croissance de *C. acetobutylicum*. Il se compose de : 16 g.L^{-1} de Bactotryptone, 10 g.L^{-1} d'extrait de levure, 5 g.L^{-1} de glucose, 4 g.L^{-1} de NaCl (Oultram *et al.*, 1988).

C. Milieu de culture utilisé pour le consortium *Clostridium acetobutylicum* et *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough

Ce milieu (SLY) est utilisé pour la co-culture *Nv*H/*C. acetobutylicum*. Sa composition est la suivante : K_2HPO_4 2,87 mM ; NH_4Cl 37,4 mM ; extrait de levure 1 g.L^{-1} ; glucose 13,8 mM ; STE 1 mL.L^{-1} ; pH 7,2. Pour les étapes de lavage, une solution de SLY sans glucose est également préparée.

D. Milieu de culture utilisé pour *Escherichia coli*

Le milieu LB (Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani)) est préparé à 25 g.L^{-1} pour les cultures liquide aérobie. Pour obtenir un milieu solide, 1,5 % d'agar a été ajouté. Le milieu est stérilisé par autoclavage 20 minutes à 121 °C.

E. Milieu de culture pour *Vibrio harveyi* BB170

Le milieu Autoinducer Bioassay (AB) est utilisé pour la croissance aérobie de la souche rapportrice *V. harveyi* BB170. La composition du milieu est la suivante : NaCl 0,3 M ; $MgSO_4$, $7H_2O$ 50 mM ; casaminoacides 2 g.L^{-1} ; L-arginine 1 mM ; K_2HPO_4 10 mM ; KH_2PO_4 10 mM ; glycérine 1 % (v/v) ; pH 7.

Pour les croissances en condition d'anaérobie, le milieu (ou l'eau) est porté à ébullition pendant cinq minutes, puis balayé à l'azote pendant 30 minutes afin de retirer l'oxygène. Ensuite, 10 mL de ce milieu, purgé à l'azote, sont répartis dans des tubes Hungate (d'une capacité totale de 16,5 mL), qui ont préalablement été purgés à l'azote pendant 15 minutes. Les tubes Hungate sont ensuite scellés, purgés à nouveau à l'azote pendant 15 minutes supplémentaires, puis stérilisés par autoclave pendant 20 minutes à 121 °C.

3. Croissance des souches bactériennes

Tous les suivis de croissance cellulaire bactérienne sont réalisés à l'aide du Cell Density Meter Utrospec 10 (Biochrom) permettant une lecture à 600 nm directement en tube Hungate ou en cuve.

A. Préparation de l'inoculum des bactéries anaérobies

C. acetobutylicum et *Nv*H sont des bactéries strictement anaérobies, les cultures sont directement inoculées avec des aliquots provenant de stocks conservés à -80 °C. Un millilitre de ce stock est inoculé en condition d'anaérobie dans un tube Hungate contenant 10 mL de milieu SKY avec 1/100000 (v/v) de β-mercaptoéthanol (BME). La culture est ensuite incubée toute la nuit à 37 °C, puis une seconde préculture est réalisée. Après cette deuxième sous-culture, les cultures de *C. acetobutylicum* et *Nv*H obtenues sont utilisées pour inoculer, à une densité optique à 600 nm de 0,1, un tube Hungate contenant 10 mL de milieu SKY avec 1/100000 (v/v) de BME.

B. Préparation de *E. coli*

Un premier étalement d'une solution stock d'*E. coli* sur une boîte de LB est réalisé et les boites sont incubées à 37 °C pendant la nuit pour isoler des colonies uniques. Une de ces colonies est ensuite utilisée pour préparer une préculture aérobie dans 5 mL de LB, incubée à 37 °C à 160 rotations par minutes (RPM). La préculture obtenue est alors utilisée pour l'inoculation des cultures au 1/100ème. La croissance bactérienne a été suivie par mesure de la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La supplémentation d'antibiotique (chloramphénicol ou ampicilline) a été réalisée selon le besoin.

C. Préparation de *V. harveyi* BB170

Une solution stock de *V. harveyi* BB170 est d'abord étalée sur une boîte de LB puis la boite est incubée à l'obscurité à 30 °C pendant la nuit. Une colonie unique est ensuite prélevée pour inoculer 10 mL de milieu AB. La solution est incubée à l'obscurité à 30 °C, à 160 RPM, pendant 16 heures.

D. Inoculation du consortium

Les cellules de *C. acetobutylicum* et de *Nv*H, cultivées respectivement dans les milieux 2xTG et SKY, sont récoltées par centrifugation à 2000 relative centrifugal force (RCF). Le surnageant est retiré avec précaution à l'aide d'une seringue pour maintenir l'anaérobiose dans le tube. Le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu SLY (sans glucose) puis centrifugé afin d'éliminer les produits métaboliques potentiellement présents. Ce lavage est effectué deux fois. Après le dernier lavage, les cellules sont resuspendues dans 10 mL de milieu SLY (sans glucose) et la densité optique est mesurée à 600 nm. La suspension cellulaire est ensuite utilisée pour inoculer les tubes Hungate contenant 10 mL de milieu SLY avec 1/100000 (v/v) de BME.

II. Méthodes de biologie moléculaire

1. Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction et la purification des plasmides p33Tac et pET21 sont réalisées après centrifugation de 2 mL de culture d'*E. coli* cultivée sur la nuit à 37 °C (10 000 RCF pendant 5 minutes) à l'aide du kit d'extraction plasmidique Genelute Sigma Plasmid PLN70 selon les recommandations du fabricant. Les plasmides obtenus ont ensuite été conservés à -20 °C avant utilisation ou analyse par séquençage Sanger (Genewiz).

2. Extraction d'ADN génomique

Les kits GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich, NA2100) et Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120) ont été utilisés pour les étapes d'extraction et de purification de l'ADN de *C. acetobutylicum* et *Nv*H. Les protocoles ont été adaptés pour permettre l'extraction à partir de bactéries à Gram positif et négatif. Pour le kit GenElute™, un culot correspondant à 1/10ème de culture a été récolté après une centrifugation à 10 000 RCF pendant 10 minutes. Le culot a ensuite été resuspendu dans 100 µL de solution de lyse pour bactéries à Gram positif, auxquels ont été ajoutés 100 µL de solution de lysozyme (20 mg/mL). La solution est ensuite incubée à 37 °C pendant 30 minutes. Par la suite, 20 µL de RNase A ont été ajoutés pour une incubation supplémentaire de 2 minutes à 37 °C. Après l'ajout de 20 µL de Protéinase K et de 200 µL de solution de lyse C, une troisième incubation à 55 °C pendant 30 minutes a été effectuée, avant de reprendre le protocole du fournisseur. L'élution finale a été réalisée à l'aide de 50 µL d'H_2O RNase Free préchauffée à 55 °C. Pour le kit Sigma-Aldrich et Wizard® Genomic DNA Purification Kit (A1120), le protocole du fournisseur pour les bactéries à Gram positif a été utilisé avec une solution de lysozyme à 10 mg/mL avant une incubation de 1 heure à 37 °C. Le temps de l'étape de lyse thermique à 80 °C a également été augmenté à 10 minutes au lieu de 5 minutes.

3. Préparation et extraction des ARN totaux

A. Préparation des échantillons *Nv*H et *C. acetobutylicum* en culture pure et consortium

Les cultures bactériennes utilisées pour la réalisation d'extraction d'ARN totaux ont été transférées dans des tubes Falcon de 15 mL préalablement balayés à l'azote pendant 10 minutes. Les cultures sont ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 15 000 g. Les culots cellulaires obtenus sont congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80 °C avant leur utilisation.

B. Préparation des échantillons *Nv*H en présence et en absence d'AI-2

L'analyse transcriptomique de *Nv*H a été réalisée à partir d'une culture en milieu riche collectée en phase exponentielle, lavée deux fois à l'aide de SLY (sans glucose), puis inoculée à une DO_{600nm} de 1 dans 1 mL final de SLY. Les cultures ont été incubées pendant 30 minutes à 37 °C avant ajout de 0,75 mM de DPD ou volume équivalent en H_2O stérilisé (contrôle). Après 45 minutes d'incubations à 37 °C, 1 mL d'une solution de RNAlater a été ajouté directement dans le tube Hungate contenant la culture pour préserver l'intégrité des ARN. Les culots cellulaires ont ensuite été collectés après 24 heures d'incubation puis les ARN ont été extraits comme décrit par la suite. L'analyse transcriptomique de *Nv*H a été réalisée en triplicat biologique.

C. Extraction et purification des ARN totaux

La lyse des cultures de *C. acetobutylicum* et *NvH* a été effectuée après resuspension des culots cellulaires préalablement préparés et stockés dans 380 µL d'une solution d'homogénéisation complétée avec 20 µL/mL de 1-thioglycérol (préalablement refroidi pendant 30 minutes dans la glace). Les suspensions obtenues ont ensuite été transférées dans des tubes MP Biomedicals™ Matrice de lyse B (MP Biomedicals™ 116911100) contenant 0,3 g de matrice B (sphères en silice de 0,1 mm). La lyse mécanique des cellules a été réalisée à l'aide du FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals) en effectuant 2 cycles à 6,5 m/s en mode "Quickprep" pendant 45 secondes, séparés par une incubation de 2 minutes à 4 °C. Après l'ajout de 35 µL de Protéinase K et d'un volume de solution de lyse dodécylsulfate de sodium (SDS) équivalent au volume total, une incubation de 10 minutes à température ambiante a été effectuée sous agitation (1600 RPM) dans le MixMate (Eppendorf). Une courte centrifugation de 10 secondes a permis la récupération du surnageant qui est utilisé pour les étapes suivantes d'extraction. L'extraction des ARN à partir de cette dernière solution a été réalisée à la plateforme transcriptomique de l'IMM à l'aide du Maxwell® RSC (Promega, AS4500) avec le kit Maxwell® RSC simplyRNA Blood (Promega, AS1380). Après purification et extraction les ARN totaux ont été conservés à -80 °C.

4. Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

La composition en réactif utilisé pour les expériences de PCR utilisant la polymérase Q5® (NEB) est décrite dans le tableau 5. Les amplifications ont été réalisées avec le thermocycleur T100™ (BioRad) selon le programme suivant adapté selon l'échantillon amplifié :

- Dénaturation : 5 minutes à 96 °C

- De 30 à 40 cycles de polymérisation composés d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 96 °C, d'hybridation de 20 secondes entre 55 et 60 °C, et une étape d'élongation de 30 secondes par kb à 72 °C.
- Une étape d'élongation finale de 2 minutes à 72 °C.

Tableau 5 : Détail des réactifs utilisés pour la réalisation de PCR.

Réactifs	Volume (µL)/réaction	Concentrations finales
Tampon de réaction Q5 5X	10	1X
dNTP 10 mM	1	200 µM
Amorce 1 10 µM	2,5	0,5 µM
Amorce 2 10 µM	2,5	0,5 µM
Échantillon	1	< 1 000 ng
Q5® High-Fidelity DNA polymérase (NEB)	0,5	0,02 U/µL
GC Enhancer 5X (NEB)	10	1X
H_2O Nuclease-Free	QSP 50 µL	

Après l'amplification PCR, les amplicons ont été purifiés à l'aide du kit de purification des produits PCR EZ-10 Spin Column (Bio Basic inc.) en suivant les recommandations du fabricant.

5. Réaction de polymérase en chaîne quantitative (qPCR)

Les PCR quantitatives réalisées au cours de ce projet ont été réalisées en utilisant les équipements de la plateforme transcriptomique de l'IMM. La composition en réactif par échantillon est détaillée dans le tableau 6. Les amplifications ont été réalisées avec l'appareil CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio Rad) selon le programme suivant adapté selon l'échantillon amplifié :

- Dénaturation : 2 minutes à 98 °C,
- De 40 cycles de polymérisation composés d'une étape de dénaturation de 5 secondes à 98 °C, d'hybridation et d'élongation de 10 secondes à 60 °C. Après chaque cycle la fluorescence de chaque échantillon a été déterminé.
- Cette étape est suivie par l'établissement d'une courbe de fusion, avec 10 secondes à 95 °C, 5 secondes à 65 °C, puis une diminution de 0,5 °C par cycle.

Tableau 6 : Détail des réactifs utilisés pour la réalisation de qPCR.

Réactifs	Volume (µL)/réaction	Concentrations finales
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix 2X	7,5	1X
Amorce 1 100 µM	0,075	0,5 µM
Amorce 2 100 µM	0,075	0,5 µM
H_2O Nuclease-Free	QSP 15 µL	

Les résultats d'amplification ont été analysés avec le logiciel CFX Maestro (Bio Rad).

6. Réaction de polymérase en chaîne Digitale en gouttelettes (ddPCR)

Les ddPCR réalisées au cours de ce projet ont été réalisées en utilisant les équipements de la plateforme transcriptomique de l'IMM. Les échantillons d'ADN à quantifier par ddPCR ont été préparés pour obtenir une concentration spécifique ou pour obtenir une concentration restant dans la plage de quantification établi. La composition en réactif par échantillon est détaillée dans le tableau 7. Une fois les réactifs ajoutés aux échantillons, un dépôt de 25 µL est réalisé par entrée de chambre des puces Sapphire (Stilla Technologies, C14012). L'amplification PCR est ensuite réalisée dans le thermocycleur Geode (Stilla Technologies, H14000) associé au générateur de pression Fluigent FLPG Plus permettant une pression de 1,3 bar. Les étapes d'amplification sont :

- Le partitionnement des échantillons à 40 °C
- La dénaturation des échantillons à 95 °C pendant 3 minutes
- La réalisation de 45 cycles composés d'une étape de dénaturation à 95 °C pendant 10 secondes suivie d'une étape d'hybridation/élongation à 60 °C pendant 15 secondes,
- Trois cycles d'augmentation de pression jusqu'à 50 mbar permettant une meilleure séparation des gouttelettes.

Tableau 7 : Détail des réactifs utilisés pour la réalisation de ddPCR.

Réactifs	Volume (µL)/réaction
H_2O RNase Free	2,225
PerfeCTa® qPCR Toughmix UNG 2X (Quantabio, 95138-012)	9,375
Alexa 647 (0.02 mg/ml) (Invitrogen, D22914)	1
20X EvaGreen® DNA-binding dye (Biotium, 31000)	1,9
Amorce 1 (20 µM)	0,25
Amorce 2 (20 µM)	0,25
ADN	10
Final Volume (uL)	25

Après l'amplification, les puces Sapphire sont alors déplacées dans le lecteur de puce Prism3 (Stilla Technologies, H22000) pour être analysées. Les logiciels CrystalReader et CrystalMiner ont été utilisés pour la lecture et l'analyse des puces.

7. Rétrotranscription des ARN

Un µg d'ARN a été mélangé avec 1 µL d'amorce aléatoire (500 µg/mL) et complété avec de l'eau RNase-free pour obtenir un volume total de 5 µL, avant d'être vortexé à 1000 RPM pendant 30 secondes et chauffé à 70 °C pendant 5 minutes, puis placé sur glace. Le mélange réactionnel de rétrotranscription, composé de 4 µL de tampon GoScript 5X, 2 µL de $MgCl_2$, 1 µL de dNTP, 7 µL

d'eau RNase-free et 1 µL de GoScript reverse transcriptase, a ensuite été ajouté, portant le volume final à 20 µL. Les échantillons ont été incubés 5 minutes à 25 °C, puis 2 heures à 42 °C, avant l'inactivation de l'enzyme à 70 °C pendant 15 minutes. Les ARN ont ensuite été stockés à -80 °C jusqu'à utilisation.

8. Conception et listes des amorces

Au cours de ce projet plusieurs amorces ont été conçues à l'aide d'approches bio-informatiques (voir Résultats, partie II) et commandées chez Integrated DNA technologies (IDT™) (tableau 8).

Tableau 8 : Liste des amorces utilisées au cours de ce projet

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5'->3')
pLD1_Fwd	gaggagctcaggaggaattcaccatggaaagagcacagcatgac
pLD1_Rev	tgatctagatcagtggtggtggtggtggtgtgcctgcgcctccgtatgttgtg
pLD2_Fwd	gaggagctcaggaggaattcaccatgagcaactacgtcctcgcc
pLD2_Rev	tgatctagactagtggtggtggtggtggtgtgcctcgacccacgccttggcgcgt
LD4_Fwd	ggaagtggacaccaccaccaccaccac
LD4_Rev	tccacttcctgcctgcgcctccgtatg
LD5_Fwd	tatgagctcaaggagatataccatggaaagagcacagcatgac
LD5_Rev	atactcgagtccacttcctccacttcctgcctgcgcctccgtatgttgtg
pLD_3131_Fwd	ccgtttgattctgcctcattg
pLD_3131_Fwd_Cy5	/5Cy5/ccgtttgattctgcctcattg
pLD_3131_Rev	actgtgtaccatgatctggac
pLD_Pthi_Fwd	gtcccgttacgctcgacga
pLD_Pthi_Fwd_Cy5	/5Cy5/gtcccgttacgctcgacga
pLD_Pthi_Rev	tgtgacatggtggcatctcc
pLD_Ppts_Fwd	acatgcccttgaaggcttcc
pLD_Ppts_Fwd_Cy5	/5Cy5/acatgcccttgaaggcttcc
pLD_Ppts_Rev	cttcggcttgtcggaatgc
pLD_DVU_0169_Fwd	aagaagttcccccagttcgc
pLD_DVU_0169_Rev	ttgtcgagattgtagcgggg
pLD_CA_C0825_Fwd	agagacaccggtgcaaagaa
pLD_CA_C0825_Rev	ctttgcgcttccccaagatg
pLD_16S_NvH_Fwd	tctggctcagattgaacgct
pLD_16S_NvH_Rev	gcaagcagaggccacctttc
pLD_16S_Ca_Fwd	caggatgacaggtggtgcat
pLD_16S_Ca_Rev	agccctagacataaggggca
pLD_DVUA0034_Fwd	gggttggtcgagaagtggtt
pLD_DVUA0034_Rev	agttgcaggagaagtacggc
pLD_CA_P0035_Fwd	agtgccgcatccaagagtaa
pLD_CA_P0035_Rev	atgccttcttcacagggagc
pLD52_DVU_3131_Fwd	tgtcaccgatgaggagaccg
pLD52_DVU_3132_Rev	tcttgtcggcctgcaggc
pLD53_DVU_3132_Fwd	cgccacgacatgacgca
pLD53_DVU_3133_Rev	catctctttgcccagcgaaatct
pLD54_DVU_3133_Fwd	cgtgaacaaggctcagggc
pLD54_DVU_3134_Rev	ccctggtcgagggcgag

9. Quantification et contrôle de la qualité des acides nucléiques

Les acides nucléiques extraits et purifiés ont été quantifiés à l'aide du NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Pour augmenter la précision de certaines mesures, une quantification supplémentaire a été réalisée à l'aide du fluoromètre Qubit™ (Invitrogen). La qualité des échantillons a ensuite été évaluée par électrophorèse sur gel d'ADN. Afin de vérifier la bonne amplification et/ou purification des produits PCR et des plasmides, 5 à 10 µL de produit, additionnés de Gel Loading Dye Purple (6X) (NEB, B7024S), ont été déposés sur un gel d'agarose à 2 % (w/v). La migration a été effectuée à 50 V dans un tampon TAE 1X (40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA) pendant 40 à 50 minutes. Le gel a ensuite été incubé pendant 15 minutes dans une solution contenant du bromure d'éthidium (BET), puis l'ADN a été visualisé sous UV à l'aide du système d'imagerie Vilbert® E-Box. Enfin, l'analyse de la qualité de certains échantillons d'acides nucléiques a également été réalisée avec un système d'électrophorèse automatisé (Agilent TapeStation 4200).

10. Clonage des gènes *DVU_3131* et *DVU_3134*

Les deux gènes *DVU_3131* (LsrR-like) et DVU_3134 (LsrK-like) présents chez *Nv*H ont été clonés au cours de cette étude pour la réalisation d'expériences *in vitro* après une production hétérologue dans l'hôte *E. coli* et la purification des protéines.

A. Amplification des gènes pour clonage

L'amplification des gènes a été effectuée par PCR à partir de l'ADN purifié de *Nv*H (7,5 $ng.\mu L^{-1}$), en utilisant les paires d'amorces pLD1_Fwd/Rev et pLD5_Fwd/Rev pour le gène *DVU_3131*, ainsi que pLD2_Fwd/Rev pour le gène *DVU_3134*. Ces amorces ont été conçues pour introduire une étiquette 6-Histidine à l'extrémité C-terminale de la protéine, éventuellement reliée par une séquence de liaison (GSGSGS). Elles permettent également d'intégrer des sites de restriction pour faciliter le clonage et incluent un site Shine-Dalgarno en aval du codon d'initiation. Pour la construction du plasmide p33Tac LsrR-GS-6His, l'ajout de la séquence de liaison (GSGSGS) a été réalisé par amplification PCR du plasmide p33Tac LsrR-6His, précédemment conçu, à l'aide de la paire d'amorces pLD4_Fwd/Rev, ce qui a permis l'insertion de la séquence de liaison (voir tableau des amorces).

B. Digestion par les enzymes de restriction et ligation

Les produits d'amplification PCR obtenus et purifiés pour les gènes *DVU_3131* et *DVU_3134* ont été digérés simultanément avec des enzymes de restriction, en parallèle avec les

plasmides purifiés. Pour ce faire, 5 µL du tampon CutSmart® (NEB) ont été mélangés à 1,5 µL de chacune des deux enzymes de restriction (*Sac*I/*Xba*I pour les constructions concernant le vecteur p33Tac, et *Sac*I/*Xho*I pour le vecteur pET21), ainsi qu'à 30 µL d'amplicon PCR purifié ou 20 µL de plasmide purifié. Le mélange a ensuite été complété jusqu'à 50 µL avec de l'eau nucléase-free. Les échantillons ont été incubés pendant 2 heures à 37 °C. Au cours de cette incubation, 5,5 µL de tampon phosphate Antartic 10X et 1 µL de phosphatase Antartica (Biolabs, M0289S) ont été ajoutés après 30 minutes de digestion enzymatique des plasmides, en préparation pour l'étape suivante de ligation entre les fragments amplifiés et les vecteurs.

Après la digestion enzymatique, les inserts (9,5 µL) ont été ajoutés aux plasmides correspondants (3 µL), ainsi qu'au tampon de ligation 10X (1,5 µL) et à la ligase T4 DNA (1 µL) (NEB). Le mélange a été incubé à 16 °C pendant une nuit, dans un volume final de 15 µL.

Les deux plasmides utilisés au cours de cette étude sont présentés dans la figure 33 ci-dessous.

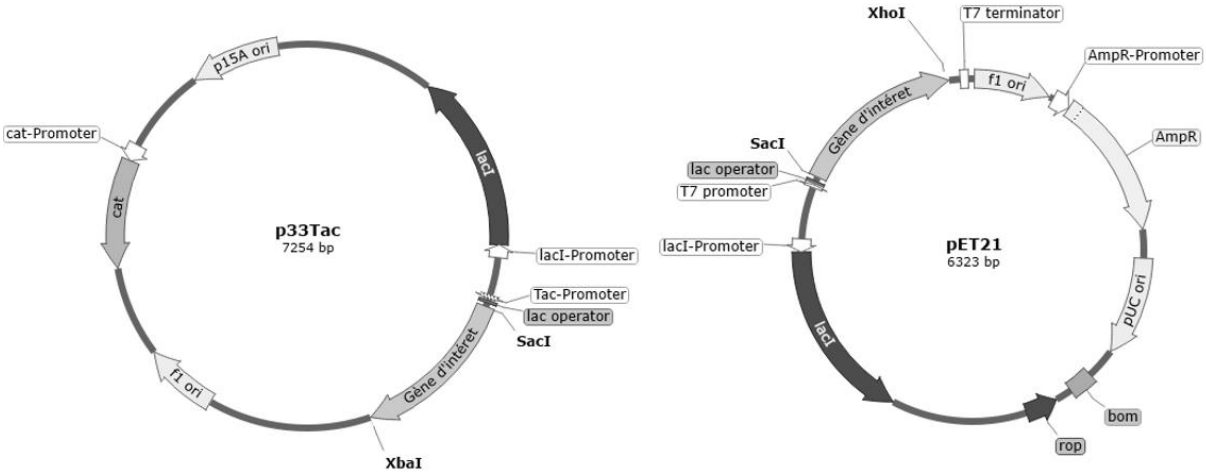


Figure 33 : Cartes des plasmides p33TAC et pET21. Les plasmides p33Tac (7254 pb) et pET21 (6323 pb) portant respectivement les gènes de résistance au chloramphénicol et ampicilline, sont représentés. Les sites de restrictions *Sac*I/*Xba*I et *Sac*I/*Xho*I utilisés pour les constructions respectives des vecteurs p33Tac et pET21 sont indiqués.

C. Préparation des cellules compétentes

La préparation des cellules compétentes d'*E. coli* débute par une préculture sur la nuit dans du LB d'une colonie isolée, servant à inoculer au 1/100ème 100 mL de LB. Lorsque la DO_{600nm} atteint 0,6-0,8, la culture est divisée en deux puis est centrifugée à 2000 g et 4 °C. Les culots sont resuspendus dans 25 mL de $CaCl_2$ 0,05 M froid, puis incubés 30 minutes sur glace, et enfin centrifugés à nouveau. Les culots obtenus après cette centrifugation sont resuspendus dans 2,5 mL de $CaCl_2$ 0,05 M avec 15 % de glycérol (v/v) et incubés 20 minutes sur glace. Enfin, les cellules compétentes sont aliquotées en volume de 100 µL et stockées à -80 °C.

D. Transformation des cellules compétentes

Dans un tube Eppendorf de 2 mL, 3 µL de plasmide sont mélangés à 50 µL de cellules compétentes. La suspension obtenue est incubée 45 minutes sur glace puis chauffée 2 minutes à 42 °C, et incubée à nouveau 5 minutes sur glace. Après l'ajout de 1 mL de LB, le mélange est incubé 5 minutes à température ambiante, puis 1 heure à 37 °C sous agitation (160 RPM). Enfin, les bactéries sont étalées sur une boîte LB contenant l'antibiotique approprié puis incubées sur la nuit à 37 °C. La présence du plasmide d'intérêt est ensuite testée par PCR directement sur les colonies isolées. La qualité du clonage est vérifiée après purification du plasmide par séquençage Sanger (Genewiz). Les souches contenant les constructions sont stockées au -80 °C dans du LB contenant du glycérol 11 % (v/v).

III. Méthodes de biochimie

1. Techniques de chromatographie pour l'analyse des métabolites

Les métabolites sécrétés dans la suspension cellulaire sont quantifiés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec le système 1260 Infinity LC (Agilent Technologies) et une colonne Hi-Plex H de 7,7 × 300 mm, 8 µm. Cette méthode de chromatographie par échange ionique et échange de ligands est optimisée pour séparer divers acides organiques ainsi que des métabolites tels que le glucose ou des solvants (éthanol…). Des échantillons de 1,5 mL de culture cellulaire sont prélevés, clarifiés à l'aide d'un filtre de 0,2 µm pour éliminer les cellules, puis 25 µL de l'échantillon clarifié sont injectés sur la colonne. La phase mobile consiste en une solution tampon de H_2SO_4 à 10 mM (dégazée et filtrée à 0,2 µm), utilisée à un débit de 0,6 mL/min. Un détecteur à indice de réfraction (RID) est employé pour la détection, en raison de sa capacité à détecter un large éventail de composés notamment les métabolites qui n'absorbent dans aucune longueur d'onde tel que le glucose. Il est ainsi complémentaire au détecteur UV-Visible (DAD). Des courbes étalons ont été réalisées pour chacun des composés quantifiés après chaque installation de la colonne afin de déterminer la relation entre l'aire du pic obtenu et la concentration et temps de rétention de chacun des composés. Les profils d'élution sont analysés sur la base des temps de rétention qui permettent l'identification du composé et du calcul de l'aire sous le pic qui permet de définir une concentration.

2. Test de bioluminescence

Pour suivre la présence d'AI-2 dans différentes conditions, 10 µL de surnageant de culture clarifié (0,2 µm) ont été ajoutés dans des plaques à 96 puits (Greiner 96 Flat Black), chaque puits contenant 90 µL de cellules de *V. harveyi* BB170, pré-cultivées pendant 16 heures dans un milieu AB dans l'obscurité et diluées à 1/5000. Ensuite, la plaque a été incubée pendant 12 heures à 30 °C (216 RPM) dans un lecteur de plaque (Tecan Spark™ 10 M). La bioluminescence produite par *V. harveyi* BB170 ainsi que l'absorbance à 600 nm ont été mesurées toutes les 30 minutes. La bioluminescence normalisée en fonction de la densité optique à 600 nm a ensuite été tracée au cours de la croissance. Comme cette souche de *V. harveyi* BB170 possède un système AI-2 fonctionnel, le point temporel sélectionné pour l'essai est déterminé en fonction du seuil de bioluminescence intrinsèque produit par les cellules de *V. harveyi* BB170 avec seulement 10 µL de milieu de culture.

Afin de suivre la biodisponibilité de l'AI-2 dans le milieu, 7 µL de milieu 2xTG clarifié (0,2 µm) de culture de *C. acetobutylicum* en phase exponentielle, en présence ou en absence de LsrK-like (3 µM), ont été ajoutés au 90 µL de *V. harveyi* BB170.

3. Méthodes de production et de purification de protéine

A. Production des protéines LsrK-like et LsrR-like

Afin de produire et purifier les protéines de type LsrR-like et LsrK-like, plusieurs conditions ont été testées. L'expression hétérologue des protéines d'intérêt dans *E. coli* a systématiquement été réalisée à partir d'une préculture en phase stationnaire, réinoculée au 1/100e dans un milieu LB contenant l'antibiotique spécifique à la construction utilisée. L'induction de l'expression a été effectuée avec différentes concentrations d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), variant de 0,1 mM à 0,5 mM. L'induction est déclenchée lorsque la densité optique à 600 nm atteint environ 0,8, et la culture est poursuivie soit pendant 3 heures à 37 °C (160 RPM), soit pendant 16 heures à 16 °C. Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation à 4000 RPM pendant 30 minutes à 4 °C. Les culots cellulaires sont ensuite soit congelés à -20 °C pour une utilisation ultérieure, soit directement utilisés en vue de la purification de la protéine. Des aliquots d'extraits bruts, avec une concentration cellulaire équivalente, sont prélevés avant et après induction par l'IPTG et centrifugés pendant 5 minutes à 10 000 RPM puis conservés à -20 °C.

B. Dosage protéique

Le dosage protéique des différentes fractions obtenues lors de la production et de la purification est réalisé à l'aide du kit Bicinchoninic Acid kit (Sigma, BCA1-1KT) en suivant les instructions du fabricant et l'absorbance à 562 nm est mesurée avec le spectrophotomètre Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologie).

C. Purification protéique par chromatographie d'affinité nickel

Les culots cellulaires sont resuspendus dans 5 mL/g dans un tampon HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M ou dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, préalablement refroidi dans la glace, auquel est rajouté 5 µg/mL de DNases I (Roche, 10104159001) et ainsi qu'une pastille de cOmplet ULTRA Tablets, (Roche, 058929533001). Après re-suspension, trois casses mécaniques sont successivement réalisées à 1000 PSI à l'aide du French press (Thermo Electron Corporation) en utilisant une cellule de pression (SIM AMINCO®,FA-031 40K). L'extrait cellulaire obtenu est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 4 °C (10 000 RPM) et le surnageant qui correspond à l'extrait brut contenant l'extrait protéique soluble est récupéré. Le surnageant est clarifié par filtration (0,45 µm) puis déposé sur une colonne nickel Histrap FF 1 mL (Cytiva,17531901) équilibrée dans le tampon de re-suspension utilisé permettant la fixation des protéines à la colonne par l'intermédiaire de leurs étiquettes 6-His présentent en C-terminal.

Après lavage de la colonne, un gradient discontinu d'imidazole allant de 0 à 0,5 M est réalisé et des fractions de 1 mL sont collectées. Les fractions sont analysées par coloration au bleu de Coomassie après une migration sur gel SDS-PAGE 12 % ou par Western-Blot et révélées par chimioluminescence. Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont collectées et la solution protéique est stockée à -20 °C ou directement utilisée après lavage dans le tampon de re-suspension et concentration sur Centricon (Amicon®, 10K).

D. Renaturation de la protéine LsrR-like

Les essais de production de la protéine LsrR-like ne permettant pas d'obtenir une protéine soluble, une stratégie de production sous la forme de corps d'inclusion suivie d'un processus de renaturation a été mise en place. La culture des cellules recombinantes d'*E. coli* a été faite selon les conditions décrites ci-dessus, à savoir : 0,5 mM IPTG, 37 °C, 5 heures, 160 RPM et les cellules ont été récupérées comme précédemment décrit. L'extrait cellulaire obtenu après la casse est centrifugé pendant 15 minutes à 4 °C (10 000 RPM) afin de récupérer la fraction insoluble contenant les corps d'inclusion formés par l'agrégation de la protéine LsrR-like dans *E. coli*. Les corps d'inclusion sont re-suspendus et lavés trois fois à l'aide de 10 mL d'une solution composée de Tris-HCl pH 7,4, NaCl 150 mM, et Triton X-100 à 1 % (w/v). Après chaque lavage, les cellules sont centrifugées à 2000 g pendant 10 minutes pour éliminer les cellules non lysées et les débris cellulaires présents dans le surnageant, le culot contenant les agrégats de protéine. Ce dernier est ensuite re-suspendu et homogénéisé à l'aide d'un Potter (10 cm^3). À l'issue du dernier lavage, le culot est pesé et re-suspendu dans 50 mL/g de tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM et urée 8 M afin de dénaturer les protéines. La solution est incubée sous agitation à 4 °C sur la nuit puis transférée dans une membrane de dialyse (10-14 kDa) de 2,5 cm d'épaisseur. Différents bains de dialyse de concentration décroissante en urée sont réalisés. La première étape de dialyse est réalisée pendant 1 heure sous agitation à 4 °C dans 2 L de tampon à 8 M urée, puis des dialyses de deux fois 1 heure contre du tampon à 6, 4, et 0 M urée sont réalisées dans 500 mL de tampon permettant une renaturation progressive des protéines. À la fin du processus de dialyse, l'échantillon est récupéré, pour effectuer les expériences de contrôle qualité. Pour finir l'échantillon est aliquoté et stocké à -80 °C ou utilisé extemporanément.

E. Analyse des protéines par électrophorèse

La présence et la pureté des protéines d'intérêt dans les extraits bruts au cours de la production comme dans les différentes fractions collectées lors des étapes de purification sont vérifiées par électrophorèse sur gel 12 % de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de

sodium (SDS-PAGE). Les échantillons sont préparés avec du tampon de charge TSTD 3X (Tris-HCl pH 8,8, 133 mM ; EDTA 3,3 mM ; Sucrose 0,67 mM ; Bleu de bromophenol 0,067 % (w/v) ; SDS 6 % (v/v) ; DTT 0,1 M ; 2-mercaptoethanol 1.67 % (v/v) et chauffés à 95 °C pendant 5 minutes. Les fractions protéiques alors dénaturées sont déposées et la migration dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,3, Glycine 192 mM, SDS 0,1 % est réalisée à 15 mA pendant 30 minutes puis à 40 mA jusqu'à l'obtention d'une migration complète du front de migration. Après migration, les protéines présentes dans le gel sont révélées soit par coloration au bleu de Coomassie pendant 1 heure, suivi d'étapes de décoloration (acide acétique à 10 % (v/v), éthanol à 30 % (v/v), H_2O à 60 %), soit par Western blot humide à l'aide d'anticorps spécifiques. Pour ce dernier, le transfert des protéines sur membrane en nitrocellulose est effectué pendant 30 minutes à 0,5 A dans un tampon de transfert (éthanol 20 % (v/v), Tris-HCl pH 8,3 et glycine 190 mM). Cette étape est suivie d'une saturation de la membrane à l'aide d'une solution contenant de la BSA (BSA à 2,5 %, PBS-Tween à 0,1 %) pendant une nuit sous agitation à 4 °C. La membrane est ensuite lavée trois fois avec une solution PBS-Tween à 0,1 % avant d'être mise en contact avec l'anticorps anti-His couplé à la HRP (3 µL d'anticorps à 1 mg/mL (Invitrogen) dans 10 mL de PBS-Tween à 0,1 %) pendant 1 heure sous agitation. Après quatre étapes de lavage avec du PBS-Tween à 0,1 % pendant 5 minutes chacune, 2 mL de luminol et 2 mL de peroxyde (WestPico) sont ajoutés. La chimioluminescence est révélée à l'aide de l'ImageQuant Las 400 Mini (GE Healthcare), et l'analyse est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

F. Analyse protéomique

L'analyse protéomique a été réalisée sur les fractions protéiques collectées après purification déposées sur un gel SDS-PAGE à 12 %. Après 5 minutes de migration à 15 mA, une coloration au bleu de Coomassie suivie d'une décoloration a été effectuée. La bande protéique contenue dans la zone d'empilement (stacking) a ensuite été découpée puis soumise à une analyse par spectrométrie de masse après digestion enzymatique à la trypsine. Les analyses ont été réalisées sur la plateforme protéomique de l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM), équipée d'un spectromètre de masse Microflex II à temps de vol (Bruker, Allemagne), permettant l'acquisition de spectres *via* la technique MALDI-TOF (Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice – Temps de Vol).

G. Analyse par dichroïsme circulaire

L'analyse de la structure secondaire des protéines purifiées est réalisée par dichroïsme circulaire (CD). Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectropolarimètre Jasco J-815 dans

une cellule en quartz de 1 mm de trajet optique. Les échantillons protéiques sont dilués dans un tampon phosphate (K_2HPO_4 20 mM/KH_2PO_4 20 mM) pH 7,4 de façon à obtenir une concentration finale de 0,1 mg.mL^{-1}. Le spectre de CD est enregistré entre 180 et 260 nm, à une température de 20 °C, avec une vitesse de balayage de 20 nm/min. Un spectre contrôle est réalisé sur une solution sans protéine et est soustrait pour corriger les signaux.

H. Gel retard

Pour évaluer la capacité de LsrR-like à reconnaître une région promotrice spécifique, une PCR est réalisée à partir de l'ADN génomique de *Nv*H avec des amorces adaptées (voir tableau des amorces), marquées ou non au dCTP-cy5 fluorescent. L'amplicon purifié est incubé (50 ng si non marqué, 3 ng si marqué) avec ou sans la protéine LsrR-like à différentes concentrations dans un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,4. Pour les contrôles, une séquence non spécifique d'ADN de *C. acetobutylicum* (80 ng) ou 60 ng de Poly-(2'-désoxyinosinyl-2'-désoxycytidylate) (poly(dI-dC)•poly(dI-dC)) est utilisée. Après 30 minutes d'incubation à 4 °C, les échantillons sont déposés sur un gel natif (6 % acrylamide/bis-acrylamide 37.5:1, Tris-Acetate EDTA 1X) et la migration s'effectue dans du tampon TAE 0,5X pendant 1 heure 30 à 50 mA. La détection est effectuée avec un scanner laser Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) pour les amplicons marqués tandis que le retard sur gel est analysé sous UV à l'aide du système d'imagerie Vilbert® E-Box après une incubation de 15 minutes dans une solution contenant du bromure d'éthidium (BET) pour les amplicons non marqués. Il est attendu que s'il existe une interaction entre la protéine et l'ADN, on puisse observer un retard de migration sur le gel.

I. Test d'activité kinase

L'activité kinase de la protéine LsrK-like a été mesurée à l'aide d'un système rapporteur basé sur une cascade enzymatique utilisant la pyruvate kinase (PK) (Sigma, P1506-5KU) et la lactate déshydrogénase type III (LDH) (Sigma, L2625-2.5 KU) (figure 34). Ce système repose sur une série de réactions dépendantes de la production d'ADP générée par hydrolyse de l'ATP lors de l'activité kinase de LsrK-like.

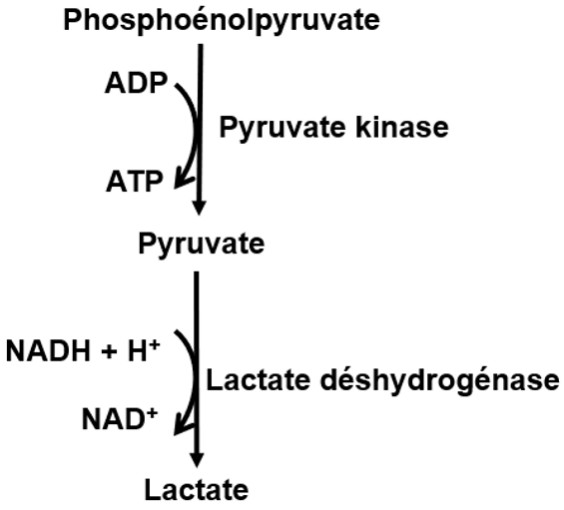


Figure 34 : Schéma de la réaction couplée PK : LDH pour la mesure de l'activité kinase. Dans ce système, le phosphoénolpyruvate (PEP) est converti en pyruvate par la pyruvate kinase en présence d'ADP, générant de l'ATP. Le pyruvate formé est ensuite transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH), utilisant le NADH qui est oxydé en NAD^+. La consommation de NADH, suivie par la diminution de l'absorbance à 340 nm, permet de quantifier indirectement l'activité kinase dans le système.

L'activité kinase est suivie par la consommation de NADH, mesurée par l'absorbance à 340 nm. Les expériences ont été réalisées à une température contrôlée de 30 °C grâce à un spectrophotomètre Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies), équipé de l'accessoire Cary Single Cell Peltier pour le contrôle de température.

Les réactions enzymatiques ont été réalisées dans un tampon de glycyl-glycine (glycyl-glycine de 50 mM, 0,5 mM d'EDTA, 15 mM de $MgCl_2$ et 50 mM de KCl). Le mélange réactionnel final pour les tests d'activité kinase contient du phosphoénolpyruvate (PEP) à 1 mM, de l'ATP à 2 mM et du $NADH,H^+$ à 0,2 mM. En outre, la réaction est couplée avec 2,5 U de lactate déshydrogénase (LDH) et 1 U de pyruvate kinase (PK) pour la détection de l'activité kinase de la protéine LsrK-like. Celle-ci a été testée à trois concentrations différentes : 0,5 µM, 1 µM et 2 µM, dans un mélange contenant soit du glycérol (1 mM), du DPD (1 mM), ou 40 µL de milieu 2xTG clarifié (0,2 µm) de culture de *C. acetobutylicum* en phase exponentielle comme substrat.

IV. Outils bio-informatiques

1. Transcriptomique

Les données de séquençage RNA Paired-End (PE) ont été traitées en plusieurs étapes en utilisant différents outils bioinformatiques pour assurer la qualité et la précision des analyses de quantification des transcrits. Tout d'abord, un contrôle de qualité a été réalisé sur les séquences brutes à l'aide de FastQC (Galaxy Version 0.73+galaxy0) pour identifier d'éventuels artefacts ou problèmes de qualité. Le nettoyage des séquences a ensuite été effectué avec l'outil fastp (Galaxy, Version 0.23.2+galaxy0 ; paramétrer pour l'analyse PE) afin d'éliminer les adaptateurs. Les séquences ont ensuite été soumises à un filtrage basé sur leur qualité et leur longueur à l'aide de Trimmomatic (Galaxy Version 0.38.1), en utilisant l'opération de fenêtrage glissant (SLIDINGWINDOW) avec une moyenne de qualité de 28 sur 8 bases consécutives et une longueur minimale des lectures conservées de 25 bases.

Les séquences nettoyées ont été alignées au génome de référence de *Nv*H ou de *C. acetobutylicum* avec Bowtie2 (Galaxy, Version 2.4.5+galaxy1) en utilisant l'option de library paired-end et en construisant un index génomique à partir des fichiers de référence spécifiques aux deux génomes (*Nv*H : ASM19575v1 ; *C. acetobutylicum* : ASM876v1). Les alignements ont ensuite été filtrés pour ne conserver que ceux dont la qualité d'alignement était supérieure à 29, grâce à l'outil Filter BAM datasets (Galaxy Version 2.5.1+galaxy0).

La quantification des gènes a été effectuée avec l'outil featureCounts (Galaxy Version 2.0.1+galaxy2), en utilisant les annotations génétiques spécifiques de chaque génome (*Nv*H : GCF_000195755.1 ; *C. acetobutylicum* : GCF_000008765.1). L'option de comptage des fragments, en ne retenant que ceux avec les deux lectures alignées, a été activée, et les duplicatas ont été ignorés pour éviter les biais de quantification. Les caractéristiques génétiques ont été définies par le filtre de type "gène" et identifiées par leurs identifiants "gene_id". Cette méthodologie a permis d'obtenir des comptes de fragments normalisés et de haute qualité (>28), essentiels pour les analyses d'expression différentielle des gènes.

Pour finir, l'analyse comparative entre échantillons a été réalisée avec DESeq2 (Galaxy Europe, Version 2.11.40.8+galaxy0) pour identifier les différences d'expression génique significatives entre les conditions expérimentales.

2. Recherche par homologie de séquence des acteurs du QS chez *Nv*H et *C. acetobutylicum* à partir de la base de données KEGG

Afin de simplifier la collecte des séquences protéiques accessibles par l'intermédiaire de KEGG database, deux scripts BASH ont été réalisés. Le premier script automatise le processus

de récupération, traitement et filtrage de liens pour des entrées KEGG et leur conversion en liens Uniprot modifiés, avec des étapes pour nettoyer les formats HTML et standardiser les liens en format « .fasta » (Annexe 1). Les séquences fasta ont ensuite été téléchargées à l'aide de la commande "wget -i input.txt -O output.fasta" adaptée aux noms des fichiers générés avant d'être utilisés pour réaliser une recherche d'homologie BlastP (ncbi-blast-2.13.0+-x64-linux) en local à l'aide du Script 2 (Annexe 2).

3. Prédiction et alignement des structures protéiques

La structure 3D des protéines a été générée avec AlphaFold2 et Alphafold3, seules les structures présentant le niveau de confiance le plus élevé ont été sélectionnées pour les études d'alignement structural.

Pour la superposition de structures, les protéines ont été alignées *via* la commande "align structure1, structure2" de PyMOL, qui permet d'aligner les atomes correspondants de deux structures en minimisant la distance entre eux. Une fois l'alignement réalisé, l'écart quadratique moyen (RMSD) est déterminé en calculant la racine carrée de la moyenne des carrés des distances entre les atomes correspondants. Un RMSD bas met en avant une similarité entre les structures, tandis qu'un RMSD élevé indique une différence structurale.

Résultats

I. Détermination du mécanisme moléculaire de communication au sein du consortium *C. acetobutylicum* et *Nv*H

1. Identification des acteurs de quorum sensing chez *C. acetobutylicum* et *Nv*H

A. Recherche des acteurs potentiels du QS de type AI-2 par une approche *in silico*

Les travaux de l'équipe ont démontré l'implication du quorum sensing de type AI-2 dans l'établissement de l'interaction entre *C. acetobutylicum* et *Nv*H. Peu d'informations étaient alors connues sur les acteurs moléculaires et les mécanismes impliqués dans la production comme la détection de l'AI-2 au sein des deux bactéries constituant ce consortium synthétique. Les premiers travaux réalisés par David Ranava au laboratoire ont permis de mettre en évidence la capacité de l'organisme *C. acetobutylicum* à produire la molécule de quorum sensing (MQS) de type AI-2 confirmant les travaux de Jibin Sun de 2004 qui proposaient l'existence d'un gène *luxS* homologue chez *C. acetobutylicum* basés sur une analyse *in silico* du génome (Sun *et al.*, 2004; Ranava *et al.*, 2021). Cependant, aucune autre protéine impliquée dans la perception de l'AI-2 chez *C. acetobutylicum* ou *Nv*H n'a été identifiée à ce jour. Afin d'améliorer nos connaissances sur l'implication du QS, le premier objectif de mon travail de thèse a été de rechercher les acteurs moléculaires potentiels par une approche *in silico*.

Quand le gène codant la protéine recherchée dans un organisme n'est pas identifiée lors de l'annotation du génome, une approche classique reposant sur l'outil bio-informatique Basic Local Alignment Search Tool for Protein (BLASTP) permet la recherche d'homologie entre une séquence protéique de référence retrouvée chez un organisme modèle et l'ensemble des protéines de l'organisme souhaité (Altschul *et al.*, 1990). L'algorithme BLASTP compare une séquence protéique à celles présentes dans une base de données, en recherchant des segments similaires. Pour cela, il segmente la séquence protéique recherchée et celles de la base de données en petites séquences appelées "mots", généralement de cinq acides aminés. Ensuite, il identifie des alignements locaux en recherchant des mots similaires ou proches entre les séquences comparées. Si cette approche, relativement simple d'utilisation est très utile, elle est grandement limitée par le nombre de séquences utilisées comme référence, ce qui peut entraîner la non-détection des protéines dont la séquence diffère trop.

Une première recherche par homologie de séquences protéiques utilisant les modèles de référence *E. coli* (pour le système AI-2 de type Lsr) et *V. harveyi* (pour le système AI-2 de type Lux) a permis la mise en évidence d'acteurs potentiels chez *C. acetobutylicum* et *Nv*H. Ainsi, le gène *luxS* chez *C. acetobutylicum* a été retrouvé comme attendu. Le gène *DVU_3131* (LsrR-like), identifié précédemment au laboratoire par recherche d'homologie de séquence protéique au cours des travaux de thèse de David Ranava et Cassandra Backes, sans aboutir à la

détermination de son rôle dans le QS AI-2 de *Nv*H a également été retrouvé. Par ailleurs, *DVU_3134*, en raison de sa proximité génétique avec le régulateur LsrR-like chez *Nv*H, avait été proposé par David Ranava comme un candidat potentiel pour la protéine LsrK (Ranava, 2016; Backes, 2018).

Ces résultats ont permis d'émettre deux hypothèses 1) l'absence d'un système complet de type AI-2 ou 2) la présence d'un système de type AI-2 non canonique, dont les séquences protéiques modèles (d'*E. coli* ou *V. harveyi*) utilisées ne permettent pas la détection et dont l'annotation ne correspondrait pas à un système QS connu.

Afin d'investiguer la seconde hypothèse, il a été nécessaire d'augmenter la diversité des séquences de référence utilisées afin de lever le biais imposé lorsqu'une seule séquence protéique de référence est utilisée. La base de données Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway (KEGG Pathway) a été choisie pour sa grande diversité de données, mais aussi pour sa facilité de lecture et d'accès aux séquences protéiques. Elle possède une structure particulière permettant la visualisation des protéines impliquées dans différentes voies cellulaires, dont une spécifique pour le QS (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=ko02024) qui permet le regroupement des séquences protéiques de différents organismes annotées comme acteurs du QS. Pour cela, KEGG utilise l'annotation des protéines basée sur des domaines fonctionnels et motifs conservés. Ces informations sont obtenues à partir de bases de données comme PFAM, InterPro, ou des algorithmes de prédiction des fonctions de la protéine.

Un script Bash a été conçu pour automatiser le téléchargement de la base de données KEGG, servant ensuite de base de référence pour l'exécution du programme BLASTP en local (voir Matériels et méthodes). La réalisation de ce script a permis d'obtenir rapidement les séquences protéiques sans avoir à télécharger manuellement chacune d'elles et d'obtenir l'ensemble des homologues pour une même protéine.

Jusqu'ici seul le gène *luxS* chez *C. acetobutylicum* (*CA_C2942*) avait pu être identifié et annoté dans les bases de données comme acteur du QS. Grâce à cette approche de recherche systématique de toutes les séquences homologues connues d'une protéine contre un génome cible, la présence d'autres protéines homologues a pu être mise en évidence pour les systèmes Lsr et Lux chez *Nv*H et *C. acetobutylicum*. Le tableau 9 synthétise les résultats obtenus pour la recherche d'homologie de séquence (BLASTP). Pour chacune des protéines, un modèle de la structure tridimensionnelle a été réalisé par AlphaFold2. Les valeurs RMSD d'alignement des

structures 3D pour ces protéines avec les protéines des organismes modèles *E. coli* et *V. harveyi* sont également présentées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Recherche d'acteurs du QS chez *Nv*H et *C. acetobutylicum* par analyse *in silico*. La protéine correspondant au meilleur alignement de séquence, entre les protéines référencées dans la base de données KEGG et celles des organismes étudiés, est rapportée. Pour chaque alignement, le pourcentage d'identité de séquence et la E. value obtenue sont indiqués. Les séquences protéiques ont ensuite été utilisées pour générer à l'aide du logiciel Alphafold2 les modèles de structure 3D. La valeur de l'alignement de structure (RMSD) a été déterminée à l'aide de PyMol en utilisant les structures alphafold présentent dans la base de données UniProt pour les deux organismes modèles *E. coli* et *V. harveyi*.

*Nv*H		BLASTP			Alignement de structure	
Protéines QS AI2	Identifiant KEGG	Protéine	Id %	E. value	UniProt	RMSD
LsrA	K10558	DVU_1070	37.013	2.61e-51	AF-P77257-F1-model_v4	3.347
LsrB	K10555	n.d.	n.d.	n.d.	AF-P76142-F1-model_v4	n.d.
LsrC	K10556	DVU_0549	32.283	6.89e-07	AF-P77672-F1-model_v4	5.954
LsrD	K10557	DVU_0713	32.381	2.40e-09	AF-P0AFS1-F1-model_v4	5.415
LsrF	K08321	DVU_0460	35.019	1.38e-35	AF-P76143-F1-model_v4	0.893
LsrG	K11530	n.d.	n.d.	n.d.	AF-P64461-F1-model_v4	n.d.
LsrK	K11216	DVU_3134	28.000	7.77e-27	AF-P77432-F1-model_v4	2.825
LsrR	K11531	DVU_3131	38.436	8.41e-63	AF-P76141-F1-model_v4	3.099
LuxS	K07173	n.d.	n.d.	n.d.	AF-P45578-F1-model_v4	n.d.
LuxP	K10910	n.d.	n.d.	n.d.	AF-P54300-F1-model_v4	n.d.
LuxQ	K10909	DVU_2679	40.849	6.09e-74	AF-P54302-F1-model_v4	2.076
LuxU	K10911	n.d.	n.d.	n.d.	AF-P0C5S4-F1-model_v4	n.d.
LuxO	K10912	DVU_2894	53.200	5.97e-87	AF-P0C5S5-F1-model_v4	0.976
LuxR	K15852	n.d.	n.d.	n.d.	AF-P21308-F1-model_v4	n.d.

C. acetobutylicum		BLASTP			Alignement de structure	
Protéines QS AI2	Identifiant KEGG	Protéine	Id %	E. value	UniProt	RMSD
LsrA	K10558	CA_C0703	36.634	5.74e-91	AF-P77257-F1-model_v4	5.141
LsrB	K10555	CA_C1351	27.727	9.51e-08	AF-P76142-F1-model_v4	2.880
LsrC	K10556	CA_C0705	31.000	2.43e-07	AF-P77672-F1-model_v4	5.831
LsrD	K10557	n.d.	n.d.	n.d.	AF-P0AFS1-F1-model_v4	n.d.
LsrF	K08321	n.d.	n.d.	n.d.	AF-P76143-F1-model_v4	n.d.
LsrG	K11530	CA_C3394	32.353	7.68e-08	AF-P64461-F1-model_v4	0.967
LsrK	K11216	CA_C2612	31.881	3.25e-62	AF-P77432-F1-model_v4	1.445
LsrR	K11531	CA_C0708	30.075	1.29e-10	AF-P76141-F1-model_v4	1.697
LuxS Ec	K07173	CA_C2942	100.000	1.83e-120	AF-P45578-F1-model_v4	0.847
LuxP	K10910	CA_C1351	28.022	1.98e-08	AF-P54300-F1-model_v4	7.114
LuxQ	K10909	CA_C1701	35.398	3.50e-30	AF-P54302-F1-model_v4	50.941
LuxU	K10911	n.d.	n.d.	n.d.	AF-P0C5S4-F1-model_v4	n.d.
LuxO	K10912	CA_C3088	49.714	4.82e-53	AF-P0C5S5-F1-model_v4	4.985
LuxR	K15852	CA_C3429	41.270	8.26e-07	AF-P21308-F1-model_v4	14.712

L'analyse de ces résultats montre que chez *C. acetobutylicum*, on retrouve des protéines homologues pour le système Lsr (LsrA, LsrB, LsrC, LsrG, LsrK, LsrR) et pour le système Lux (LuxP, LuxQ, LuxO, LuxR). Chez *Nv*H, on retrouve des protéines homologues pour le système Lsr (LsrA, LsrC, LsrD, LsrF, LsrR, LsrK) et pour le système Lux uniquement 2 protéines (LuxQ, LuxO). La comparaison des protéines identifiées dans chacune des bactéries avec les protéines

constituant classiquement un système “complet” de type Lux ou Lsr montre, qu’en dépit de la présence de protéines homologues aux systèmes Lsr et Lux chez *C. acetobutylicum* et *Nv*H, aucun des deux organismes ne possède un système de quorum sensing de type AI-2 complet. Chez *Nv*H, l’absence de plusieurs protéines clés du système Lux a permis d’écarter cette possibilité, orientant les recherches vers un éventuel système Lsr. Pour *C. acetobutylicum*, l’analyse par superposition des structures prédites par AlphaFold2 révèle une très forte différence de structure entre les protéines obtenues par la recherche d’homologie de séquence et les protéines de référence (tableau 9) suggérant une faible probabilité que ce mécanisme soit fonctionnel et permettant ainsi d’invalider la présence d’un système Lux également chez *C. acetobutylicum*.

Dans les deux organismes, le système d’import Lsr apparaît incomplet ainsi chez *C. acetobutylicum* il manque les protéines LsrD et LsrF respectivement impliquées dans l’import de l’AI-2 et dans sa dégradation. Chez *Nv*H, LsrB, LsrG et LuxS respectivement impliquées dans la détection d’AI-2, la dégradation de l’AI-2 et dans la synthèse d’AI-2 sont absents.

La présence de certaines protéines du système Lsr qui sont impliquées dans la réponse au signal LsrK et LsrR suggère toutefois que celles-ci pourraient être associées à un système non canonique de reconnaissance d’AI-2. En effet, de récentes études ont révélé l’existence de systèmes non canoniques de détection tels que les protéines à domaine dCACHE pour la reconnaissance de l’AI-2 ayant le même rôle que LuxP pour les systèmes Lux (Zhang *et al.*, 2020). De la même façon, pour le système Lsr, des systèmes non-canoniques tels que le système de transport des riboses (RbsB) ont été mis en évidence chez *Haemophilus influenzae* (strain 86-028NP) comme alternative à LsrB pour l’internalisation de l’AI-2 (Armbruster *et al.*, 2011). La recherche d’un système non canonique avait été entrepris au cours des travaux de thèse de Cassandra Backes, au sein du laboratoire, où l’hypothèse de l’implication des gènes de l’opéron *DVU_0165-0169* codant pour un ABC transport avait été émise sans pouvoir être démontrée.

B. Organisation génétique des gènes potentiellement impliqués dans le QS

Comme décrit dans l’introduction, les gènes codant pour des systèmes de QS de type AI-2 sont généralement organisés en structures opéroniques permettant une régulation commune (Xue *et al.*, 2009). L’analyse de la répartition sur le génome des gènes cibles identifiés précédemment démontre une absence de regroupement au sien d’une structure opéronique. Toutefois, afin d’analyser si certains des gènes identifiés étaient en structure opéronique, une analyse permettant la prédiction de structure opéronique basée sur la distance intergénique, la conservation de leur synténie ainsi que sur la fonctionnalité des gènes a été réalisée *via*

MicrobesOnline Operon Predictions. Les résultats donnent une organisation en une seule unité transcriptionnelle des gènes *DVU_3131* (LsrR-like) à *DVU_3134* (LsrK-like) de *Nv*H, tandis que deux opérons distincts mais génétiquement proches sont proposés pour *C. acetobutylicum* allant de *CA_C0703* (LsrA-like) à *CA_C0705* (LsrC-like) pour le premier et de *CA_C0708* (LsrR-like) à *CA_C0713* pour le deuxième. L'analyse de la répartition des gènes sur le génome révèle que les systèmes de transporteurs ABC identifiés chez *Nv*H (*DVU_1070*, *DVU_0549*, *DVU_0713*) et *C. acetobutylicum* (*CA_C0703*, *CA_C0705*, *CA_C0708*) ne sont pas organisés en opéron, contrairement à ce que l'on observe habituellement dans les modèles classiques. Cette absence d'organisation en unité transcriptionnelle suggère que ces systèmes ne sont probablement pas fonctionnels pour l'internalisation de la molécule AI-2 et que d'autres acteurs pourrait être impliqués.

Toutefois, chez *Nv*H, les gènes *DVU_3131* (LsrR-like) et *DVU_3134* (LsrK-like) sont présents au sein d'un même opéron. Cette disposition suggère un potentiel mécanisme de réponse concertée, similaire à celui des systèmes de régulation bien caractérisés (figure 35).

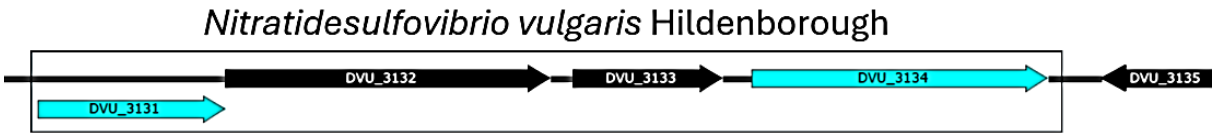


Figure 35 : Organisation génétique des gènes *DVU_3131* et *DVU_3134*. Les gènes potentiellement impliqués dans le QS chez *Nv*H sont représentés *via* le logiciel Snapgene en bleu. La structure opéronique déterminée *via* l'outil MicrobesOnline Operon Predictions est identifiée par un carré.

Par comparaison aux systèmes Lsr classiquement retrouvés pour le QS de type AI-2, où les gènes *lsrR* et *lsrK* sont présents en opéron à proximité de l'opéron *lsrABCDFG,* ici l'opéron contenant les gènes *DVU_3131* à *DVU_3134* n'est proche d'aucune autre unité transcriptionnelle semblant être impliquée dans le QS. Basé sur l'analogie avec certains organismes présentant un système AHL incomplet (dans lesquels seul LuxR est présent), l'hypothèse d'un système ne comprenant que LsrR/LsrK chez *Nv*H a donc été étudiée (Bez *et al.*, 2023).

Afin de confirmer que les deux gènes *DVU_3131* (LsrR-like) et *DVU_3134* (LsrK-like) sont bien en unité transcriptionnelle, des amorces spécifiques permettant l'amplification des régions intergéniques entre *DVU_3131 – DVU_3132 ; DVU_3132 – DVU_3133 ; et DVU_3133-DVU_3134* ont été conçues. L'amplification PCR a été réalisée sur un extrait purifié d'ADN génomique (ADNg) comme contrôle positif, sur un extrait purifié d'ARN comme contrôle négatif pour vérifier l'absence d'ADN génomique contaminant sur l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu par

rétrotranscription des ARN qui permet de confirmer la transcription des gènes issus du même ARN messager et pour finir un contrôle négatif sans matrice. Le résultat a été analysé sur gel d'agarose marqué au Bromure d'éthidium (BET) et révélé aux UV (figure 36).

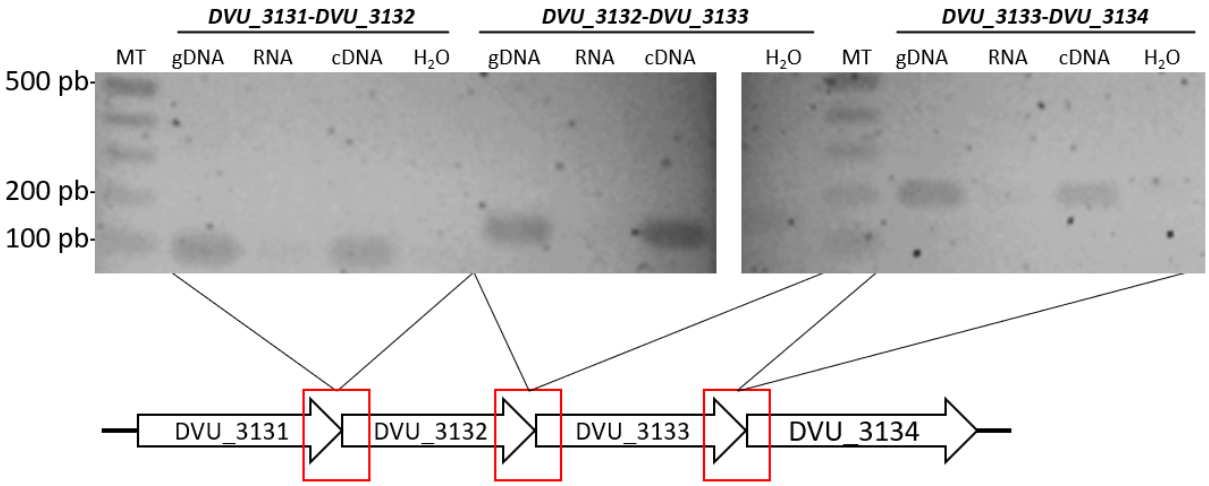


Figure 36 : Validation expérimentale de la structuration en opéron des gènes *DVU_3131* (LsrR-like) à *DVU_3134* (LsrK-like). Électrophorèse sur gel d'agarose 2 % coloré au bromure d'éthidium (BET), montrant les produits d'amplification PCR obtenus avec couples d'amorces pLD52, 53 et 54 (tableau 8), de gauche à droite, sur l'ADN génomique de *Nv*H (ADNg), les ARN purifiés de *Nv*H, les ADN complémentaires (ADNc) et le contrôle négatif (H_2O), pour vérifier la co-transcription des gènes *DVU_3131*, *DVU_3132*, *DVU_3133* et *DVU_3134* chez *Nv*H.

L'absence de bandes dans les puits correspondant à l'ARN (avant rétrotranscription) confirme la bonne déplétion de l'ADNg lors des étapes d'extraction et de purification des ARN. De plus, l'absence de bande dans les contrôles sans matrice (H_2O) permet de confirmer l'absence de contaminant dans les réactifs utilisés ainsi que dans les amorces utilisées. Enfin, La présence de bandes uniquement dans les puits contenant de l'ADNg et de l'ADNc permet de confirmer que les gènes *DVU_3131* (LsrR-like) à *DVU_3134* (LsrK-like) sont présents au sein d'une même unité transcriptionnelle ce qui implique une régulation à l'initiation de transcriptionnel commune aux gènes exprimant les protéines LsrR-like et LsrK-like.

En tenant compte des homologies de séquences et de structures, ainsi que de leur organisation génétique, nous pouvons conclure que les gènes *DVU_3131* et *DVU_3134* sont des bons candidats comme acteurs du QS de type AI-2 chez *Nv*H. Ainsi, l'étude de la fonctionnalité des protéines LsrR-like et LsrK-like de *Nv*H a été initiée en utilisant une approche *in vitro*.

2. Etude des protéines du système de régulation Lsr chez *Nv*H par une approche *in vitro*

A. Production et purification des protéines chez l'hôte hétérologue *E. coli*

Les approches *in silico* ont permis de proposer un rôle de protéine kinase pour la protéine LsrK-like codée par *DVU_3134* et de régulateur pour la protéine LsrR-like, codée par *DVU_3131*. L'objectif a donc été de valider la fonction de ces deux protéines. Afin d'étudier *in vitro* la fonctionnalité des protéines LsrR-like (~35 kDa) et LsrK-like (~55 kDa) de *Nv*H, les gènes *DVU_3131* et *DVU_3134* contenant une séquence ADN en 3' permettant l'ajout d'une étiquette 6-His en C-terminal ont été individuellement clonés dans un vecteur p33Tac (Matériels et méthodes) permettant l'expression des gènes en présence d'IPTG. Après vérification par séquençage de Sanger (Genewiz) des constructions, les plasmides contenant soit le gène *DVU_3131* (p33Tac-LsrR-6His) soit le gène *DVU_3134* (p33Tac-LsrK-6His) ont été introduits dans l'hôte hétérologue *E. coli* DH5α (voir Matériels et méthodes, tableau 4) afin de s'affranchir de la présence éventuelle d'AI-2 au cours de la production, l'expression des gènes codant les protéines recombinantes a été induite avec 0,1 mM IPTG à 16 °C pendant 16 heures. La production de chaque protéine a ensuite été validée par migration d'un extrait cellulaire sur gel SDS-PAGE 12 % et coloration des protéines au bleu de Coomassie (figure 37 (A)), et par western blot à l'aide d'un anticorps spécifique anti-6His (figure 37 (B)).

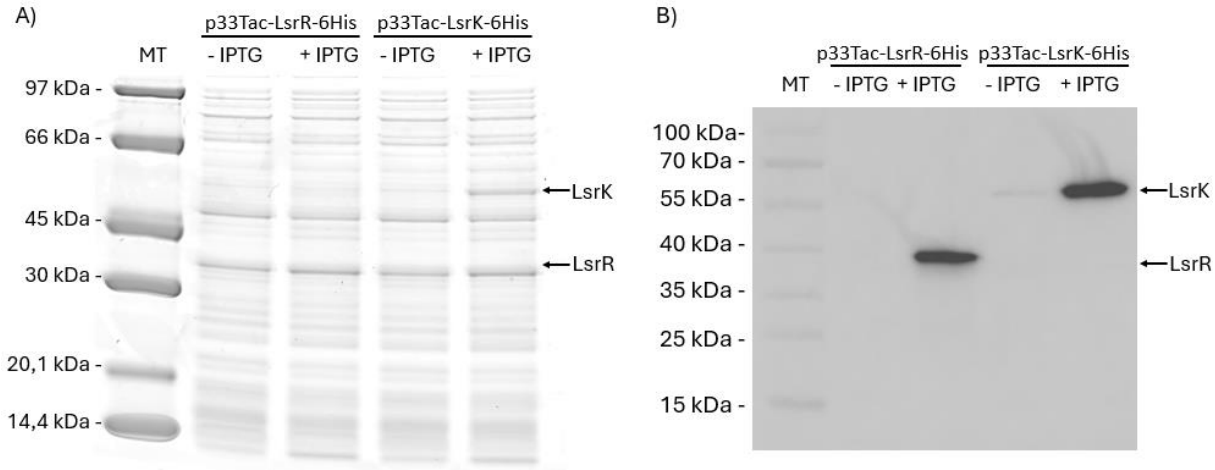


Figure 37 : Test de production des protéines recombinantes LsrR-like et LsrK-like chez *E. coli*. Pour chaque construction, un extrait cellulaire a été récolté avant (-IPTG) et après (+IPTG) induction des protéines à l'IPTG. Les aliquots, supplémentés d'un tampon de charge et préalablement chauffés à 95 °C pendant 5 minutes ont été chargés sur un gel SDS-PAGE 12 % révélé après migration au bleu de Coomassie (A) ou par chimioluminescence (B).

L'analyse du gel coloré au bleu de Coomassie ainsi que du western blot montre que les deux protéines sont produites chez *E. coli* dans les conditions utilisées. En effet, l'apparition

d'une bande à 55 kDa pour LsrK-like dans la fraction +IPTG après coloration au bleu de Coomassie, suggère que cette protéine est fortement produite dans ces conditions de culture. En revanche, la bande correspondant à la protéine LsrR-like dont la taille est attendue à 35 kDa est peu voire pas visible après coloration au bleu de Coomassie. Cependant, la présence de LsrR-like dans la fraction "+IPTG" a pu être validée par western blot à l'aide d'un anticorps dirigé spécifiquement contre l'étiquette 6-His en C-terminal de la protéine. Ces expériences ont donc permis de valider la production de ces protéines chez *E. coli*.

a. Purification de LsrR-like

La production de la protéine LsrR-like a été réalisée à partir d'une culture de 1 L d'*E. coli* DH5α contenant le vecteur p33Tac-LsrR-6His suivant les conditions décrites précédemment. Les cellules ont été récoltées par centrifugation. Le culot cellulaire (2,5 g) a ensuite été conservé à -20 °C ou directement re-suspendu pour l'étape de purification tel que décrit dans la partie Matériels et méthodes. Brièvement, les cellules sont re-suspendues dans un tampon de lyse, puis cassées à l'aide d'une presse de French. L'extrait protéique total est récupéré par centrifugation et chargé sur une colonne de nickel (Histrap FF 1 mL, Cytiva). Les protéines sont ensuite séparées à l'aide d'un gradient discontinu d'imidazole. La présence de la protéine LsrR-like dans les fractions d'élution a été validée par une expérience de western blot en utilisant un anticorps spécifique, comme illustré dans la figure 38. L'analyse des fractions contenant la protéine d'intérêt par migration sur gel SDS-PAGE 12 % et coloration au bleu de Coomassie montre la présence de bandes supplémentaires, non révélées à l'anticorps (figure 38). De plus, la protéine est présente sur une large gamme de concentration en imidazole et enfin la production obtenue est très faible avec seulement 0,18 mg (déterminé par dosage colorimétrique BCA (Matériels et méthodes) de protéines à partir de 2,5 g de cellules.

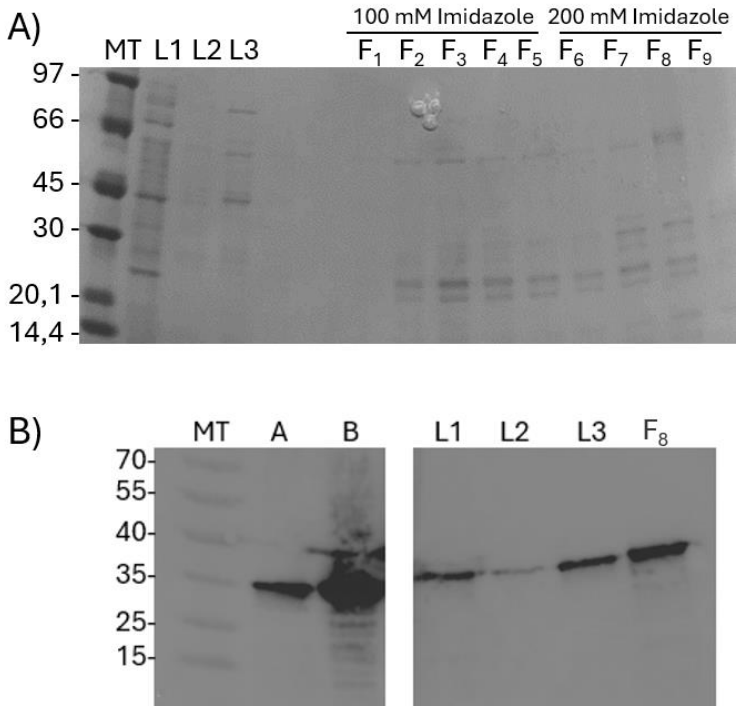


Figure 38 : Purification de LsrR-like chez l'hôte hétérologue *E. coli*. Pour chaque étape de purification, un extrait a été déposé sur gel SDS-PAGE 12 % et coloré au bleu de Coomassie (A) ou révélé par chimioluminescence (B). Abréviations : MT, Marqueur de taille (en kDa); A, extrait brut –IPTG (5 µL); B, extrait brut +IPTG (5 µL) ; L1, protéines non-retenues ; L2, fraction d'élution à 5 mM imidazole, L3, fraction d'élution à 50 mM imidazole ; F_1 à F_9, fractions d'élution obtenues à 100 et 200 mM imidazole. 5 et 10 µL des fractions d'élutions ont été déposés sur gel dans la figure 38 (A) et 38 (B), respectivement.

Ces résultats nous ont conduit à optimiser le processus de production de la protéine. Notre hypothèse a été qu'il nous fallait optimiser la construction pour une meilleure purification. En effet, puisque la protéine est produite et présente dans la fraction soluble après casse et en quantité significative, le problème ne semblait pas être la production de la protéine mais la purification et / ou la stabilité de celle-ci. Afin d'optimiser la production hétérologue de cette protéine chez *E. coli*, une séquence d'ADN codant pour 3xGLY-SER a donc été ajoutée en aval de la séquence codant pour l'étiquette 6-His (p33tac lsrR-GS-6-HIS). L'ajout d'un "linker" a pour objectif d'augmenter la distance entre l'étiquette 6-His et la protéine afin d'éviter que l'étiquette induise un mauvais repliement de la protéine (Yu *et al.*, 2010). De plus, cette construction a été transférée dans un vecteur pET21, en aval d'un promoteur T7 permettant l'expression des gènes d'intérêt dans la souche *E. coli* BL21, qui permet une production importante de protéines (voir Matériels et méthodes, tableau 4). Un test de production pour l'ensemble de ces constructions a été réalisé et analysé par western blot à l'aide d'un anticorps anti-His. Comme attendu, l'ajout d'une séquence "linker" se traduit par un léger retard sur gel SDS-PAGE pour les constructions B et C (figure 39). De plus, *E. coli* BL21 pET21-LsrR-GS-6His permet une production plus importante de la protéine recombinante LsrR-like (figure 39).

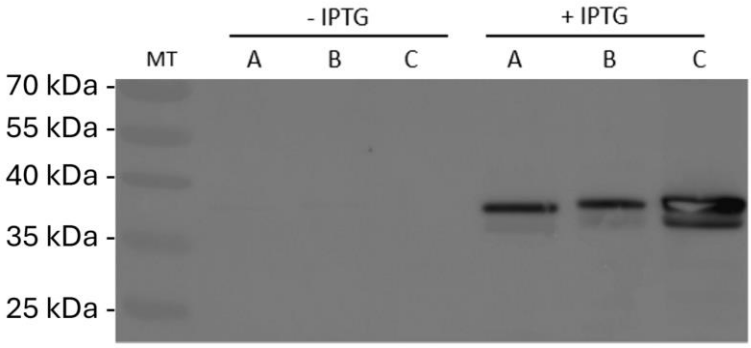


Figure 39 : Optimisation de la production de LsrR-like. Le test de production a été réalisé à 16 °C pendant 16h sous agitation (160 RPM). Pour chaque construction, un extrait cellulaire a été récolté avant (-IPTG) et après (+IPTG) induction de l'expression à l'IPTG. Les aliquots, supplémentés d'un tampon de charge et préalablement chauffés à 95 °C pendant 5 min, ont été chargés sur un gel SDS-PAGE 12 %. La présence des protéines recombinantes a été révélée par chimioluminescence. Abréviation : A, *E. coli* DH5α p33Tac-LsrR-6His ; B, *E. coli* DH5α p33Tac-LsrR-GS-6His ; C, *E. coli* BL21 pET21-LsrR-GS-6His.

Pour la suite des tests de production et de purification, seule la construction *E. coli* BL21 pET21-LsrR-GS-6His a été utilisée. Le tampon utilisé au cours de la purification (HEPES 20 mM pH 7,4 ; NaCl 0.5M) a été également adapté selon les articles de Lumin Yu et de Xiaotian Liu (Liu *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2020). Ainsi un tampon Tris HCl 20 mM pH 7,4, et une concentration en NaCl (150 mM) a été choisi pour la réalisation de tests de production (figure 40 (A)) (Szatmári *et al.*, 2020). Cette stratégie a permis d'augmenter le rendement de purification de façon significative (0,14 %) même si ce dernier reste faible. De plus, des bandes contaminantes probablement dues à de la dégradation sont toujours présentes. L'analyse du culot de cellules après l'étape de casse et centrifugation montre la présence de LsrR-like.

Ces résultats suggèrent que la protéine recombinante LsrR est majoritairement produite sous forme d'agrégats. Ainsi, nous avons entrepris de renaturer ces agrégats suivant le protocole décrit dans la section Matériels et méthodes. Pour cela, la protéine LsrR-like a été produite à partir d'une culture d'*E. coli* BL21 à 37 °C, 160 RPM à l'aide de 0,5 mM IPTG. Après 3 h d'incubation, les cellules ont été récoltées par centrifugation, et lysées selon la procédure précédemment décrite. Les corps d'inclusions ont ensuite été séparés des protéines solubles et membranaires, par plusieurs étapes de centrifugation (section Matériels et méthodes). Les protéines alors agrégées ont dans un premier temps été dénaturées à l'aide d'urée 8 M puis renaturées par des étapes de dialyse successives afin de diminuer progressivement la concentration en urée (voir Matériels et méthodes). Ce protocole a permis d'obtenir 2,47 mg de protéine à partir de 1,24 g de cellules (figure 40 (A) et 40 (B)). Afin de vérifier le bon repliement de la protéine après renaturation, une analyse par dichroïsme circulaire a été réalisée (figure 40 (C)).

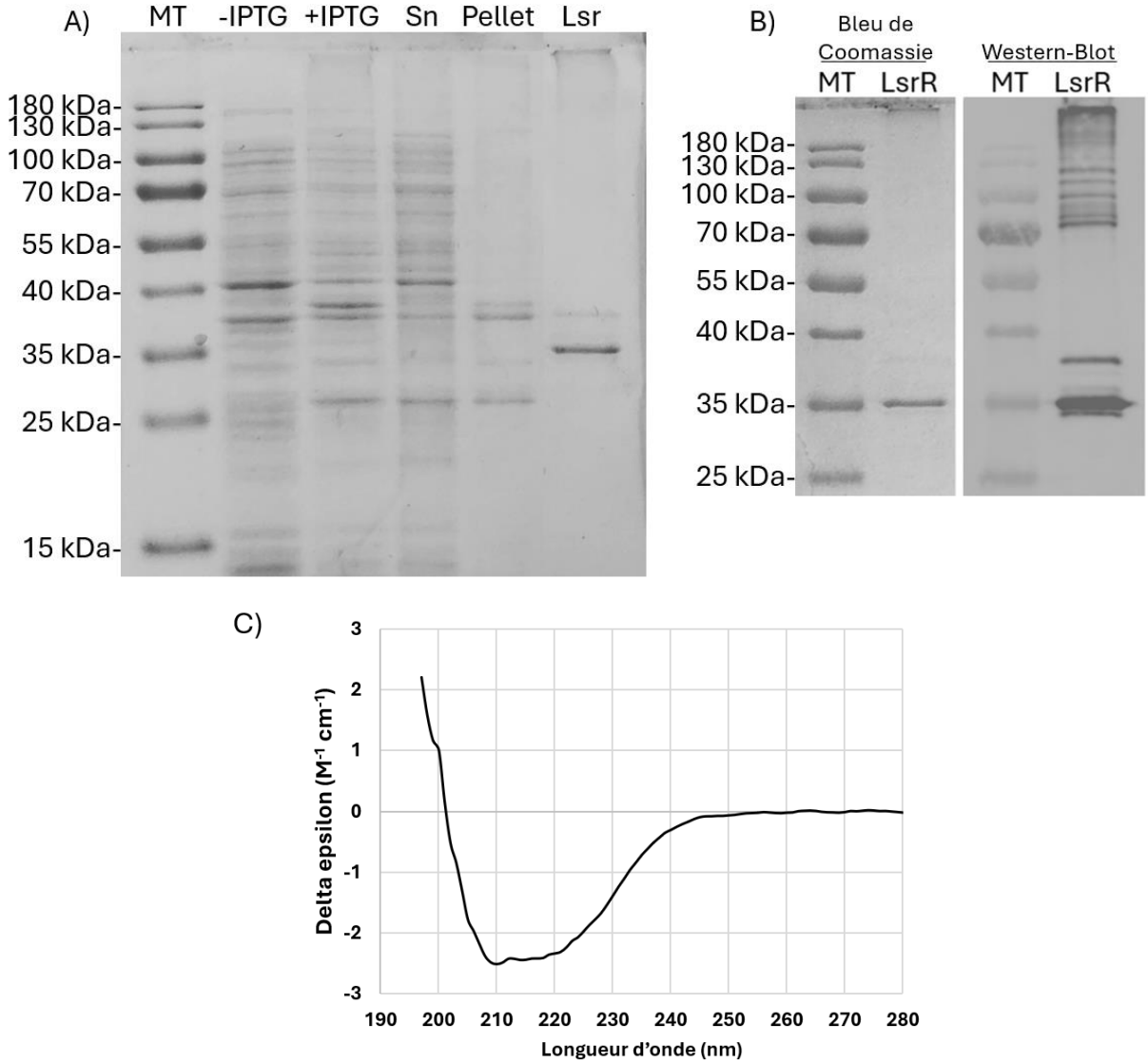


Figure 40 : Purification de la protéine LsrR-like à partir de corps d'inclusion. Les aliquots de *E.coli* BL21 LsrR-GS-6His correspondant à la fraction avant (-IPTG), après (+IPTG) induction, ainsi que la fraction soluble (Sn), non-soluble (Pellet) après lyse cellulaire, et la fraction contenant les corps d'inclusions renaturés (Lsr) ont été déposé sur gel SDS-PAGE 12 % et révélés au bleu de Coomassie (A). La fraction contenant les corps d'inclusions renaturés a également été analysée par Western-Blot et révélée par chimioluminescence (B) Ainsi que par dichroïsme circulaire dans la région correspondant aux UVs lointains (190-260 nm) (C).

Le gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie montre une bande à 35 kDa. Une bande est également présente au niveau du puit suggérant qu'une partie de la protéine reste agrégée. La présence d'autres bandes de poids moléculaire supérieur à 35 kDa ont été révélées par western-blot validant la présence persistante d'agrégats en fin de purification. Le spectre de dichroïsme circulaire réalisé sur le lot de protéines obtenues après les étapes de purification présente les caractéristiques d'une structuration en hélices alpha et feuillets bêta. Notamment, le spectre expérimental correspond aux prédictions de structures réalisées à l'aide du logiciel

AlphaFold2 avec un profil hélice α/feuillet β. La bonne adéquation entre le spectre expérimental et les prédictions de structures secondaires valide que le lot de protéines obtenu est très majoritairement dans un état “natif”. Une présence significative de protéines non structurées aurait fortement perturbé le spectre. Une analyse par spectrométrie de masse de la fraction contenant les corps d’inclusions renaturés a été réalisée par la plateforme de protéomique de l’IMM. Cette analyse confirme la présence majoritaire de la protéine LsrR-like dans cette fraction (Annexe 3).

b. Production et purification de LsrK-like

La protéine LsrK-like a été produite à partir d’un litre de culture après induction de l’expression du plasmide à l’aide de 0,1 mM IPTG, pendant 16 heures à 16 °C comme décrit par Ting Xue *et al.* en 2009 (Xue *et al.*, 2009). LsrK-like a été purifiée à partir du surnageant après casse et centrifugation de 2,17 g (poids humide) de culot cellulaire, sur une colonne Histrap FF 1 mL à l’aide d’un gradient discontinu d’imidazole. Le suivi de l’élution a été réalisé par gel SDS-PAGE 12 % coloré au bleu de Coomassie (figure 41 (A)). Après purification, la concentration de la fraction 7 à une concentration en protéine de 0,6 mg.mL^{-1} a été choisie afin de vérifier le bon repliement protéique par dichroïsme circulaire (figure 41 (B)).

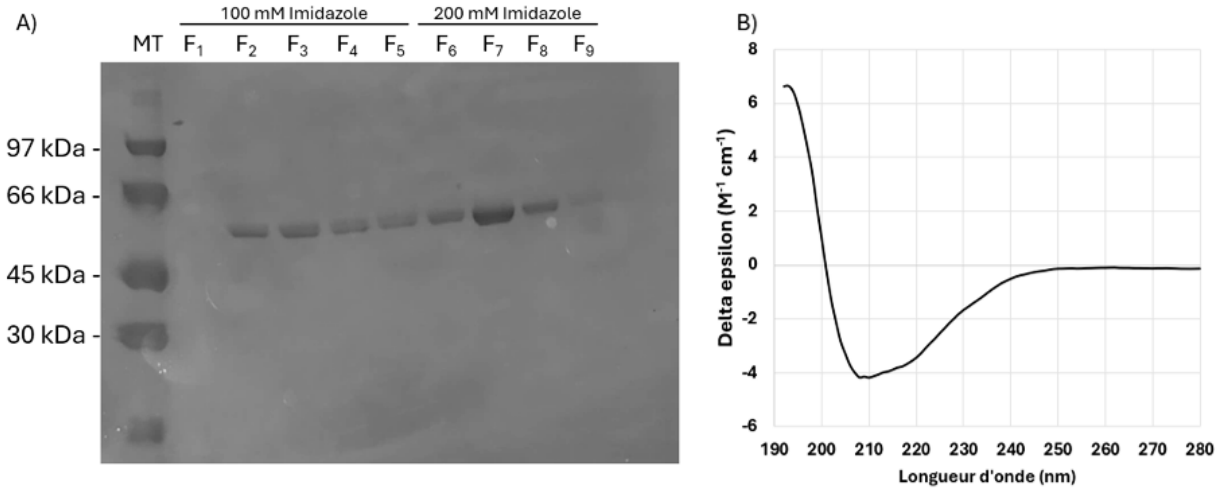


Figure 41 : Purification de la protéine LsrK-like. La purification de la protéine a été réalisée telle que décrite dans la partie Matériels et méthodes. Les différentes fractions d’élution (F_1 à F_9) de la chromatographie d’affinité (Histrap FF 1 mL) ont ensuite été déposées (10 µL) sur gel SDS-PAGE 12 % et révélées par coloration au bleu de Coomassie (A). La fraction F7 a ensuite été analysée par dichroïsme circulaire dans la région des UVs lointains.

Le gel en condition dénaturante et coloré au bleu de Coomassie ne montre qu’une seule bande et l’analyse du spectre de dichroïsme circulaire confirme que la protéine purifiée est repliée avec un profil hélice α/feuillet β ce qui est en accord avec la structure prédite par AlphaFold2 (Micsonai *et al.*, 2015).

Afin d'améliorer le rendement de purification, du glycérol 5 % final a été rajouté dans l'ensemble des tampons utilisés. Cette modification a permis d'obtenir 3,7 mg de protéines pures à partir de 1,7 g de cellules (poids humide). L'analyse par gel SDS-PAGE des fractions d'élution montre un pic d'élution à 100 mM d'imidazole (comparé à une élution sur l'ensemble du gradient dans les conditions précédentes) (figure 42).

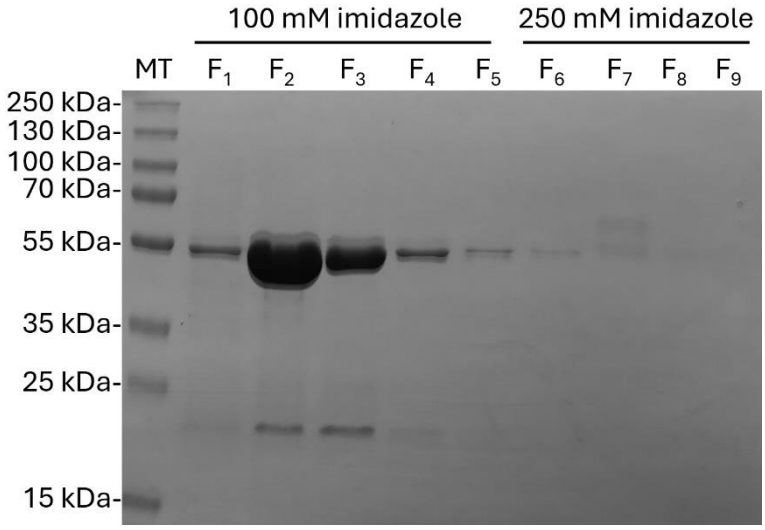


Figure 42 : Purification de LsrK-like par chromatographie d'affinité. Dix microlitres des fractions 1 à 5 (éluées avec 100 mM d'imidazole) et 6 à 9 (éluées avec 200 mM d'imidazole) ont été déposés sur gel SDS-PAGE 12 % coloré après migration au bleu de Coomassie.

B. Test de fonctionnalité des protéines LsrR et LsrK-like

a. Activité kinase de la protéine LsrK-like de *Nv*H

La protéine LsrK est une kinase dont la fonction est de phosphoryler l'AI-2. Nous avons donc d'une part testé si la protéine LsrK-like purifiée interagissait avec l'AI-2 et d'autre part si elle avait bien une activité kinase. Afin de valider l'interaction entre l'AI-2 et LsrK-Like, nous avons exploité le fait que *V. harveyi* BB170 est capable de détecter cette MQS uniquement sous sa forme non phosphorylée et que si du LsrK est présent dans le test, alors la quantité d'AI-2 disponible diminue et donc la bioluminescence diminue également. Cette stratégie a été exploitée par Roy *et al*. en 2010 dans une expérience de blocage du signal par l'ajout de la protéine LsrK dans le milieu de culture contenant *E. coli* et *S. typhimurium*, afin d'étudier l'impact du signal AI-2 entre les deux populations (Roy *et al.*, 2010). Aurélien Alafaci, au sein du laboratoire Écologie et biologie des interactions (EBI) de Poitiers, a bloqué la communication induite par l'AI-2 chez *Borrelia afzelii* et *Borrelia garinii* à l'aide de la protéine LsrK de *E. coli* (Alafaci, 2021). Dans le cadre de cette dernière étude, 1 µM de la protéine LsrK d'*E. coli* K12 a été directement ajouté aux cultures qui ont ensuite été incubées 16 heures. Sur la base de ces deux approches, la capacité de LsrK-like à fixer l'AI-2, diminuant ainsi sa biodisponibilité, a été testée directement

sur un surnageant de culture filtré et contenant de l'AI-2. Ainsi, la souche rapportrice *V. harveyi* BB170 a été incubée avec du surnageant de *C. acetobutylicum* en présence ou en absence de la protéine LsrK-like (3 µM) de *Nv*H (figure 43).

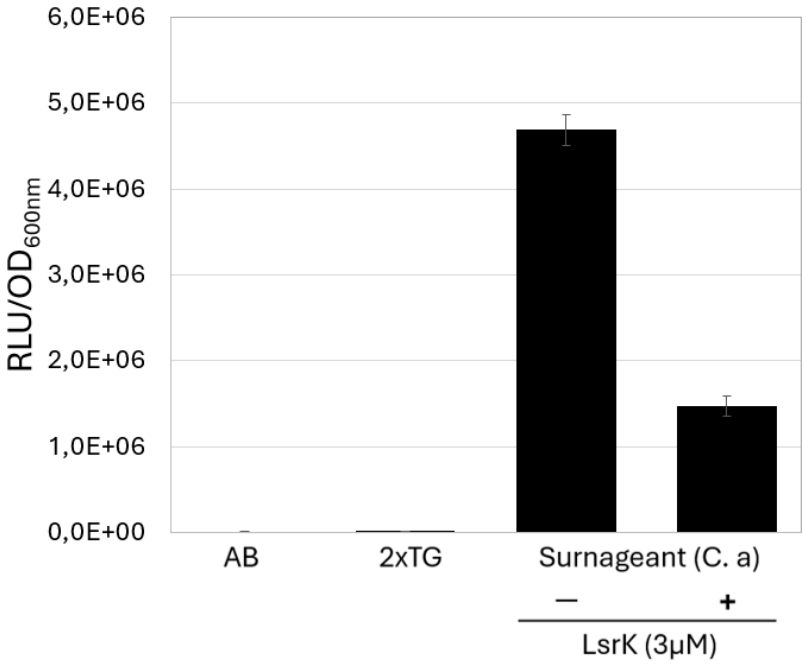


Figure 43 : Test de quenching du signal QS chez *V. harveyi* par LsrK-like. La bioluminescence a été utilisée comme rapporteur de l'activité QS chez *V. harveyi* BB170. Les contrôles AB et 2xTG contiennent uniquement la bactérie *V. harveyi* BB170 à laquelle 10 µL de milieu AB ou 2xTG ont été ajoutés. Le surnageant de *C. acetobutylicum* (7 µL) collecté en phase exponentielle dans le milieu 2xTG contenant de l'AI-2, a été supplémenté de tampon (Tris HCl 20 mM, pH 8, NaCl 150 mM, glycérol 5 %) utilisé pour la purification de LsrK-like (-) ou de LsrK-like (3 µM) (+). La bioluminescence ainsi que la DO_{600nm} ont été mesurées après 7 h de culture. L'intensité de la bioluminescence, exprimée en unité relative ("Relative light Unit", ou RLU) a été normalisée sur la DO_{600nm} de *V. harveyi* BB170. Ces résultats sont issus d'un triplicat technique. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (SD) calculés à partir des données expérimentales.

Il est possible d'observer sur la figure 43 qu'aucune bioluminescence n'est détectée pour les contrôles contenant le milieu de croissance de *V. harveyi* BB170 (milieu AB) ou le milieu de culture de *C. acetobutylicum* (2xTG). L'ajout du surnageant de culture de *C. acetobutylicum*, contenant de l'AI-2, se traduit comme attendu par l'augmentation de la bioluminescence (Ranava *et al.*, 2021). Une diminution d'un facteur 3 de la bioluminescence normalisée est observée après ajout de LsrK-like (3 µM) au surnageant de *C. acetobutylicum*. En analogie avec les études décrites dans la littérature, ce résultat suggère que la protéine LsrK-like soit capable de reconnaitre spécifiquement l'AI-2 agissant ainsi comme QQ du signal QS dans les

surnageants. Cette expérience montre que LsrK-like reconnait l'AI-2. Même si cette approche ne donne pas accès aux paramètres de l'interaction comme la constante d'affinité, cette technique simple et rapide a permis l'observation d'un impact de la présence de LsrK-like sur un test d'activité d'AI-2 suggérant un lien entre cette molécule et cette protéine. Bien que à notre connaissance, la présence de métabolites n'impacte pas le test AI-2, cette expérience pourrait être complétée par l'utilisation directe d'AI-2 synthétique ce qui enlèverait tout biais potentiel induit par la composition du surnageant de *C. acetobutylicum*.

Afin de démontrer l'activité kinase de la protéine LsrK-like, un test d'activités couplées utilisant les enzymes pyruvate kinase (PK) et lactate déshydrogénase (LDH) a été mis en place (figure 34). Ce test enzymatique permet de mesurer l'activité d'une enzyme ayant une activité kinase dépendante de l'ATP. Comme décrit dans la section Matériels et méthodes, cette méthode repose sur la conversion de l'ATP en ADP lors de la phosphorylation d'un substrat par une kinase. La PK catalyse la conversion du phosphoénolpyruvate en pyruvate, tout en régénérant de l'ATP à partir de l'ADP produit par la kinase étudiée. Le pyruvate formé est ensuite utilisé comme substrat par la LDH, qui le réduit en lactate en consommant du NADH, H^+. La diminution de l'absorbance du NADH à 340 nm permet ainsi de suivre la réaction en temps réel au spectrophotomètre et de quantifier la phosphorylation du substrat par la kinase. La réaction est démarrée par ajout de PK et la concentration en NADH consommé en fonction du substrat utilisé est présentée dans le tableau 10.

Tableau 10 : Test d'activité kinase. La consommation du NADH, rapporteur de l'activité kinase suite à une cascade de trois réactions, est suivie par absorbance à 340 nm mesurée après avoir incubé le mix réactionnel (V= 50 µL) contenant LsrK-like (5 µM) à 37 °C pendant 12 h en présence ou absence de substrat. L'efficacité de la réaction a été mesurée à partir de différents substrats : Glycérol (1 mM), AI-2 (1 mM) et du surnageant de *C. acetobutylicum* collecté en phase exponentielle contenant de l'AI-2 (40 µL).

Réaction	[NADH,H^+] consommé (µM)
LsrK	76,3 ± 0,3
LsrK + Glycérol	146,5 ± 4,9
LsrK + Sn *C.a*	137,6 ± 7,2
LsrK + AI-2	115,7 ± 1,5

On observe que l'ajout de surnageant de culture de *C. acetobutylicum* contenant de l'AI-2 induit une consommation de NADH. L'activité mesurée avec 40 µL de surnageant montre une consommation en NADH de 137,6 ± 7,2 µM. Le surnageant de culture de *C. acetobutylicum* est préparé dans les mêmes conditions que pour les expériences de quenching de la luminescence de la souche rapportrice *V. harveyi* BB170 et bien que nous n'ayons pas de moyen d'évaluer la concentration en AI-2, nous estimons être à une concentration saturante en substrat dans nos conditions. Afin de confirmer que l'activité mesurée est liée à la présence d'AI-2 dans le surnageant, des mesures d'activité kinase ont été réalisées avec un précurseur commercial de l'AI-2, le DPD, comme substrat à une concentration de 1 mM. L'analyse des résultats montre que LsrK-like est capable de phosphoryler le DPD et que comme avec le surnageant, la quasi totalité du NADH présent est consommée. Cette expérience démontre donc l'activité kinase de LsrK-like en présence d'AI-2 ou de son précurseur commercial comme accepteur.

En absence d'AI-2 (synthétique ou surnageant de *C. acetobutylicum*) l'ajout de la protéine LsrK au mix réactionnel PK:LDH s'est traduit par la consommation d'une partie du NADH. Ceci signifie qu'une molécule présente dans le mix réactionnel est soit substrat du système rapporteur, soit qu'elle est substrat de la LsrK–like. Le contrôle réalisé en absence de LsrK-like dans le milieu nous permet d'éliminer la première hypothèse. LsrK-like serait donc capable de phosphoryler une autre molécule que l'AI-2. Une analyse approfondie de la séquence de LsrK-like a permis de pointer l'existence d'un domaine putatif glycérol kinase au sein de la protéine. Ainsi, l'activité basale observée par la consommation en NADH de 76,3 ± 0,6 µM en absence de substrat peut être expliquée par la présence de glycérol dans le tampon de purification de la protéine et donc *in fine* dans le milieu réactionnel. Afin de tester cette hypothèse, l'échantillon protéique a été lavé à l'aide d'un tampon sans glycérol par plusieurs passages en Centricon afin d'éliminer le maximum de glycérol, puis le même test a été réalisé en présence de 1 mM de glycérol dans le mix réactionnel. On observe alors une consommation de 146,5 ± 4,9 µM de NADH, validant ainsi l'hypothèse que LsrK-like possède une activité glycérol kinase. Les protéines LsrK et glycérol kinase (GlpK) appartiennent à la même famille de carbohydrate kinase FGGY dont font également partie la xylulose kinase (XylB) et la L-ribulose kinase (AraB). Des études portant sur cette famille de protéines ont permis la détermination de motifs consensus propres aux glycérol kinases, xylulose kinases et aux L-ribulose kinases (Zhang *et al.*, 2011). Bien qu'aucune étude n'ait mis en évidence de motif consensus pour la protéine LsrK également membre de cette famille, Silvia Stotani, Université de Pavie, a émis l'hypothèse au cours de sa thèse que la protéine LsrK présente chez *E. coli* serait plus proche des xyluloses kinases que des glycérol kinases (Stotani, 2018). Dans le cas de la protéine DVU_3134 (LsrK-like), l'analyse par

superposition de structures indique ici la présence d'un motif consensus REYQF représentatif des glycérol kinases (figure 44).

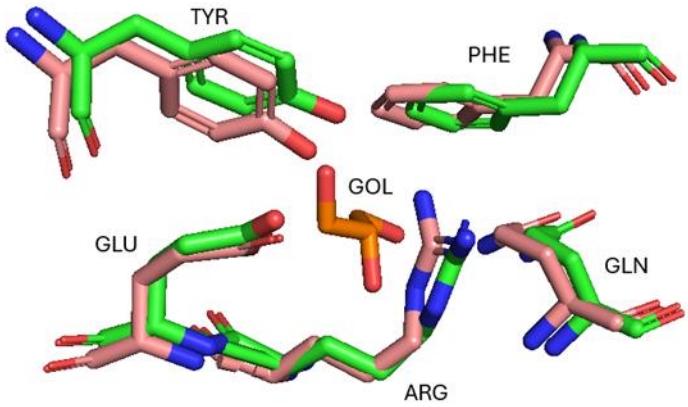


Figure 44 : Représentation 3D du motif REYQF retrouvé chez *Nv*H. Superposition des glycérol kinases de *E. coli* (PDB-ID:1GLA) et *Nv*H (prédiction UniProt : AF-Q726H4-F1-model_V3) respectivement en rose pâle et vert.

L'ensemble des données obtenues *in silico* et expérimentales ont permis de montrer la présence d'une activité glycérol kinase de LsrK-like de *Nv*H.

L'activité kinase de LsrK-like en présence du surnageant de *C. acetobutylicum* mais aussi en présence de DPD a permis la confirmation de la présence d'une activité secondaire de cette enzyme pour l'AI-2. Afin de s'affranchir de la présence de glycérol dans le tampon de purification tout en conservant une protéine stable, LsrK-like a finalement été purifiée dans un tampon sans glycérol. La purification en absence de glycérol conduit à un rendement de purification plus faible et on observe que la protéine est présente dans de nombreuses fractions lors de l'élution de la colonne, suggérant des problèmes de stabilité. Pour pallier à ce problème, l'ensemble des étapes sont réalisées sur la journée, sans période de stockage et les cinétiques d'activité kinase déterminées extemporanément.

En absence de glycérol dans les tampons de purification et de stockage, aucune activité kinase n'a été observée sans ajout de substrat, confirmant bien que cette activité était liée au glycérol présent dans le tampon de purification. L'activité kinase a ensuite été suivie en fonction du temps afin de pouvoir déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme pour le glycérol et l'AI-2 (figure 45).

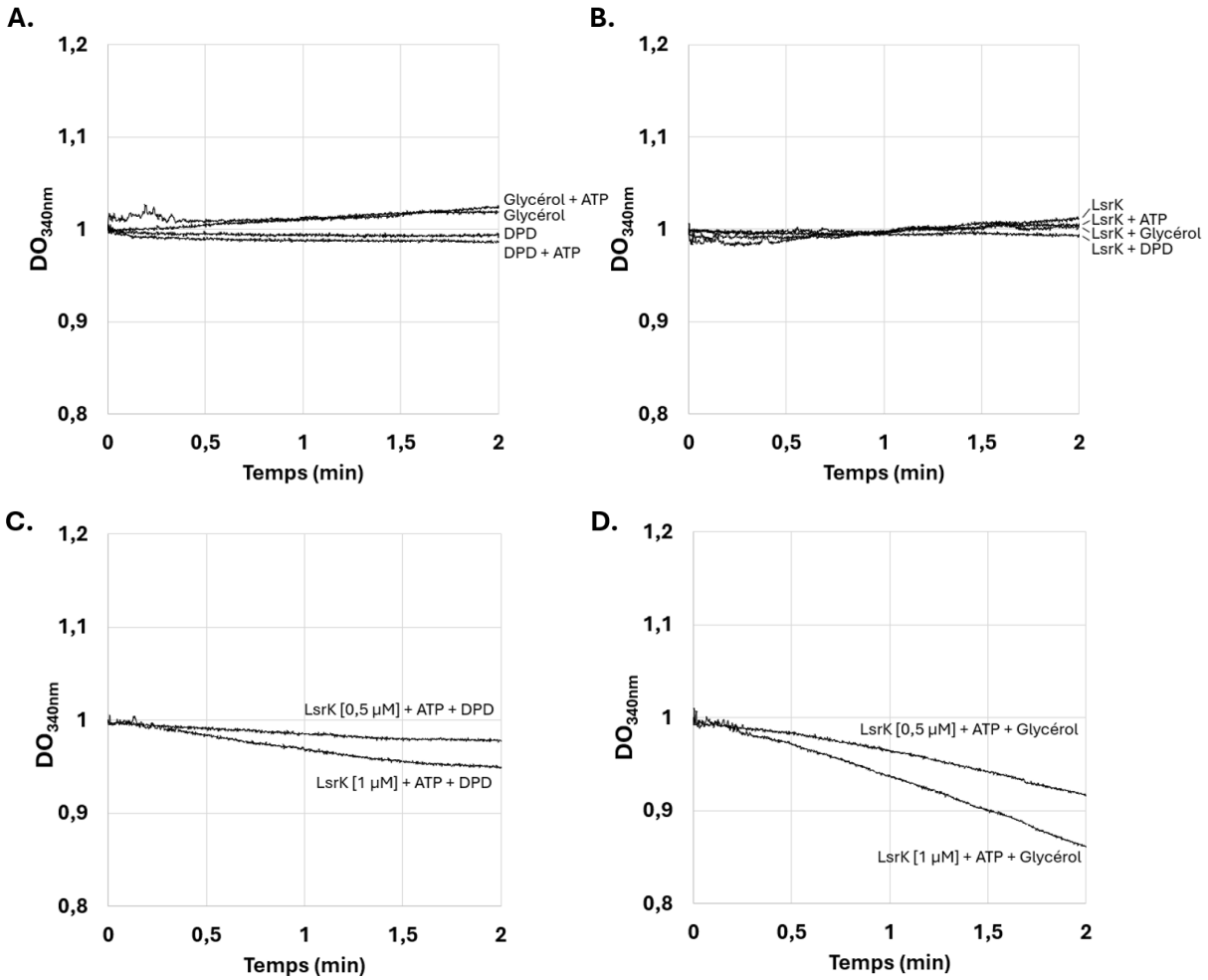


Figure 45 : Cinétiques enzymatiques de LsrK-like pour différents substrats. Les contrôles sans enzymes (A) ou sans la totalité des réactifs permettant la phosphorylation du substrat (B) sont présentés. Les cinétiques de phosphorylation de l'AI-2 (C) et du glycérol (D) ont été réalisées avec 0,5 µM et 1 µM de l'enzyme LsrK et sont représentatives des différents réplicas réalisés (n = 3).

Le contrôle des réactions avec ou sans ATP et avec ou sans substrats a été réalisé pour s'assurer d'éventuel biais réactionnel (figure 45 (A) et (B)) et la cinétique de phosphorylation a été suivie en présence de 1 mM DPD (figure 45 (C)), ou glycérol (figure 45 (D)), avec 0,5 µM et 1 µM d'enzyme. L'ajout de chacun des 2 substrats conduit à une consommation du NADH et le doublement de la concentration de LsrK-like a permis l'obtention d'un doublement de la pente de consommation en NADH. Le doublement de la concentration de l'enzyme a permis l'obtention d'un doublement de la pente de consommation du substrat, indiquant une relation proportionnelle entre la concentration enzymatique et la vitesse de réaction, et confirmant que l'enzyme est bien le facteur limitant dans ces conditions expérimentales.

L'analyse des cinétiques enzymatiques a permis la détermination de l'activité spécifique de LsrK-like pour chacun des substrats (figure 46).

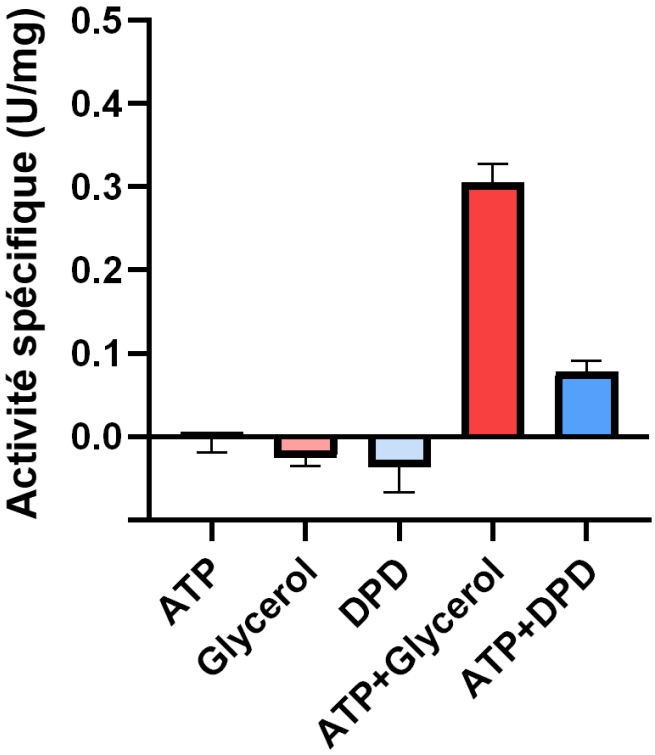


Figure 46 : Détermination de l'activité spécifique de LsrK-like purifiée en absence de glycérol pour le glycérol et le DPD. L'activité de LsrK-like en présence d'ATP, de glycérol, de DPD, d'ATP + glycérol et d'ATP + DPD est présentée de gauche à droite, respectivement. L'activité spécifique est exprimée en µmol de substrat transformé par minutes (U) /mg d'enzyme. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (SEM) calculés à partir des données expérimentales (n=3) avec le logiciel GraphPad Prism 8.2 (GraphPad Software, Inc.).

Ainsi, LsrK-like présente une activité 4 fois plus importante pour le glycérol (0,305 ± 0,05 $U.mg^{-1}$) que pour le DPD (0,078 ± 0,03 $U.mg^{-1}$) dans nos conditions expérimentales. Outre le fait que l'on ne peut exclure que le DPD n'ait pas exactement la même structure que l'AI-2 "natif" ou encore un processus de rétro-inhibition, des récentes études ont mis en évidence la mise en place d'interactions entre la protéine LsrK et une protéine de transport de phosphate (HPr) (Ha *et al.*, 2018). Ainsi la nécessité de la présence de partenaires pourrait également expliquer la limite réactionnelle observée. Pour finir, il est également possible que cette double activité ait un rôle physiologique ou que cette activité provienne d'une adaptation évolutive du système glycérol chez *Nv*H.

Pour conclure, ces expériences nous ont permis de valider que LsrK-like interagissait avec l'AI-2 ainsi que le rôle de kinase de la protéine LsrK-like. De plus, nous avons pu mettre en évidence une activité de promiscuité pour le DPD, le précurseur de l'AI-2, et le glycérol. Une activité de promiscuité est un concept qui repose sur le fait que toutes les enzymes annotées sont capables de catalyser une réaction différente de celle pour laquelle elles ont été décrites (promiscuité enzymatique), ou d'utiliser un autre substrat (promiscuité de substrat) (Kazlauskas,

2005; Valle and Bolívar, 2021). Ainsi dès 1998, D'Ari *et* Casadesus démontraient que chez *E. coli* ce processus permettait l'établissement d'un véritable réseau métabolique alternatif, octroyant un meilleur fitness et une plasticité métabolique à l'organisme (D'Ari and Casadesús, 1998).

Ainsi, pour la première fois, la capacité d'une enzyme glycérol kinase à reconnaitre et phosphoryler la molécule du QS de type AI-2 a été mise en évidence questionnant ainsi la capacité d'autres glycérol kinases à posséder une activité de promiscuité pour l'AI-2.

b. Etude fonctionnelle du régulateur transcriptionnel de la protéine LsrR-like de *Nv*H

La protéine LsrR d'*E. coli* est un régulateur transcriptionnel de l'opéron *lsrACDBF* ainsi que de son propre opéron *lsrRK*. Les gènes *lsrR* et *lsrK* sont situés en amont de l'opéron *lsrACDBF*. Le rôle principal de LsrR est d'inhiber l'expression de ces opérons en l'absence d'AI-2. Lorsque la concentration d'AI-2 atteint un seuil suffisant pour son internalisation, la protéine LsrK phosphoryle le signal, permettant ainsi sa reconnaissance par LsrR. Cette phosphorylation entraîne la levée de la répression par LsrR, activant ainsi l'expression des opérons. Dans le cas de *Nv*H, les gènes codant pour les protéines LsrR-like et LsrK-like sont présents au sein d'une même unité transcriptionnelle mais sans être à proximité d'un opéron *lsrACDBF*-like. Par analogie avec le système décrit chez *E. coli*, la capacité de la protéine recombinante LsrR-like à réguler l'expression du gène *DVU_3131* a été étudiée. Pour cela, une expérience de retard sur gel a été réalisée, en effet en utilisant le promoteur de l'opéron *lsrRK*-like, s'il y a interaction nous devrions observer un retard dans la migration de la fraction d'ADN cible sur un gel natif 6 %. LsrR-like a donc été purifiée comme décrit précédemment et nous avons amplifié la région promotrice de l'opéron *lsrRK*-like appelé P_{DVU_3131} afin de tester l'interaction (figure 47). Pour s'assurer de la spécificité de l'interaction protéine-ADN l'utilisation de poly dIdC-dIdC, molécule compétitrice, mimant la structure de l'ADN a été utilisée comme contrôle.

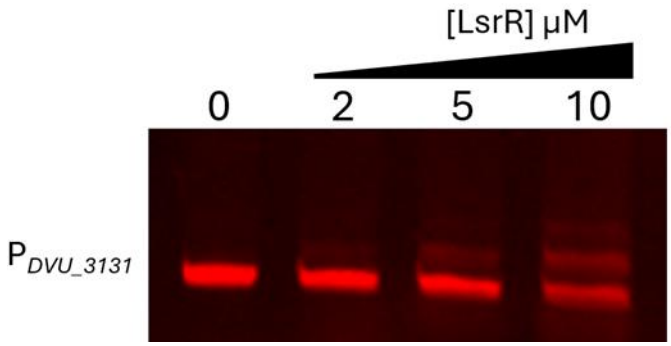


Figure 47 : Fixation spécifique de la protéine LsrR-like à la région promotrice de l'opéron *lsr*. Après une incubation de 30 minutes à 4 °C avec l'ADN et 60 ng de poly(dI-dC)•poly(dI-dC), les fractions contenants 0, 2, 5 ou 10 µM de LsrR-like et 3 ng de $P_{DVU3131}$ ont été déposées sur un gel natif 6 % et révélé par fluorescence (n>3).

Comme l'illustre la figure 47, un retard sur gel de la bande d'ADN peut être observé lorsque ce dernier est incubé avec LsrR-like. De plus, cet effet est d'autant plus important que la concentration en protéine augmente. Cette expérience permet de valider la fixation spécifique de LsrR-like sur la région promotrice du gène *DVU_3131*. Comme cela est souvent le cas, la totalité de l'amplicon (P_{DVU_3131}) n'est pas complexée à la protéine, comme le montre la présence de la bande correspondant à l'amplicon non lié. Il est à noter que nous avons tenté de modifier les différents paramètres de l'expérience comme la température, concentration en ADN, sans obtenir un déplacement total de la bande, il semblerait que la concentration en protéine soit limitante. En effet, lorsque la concentration en protéine est de 10 µM, le retard sur gel présente plusieurs bandes supplémentaires pouvant être issues par la présence d'agrégats protéiques dans l'échantillon.

Fort du résultat sur l'interaction LsrR-like/ADN, nous avons testé si l'AI-2 phosphorylé avait un impact sur cette interaction. Notre hypothèse étant que LsrR-like, comme chez *E. coli*, se fixe à l'ADN au niveau du promoteur de l'opéron *lsrRK*-like induisant sa répression. La fixation de l'AI-2-P à LsrR-like engendre un changement conformationnel de la protéine altérant la fixation de la protéine à l'ADN et se traduisant par une levée de la répression de l'expression génétique. Pour tester cette hypothèse nous nous sommes inspirés des travaux de Ting Xue *et al*. de 2009, qui ont mis en évidence l'impact de la présence d'AI-2 phosphorylé (AI-2-P) sur la fixation de LsrR à l'ADN par une expérience de retard sur gel (Xue *et al.*, 2009). Ainsi, la protéine la protéine LsrR-like a été pré-incubée 30 minutes à 30 °C avec un mix réactionnel contenant ou du glycérol-P (Gly-P), ou de l'AI-2-P ou de l'AI-2 en contrôle, puis la séquence promotrice de *DVU_3131* (P_{DVU_3131}) a été rajoutée et l'ensemble a été de nouveau incubé 30 minutes à 30 °C (figure 48).

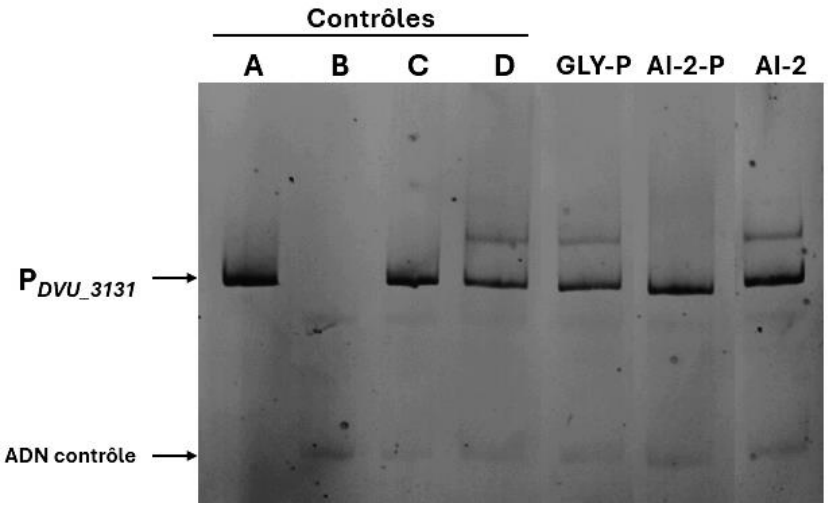


Figure 48 : Tests de fixation de LsrR à l'ADN en présence de différentes molécules. Les puits A, B, C et D correspondent (A) à la migration de 50 ng d'amplicon de la séquence promotrice P_{DVU_3131}, (B) 80 ng de la séquence contrôle amplifiée du gène *CA_C0825* de *C. acetobutylicum,*

puis l'addition des deux séquences d'ADN en présence (D) ou en absence (C) de LsrK-like utilisés ici comme contrôles négatifs. Afin d'étudier l'impact de la présence d'AI-2, d'AI-2-P, et du glycérol-3-phosphate (Gly-P), produit de la phosphorylation du glycérol par LsrK-like en présence d'ATP, la protéine LsrR-like a été incubée avec le mix réactionnel contenant la molécule d'intérêt (+Gly-P, ou +AI-2-P, ou +AI-2) pendant 30 minutes à 30 °C, puis les séquences d'ADN ont été ensuite ajoutées à ce mix et de nouveau incubé dans les mêmes conditions que précédemment.

Comme démontré précédemment, l'ajout de la protéine LsrR-like à la séquence promotrice du gène *DVU_3131* présente un retard sur gel (figure 48; piste D). La présence de glycérol phosphorylé dans le mix réactionnel ne modifie pas le profil de migration. Il en est de même si le mix réactionnel contient de l'AI-2. Le glycérol phosphorylé comme l'AI-2 sont donc incapables d'empêcher l'interaction LsrR-like/ADN et donc de lever de répression. La migration sur gel de la fraction composée de la protéine pré-incubée avec l'AI-2 phosphorylé révèle quant à elle la perte du retard sur gel indiquant la levée de l'interaction entre LsrR-like et la région promotrice.

L'ensemble de ces résultats démontre que les gènes identifiés par l'approche *in silico* codent respectivement pour une AI-2 kinase et une protéine régulatrice se fixant au promoteur du gène *DVU_3131*. L'AI-2 phosphorylé est capable de prévenir cette interaction. Nous avons donc un système de type LsrK-LsrR fonctionnel. Nos travaux ont également montré que la protéine LsrK présentait une activité glycérol kinase mais que le produit de cette réaction, le glycérol phosphorylé est incapable de lever l'interaction LsrR/ADN. De façon intéressante, en dépit d'une activité plus importante pour le glycérol par LsrK-like, aucun impact du glycérol phosphorylé n'a pu être observé dans ces conditions.

c. Identification de la réponse génétique de *Nv*H au signal AI-2

L'équipe avait précédemment démontré l'importance de l'AI-2 sur la mise en place de l'interaction entre *Nv*H et *C. acetobutylicum* en consortium (Ranava *et al.*, 2021). La première partie de mes travaux a permis de démontrer d'une part la présence des gènes codant pour des protéines LsrK et LsrR fonctionnelles et impliquées dans le système de réponse des bactéries à l'AI-2. Un homologue de LsrB, récepteur du signal AI-2 chez *Nv*H, n'a lui pas été identifié suggérant fortement un système de détection/réponse non canonique.

Suite à la mise en évidence d'un système permettant la perception de l'AI-2, l'objectif a été d'identifié, chez *NvH*, les gènes répondant au signal AI-2. Pour cela, nous avons choisi une stratégie d'analyse transcriptomique comparative par séquençage de nouvelle génération (NGS). Étudier le système de quorum sensing (QS) de type AI-2 chez *Nv*H dans des milieux riches en sulfate et complexes se révèle difficile, car *Nv*H produit une molécule QSI qui bloque l'AI-2,

empêchant l'analyse de la voie de signalisation AI-2 dans ces conditions (voir Introduction, partie 3). Pour surmonter cet obstacle, nous avons choisi de travailler en milieu pauvre en glucose, dans lequel *Nv*H ne produit pas de QSI, ce qui permet d'étudier le régulon du QS. Ce milieu reflète également les conditions du consortium, où l'AI-2 joue un rôle clé dans l'interaction.

Ainsi, une préculture de *Nv*H a été réalisée en milieu riche (SKY), puis les cellules ont été récoltées par centrifugation en phase exponentielle, lavées et resuspendues en milieu pauvre. Cette suspension a été utilisée pour une seconde culture en milieu carencé pendant 45 minutes à 37 °C, en présence ou absence (contrôle avec H_2O) de 0,75 mM d'AI-2 synthétique (DPD).

Trois réplicats biologiques ont été réalisés afin de constituer un jeu de données statistiquement exploitable. Après la collecte des cultures bactériennes, les ARN totaux ont été extraits et purifiés en vue d'un séquençage NGS Illumina (Genewiz). La préparation des échantillons et le protocole d'analyse des données issues du séquençage sont détaillés dans la section Matériels et méthodes. Brièvement, les résultats de séquençage ont été traitées sur le serveur Galaxy Europe. Le contrôle de la qualité des séquences avant et après nettoyage a été réalisé à l'aide des outils FastQC (Galaxy, Version 0.73+galaxy0). Le nettoyage des séquences a été réalisé à l'aide des outils fastp (Galaxy, Version 0.23.2+galaxy0) pour éliminer les séquences des adaptateurs et Trimmomatic (Galaxy, Version 0.38.1) pour éliminer les séquences ayant une mauvaise qualité. Cette étape est indispensable pour assurer un alignement optimal des séquences sur le génome de référence et pour retirer les nucléotides de faible qualité des lectures, ce qui permet de réduire les biais potentiels dans l'alignement sur le génome de référence liés à une mauvaise assignation des nucléotides. Pour finir les séquences ont été alignées au génome de référence de *Nv*H (NCBI_Assembly : GCF_000195755.1) avec l'outil Bowtie2 (Galaxy, Version 2.4.5+galaxy1) et dénombrées avec featureCounts (Galaxy, Version 2.0.1+galaxy2). L'analyse comparative des échantillons traités ou non par un ajout exogène d'AI-2 durant 45 minutes a été réalisée à l'aide du logiciel DESeq2 (Galaxy Europe, Version 2.11.40.8+galaxy0). L'ensemble des paramètres sélectionnés est détaillé dans la partie Matériels et méthodes.

L'analyse comparative des données alors obtenues lorsque *Nv*H est traité ou non, un ajout d'AI-2 montre que *Nv*H module l'expression de 38 gènes au total (Annexe 4). Parmi eux, 32 présentent une induction de plus de 2 fois avec une p-value ajustée < 0.05 en présence d'AI-2 dans le milieu, tandis que 6 montrent une diminution d'expression d'au moins un facteur 2 avec un p-value ajustée < 0.05 en présence d'AI-2 (figure 49).

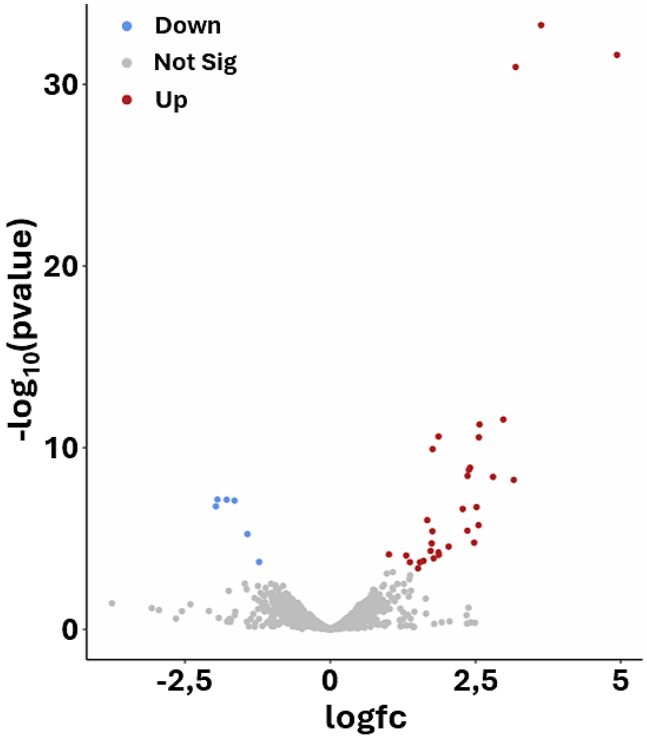


Figure 49 : Analyse des variations d'expression génique de *Nv*H en présence d'AI-2. Chaque point représente un gène. L'axe des abscisses (logfc) indique le log2 du ratio de changement d'expression (log2 fold change) et l'axe des ordonnées (-log10(pvalue)) représentant le niveau de signification statistique (p-value ajustée) de chaque gène de *Nv*H. Les gènes en rouge sont significativement surexprimés ("Up"), tandis que les gènes en bleu sont significativement sous-exprimés ("Down"). Les gènes en gris ne montrent pas de variation d'expression significative ou une variation inférieure à un facteur 2 ("Not Sig"). Les points plus éloignés de l'origine (0 sur l'axe des abscisses) indiquent des gènes avec les changements d'expression plus prononcés et/ou des valeurs p plus significatives.

Pour obtenir une première vue d'ensemble des résultats, une analyse différentielle a été réalisée en fonction des COG (Clusters of Orthologous Genes) attribués à chaque gène grâce à l'annotation effectuée *via* EggNOG (figure 50) (Annexe 5).

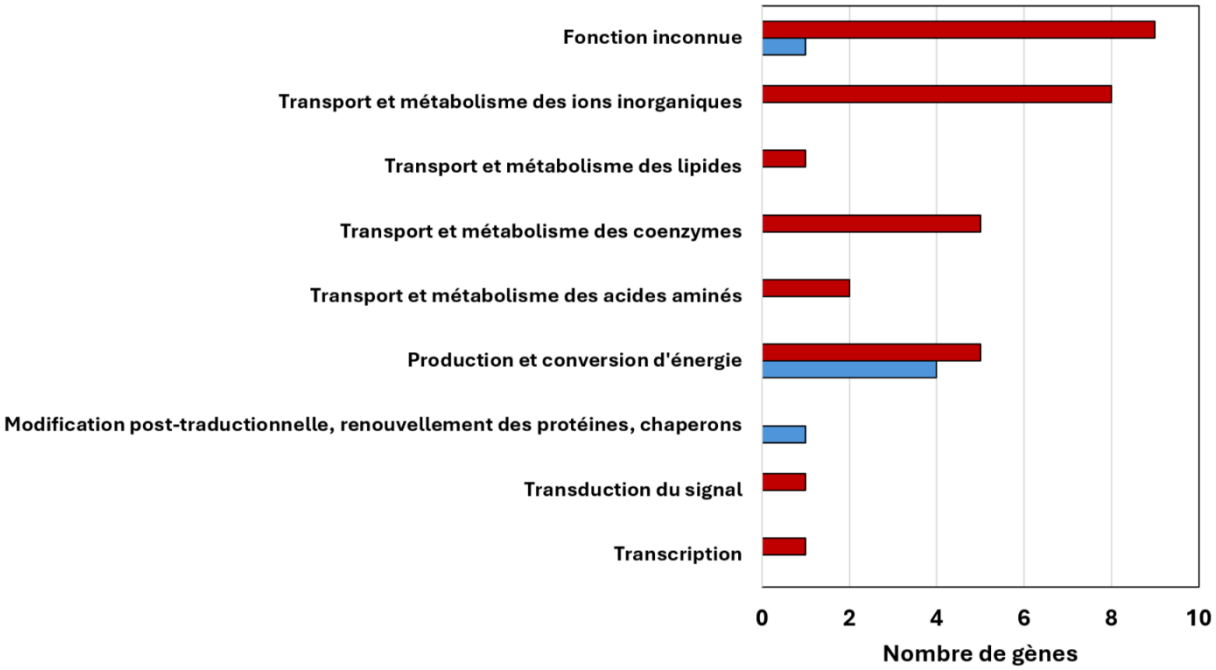


Figure 50 : Représentation graphique de la répartition des gènes régulés par l'AI-2 en fonction de leur classification COG. En rouge et bleu sont représentés les familles de gènes dont l'expression est plus élevée ou plus faible en présence d'AI-2, respectivement.

Comme le montre la figure 50, on observe qu'en réponse à l'AI-2, *Nv*H régule principalement des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des ions inorganiques et des coenzymes (COG "P"), ainsi que dans la production et la conversion d'énergie (COG "C"). À l'aide de l'outil "MicrobesOnline Operon Predictions", il a été montré que les 38 gènes sont répartis en 17 unités transcriptionnelles, dont 11 gènes uniques et 7 groupes organisés en opérons. Parmi ces derniers, nous nous sommes concentrés sur les opérons pour la suite de cette étude (tableau 11).

Tableau 11 : Liste des gènes de *Nv*H différentiellement exprimés en présence d'AI-2.

	Gène	COG	Protéine	Log2(FC)	P value ajustée
Opéron 1	DVU_1764	K	CopG family transcriptional regulator	1,67	1,61E-04
	DVU_1765	C	ThiH protein, putative	1,76	4,99E-08
	DVU_1766	E	Aspartate ammonia-lyase, putative	1,51	3,81E-02
	DVU_1767	C	Radical SAM domain protein	1,78	1,24E-02
	DVU_1769	C	Periplasmic [Fe] hydrogenase large subunit (HydA)	1,86	1,28E-08
	DVU_1770	C	Periplasmic [Fe] hydrogenase small subunit (HydB)	2,41	4,64E-07
Opéron 2	DVU_2092	H	ThiF family protein	1,86	6,68E-03
	DVU_2093	C	ThiH protein	2,36	5,58E-04
	DVU_2094	H	Thiazole synthase (thiG)	2,55	2,89E-04
	DVU_2095	H	Thiamine biosynthesis protein (ThiS)	2,47	2,26E-03
Opéron 3	DVU_2540	E	2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase, D-component	2,38	5,60E-07
	DVU_2541	I	CoA-substrate-specific enzyme activase, putative	3,16	1,51E-06
Opéron 4	DVU_2571	P	Ferrous iron transport protein B	2,36	1,08E-06
	DVU_2572	P	Ferrous iron transport protein A, putative	2,98	2,34E-09
	DVU_2573	S	FeoB-associated Cys-rich membrane protein	2,56	1,28E-08
	DVU_2574	P	Ferrous ion transport protein, putative	1,75	2,38E-03
Opéron 5	DVU_2663	S	ATPase P	1,76	5,76E-04
	DVU_2664	P	Phosphate ABC transporter, ATP-binding protein, putative	2,57	3,46E-09
	DVU_2665	P	Phosphate ABC transporter, permease protein, putative	2,52	3,41E-05
	DVU_2667	P	Phosphate-binding protein	4,93	3,97E-29
Opéron 6	DVU_2751	S	Methylamine utilisation protein MauE domain-containing protein	1,31	8,99E-03
	DVU_2752	P	Rhodanese-like domain protein	3,63	1,83E-30
	DVU_2753	S	C_GCAxxG_C_C family protein	1,37	1,82E-02
Opéron 7	DVU_2809	C	Formate dehydrogenase 2 subunit gamma (cytochrome c-553))	-1,97	3,30E-05
	DVU_2810	O	Formate dehydrogenase formation protein FdhE, putative	-1,43	7,78E-04
	DVU_2811	C	Formate dehydrogenase 2 subunit beta (cytochrome c-553)	-1,78	1,61E-05
	DVU_2812	C	Formate dehydrogenase 2 subunit alpha (cytochrome c-553)	-1,94	1,61E-05

Les 7 opérons regroupant 27 des 38 gènes différentiellement exprimés sont présentés dans le tableau 11. Parmi les gènes régulés on retrouve les gènes associés au métabolisme de l'H_2 et du formiate qui sont deux acteurs clés du métabolisme énergétique chez *Nv*H. Sur les 7 opérons impactés par la présence de l'AI-2, seul l'opéron 7 contenant les gènes codant pour la formiate déshydrogénase (*DVU_2809* ; *DVU_2810* ; *DVU_2811* ; *DVU_2812*) est réprimé en présence d'AI-2. La formiate déshydrogénase catalyse la réduction réversible du $CO_2 + 2H^+$ en formate. Cette formiate déshydrogénase, localisée dans le périplasme, est une des 3 formiate déshydrogénases présentes chez *Nv*H.

Les autres opérons induits en présence d'AI-2, présentent chacun des caractéristiques distinctes qui illustrent la variété des fonctions biologiques influencées par l'AI-2. Par exemple, l'opéron 1 contient des gènes codant pour l'hydrogénase périplasmique hydA/B, impliquée dans

la production d'hydrogène lors de la fermentation. Ces gènes jouent un rôle clé dans l'oxydation de l'hydrogène, un substrat essentiel pour divers processus biologiques, et leur régulation par l'AI-2 suggère qu'ils participent à des voies métaboliques spécifiques, notamment celles liées à la gestion énergétique de la cellule *via* le recyclage des électrons à travers la membrane plasmique, en lien avec la réduction du sulfate, tout comme la formiate déshydrogénase (Sim *et al.*, 2013; Marbehan *et al.*, 2024).

L'opéron 2, quant à lui, est composé de gènes impliqués dans la synthèse de la thiamine, une vitamine B1 essentielle pour la synthèse des acides nucléiques et des protéines, en plus de jouer un rôle crucial dans le métabolisme cellulaire. L'induction de cet opéron en présence d'AI-2 pourrait signaler une réponse à des conditions de stress ou à des besoins énergétiques accrus dans l'environnement de la cellule.

L'opéron 3 regroupe des gènes responsables de la dégradation des acides aminés. La dégradation des acides aminés est un processus vital pour le maintien de l'équilibre énergétique et la production de précurseurs pour la synthèse de biomolécules. La régulation positive de cet opéron par l'AI-2 pourrait indiquer une adaptation de la cellule aux variations de la disponibilité en acides aminés dans son environnement.

L'opéron 4 contient des gènes impliqués dans le transport du fer, un élément essentiel dans de nombreux processus biologiques, notamment la synthèse des protéines. La régulation de cet opéron par l'AI-2 suggère une réponse adaptative aux besoins en fer, un métal souvent limité et strictement régulé au niveau cellulaire.

L'opéron 5 inclut des gènes impliqués dans le transport du phosphate, un autre élément vital pour la cellule, en particulier pour la production d'ATP. Le contrôle de cet opéron en réponse à l'AI-2 pourrait être lié à l'équilibre énergétique de la cellule, en fonction de la disponibilité du phosphate dans son environnement. Il est également intéressant de noter que chez *Nv*H, 2 systèmes d'import du phosphate sont présents, le premier codé par l'opéron contenant les gènes *DVU_2477*, *DVU_2478*, *DVU_2479* et le deuxième codé par l'opéron contenant les gènes *DVU_2663*, *DVU_2664*, *DVU_2665*, *DVU_2666*, *DVU_2667*. Cependant, seul le premier de ces opérons a été décrit comme exprimé en condition de carence nutritionnelle en phosphate sous le contrôle du régulateur transcriptionnel PhoB. L'absence de la reconnaissance du deuxième opéron phosphate ABC transporteur par PhoB pose la question d'une potentielle fonction cellulaire différente qu'initialement prédite (Rajeev *et al.*, 2011). En lien avec l'absence de fonction attribuée pour l'import de phosphate du deuxième opéron, la présence de ce dernier

parmi les gènes induits par la présence d'AI-2, soulève la question de son rôle dans la communication AI-2 chez *Nv*H.

Enfin, l'opéron 6 regroupe des gènes liés à la régulation des composés soufrés et à la formation de clusters fer-soufre (Fe-S), des structures essentielles pour de nombreuses réactions enzymatiques et pour le transport des électrons dans diverses voies métaboliques. Cette régulation indique que l'AI-2 pourrait jouer un rôle dans la gestion des composés soufrés, un élément clé dans des processus comme la réduction des sulfates et la gestion des stress oxydatifs.

Chaque opéron met en évidence une fonction biologique spécifique influencée par l'AI-2, suggérant que cette molécule joue un rôle clé dans la régulation de voies métaboliques essentielles à la survie et à l'adaptation des cellules à leur environnement. Le fait que les fonctions contrôlées par l'AI-2 soient diverses mais axées sur l'adaptation et le métabolisme suggère que, dans le contexte du consortium *Nv*H:*C. acetobutylicum*, lorsque *Nv*H détecte *via* l'AI-2 la présence de *C. acetobutylicum* dans des conditions de carence, il entreprend un changement profond de son métabolisme, probablement en prévision d'un partage énergétique avec *C. acetobutylicum*. Ainsi, cette régulation pourrait être d'une importance capitale pour comprendre comment *Nv*H s'adapte à des conditions fluctuantes et optimise son métabolisme en fonction de ses besoins.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent également que le métabolisme de *Nv*H s'adapte en réponse au signal AI-2, plutôt qu'une activation des voies de chimiotactisme, de formation de biofilm ou de motilité, qui auraient pu être attendues, étant donné que les premières étapes du couplage entre *Nv*H et *C. acetobutylicum* nécessitent un rapprochement des deux bactéries, comme observé lors des expériences d'imagerie (voir partie III : Modèle d'étude). L'activation de la synthèse de la thiamine (un cofacteur impliqué dans de nombreuses voies cellulaires) ainsi que l'importation du fer par la cellule renforcent l'hypothèse d'une activation de voies métaboliques spécifiques. Cependant, l'activation du métabolisme de *Nv*H ne semble pas être liée à une croissance cellulaire utilisant l'AI-2 comme source de carbone, car aucune voie majeure d'assimilation du carbone n'est activée. Afin de vérifier cette hypothèse, la capacité de *Nv*H à se développer dans un surnageant de *C. acetobutylicum* produisant de l'AI-2 a été investiguée. Pour cela, une culture de *C. acetobutylicum* a été réalisée en milieu de consortium SLY. Les échantillons ont été prélevés aux moments suivants : après inoculation, début phase exponentielle (DO_{600nm} 0,29), milieu de phase exponentielle (DO_{600nm} 0,73) et phase stationnaire (DO_{600nm} 1,4), respectivement. Ces surnageants ont été ensuite "clarifiés" c'est à dire filtrés afin

d'être stérilisés (0,2 µm) puis inoculés avec 0,1 DO_{600nm} de *Nv*H. En parallèle, la souche de *Nv*H a été mise en culture dans les milieux SLY (contrôle négatif) et SKY (contrôle positif). La croissance a été mesurée après 22 heures d'incubation en suivant l'évolution de la DO_{600nm} (figure 51).

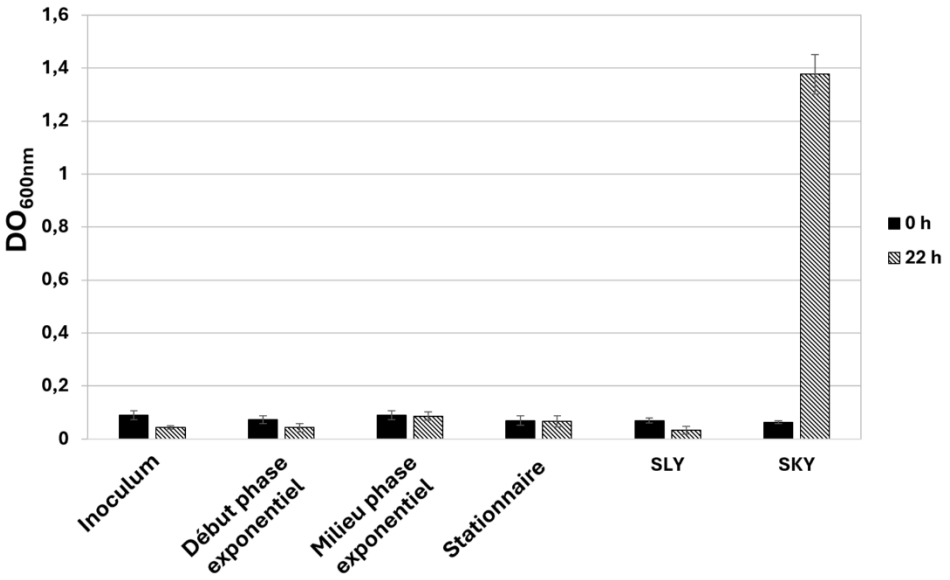


Figure 51 : Croissance de *Nv*H en culture dans le surnageant de culture clarifié de *C. acetobutylicum*. La DO_{600nm} a été mesurée après inoculation (noir) et après 22 heures (hachuré) de cultures à 37 °C. Les cultures de *Nv*H ont été réalisées en utilisant le surnageant de culture de *C. acetobutylicum* clarifié (0,2 µm) après inoculation dans le milieu 2xTG, en début de phase exponentielle, en milieu de phase exponentielle puis en phase stationnaire. Les contrôles de croissance de *Nv*H en milieu carencé (SLY) et riche (SKY) sont également présentés (n=3).

Comme montré dans la figure 51, la souche de *Nv*H n'est pas capable de croître sur les surnageants de *C. acetobutylicum* et présente une croissance en milieu riche SKY. Cela indique que les métabolites produits dans le surnageant de *C. acetobutylicum*, dont l'AI-2, ne peuvent pas servir de substrat pour le développement de *Nv*H. Ce résultat est cohérent avec l'incapacité de *Nv*H à croître dans un milieu pauvre tel que SLY, qui ne contient pas de lactate ni de sulfate. Ce phénomène renforce l'idée que le développement de *Nv*H nécessite un couplage métabolique pour assurer son développement en présence de *C. acetobutylicum*.

d. Régulation des unités transcriptomiques régulées en présence d'AI-2 par le régulateur LsrR

Comme nous l'avons vu dans la section précédente, l'ajout d'AI-2 entraîne l'induction de 7 structures opéroniques différentes. Dans la suite de ce travail, la détermination des unités transcriptionnelles sous contrôle direct du régulateur LsrR a été entreprise. Pour cela nous avons choisi l'approche des gels retard (EMSA) afin de déterminer si la régulation observée par séquençage NGS était issue d'une régulation directe de l'opéron, par la fixation du régulateur

transcriptionnel DVU_3131, ou issue d'une activation indirecte. Ce travail est encore en cours, mais dans cette section, les résultats obtenus pour les promoteurs des opérons 2 et 5, qui codent respectivement la machinerie de synthèse de la thiamine et le transporteur de phosphate sont présentés.

Pour cela, les régions promotrices de ces deux unités transcriptionnelles ont été amplifiées par PCR et marquées de manière fluorescente avec l'aide de la cy5. Une fois marqués et purifiés, les produits PCR ont été incubés en présence de la protéine LsrR purifiée.

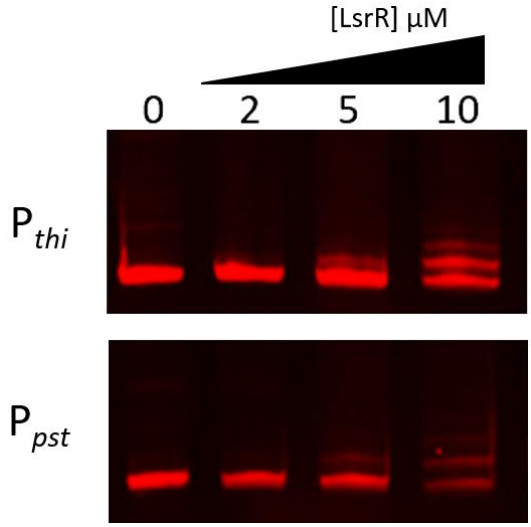


Figure 52: Fixation spécifique de la protéine LsrR-like à la région promotrice de l'opéron lsr. Après une incubation de 30 minutes à 4 °C avec l'ADN et 60 ng de poly(dI-dC)•poly(dI-dC), les fractions contenant 0, 2, 5 ou 10 µM de LsrR-like et 3 ng d'amplicon ont été déposées sur un gel natif 6 % et révélées par fluorescence (n>3).

Comme observé dans la figure 52, l'ajout de la protéine LsrR-like à la séquence promotrice des opérons 2 et 5 montre la capacité du régulateur transcriptionnel à reconnaître spécifiquement les régions promotrices de ces deux opérons.

Ce résultat suggère une régulation directe des gènes codant pour l'ABC transporteur ainsi que des gènes impliqués dans la synthèse de la thiamine en présence d'AI-2 et souligne ainsi le rôle potentiel de ces derniers dans la mise en place du mécanisme globale de réponse à l'AI-2 chez *Nv*H.

3. Conclusion

Cette partie du travail a eu pour objectif de rechercher, identifier et caractériser un/des système(s) associé(s) à la signalisation de type AI-2 chez les bactéries *C. acetobutylicum* et *Nv*H. La stratégie mise en place a consisté à combiner approche *in silico*, *in vitro* et *in vivo*. Ainsi dans

un premier temps, une recherche *in silico* des acteurs du QS de type AI-2 chez *C. acetobutylicum* et *Nv*H a été réalisée.

Chez *Nv*H, les résultats obtenus mettent en évidence la présence de systèmes non canoniques putatifs, notamment en raison de l'absence de certains gènes et de la non-conservation de la synténie classiquement retrouvée pour ce système de communication. Après analyse par alignement de séquences et superposition de structures, deux gènes codant des homologues putatifs LsrR-like (*DVU_3131*) et LsrK-like (*DVU_3134*) chez *Nv*H, présents dans une même unité transcriptionnelle, ont été retenus. Chez *C. acetobutylicum*, si le gène *luxS* (*CA_C2942*) était déjà identifié, cette approche a permis la mise en lumière d'autres gènes potentiellement impliqués dans la détection et la réponse à l'AI-2. Dans le cas du récepteur au signal un homologue de LsrB (*CA_C1351*) a pu être identifié ainsi que des protéines d'import LsrA (*CA_C0703*) et LsrC (*CA_C0705*). Pour la réponse au signal de *C. acetobutylicum* un homologue de LsrK (*CA_C2612*) et de LsrR (*CA_C0708*) ont également pu être identifiés.

Les travaux se sont ensuite concentrés sur le décryptage chez *Nv*H. Ainsi, afin de confirmer l'implication de ces deux gènes dans la réponse au signal AI-2 par *Nv*H, une approche *in vitro* a été mise en œuvre. Pour cela, une étape de production dans l'hôte hétérologue *E. coli* (DH5α et BL21) et de purification des protéines LsrR-like et LsrK-like, et différents tests biochimiques ont été menés.

La capacité du régulateur transcriptionnel LsrR-like à se fixer de façon spécifique à son propre promoteur a pu être déterminée à l'aide d'expérience de retard sur gel révélant une auto-régulation de l'opéron comme retrouvée dans les systèmes QS AI-2 canoniques. Les tests d'activité kinase réalisés avec LsrK-like ont permis de mettre en évidence son rôle dans la phosphorylation de AI-2 mais aussi que cette enzyme avait une activité de promiscuité puisqu'elle est capable de phosphoryler le glycérol et l'AI-2. L'analyse de LsrK-like, annotée comme glycérol kinase dans les bases de données, révèle un site catalytique commun avec les glycérol kinases. Les enzymes LsrK et glycérol kinases appartiennent toutes deux à la famille des carbohydrate kinases FGGY incluant également les xylulose kinases (XylB) et les L-ribulose kinases (AraB). Ces résultats, révélant une double activité kinase par LsrK-like avec une proximité plus forte au sein de la famille des carbohydrates kinases FGGY avec les glycérol kinases, suggèrent une diversité plus large que celle proposée par Silvia Stotani de 2018 qui soulignait une proximité plus forte entre LsrK de chez *E. coli* avec les xylulose kinases (Stotani, 2018). A la suite des résultats obtenus pour LsrR-like et LsrK-like, un retard sur gel en présence et en absence d'AI-2 phosphorylé a été réalisé. L'AI-2 phosphorylé est capable d'empêcher l'association de

LsrR à l'ADN, ce qui n'est pas le cas pour le glycérol phosphorylé. Ce résultat confirme donc l'implication conjointe de ces deux protéines dans la réponse à l'AI-2 par *Nv*H.

Une analyse du transcriptome de *Nv*H en présence d'AI-2 a été réalisée par séquençage nouvelle génération (NGS). Les résultats obtenus ont permis de mettre en avant l'impact de l'AI-2 sur le métabolisme de *Nv*H *via* l'activation de voies impliquées dans la synthèse de cofacteurs tels que la thiamine ou l'import de fer dans la cellule, ainsi que par l'activation de voies impliquées dans la dégradation d'acides aminés et dans le métabolisme de l'hydrogène (acteur clé du métabolisme énergétique chez *Nv*H). Ces résultats révèlent une activation du métabolisme de *Nv*H induit pas la seule présence de AI-2 bien que cette molécule ne soit pas à elle seule suffisante pour la croissance cellulaire de *Nv*H. Ceci indiquerait donc que *Nv*H, en réaction à la réception du signal, pourrait adapter en amont son métabolisme bien que la bactérie partenaire (et donc la source de carbone) ne soit pas présente. Ces résultats sont à replacer dans un contexte écologique plus large où *Nv*H se positionne entre les bactéries fermentaires et les méthanogènes, et interagit métaboliquement avec les 2 types d'espèces. Il est intéressant de signaler que peu de méthanogènes ont été identifiés comme capable de QS de type AI-2 et donc les interactions mises en place dans ce cas devraient faire appel à un autre mode de signalisation. Le point à souligner est que dans les deux types d'interactions, les voies hydrogène de *Nv*H sont impliquées. Sachant que l'hydrogène est un vecteur énergétique inter-espèces reconnu, *Nv*H et plus largement les BSR pourraient donc avoir un rôle pivot dans le fonctionnement de l'ensemble de la chaine trophique.

Pour aller plus loin, l'analyse de la régulation des opérons a été réalisée par une expérience de retard sur gel afin de déterminer si l'implication de LsrR dans leurs expressions est directe ou indirecte. Grâce à cela, il a été possible de confirmer la capacité de LsrR-like à réguler directement l'opéron thiamine et l'opéron ABC transporteur phosphate. Malgré la recherche de séquence consensus présentes dans les différentes séquences promotrices aucun motif potentiellement spécifique de LsrR-like n'a encore pu être déterminé. Dans ce sens, la réalisation de retard sur gel avec des séquences promotrices réduites permettrait d'affiner les résultats. De plus, la réalisation d'une analyse du transcriptome par séquençage NGS à un temps plus précoce (15 minutes) a été entreprise pour identifier d'autres gènes potentiellement impliqués dans la réponse au signal et sous le contrôle direct de LsrR-like. La forte régulation de l'opéron ABC transporteur phosphate ainsi qu'une régulation directe de celui-ci par LsrR-like pointe vers un rôle dans l'internalisation de l'AI-2. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant d'utiliser une sonde D-desthiobiotin-AI-2 récemment développée par Vanessa Miranda *et al*. en 2019

permettant le marquage et une purification sur colonne des récepteurs AI-2 (Miranda *et al.*, 2019).

II. Développement et application de la Digital Droplet PCR pour la quantification absolue des cellules dans le consortium synthétique *C. acetobutylicum* et *Nv*H

1. Introduction

L'étude des consortia synthétiques présente des limitations par rapport aux approches conventionnelles utilisées pour l'étude des cultures pures. Un exemple simple est la mesure de la DO_{600nm} d'une culture pure qui permet de quantifier, en fonction de la turbidité, le nombre approximatif de cellules présentes dans le milieu de culture. Dans le cas d'un consortium synthétique, la valeur de la turbidité obtenue peut être différente d'une simple somme de DO de chacune des deux espèces cultivées et ne permet donc pas de connaître la contribution de chacune des espèces à la turbidité totale.

Comme présenté dans l'introduction, lors de la croissance du consortium *C. acetobutylicum* et *Nv*H, la densité optique mesurée est plus élevée que la simple somme des courbes de croissance des deux bactéries, ce qui traduit un effet synergique de ces deux souches sur leur croissance respective. Des approches de quantification par cytométrie en flux et par PCR quantificative en temps réel (qPCR) sur le consortium ont alors permis d'établir la capacité de *Nv*H à croître en présence de *C. acetobutylicum* dans un milieu de croissance qui est dépourvu de souffre, un composé indispensable à la croissance de *Nv*H (Benomar *et al.*, 2015). Cependant, si la cytométrie en flux a montré un chevauchement des spectres de diffusion latérale respectif à 30 h suggérant l'existence d'un rapprochement entre les bactéries qui a été confirmé par microscopie, elle n'a pas permis de dénombrer chacune des espèces. De même, la qPCR qui nécessite l'élaboration d'une courbe étalon spécifique à chaque couple d'amorces n'a pas permis de définir de manière absolue le nombre de cellules de chaque espèce et donc de déterminer la proportion (ratio) des deux espèces bactériennes au sein d'un consortium. Afin de dénombrer de manière précise le nombre de bactéries *C. acetobutylicum* et *Nv*H en consortium et de suivre l'évolution de ces populations au cours du temps une approche basée sur la digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) a été mise au point. Contrairement à la qPCR, la ddPCR est une méthode permettant une quantification absolue du nombre de copies d'une séquence ADN cible. La ddPCR repose sur la séparation des différents fragments d'ADN ou de génome présents dans un échantillon en microgouttelettes, chacune contenant les réactifs nécessaires à une amplification PCR. Une fois la PCR terminée, l'amplification d'ADN est évaluée par fluorescence permettant de déterminer la présence ou l'absence de la séquence cible au sein des gouttelettes. Tout d'abord une dilution de l'échantillon est réalisée afin de permettre son partitionnement parmi 20 000 à 40 000 gouttelettes, pouvant contenir zéro, une ou rarement plusieurs copies de la séquence ciblée. La ddPCR permet donc de dénombrer par quantification de la fluorescence émise par l'agent intercalant utilisé, les gouttelettes positives (contenant la séquence ciblée et ayant subi l'amplification) et les gouttelettes négatives (ne contenant pas la

séquence ciblée) en point final. Une fois la quantification réalisée, le nombre initial de séquences cibles est déterminé à l'aide de la loi de Poisson. La loi de Poisson est une loi de probabilité discrète qui décrit le nombre d'événements se produisant dans un intervalle de temps ou un espace fixe, à condition que ces événements soient indépendants les uns des autres et qu'ils se produisent à un taux constant. Dans le contexte de la ddPCR, les résultats discrets (nombre limité de résultats possibles) sont la présence ou l'absence du gène cible. Une fois la loi de Poisson appliquée, le nombre de copies par microlitre peut être obtenu et rapporté ensuite à l'échantillon total.

L'émergence de cette technologie dans les années 2000 a vu son utilisation grandement augmentée notamment du fait de (i) sa capacité à obtenir un nombre absolu de copie d'ADN dans un échantillon, (ii) sa grande précision de mesure, et enfin (iii) sa plus faible sensibilité à la présence d'inhibiteur en comparaison de la qPCR (Kojabad *et al.*, 2021). Son utilisation dans le domaine de la santé a conduit à de nombreuses publications, comme dans le cas de la détection de virus, de variants génétiques ou dans le génotypage des tumeurs pour des traitements personnalisés des patients (Kojabad *et al.*, 2021; Abbasi *et al.*, 2022; Olmedillas-López *et al.*, 2022). L'utilisation de la ddPCR pour la détection de la présence de taxa spécifiques (utilisation d'amorce 16S spécifique) au sein d'échantillons complexes a également fait l'objet de publications (Wang *et al.*, 2021; D. Wang *et al.*, 2022). En revanche, encore aujourd'hui son utilisation pour le suivi d'une culture microbienne pluri-espèces au cours du temps n'a pas fait l'objet de publication. Ceci est probablement à mettre en lien avec le fait que cette technologie soit encore peu présente dans les laboratoires de microbiologie moléculaire qui ne s'intéressent que depuis peu de temps à la problématique du fonctionnement des consortia microbiens mais aussi à la nécessité d'une mise au point plus poussée que pour la qPCR. Cette approche était donc balbutiante au début de ma thèse, et l'IMM s'est équipé d'un appareil dédié en 2021. Afin de développer cet outil comme méthode de suivi de populations microbiennes mixtes, j'ai mis au point au cours de ma thèse un protocole qui est présenté en détail ci-dessous et qui a fait l'objet de la rédaction d'une publication scientifique.

2. Stratégie de conception et de vérification des amorces pour quantification par ddPCR

La quantification du nombre de copies d'une séquence cible nécessite la conception d'un couple d'amorces spécifiques à cette séquence. Pour garantir que la quantification soit représentative de la cible souhaitée, il est essentiel de s'assurer de la spécificité des amorces et d'éviter les hybridations non désirées avec d'autres séquences du génome, du plasmide de

l'organisme ou du génome des autres organismes présents. Aujourd'hui, des outils bio-informatiques tels que Primer-BLAST permettent de concevoir rapidement des amorces spécifiques de la séquence souhaitée et de réaliser un premier filtrage pour une séquence donnée (Ye *et al.*, 2012). Ceci réduit le temps nécessaire aux étapes d'optimisation des amorces qui peuvent être très chronophages et permet de limiter les risques d'hybridation sur d'autres sites, ce qui n'était pas possible lorsque ces étapes étaient réalisées manuellement.

La quantification par ddPCR repose, comme pour la qPCR, sur l'analyse de l'intensité de fluorescence. Toutefois, dans le cas de la ddPCR qui repose sur l'utilisation d'agent intercalant tel que l'Evagreen, c'est la différence d'intensité, appelé amplitude, entre les gouttes négatives et positives qui est cruciale pour la quantification et non pas le niveau relatif d'intensité de fluorescence par puits propre à la qPCR. Par conséquent, cette méthode d'analyse impose une contrainte de sensibilité accrue, afin de ne pas détecter des produits non spécifiques, en particulier ceux induits par la formation non désirée de structures secondaires, d'homodimères ou d'hétérodimères tels que présentés dans la figure 53.

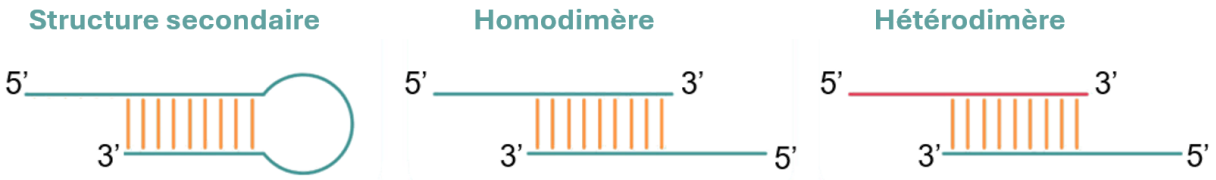


Figure 53 : Types de formation de produits non-spécifiques par PCR.

Afin d'éviter les biais lors de la quantification, il est donc essentiel de minimiser la formation de ces produits non spécifiques. Pour ce faire, des outils bio-informatiques permettent de réaliser un filtrage des couples d'amorces potentiellement à "risque". Parmi ces outils, on peut citer Primer-BLAST, PCR Primer Stats du programme Sequence Manipulation Suite ou encore NetPrimer de Premier Biosoft (Premier Biosoft, Palo Alto, CA, USA) (Stothard, 2000; Ye *et al.*, 2012). Dans le cadre de cette étude les amorces réalisées ont été filtrées à l'aide de Primer-BLAST puis par NetPrimer de Premier Biosoft.

De plus, pour utiliser la ddPCR sur des consortia, il est essentiel de choisir lors de la conception des amorces, une séquence sans homologie afin d'éviter les biais de mesure causés par une fixation non spécifique sur des séquences du partenaire bactérien. À cette fin, des séquences sans homologie entre *C. acetobutylicum* et *NvH* ont été identifiées à l'aide de GView Server, puis confirmées par une recherche d'homologie de séquence nucléique avec BlastN de NCBI. Les gènes *CA_C0825* et *DVU_0169* ont été sélectionnés pour *C. acetobutylicum* et *NvH*, respectivement.

3. Test de sélectivité des amorces

A. Validation par PCR conventionnelle

Après la conception assistée par bio-informatique des couples d'amorces spécifiques (tableau 8), pLD_{DVU_0169} pour *Nv*H et pLD_{CA_C0825} pour *C. acetobutylicum*, des tests de spécificité ont été réalisés par PCR conventionnelle et qPCR. Pour cela, l'ADN des bactéries a été extrait et purifié avec le kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (A1120) et les cycles d'amplifications PCR ont été réalisés 40 fois. Le choix de la réalisation d'une PCR conventionnelle comme première approche permet une vérification simple, rapide et peu onéreuse de la spécificité des amorces (figure 54).

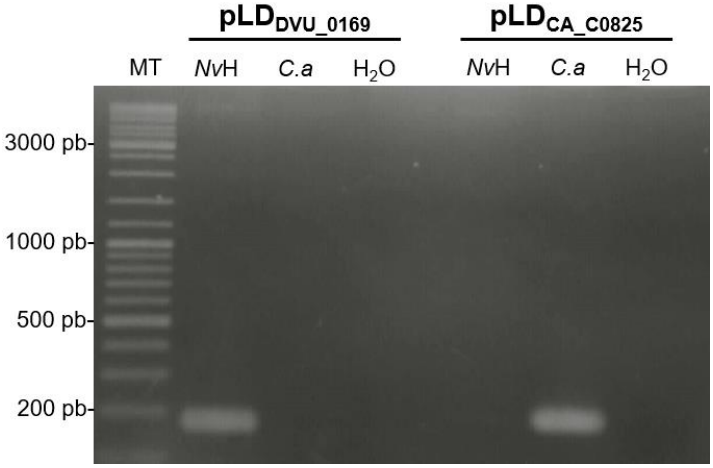


Figure 54 : Test de la spécificité des amorces pLD_{DVU_0169} et pLD_{CA_C0825} pour les gènes *DVU_0169* et *CA_C0825* de *Nv*H et *C. acetobutylicum*. Les amplicons purifiés ont été révélé au BET après électrophorèse sur gel agarose 2 %. Les couples d'amorce pLD_{DVU_0169} et pLD_{CA_C0169} ont été utilisé pour la réalisation d'une amplification PCR utilisant l'ADN génomique de *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*Nv*H), de *Clostridium acetobutylicum* (C. a) ou de l'eau nucléase free pour le contrôle.

Comme on peut le voir sur la figure 54, l'approche par PCR conventionnelle permet de confirmer que chaque couple d'amorces est bien spécifique au gène sélectionné pour chacun des 2 organismes ciblés. En effet, les couples pLD_{DVU_0169} et pLD_{CA_C0825} permettent respectivement une amplification des gènes *DVU_0169* de *Nv*H et de *CA_C0825* de *C. acetobutylicum* et chacun de ces couples ne génère pas de produit d'amplification lorsque l'ADN génomique de l'autre organisme est utilisé comme matrice. De plus, aucune amplification n'est observée pour le contrôle sans matrice, indiquant l'absence de contamination. Bien que la PCR ne révèle ni amplification aspécifique, ni amplification croisée entre les génomes des deux bactéries, la sensibilité de la détection sur gel d'agarose n'est pas suffisante pour déterminer si, au cours de la PCR, des produits d'amplification liés par des dimères d'amorces ou des produits

aspécifiques en quantité trop faible pour être détecté sur gel sont formés. Ces produits non visibles sur gel pourraient poser problème en ddPCR, car la sensibilité accrue de cette technique permettrait de les détecter, induisant ainsi une imprécision, voire un biais dans l'analyse par ddPCR. Cette étape de contrôle par PCR est donc nécessaire car elle permet la vérification de la spécificité des amorces mais reste non suffisante.

B. Validation par qPCR

Afin de renforcer les résultats de spécificité par PCR conventionnelle mais également de rechercher la possible présence d'amplifications non-spécifiques, issues par exemple de l'hybridation éventuelle des amorces entre elles, une analyse par qPCR a été réalisée. Pour cela les couples d'amorces ont été testés sur une gamme d'ADN de *C. acetobutylicum* et *Nv*H allant de 5 ng.µL^{-1} à 5.10^{-5} ng.µL^{-1} par qPCR (figure 55). Cette large gamme permet d'évaluer la sensibilité, la spécificité et l'efficacité de la réaction d'amplification en fonction de la quantité d'ADN cible présente.

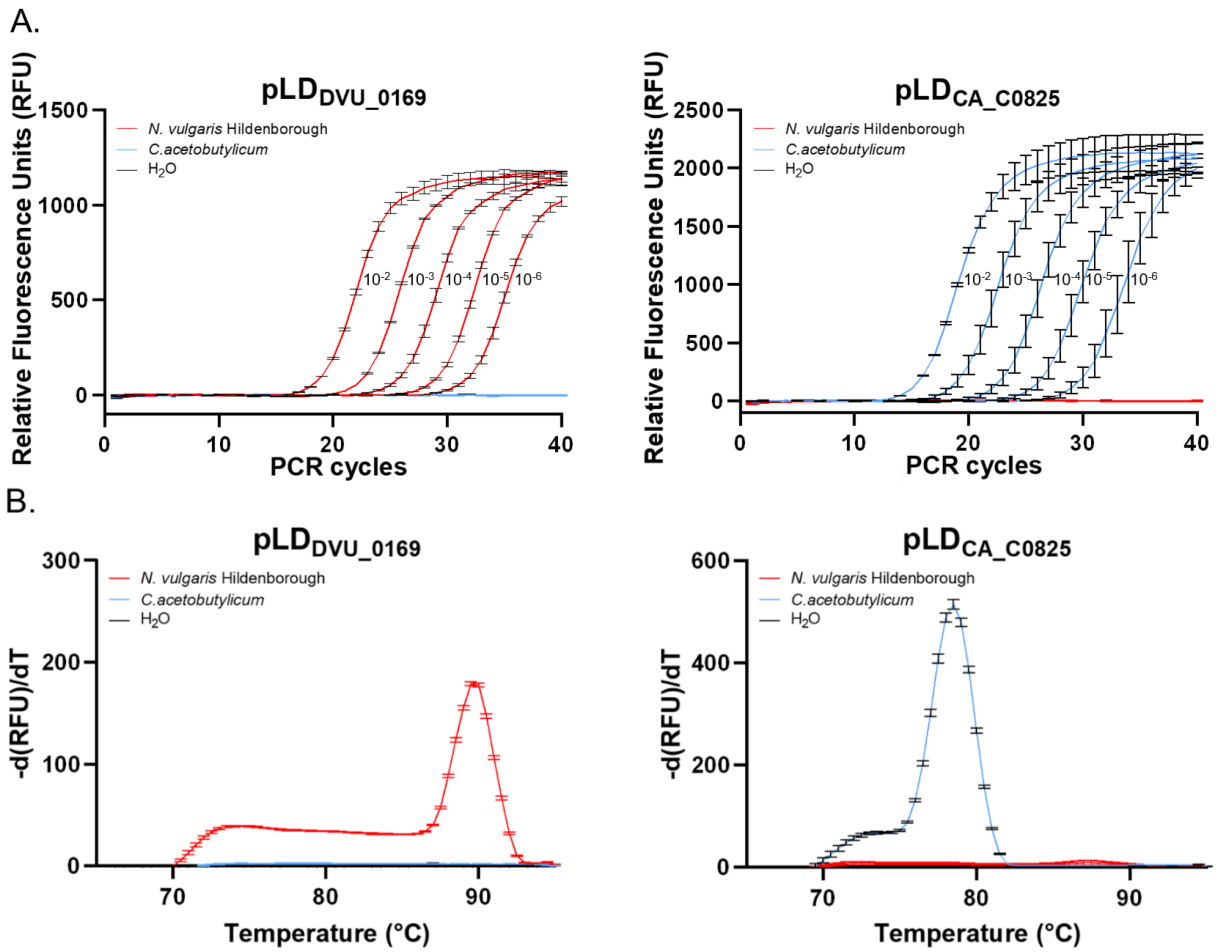


Figure 55 : Analyse par qPCR de la spécificité des amorces. A) L'amplification par qPCR a été réalisée avec les amorces ciblant *DVU_0169* de *Nv*H (panels de gauche) ou ciblant *CA_C0825* de *C. acetobutylicum*) (panels de droite). Les courbes obtenues pour *C. acetobutylicum* et *Nv*H sont

représentées en bleu et en rouge, respectivement. Une dilution en cascade allant de 5 ng.µL^{-1} à 5.10^{-5} ng.µL^{-1} a été réalisée et les résultats ont présentés selon leurs amplifications respectives (A) et leurs courbes de fusions obtenues (B). Les résultats présentés sont représentatifs des trois jeux de données obtenus pour cette analyse (n=3).

Comme on peut l'observer sur la figure 55, l'amplification avec les amorces spécifiques de *Nv*H (pLD$_{DVU_0169}$) montre une courbe sigmoïdale caractéristique d'une qPCR en présence de l'ADN de *Nv*H (courbe rouge). La possibilité d'une amplification croisée a été testée en utilisant l'ADN de *C. acetobutylicum* comme matrice et aucune amplification n'est observée confirmant la spécificité du couple d'amorces pour *Nv*H (courbe bleu). Les courbes de fusion réalisées à la fin des amplifications par qPCR ont été analysées pour chaque couple d'amorces afin de d'évaluer la spécificité des produits amplifiés et d'exclure la présence de produits non spécifiques ou de dimères d'amorces. Un seul produit d'amplification (pic dans le tracé de la courbe de fusion) est présent à 90 °C pour le couple d'amorce ciblant *Nv*H (pLD$_{DVU_0169}$), correspondant à la présence d'un produit d'amplification unique et confirmant l'absence de produit secondaire. L'absence de pic pour l'ADN de *C. acetobutylicum* lors de la réalisation de la courbe de fusion confirme une amplification spécifique pour l'ADN *Nv*H. De la même manière, le couple d'amorces (pLD$_{CA_C0825}$) pour *C. acetobutylicum* a été testé dans les mêmes conditions, révélant la spécificité du couple d'amorces pour *C. acetobutylicum* et l'absence de production de produits non spécifiques ou de dimères d'amorces.

Grâce à ce test d'amplification par qPCR, nous avons confirmé la spécificité des amorces ainsi que l'absence de produit non spécifique et l'absence de produit secondaire tel que des dimères d'amorces.

C. Validation par ddPCR

Bien que les approches par PCR conventionnelle et qPCR montrent que les amorces sont spécifiques, un contrôle de spécificité et d'une absence d'amplification de produit non-spécifique ont également été réalisés par ddPCR (figure 56). Une concentration d'ADN à 0,05 ng.µL^{-1} a été testée et 40 cycles ont été réalisés (voir Matériels et méthodes). Avec la ddPCR, l'échantillon est partitionné en milliers de petites gouttelettes, chacune représentant une réaction PCR individuelle. Les gouttelettes sont ensuite classées comme "positives" (en bleu) ou "négatives" (en gris) en fonction de la présence ou non du signal d'amplification dans chaque gouttelette.

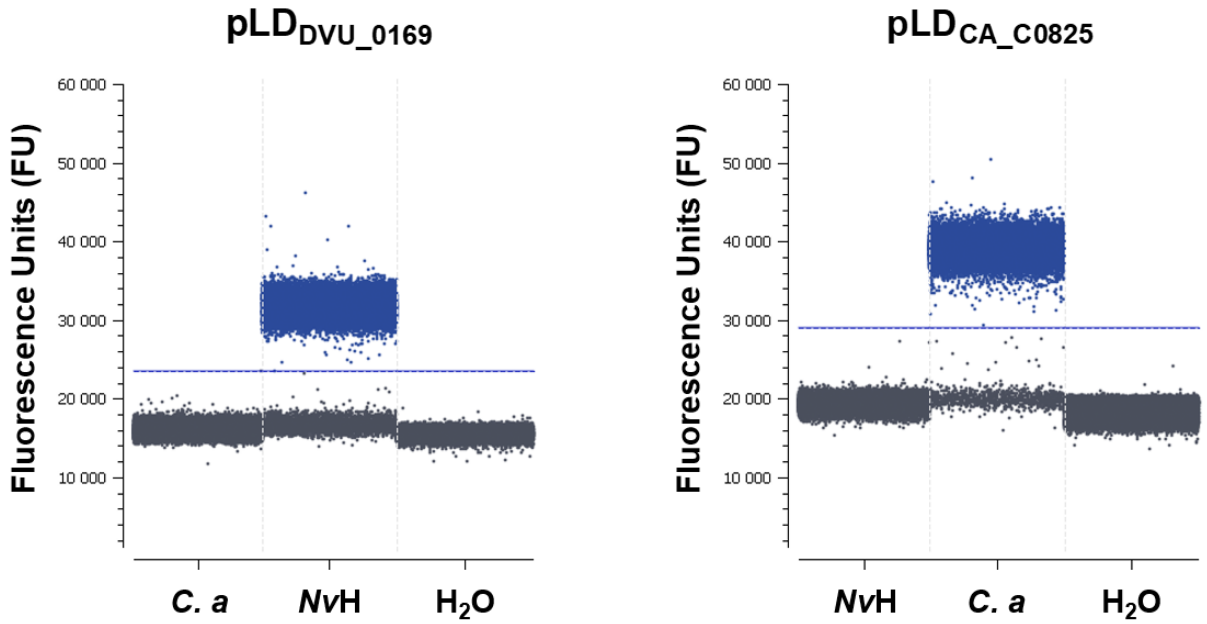


Figure 56 : Test de spécificité des amorces par ddPCR. Distribution des gouttelettes positives (en bleu) et négatives (en gris) en fonction de leurs intensités de fluorescence. Les couples d'amorce pLD_{DVU_0169} et pLD_{CA_C0169} ont été utilisé pour la réalisation d'une amplification par ddPCR utilisant l'ADN génomique de *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*Nv*H), de *Clostridium acetobutylicum* (C. a) ou de l'eau nucléase free pour le contrôle.

À 0,05 ng.µL^{-1} d'ADN des gouttelettes positives sont observées lorsque le couple d'amorce pLD_{DVU_0169} est utilisé avec l'ADN de *Nv*H indiquant une amplification PCR à cette concentration. Lors du test avec les amorces *Nv*H sur l'ADN de *C. acetobutylicum*, aucune gouttelette positive n'est observée, confirmant l'absence d'amplification croisée ou de dimères d'amorce et donc une spécificité des amorces *Nv*H. De plus, l'absence de gouttelette positive lors du contrôle eau permet de confirmer l'absence de produit secondaire tel que des dimères d'amorces. Il est également important de noter que la différence d'amplitude de fluorescence entre les gouttelettes positives et négatives est assez grande pour permettre une distinction claire entre les deux populations de gouttes. De la même manière, le test utilisant le couple d'amorce ciblant *C. acetobutylicum* a montré une spécificité pour *C. acetobutylicum*, aucune amplification avec l'ADN de *Nv*H, l'absence de la formation de produit secondaire lors de l'amplification avec l'eau et une différence d'amplitude suffisamment élevée pour réaliser une distinction claire entre les gouttelettes positives et négatives.

La réalisation de ce dernier test d'amplification par ddPCR a permis de valider définitivement la spécificité des amorces pour les organismes respectifs (voir Matériels et méthodes).

D. Validation de la fragmentation de l'ADN

La ddPCR est une technique de quantification absolue de l'ADN, qui repose sur le partitionnement de l'échantillon en milliers de micro-réactions. Cependant, pour que cette détection soit optimale, il est crucial de s'assurer que l'ADN à analyser est fragmenté de manière homogène et bien distribuée. En effet, pour avoir une quantification absolue il est important d'avoir une fragmentation de l'ADN afin d'avoir idéalement une seule copie de séquence cible par gouttelette positive. Si la séquence est unique et les amorces spécifiques alors la quantification du nombre de copies peux être associée au nombre de copies de génome présent dans un échantillon. Dans le cas d'un gène multicopie tel que le gène 16S, si l'ADN est mal fragmenté, plusieurs copies du gène cible peuvent se retrouver dans une seule gouttelette. Cela pose un problème, car la ddPCR détecte uniquement si la gouttelette est positive ou négative, mais ne peut pas déterminer combien de copies du gène sont présentes dans cette gouttelette. Ainsi, si plusieurs copies du gène cible sont amplifiées dans la même gouttelette, cela faussera la quantification, donnant l'impression qu'il y a moins de copies d'ADN que ce qui est réellement présent.

Dans le cas de la quantification d'un gène multicopie, une fragmentation inadéquate de l'ADN peut entraîner une répartition inégale des séquences cibles dans les gouttelettes. Il convient toutefois que l'ADN ne soit ni trop ni pas assez fragmenté. Si, l'ADN est trop fragmenté, il y a un risque de ne pas pouvoir amplifier la séquence cible car celle-ci risque d'être clivée. En revanche, un ADN pas assez fragmenté peut poser problème si les fragments sont trop longs pour se répartir correctement entre les gouttelettes, ce qui peut limiter l'accès des amorces aux régions cibles. Afin de s'assurer de la fragmentation de l'ADN, une première analyse par TapeStation a été réalisée afin de vérifier le profil des ADN purifiés (voir Matériels et méthodes) (figure 57).

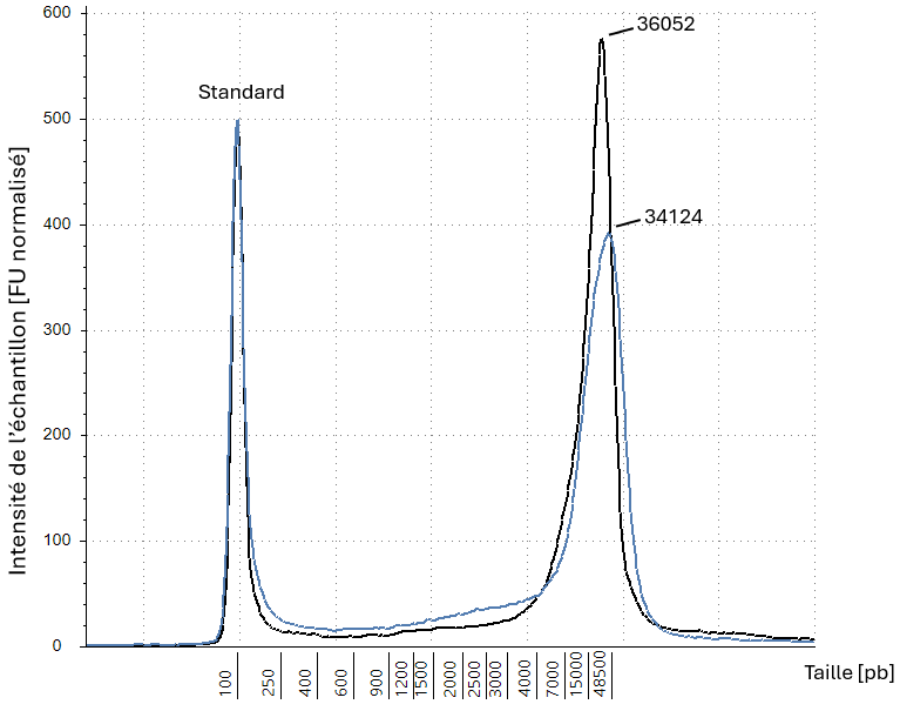


Figure 57 : Analyse du profil de l'ADN extrait de *C. acetobutylicum* et *Nv*H. Les spectres d'intensité de l'échantillon de *Nv*H et *C. acetobutylicum* sont représentés en bleu et noir respectivement.

Comme il est possible d'observer sur la figure 57, les ADN de *C. acetobutylicum* et *Nv*H sont tous les deux fragmentés et présentent une taille de fragment moyen de 36052 pb et 34124 pb pour *C. acetobutylicum* et *Nv*H, respectivement. Pour s'assurer que cette fragmentation soit suffisante pour le bon dénombrement du nombre de copie de gène, une analyse comparative entre le nombre de copies de gènes uniques et le nombre de copies du gène 16S qui est multicopie dans les génomes a été réalisée sur une quantité d'ADN matrice de 0,05 ng.µL^{-1}. Dans le cas des gènes uniques, présents dans des cellules contenant une seule copie de génome (*CA_C0825* pour *C. acetobutylicum* et *DVU_0169* pour *Nv*H), la ddPCR devrait détecter une seule copie par gouttelette positive. Dans le cas d'un gène multicopie tel que le gène 16S (5 copies sont présentes chez *Nv*H et 11 sont présents chez *C. acetobutylicum*) si l'ADN est mal fragmenté et/ou que plusieurs copies du gène 16S sont présentes dans la même gouttelette, la ddPCR ne pourra pas distinguer si la gouttelette contient une seule ou plusieurs copies de 16S. Elle comptera simplement la gouttelette comme positive, conduisant à une sous-estimation du nombre total de copies du gène 16S, car plusieurs copies seront présente dans une même gouttelette, comme cela a été expliqué précédemment. Ainsi la conception des couples d'amorces spécifiques aux gènes 16S a été réalisée et l'analyse comparative a été effectuée (tableau 8).

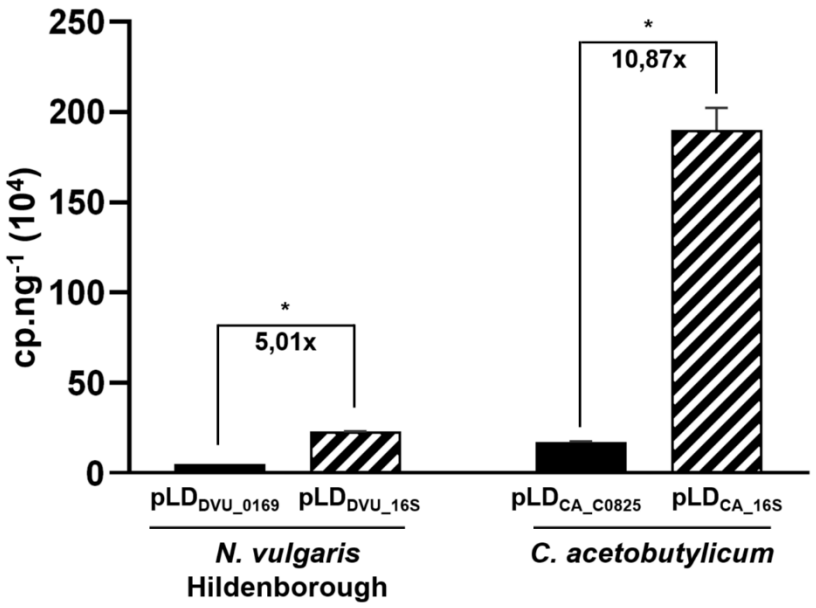


Figure 57 : Analyse comparative du nombre de copies d'un gène unique par rapport au nombre de copies d'un gène multicopie. Un test de U de Mann-Whitney a été réalisé sur des échantillons en tripliquât, une $p<0.05$ est représentée par une *.

Comme il est possible d'observer sur la figure 57 la présence d'un facteur de 5,01 et d'un facteur de 10,87 entre le nombre de copies de gène unique et le nombre de copies de gènes 16S a pu être déterminée pour *Nv*H et *C. acetobutylicum*, respectivement. La conservation du ratio copie de gène unique par rapport au nombre de copie de gènes multicopie théorique (1 : 5 pour *Nv*H et 1 : 11 pour *C. acetobutylicum*) permet de confirmer la bonne fragmentation de l'ADN et la capacité à déterminer le nombre de copies de gènes multicopies dans un échantillon.

La capacité de la ddPCR à déterminer une différence entre le nombre de copie d'un gène unique et le nombre de copies d'un gène multicopie ouvre également la possibilité de la quantification du nombre de plasmides présents dans les bactéries en faisant une analyse comparative entre le nombre de copies d'un gène unique présent sur le génome et le nombre de copies d'un gène unique présent sur le plasmide. La quantification du nombre de copies de plasmides au sein des bactéries de cette étude trouve son intérêt dans la présence, dans le plasmide, de gènes impliqués dans la formation du biofilm chez *Nv*H, ainsi que de gènes impliqués dans la solvantogénèse chez *C. acetobutylicum*. La quantification du nombre de copies d'un plasmide ainsi que sa stabilité au cours du temps restent une étape encore aujourd'hui fastidieuse. Les travaux de Michael Jahn *et al.* de 2014 et de 2016, montrent un dénombrement des copies des différents plasmides, permettant tous l'expression de l'EGFP chez *E. coli*, variable du fait de leur système de réplication. Pour cela, une approche de cytométrie en flux, permettant la séparation des cellules en fonction de l'intensité de l'EGFP, a

été couplée avec la quantification absolue par ddPCR pour obtenir le nombre de copies de plasmides (Jahn *et al.*, 2014, 2016). Cette approche a permis d'évaluer le nombre de plasmides par cellule selon les phénotypes observés. La séparation par cytométrie en flux permet l'obtention d'un nombre moyen de plasmides selon les phénotypes observés. Ici, la mise en place de la détermination directe du nombre de copie de plasmides par ddPCR a été réalisée pour une quantification globale et rapide, l'objectif étant de s'affranchir des limitations de l'utilisation de la cytométrie en flux dans le cas d'un échantillon complexe multi-espèces présentant des événements d'agrégation ou d'échange cytosolique, comme observé précédemment au laboratoire pour la détermination du nombre de cellules en consortia (Benomar *et al.*, 2015).

Les plasmides de *C. acetobutylicum* et de *Nv*H étant de taille conséquente (192 kb pour *C. acetobutylicum* et 202 kb pour *Nv*H) l'extraction et la purification avec le kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (A1120) permettent leur purification en même temps que l'ADN génomique. Ainsi la conception de couples d'amorces pour le plasmide de *C. acetobutylicum* et de *Nv*H a été réalisée comme décrit précédemment et a été utilisée pour la détermination du nombre de copies de plasmides dans 0,05 ng.µL^{-1} d'ADN extrait (figure 58) (tableau 8).

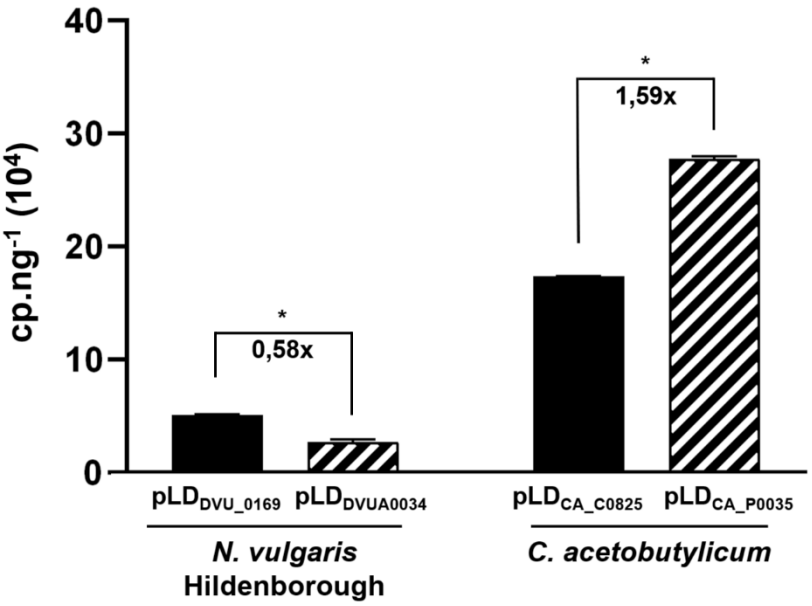


Figure 58 : Analyse comparative du nombre de copies d'un gène unique par rapport au nombre de copies d'un gène unique présent sur le plasmide. Le nombre de copies des gènes uniques et des plasmides est présenté respectivement en noir et en hachuré. La significativité* des résultats a été déterminée par le test U de Mann-Whitney ($p < 0,05$) (n=3).

Grâce à cette approche un ratio de 0,5 et 1,6 entre le nombre de copies de plasmides et le nombre de copies de génome chez *Nv*H et *C. acetobutylicum*, respectivement, a pu être déterminé. Pour *C. acetobutylicum*, un ratio global de 1,6 indique la présence moyenne de 3

plasmides pour 2 génomes. Tandis que pour *Nv*H, un ratio de 0,5 indique la présence de 1 plasmides pour 2 génomes. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. Pour *C. acetobutylicum*, ce ratio peut indiquer la présence de deux copies de plasmides pour 50 % des cellules et une copie de plasmide pour les autres 50 % de cellules tandis que pour *Nv*H le ratio de 0,5 peut se justifier par l'absence de plasmide dans 50 % des cellules alors que les 50 autres % possèdent une copie de plasmide. Dans le cas de *Nv*H, une autre hypothèse est possible, celle de la présence de deux copies de génomes par bactérie. Quel que soit la raison de ce résultat, il souligne l'hétérogénéité qui existe au sein même d'une culture pure.

4. Limite de détection par ddPCR en présence ou en absence du partenaire bactérien

Une fois la conception et la spécificité des amorces effectuées, la détermination des limites de détection a été entreprise pour les génomes de *C. acetobutylicum* et *Nv*H par ddPCR. L'objectif a été d'évaluer la capacité de la ddPCR à détecter avec précision des échantillons contenant des concentrations décroissantes d'ADN. Pour cela, une dilution en série a été réalisée avec l'ADN de *Nv*H ou *C. acetobutylicum* d'une concentration allant de 5.10^{-2} ng.µL^{-1} à 5.10^{-6} ng.µL^{-1} et pour chaque dilution le nombre de copies d'ADN, exprimé en copie.µL^{-1}, (axe des ordonnées gauche) est évalué ainsi que le coefficient de variation en pourcentage (axe des ordonnées droite) afin de déterminer la fiabilité de la quantification. L'axe des abscisses représente la concentration d'ADN en ng.µL^{-1} (figure 59).

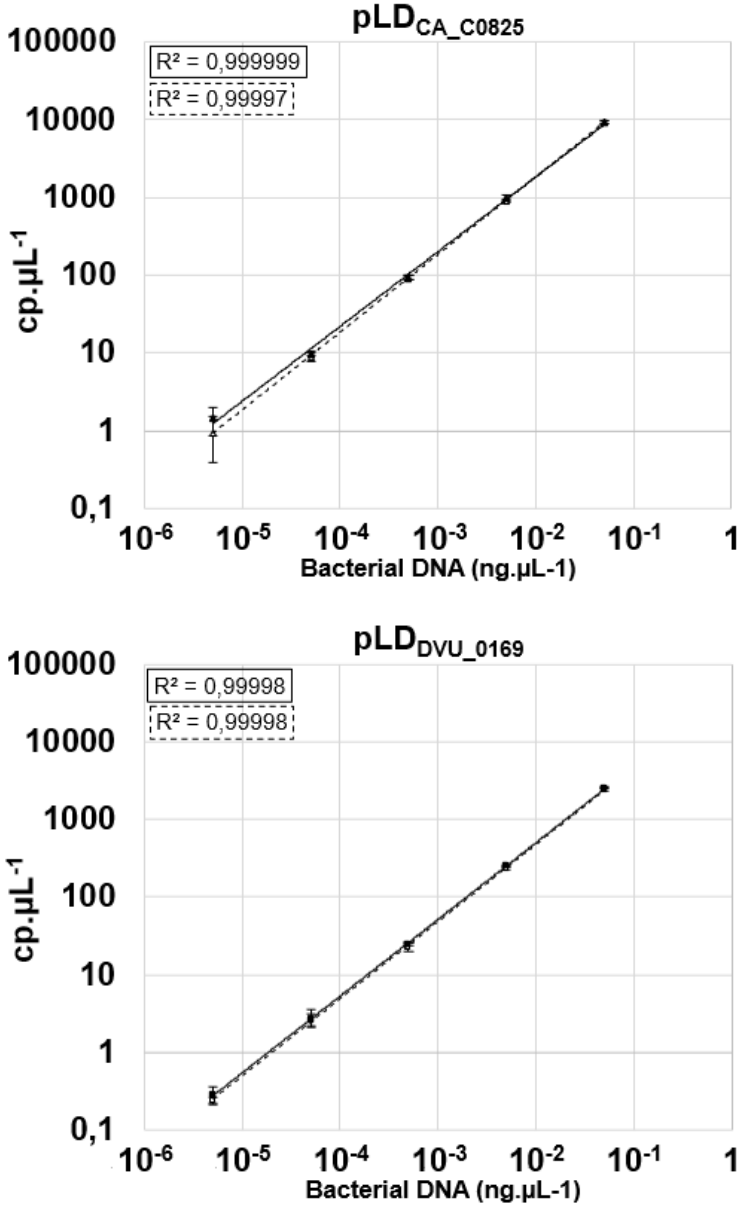


Figure 59 : Test de seuil de détection en présence ou absence d'ADN exogène. La linéarité de la quantification par ddPCR a été testée par l'analyse de dilutions sérielles de l'ADN extrait de *C. acetobutylicum* (A) et *Nv*H (B), en présence (ligne pointillée) ou en absence (ligne pleine) d'ADN exogène (0,05 ng.µL^{-1}) (n=3).

Comme on peut le voir sur la figure 59, tant pour *C. acetobutylicum* (figure 59 (A)) que pour *Nv*H (figure 59 (B)) il est possible de détecter avec confiance un minimum d'environ 10 copies.µL^{-1} par échantillon. Les résultats montrent un signal qui évolue linéairement en fonction de la concentration en ADN. Cette linéarité, avec un R carré proche de 1, entre les points de dilution indique que la quantification par ddPCR réalisée est reproductible et qu'il n'y a pas de modification de quantification due à la dilution. Cette expérience permet également de voir qu'à la concentration la plus faible (5.10^{-6} ng.µL^{-1}) il est possible de détecter jusqu'à moins de 1 copie.µL^{-1}. Cependant, une fois le nombre de copies proche de 1 copie.µL^{-1} la précision de

mesure diminue augmentant l'écart type des moyennes obtenues ce qui rend le résultat peu fiable avec seulement 3 échantillons analysés (n=3).

Dans un second temps, afin d'investiguer si la présence de l'ADN de l'autre organisme impactait la limite de détection ou la linéarité obtenue, une quantité fixe de 0,05 ng.µL^{-1} d'ADN de l'autre organisme a été rajoutée à chacune des dilutions sériées. Comme il est possible de voir sur la figure 59 (A et B), les tracés en présence (trait en pointillé) ou en absence de l'ADN (trait plein) de l'autre organisme se superposent indiquant qu'il n'y a pas d'impact lié à la présence de l'ADN de l'autre organisme sur la détection de l'ADN de l'organisme cible.

L'ensemble de ces résultats démontre qu'il est donc possible de quantifier le nombre de copie d'une séquence d'ADN par microlitre dans une gamme de concentration, comprise entre 0,05 ng.µL^{-1} et 5.10^{-6} ng.µL^{-1}, en présence ou en absence de 0,05 ng.µL^{-1} d'un ADN d'une autre bactérie. Ces résultats permettent d'une part de valider la faisabilité d'une détection spécifique des deux bactéries dans un échantillon mixte pour l'analyse du consortium bactérien et d'autre part, de mettre en évidence la capacité à détecter avec confiance les séquences cibles même lorsque celles-ci sont minoritaires (5*10^{-5} ng.µL^{-1} détectable dans 0,05 ng.µL^{-1}). Ces résultats permettent également de mettre en évidence que la réalisation d'un tripliquat biologique permet une détermination du nombre de copies avec une confiance élevée jusqu'à une concentration de 5*10^{-5} ng.µL^{-1} et souligne la nécessité de réaliser un plus grand nombre d'échantillons afin d'augmenter la précision de détection pour une concentration plus faible.

5. Détermination du nombre de copies de génome en condition de consortium contrôlé

A. Quantification par ddPCR d'un consortium contrôlé *C. acetobutylicum* 0,1:*Nv*H 0,1

Les expériences précédentes, réalisées avec d'ADN extrait de culture pure, ont démontré la capacité à quantifier la présence d'une bactérie, y compris en toute petite quantité ainsi que la sensibilité de la méthode dans le cas où des ADN étaient mélangés en amont de la mesure. Avant d'envisager le suivi de la croissance du consortium *C. acetobutylicum*/*Nv*H au cours du temps, la mise au point a été faite sur des cultures contrôlées, où des quantités connues de bactéries ont été mélangées puis directement récoltées pour réaliser l'extraction des acides nucléiques. Pour obtenir un dénombrement fiable des 2 organismes, l'extraction des acides nucléiques doit être reproductible et qualitative en présence de bactéries à Gram positif (*C. acetobutylicum*) et à Gram négatif (*Nv*H), aussi bien individuellement qu'ensemble. La mise au point d'un protocole adapté à l'extraction simultanée d'une culture mixte (Gram +/Gram -) a donc

été effectuée. L'extraction de plusieurs échantillons de culture pure a été réalisée à l'aide de deux kits d'extractions reposant pour le kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120) sur l'extraction et purification nucléique par précipitation tandis que le kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma, NA2110) repose sur l'extraction et purification nucléique avec une colonne composée de silice. Après l'extraction et la purification des ADN, les échantillons ont été quantifiés par ddPCR afin d'évaluer si ces dernières sont reproductibles et qualitatives. La réalisation de ces essais a permis de sélectionner le kit GenElute™ comme étant le plus adapté pour répondre à nos besoins de reproductibilité. Cette étape dans la mise au point du protocole souligne aussi l'importance de tester différents kits. En effet, dans le cas présent où le consortium est composé de bactéries à Gram positif et négatif, il convient d'utiliser un kit permettant d'extraire de façon équivalente l'ADN des deux types de bactéries afin de ne pas introduire un biais dès l'extraction.

Après avoir défini les conditions d'extraction et de purification des ADN, différentes cultures pures de *C. acetobutylicum* et *Nv*H à une DO_{600nm} de 0,1 ou en consortium avec une DO_{600nm} de 0,1 de chacune des deux bactéries ont été réalisées pour une quantification du nombre de copies de génome par ddPCR. Cette DO a été choisie pour mimer l'inoculum des expériences de consortium *C. acetobutylicum* et *NvH* réalisées au laboratoire. Une fois l'inoculation réalisée, les cellules ont directement été prélevées pour réaliser l'extraction d'ADN. L'ADN de ces différentes cultures extrait et purifié avec le kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma, NA2110) a ensuite été analysé par ddPCR (figure 60).

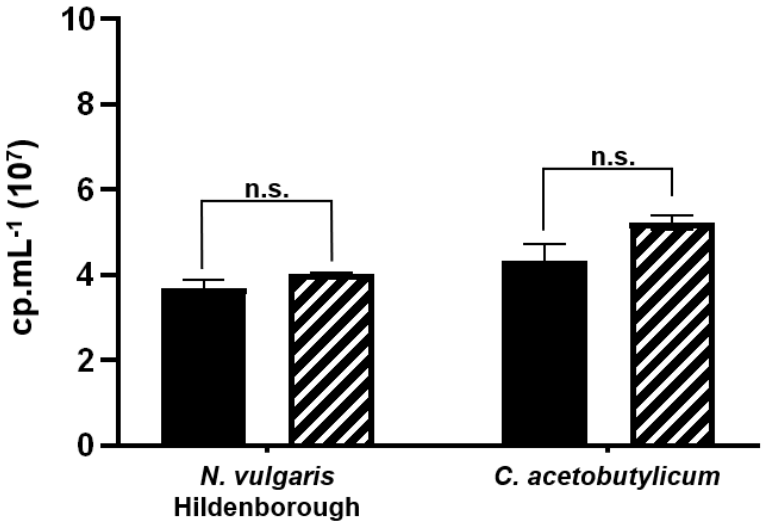


Figure 60 : Quantification par ddPCR d'un inoculum bactérien pure culture ou en consortium. L'extraction nucléique a été réalisée sur des inocula de DO_{600nm} de 0,1 en culture pure (noir) ou co-culture (hachuré). La significativité des résultats a été déterminée par le test U de Mann-Whitney, n.s. représente une absence de significativité au test (n=3).

Comme le montre la figure 60, aucune différence significative n'a été constatée entre le nombre de copies de génome de *Nv*H lorsque la bactérie est en culture pure ou en présence d'une DO_{600nm} égale de *C. acetobutylicum*. De la même façon aucune différence significative n'a été constatée entre le nombre de copies de génome obtenu pour *C. acetobutylicum* en culture pure ou en coculture avec une DO_{600nm} 0.1 de *Nv*H. Ce test a permis de démontrer qu'avec le système sélectionné, l'extraction d'ADN d'une espèce n'est pas influencée par la présence de l'autres, permettant ainsi un dénombrement fiable des deux espèces en coculture. Le résultat obtenu a été comparé au nombre de cellules dénombrées en utilisant une cellule de Malassez. On obtient, $5{,}29.10^{8}$ cellules.mL^{-1} et $5{,}48.10^{8}$ cellules.mL^{-1} pour *C. acetobutylicum* et *Nv*H, respectivement. L'obtention de résultats très similaires par les 2 approches *i.e.* comptage par cellule de Malassez et quantification par ddPCR, nous permet de valider le protocole d'extraction nucléique développé ainsi que celui de quantification par ddPCR des cellules en culture pure mais aussi et surtout une quantification fiable du nombre de copies de génome en consortium en utilisant la ddPCR. Cette comparaison a également permis de mettre en avant un ratio proche de 1 entre le nombre de copies de génome et le nombre de cellule confirmant ainsi la présence d'une seule copie de génome par cellule pour *C. acetobutylicum* et *Nv*H.

B. Détermination du seuil de détection par ddPCR de *Nv*H dans un consortium contrôlé

Le paragraphe précèdent démontre qu'il est possible de quantifier une bactérie donnée dans un mix bactérien contrôlé (mélange de quantité connue). L'étude du seuil de détection de *Nv*H en absence et en présence de *C. acetobutylicum* a été l'objectif suivant. Nous avons réalisé des cultures mixtes contrôlées, où *Nv*H est inoculée à différentes DO_{600nm} (0,2 ; 0,1 ; 0,01 et 0,001), en absence ou en présence de *C. acetobutylicum* à une DO_{600nm} fixe de 1 (figure 61). L'objectif étant de tester la capacité technique de détecter des bactéries minoritaires en proportion dans des conditions de consortium.

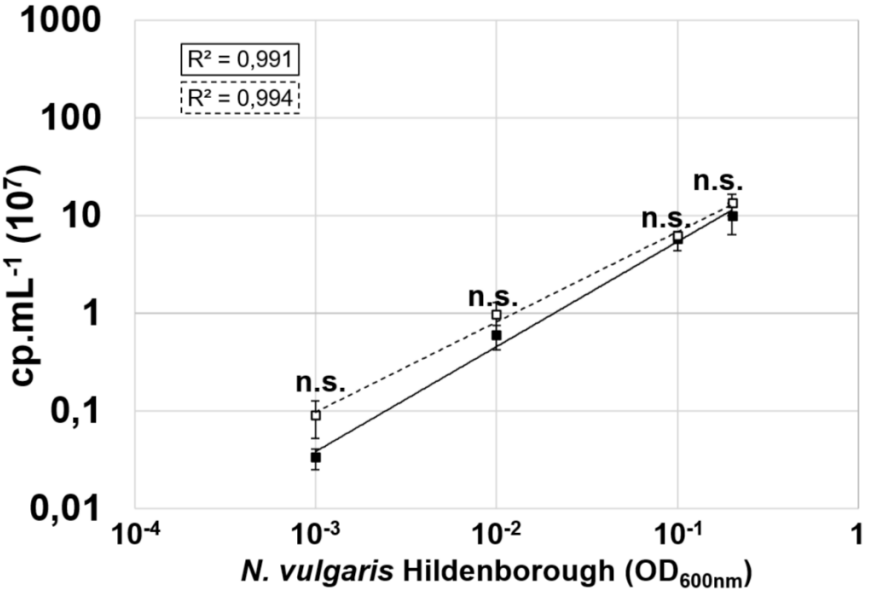


Figure 61 : Seuil de détection de *Nv*H en présence de *C. acetobutylicum*. La quantification du nombre de copie de génome de *Nv*H a été réalisée pour différente OD_{600nm} (OD_{600nm} : 0,2 ; 0,1 ; 0,01 ; 0,001) en absence (trait plein) ou en présence (tirait pointiller) d'une OD_{600nm} fixe (OD_{600nm} : 1) de *C. acetobutylicum*. La significativité des résultats a été déterminée par le test U de Mann-Whitney (n=3) et aucune différence significative n'a été observée entre les points de cultures pures ou en consortium pour *Nv*H (n.s.). Le dénombrement du nombre de copies de génome de *C. acetobutylicum* dans les différents consortia est, quant à lui, significativement identique entre eux.

La quantification du nombre de copie de génome de *C. acetobutylicum* et de *Nv*H a permis de démontrer la capacité de la ddPCR à dénombrer un consortium mixte composé d'une bactérie à Gram positif (*C. acetobutylicum*) et d'une bactérie à Gram négatif (*Nv*H), sans impact significatif de la présence de l'une ou de l'autre. En effet, le nombre de copie de génome de *Nv*H en absence ou en présence de *C. acetobutylicum* n'a pas montré de différence significative. De la même façon, la présence de *Nv*H n'a pas impacté la quantification de *C. acetobutylicum* qui a été inoculé à DO_{600nm} de 1 dans tous les échantillons mixtes et pour lesquels une quantification de (8,62 ± 1,06) x 10^{-8} cp·mL^{-1} a été obtenue. La détermination du seuil de détection dans nos conditions de culture n'a cependant pas été effectuée en dessous d'une DO_{600nm} de 0,001 pour *Nv*H, en raison de la perte de visibilité du culot après centrifugation. En effet, il est possible d'observer une perte de la linéarité pour *Nv*H inoculé à 0,001 en absence de *C. acetobutylicum*. Ceci peut s'expliquer par la formation d'un culot plus petit et plus fragile après centrifugation en culture pure, tandis qu'en présence de *C. acetobutylicum*, un effet de centrifugation peut avoir été induit, entraînant la formation d'un culot plus gros et plus stable.

Grâce à cette expérience, il a été possible de confirmer l'efficacité du protocole d'extraction et purification d'ADN à différentes concentrations cellulaires et selon différents ratios. L'efficacité de l'extraction et la purification pour les bactéries à Gram positif et négatif

sans distinction dans un consortium a également pu être confirmer. Pour finir, cette expérience a également permis de confirmée la capacité technique de déterminer le nombre de copies de génome pour une culture mixte composé de 1.10^4 cellules de *Nv*H dans 1.10^9 cellules de *C. acetobutylicum* soit un ratio de 1 cellule de *Nv*H pour 100000 cellules de *C. acetobutylicum*.

6. Détermination du ratio bactérien au sein d'un consortium synthétique

L'ensemble des expériences réalisées a donc permis de choisir le kit d'extraction n'induisant pas ou le moins de biais sur l'extraction d'ADN, de démontrer dans le cas d'un mix microbien que les résultats obtenus étaient similaires à ceux obtenus avec une méthode de comptage plus classique et enfin que la présence d'une bactérie n'impactait pas la quantification d'une autre au sein d'un mix. Forts de la mise au point de cette technique de quantification, nous avons alors appliqué cette approche pour quantifier de façon absolue, le ratio de bactéries au sein du consortium synthétique d'intérêt C. *acetobutylicum* - *Nv*H. Au cours des différentes étapes de mise au point, plusieurs essais ont été réalisés, notamment pour déterminer l'évolution du ratio *C. acetobutylicum/Nv*H au sein du consortium synthétique. Après l'inoculation des cultures pures et du consortium, des échantillons ont été prélevés 2 heures après le début de la culture correspondant à la phase de latence (temps 1), puis après 18 heures de culture correspondant à la phase exponentielle (temps 2). L'extraction et la purification des ADN ont été réalisées avec le kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120) puis les échantillons ont été analysés par ddPCR (figure 62).

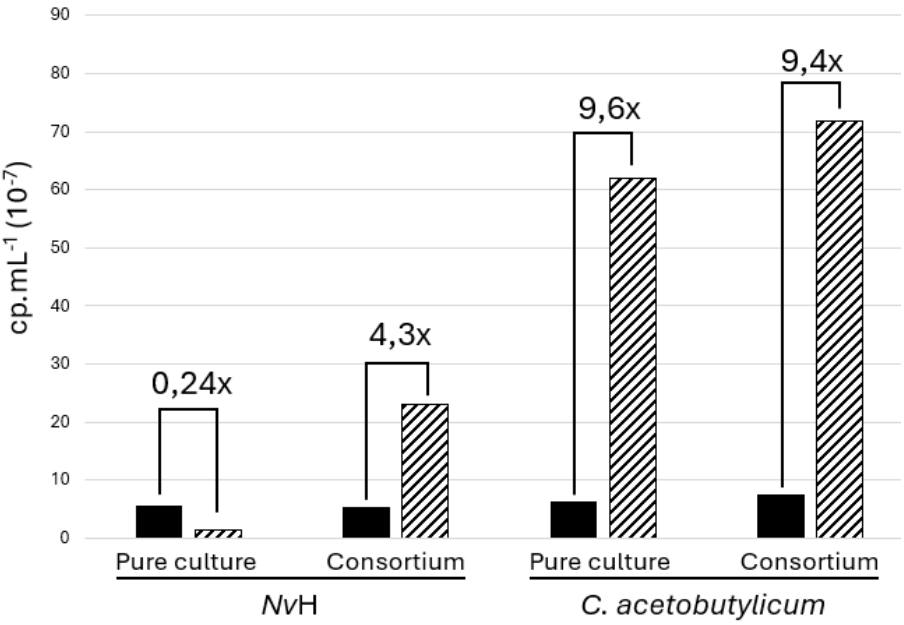


Figure 62 : Quantification du nombre de copies de génome de *Nv*H et *C. acetobutylicum* en phase de latence et exponentielle en culture pure et en consortium. Les valeurs obtenues pour *Nv*H, à gauche, et de *C. acetobutylicum*, à droite, en culture pure et en consortium sont

représentées en noir pour les mesures correspondant à la phase de latence et en hachuré pour les mesures correspondant à la phase exponentielle (n=1).

Les résultats obtenus suggèrent une croissance d'un facteur 4 de *Nv*H entre la phase de latence et la phase exponentielle de croissance en présence de *C. acetobutylicum*. Ce résultat confirme donc les observations faites précédemment par l'équipe d'un développement de *Nv*H uniquement quand *C. acetobutylicum* est présent dans le milieu. C'est également la première fois qu'une quantification est faite. À l'inverse, une diminution d'un facteur 4, indiquant une mortalité de *Nv*H, a été observée lorsque celle-ci est cultivée en culture pure entre le temps 1 et le temps 2. De manière intéressante, le facteur de croissance de *C. acetobutylicum* entre le temps 1 et le temps 2, en culture pure comme en consortium, ne semble lui pas avoir été affecté.

La quantification du nombre de copies de génome, suivant les dernières mises au point réalisées, est en cours afin de valider les résultats de cette expérience et de suivre l'évolution du ratio bactérien à d'autres moments. Si ces résultats très encourageants sont confirmés, un suivi du ratio bactérien en réacteur continu sera envisagé pour mieux appréhender la stabilité du consortium au fil du temps. De plus, les informations sur la croissance propre à chacune des deux espèces au sein du consortium permettront d'affiner le modèle de prédiction développé en collaboration avec le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP).

7. Test sur cellules entières

L'une des limitations rencontrées au cours du développement de la ddPCR pour la quantification bactérienne au sein d'un consortium synthétique a été le développement d'un protocole d'extraction et de purification d'ADN permettant une mesure du nombre de copies de génome reproductible et quantitative pour une culture mixte composée de bactéries à Gram positif et négatif tout en couvrant une large gamme de concentrations cellulaires (de l'inoculum à la phase stationnaire). Le développement d'un protocole utilisant le kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma, NA2110) a permis de satisfaire ces critères. Cependant, dans le cas de consortia naturels, d'échantillons de patients, ou dans le cas de bactéries nécessitant des procédures d'extraction plus complexes ou encore pour une technique plus rapide, d'autres approches doivent être développées. Dans ce contexte de développement d'une approche rapide et permettant de s'affranchir des étapes d'extraction/purification d'ADN, des tests sur cellules entières ont été réalisés. Cette expérience se base sur le même principe que les PCR sur bactérie entière provenant, par exemple, de colonies isolées sur boîte de gélose utilisées directement comme matrice pour l'amplification PCR. La première étape de l'amplification PCR sur cellules entières est une étape de dénaturation à 95 °C de généralement 2 minutes pour les PCR conventionnelles mais augmentée à 10 minutes pour permettre une lyse thermique des

bactéries. La première étape de dénaturation à 95 °C de l'ADN pour l'amplification par ddPCR a également été augmentée à 10 minutes pour permettre la lyse des cellules une fois réparties individuellement dans les gouttelettes (voir Matériels et méthodes). La comparaison du nombre de copies de génome obtenu, pour un même nombre de cellules, après une extraction et purification de l'ADN par rapport à une amplification par ddPCR sur cellule entière est présentée ci-dessous (figure 63).

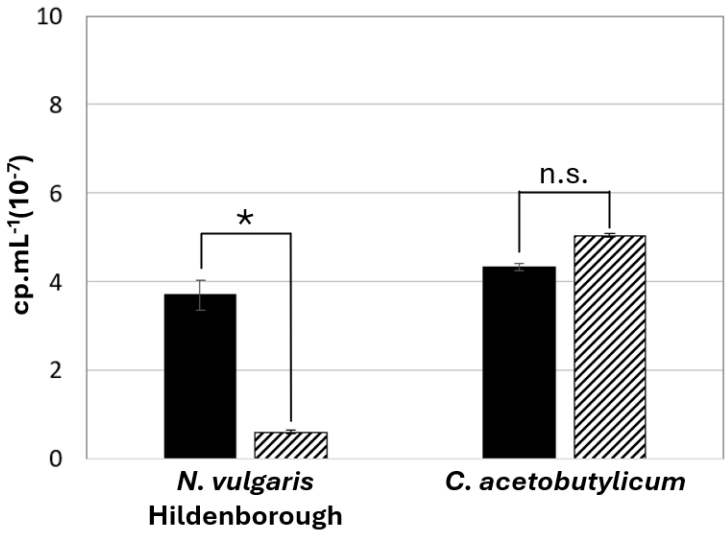


Figure 63 : Quantification du nombre de copies de génome par ddPCR sur cellules entières. Le nombre de copies de génome obtenu après extraction et purification de l'ADN (en noir) de *Nv*H (à gauche) et *C. acetobutylicum* (à droite) sont comparés après quantification par ddPCR sur cellules entières (hachuré). La significativité* des résultats a été déterminée par le test U de Mann-Whitney ($p < 0,05$) (n=3).

La réalisation de la lyse thermique à 95 °C pendant 10 minutes par ddPCR a permis une lyse efficace de *C. acetobutylicum* donnant un nombre de copies de génome proche de celui obtenu après extraction et purification avec le kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma, NA2110) suivant le protocole décrit dans la partie Matériels et méthodes. Cependant, le nombre de copies de génome obtenu pour *Nv*H lors de l'injection direct des cellules n'a pas permis de recouvrir le nombre de copies de génome obtenu après extraction et purification de l'ADN. Ce résultat suggère que la lyse thermique de *Nv*H n'a pas pu aboutir malgré l'ajout d'une étape supplémentaire de 10 minutes à 95 °C.

L'approche de ddPCR sur cellules entières a été initiée pour permettre une quantification rapide du nombre de copies de gènes dans un échantillon, sans nécessiter d'étape d'extraction d'ADN. Pour évaluer cette méthode, le nombre de copies de gènes obtenu après extraction d'ADN a été comparé à celui obtenu à partir d'un extrait brut issu d'une lyse thermique de 10 minutes à 95 °C, ainsi qu'au nombre de copies obtenu après injection directe des cellules entières. Afin de permettre la quantification du nombre de copies de gène, des cellules entières

répartie dans les gouttelettes, un cycle supplémentaire de lyse thermique de 10 minutes à 95 °C a été ajouté au début du programme ddPCR.

Les premiers résultats ont montré que le nombre de copies du gène de *C. acetobutylicum* était identique dans les trois conditions testées. En revanche, pour *Nv*H, la quantification du nombre de copies de gènes après injection des cellules entières a révélé une inefficacité de la lyse des cellules dans les gouttelettes, malgré l'ajout de l'étape thermique dans le protocole ddPCR. Des expériences complémentaires, telles que la réalisation d'un choc thermique plus fort par ajout d'un cycle initial à basse température en amont du cycle de 10 minutes à 95 °C, sont en cours pour permettre une meilleure lyse des cellules de *Nv*H dans ces conditions.

Ces résultats sont très encourageants, en effet l'analyse sur cellules entières présente l'avantage de réduire le coût expérimental en supprimant l'étape d'extraction d'ADN, tout en permettant une quantification rapide et absolue du nombre de copies de gènes dans un échantillon.

8. Conclusion

L'objectif fixé était de développer une approche de ddPCR et de valider cette méthode en quantifiant les bactéries présentes dans un consortium synthétique. Cela était important car aucune méthode jusqu'alors n'avait réussi à dénombrer les individus au sein d'une communauté mixte telle que *C. acetobutylicum* et *Nv*H.

Une stratégie de quantification du nombre de copies de génome par ddPCR a été développée dans le cadre de ce projet, permettant de valider son efficacité sur un consortium bactérien. Ces résultats ont mis en évidence l'importance de sélectionner des couples d'amorces par une approche bio-informatique en amont de l'expérience. De plus, des tests de contrôle de la spécificité ont été réalisés par PCR, qPCR et ddPCR afin de confirmer l'absence d'amplicons non spécifiques susceptibles de biaiser la quantification. Des gammes de détection ont également été établies par dilution en série d'ADN, permettant de détecter une copie de gène par microlitre, que ce soit dans des échantillons indépendants ou mixtes, sans introduire de biais dans la quantification. Toutefois, dans le cas d'échantillons ne contenant qu'une faible quantité de cellules ou d'ADN, la réalisation de réplicas supplémentaire est nécessaire pour augmenter la précision ainsi que la confiance statistique des résultats.

Le nombre de copies de plasmides a également été étudié au cours de ce projet, et des ratios de nombre de copies de plasmide/nombre de copies de génome de 0,5 et 1,6 ont été observés pour respectivement *Nv*H et *C. acetobutylicum*. Couplée à l'analyse des échantillons par ddPCR sur cellules entières, cette étude a montré que *C. acetobutylicum* possède une copie

de génome pour 1,5 copies du plasmide pSOL1 par cellule, validant la présence d'une à deux copies de plasmide par cellule, probablement réparties de manière hétérogène au sein de la population. Pour *Nv*H, le ratio de 1 copie de génome pour 0,5 copie de plasmide semble indiquer l'absence de plasmide dans 50 % des cellules de *Nv*H, des expériences complémentaires sont en cours pour confirmer ces résultats. Les plasmides peuvent, comme c'est le cas dans les modèles étudiés, porter des gènes codant des protéines ayant un rôle clef dans la physiologie (métabolisme, adaptation…) de la bactérie, il est donc non seulement important de les détecter mais aussi de les quantifier ne serait-ce que pour mieux appréhender la problématique de l'hétérogénéité au sein d'une population dite "culture pure" ou l'impact d'une population sur l'autre dans le cas d'un consortium.

La mise en place d'un protocole permettant l'extraction de bactéries à Gram positif et à Gram négatif à différentes concentrations cellulaires couplée à la quantification par ddPCR a permis de déterminer le nombre de copies de génomes en présence ou en absence du partenaire bactérien. On a démontré que la présence d'une autre espèce de bactérie n'induisait pas de différence significative dans la quantification de l'espèce cible. De plus, la quantification par ddPCR a été réalisée sur des cultures bactériennes représentatives des concentrations cellulaires utilisées lors de l'inoculation des bactéries en consortium (DO_{600nm} 0,1 pour un ratio *Nv*H 1:1 *C. acetobutylicum*), ainsi que des conditions représentatives d'une prédominance de *C. acetobutylicum* au sein du consortium avec une concentration cellulaire de *Nv*H variable (DO_{600nm} : 0,2 ; 0,1 ; 0,01 ; 0,001) et une concentration de *C. acetobutylicum* majoritaire (DO_{600nm} : 1). La présence de *Nv*H même lorsque sa concentration était 10^5 fois inférieure à celle de *C. acetobutylicum* a été mise en évidence, soulignant ainsi la sensibilité de l'approche.

Ces différents résultats mettent en avant le fort potentiel de la ddPCR pour la détermination simple et rapide de 1) la présence d'organismes spécifiques au sein d'un consortium synthétique ; 2) la détermination du ratio copies de plasmide/copies de génome ; 3) l'analyse de l'évolution d'une population au sein d'un échantillon mixte. Comme dans toutes expériences, la notion statistique est extrêmement importante et donc il y a nécessité à ce que les expériences soient réalisées plusieurs fois avec des réplicas biologiques et techniques

III. Analyses transcriptomiques par RNA-seq du consortium bactérien *C. acetobutylicum* et *Nv*H en vue d'étudier l'impact des interactions inter-espèces sur la physiologie des bactéries

Dans les parties précédentes, nous avons identifié et étudié la réponse de *Nv*H à la molécule de communication AI-2, impliquée dans l'établissement de l'interaction avec *C. acetobutylicum* au sein du consortium. Nous avons ainsi caractérisé la protéine responsable de la phosphorylation de l'AI-2, ainsi que celle impliquée dans la régulation de l'opéron en réponse au signal AI-2 phosphorylé. Nos travaux ont également permis d'identifier plusieurs gènes régulés par le signal AI-2 chez *Nv*H. Cependant, l'ensemble de ce travail a été réalisé en l'absence de *C. acetobutylicum* qui est un acteur majeur dans la communication de *Nv*H. Afin de comprendre, à l'échelle moléculaire, comment l'interaction entre *Nv*H et *C. acetobutylicum* permet de mettre en place un couplage énergétique à travers un système de communication de type AI-2, nous avons étudié la réponse de *Nv*H en présence de *C. acetobutylicum* et, inversement, celle de *C. acetobutylicum* en présence de *Nv*H. Pour cela, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par séquençage NGS à partir de consortia de *C. acetobutylicum* et *Nv*H.

Cette étude menée par transcriptomique a nécessité de développer en amont un protocole sur l'évolution des quantités relatives de ces deux bactéries par ddPCR (décrit dans Résultats, partie 2) mais aussi de standardisation des consortia.

En effet, la mise en place du consortium requière de mixer deux espèces bactériennes. Toutes modifications dans l'état initial des bactéries, comme dans les conditions abiotiques initiales vont impacter cette mise en place et potentiellement engendrer des différences dans la dynamique d'interaction d'une expérience à l'autre. Ainsi, nous avons d'abord mené des expériences pour optimiser et standardiser les conditions de culture, afin d'identifier les facteurs influençant l'établissement de l'interaction écologique entre les deux bactéries.

1. Standardisation des conditions de croissance en vue d'une étude métatranscriptomique

Les travaux effectués au laboratoire avant mon arrivée, ainsi que de nombreuses études publiées, soulignent l'importance des conditions initiales pour l'établissement d'un comportement spécifique. Par exemple, en 2021, Chun-Hui Gao *et al*. ont mis en évidence la complexité de la caractérisation des conditions d'étude des interactions au sein de consortia bactériens. Leur étude montre que l'utilisation d'inocula avec différents ratios de bactéries modifie de manière significative les interactions écologiques observées. Ces travaux illustrent également une vision encore trop réductrice des interactions microbiennes, souvent interprétées comme des propriétés intrinsèques des espèces, avec la disponibilité des ressources perçue comme le principal facteur déterminant les interactions positives ou négatives (Gao *et al.*, 2021). L'étude de Marie Vasse *et al*. de 2024 met en avant l'impact de la température sur la mise en

place des interactions au sein d'un consortium bactérien composé de *Pseudomonas fluorescens* et de *Myxococcus xanthus*. Ainsi, en fonction de la température de croissance des précultures, les bactéries échangeront leur rôle de proie et de prédateur (Vasse *et al.*, 2024).

La mise en place d'expériences de RNA-seq visant à décrypter l'impact et les conséquences des interactions au niveau moléculaire requière donc de maîtriser au maximum les conditions initiales du consortium. Nous avons donc commencé par optimiser la mise en place du consortium et étudier l'impact de plusieurs paramètres sur son établissement. Ainsi, la durée de mise en contact entre les deux bactéries, l'état métabolique de l'inoculum utilisé (en phase exponentielle ou stationnaire) et l'ajout d'un stress thermique supplémentaire ont été évalués.

A. Impact du choix des inocula

Le premier paramètre que nous avons étudié est l'impact de l'état physiologique des cellules (en phase exponentielle ou stationnaire) dans les inocula de départ sur l'établissement du consortium, et notamment sur l'écart de croissance observé entre le consortium et les bactéries cultivées individuellement.

Pour cela, afin de former les consortia, deux inocula distincts ont été préparés, l'un contenant des cellules en phase exponentielle et l'autre des cellules en phase stationnaire. Les inocula de cellules en phase exponentielle proviennent de précultures de *C. acetobutylicum* (DO 1,2) et de *Nv*H (DO 0,8), cultivées dans leur milieu riche respectif. Par la suite, les cellules ont été lavées deux fois avant d'être utilisées pour inoculer à DO_{600nm} de 0,1 et un ratio de 1:1 le milieu de consortium SLY. Les inocula de cellules en phase stationnaire ont été préparés de manière similaire exceptée leur récolte en phase stationnaire. Les consortia ont ensuite été cultivés à 37 °C et la croissance cellulaire, ainsi que les flux métaboliques ont été mesurés à différents temps (figure 64).

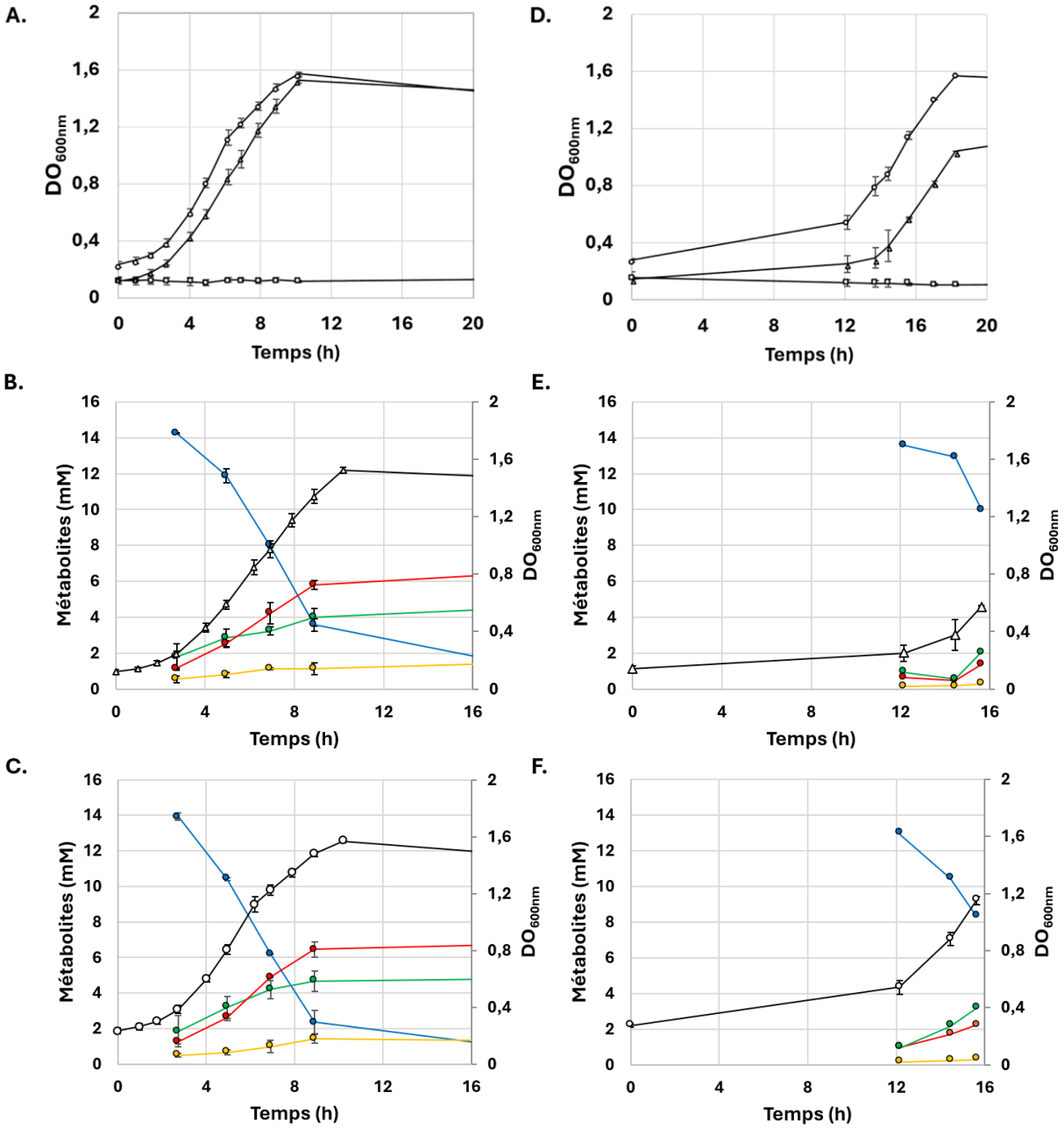


Figure 64 : Impact de l'état métabolique des cellules de l'inoculum sur les performances de l'écosystème. Des cellules en phase exponentielle de croissance (A, B et C) ou stationnaire (D, E, F) ont été utilisées pour l'inoculation des consortia. La croissance (A et D) de *C. acetobutylicum* (triangle) et *Nv*H (carré) en cultures pures et en consortium (rond) a été suivie par mesure de la DO_{600nm}. En parallèle de la mesure de la DO_{600nm} (en noir) les flux métaboliques (B, C, E et F) incluant la consommation du glucose (bleu) et la formation des produits de fermentation tels que le lactate (en orange), acétate (en rouge) et le butyrate (en vert) ont été déterminés par HPLC à partir de surnageants de culture clarifiés. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (SD) calculés à partir des données expérimentales (n =2).

Comme on peut le voir sur la figure 64, les cinétiques de croissance du consortium varient selon l'état physiologique des inocula. Ainsi, lorsque des cellules en phase exponentielle de croissance sont utilisées pour inoculer la co-culture, l'initiation de la croissance cellulaire est

rapide puisqu'aucune phase de latence n'a été observée (figure 64 (A)). En revanche, lorsque les cellules sont issues d'une culture en phase stationnaire, on observe une phase de latence d'environ 10 heures. Cette différence pourrait s'expliquer par la différence d'état métabolique entre les deux phases ou encore par une différence en quantité de cellules viables et donc par un temps d'adaptation plus long dans le cas de cellules issues de la phase stationnaire. Toutefois, un effet synergique sur la croissance est observé dans les deux conditions avec une augmentation de taux de croissance de 0,236 h^{-1} à 0,291 h^{-1} (cellules issues de la phase exponentielle) et de 0.207 h^{-1} à 0.267 h^{-1} (cellules issues de la phase stationnaire), bien que la DO_{600nm} soit plus élevée au cours de la phase exponentielle quand les inocula sont préparés à partir de cellules en phase stationnaire (figure 64 (D)).

Parallèlement à la mesure de la densité optique, nous avons également étudié, par chromatographie liquide à haute performance, l'impact de l'inoculum sur les métabolites produits (voir Matériels et méthodes). Comme l'illustre la figure 64 (B, C, E et F), des différences peuvent être observées en fonction de l'état physiologique initial des bactéries. Cette variation se reflète dans la cinétique de production/consommation (ou flux) des métabolites présents dans les surnageants de culture. Les profils métaboliques obtenus à partir de la culture pure de *C. acetobutylicum* et du consortium lorsque l'inoculum est constitué de cellules en phase exponentielle (figures 64 (B) et (C)) sont similaires. Néanmoins, en présence de *Nv*H, la cinétique de consommation du glucose est plus élevée. Cette accélération de la consommation du glucose se traduit également par une augmentation des cinétiques de production du butyrate et de l'acétate, tandis que le flux lactate semble peu affecté. Dans le cas du consortium issu d'un inoculum en phase stationnaire (figures 64 (E) et (F)), l'augmentation synergique de la croissance cellulaire est concomitante à une modification importante des cinétiques des flux métaboliques suggérant une augmentation de la capacité métabolique de la co-culture. Comme *NvH* ne produit pas de butyrate, ce métabolite peut servir de marqueur du métabolisme de *C. acetobutylicum*. Ainsi, le ratio butyrate produit/glucose consommé a été mesuré dans les deux conditions de culture pure à une densité optique de 0,6. Fait intéressant, ce ratio reste similaire entre la culture pure (0,155) et le consortium (0,162) avec un inoculum en phase exponentielle, tandis qu'il varie considérablement entre la culture pure (0,146) et le consortium (0,223) lorsque l'inoculum provient d'une phase stationnaire. Ainsi, ces résultats soulignent que la phase initiale de l'inoculum ne modifie pas les voies métaboliques car seuls les ratios changent, les composés détectés restent les mêmes, en revanche la modification du ratio butyrate/glucose suggère une réorientation des flux métaboliques par *C. acetobutylicum* vers le butyrate au détriment du lactate en réponse à la présence du consortium. En conclusion, l'utilisation de cellules en phase

stationnaire favorise un effet synergique sur la croissance et l'activité métabolique du consortium. L'état métabolique et/ou le nombre de cellules viables lors de l'initiation du consortium jouent donc un rôle important sur le comportement de la co-culture.

B. Test de restauration du profil de type synergie à partir d'inocula issus de la phase exponentielle

Les expériences précédentes ont permis de montrer que de constituer un consortium avec des bactéries en phase stationnaire favorise l'établissement d'une interaction synergique entre ces deux espèces bactériennes. Ces résultats soulèvent la question des facteurs influençant la croissance et le métabolisme du consortium. Notamment, les expériences précédentes ont révélé la présence d'une phase de latence avant initiation de la croissance de la co-culture. Afin de déterminer si cette phase de latence favoriserait l'établissement de l'interaction entre les deux bactéries, une expérience a été menée afin de mimer un contact prolongé (qui se mettrait en place lors de la phase de latence) entre les deux bactéries partenaires à partir de cultures récoltées en phase exponentielle de croissance. Pour se faire, les bactéries récoltées en phase exponentielle de croissance ont été inoculées dans le milieu SLY, et la culture est incubée pendant 15 heures à 23 °C puis transférée à 37 °C. L'objectif est de favoriser le temps de contact au détriment de la croissance cellulaire (figure 65).

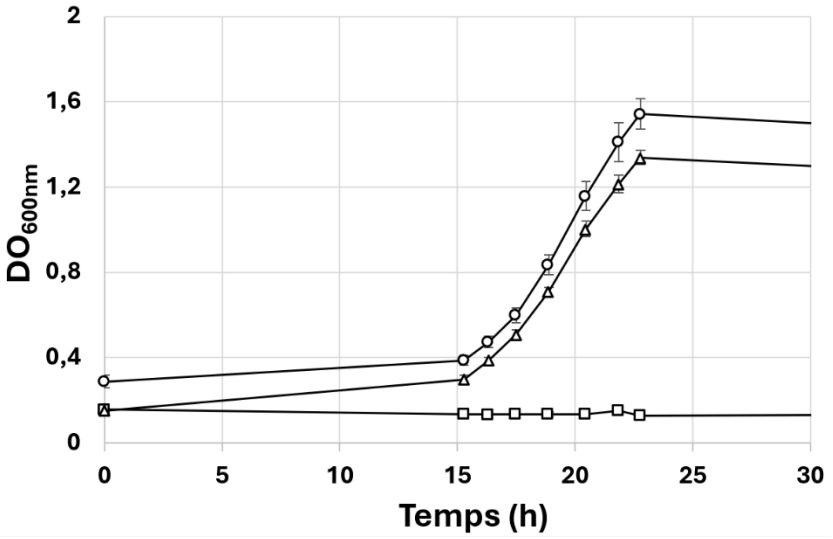


Figure 65 : Impact d'un contact prolongé entre *C. acetobutylicum* et *Nv*H sur la croissance de la co-culture. La croissance de *C. acetobutylicum* (triangle), *Nv*H (carré) et le consortium (rond) a été suivie à DO_{600nm} après une incubation de 15 heures à 23 °C. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (SD) calculés à partir des données expérimentales (n=2).

Les courbes de croissance obtenues sont présentées dans la figure 65. On observe que les profils de croissance sont similaires (taux de croissance de 0,221 h^{-1} et 0,222 h^{-1} pour *C.*

acetobutylicum et le consortium, respectivement) à ceux obtenus pour *C. acetobutylicum* à partir d'inocula en phase exponentielle, la seule différence étant la présence d'une phase de latence. De plus, aucun effet synergique n'est observé sur la densité optique entre les cultures pures et le consortium. Ce résultat suggère que dans ces conditions, le contact prolongé des deux bactéries pendant la phase de latence, n'est pas seul responsable du phénotype observé sur la croissance (figure 64 (D)) et que d'autres facteurs jouent probablement un rôle important.

Comme exposé au début de cette partie, le ratio cellulaire utilisé lors de l'inoculation de consortia peut aussi grandement impacter l'établissement des interactions entres les organismes. Afin d'évaluer cet effet, une concentration initiale plus faible de cellules *C. acetobutylicum* en phase exponentielle a été utilisée pour obtenir un ratio de *C. acetobutylicum: NvH de* 1:10 (figure 66).

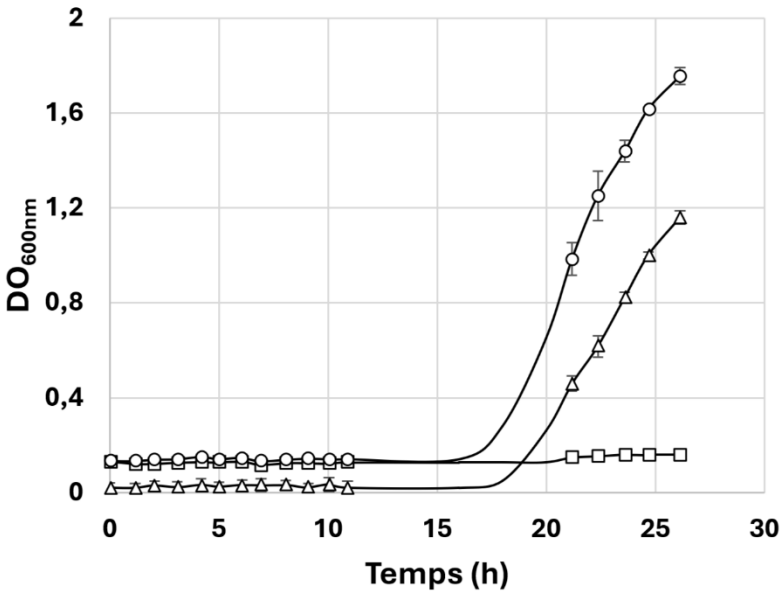


Figure 66 : Impact du ratio *C. acetobutylicum*:*Nv*H sur la croissance cellulaire du consortium. La croissance de *C. acetobutylicum* inoculée (DO_{600nm} = 0,01 (triangle), de *Nv*H à DO_{600nm} = 0,1 (carré), et du consortium à un ratio DO_{600nm} de 0,01:0,1 (rond) a été suivie par mesure de la DO_{600nm}. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (SD) calculés à partir des données expérimentales (n=1).

Ainsi, bien que les cellules utilisées aient été collectées en phase exponentielle de croissance, le profil observé est similaire à celui obtenu précédemment pour des cellules en phase stationnaire à un ratio de *C. acetobutylicum*:*Nv*H de 1:1 avec cette fois un taux de croissance estimé de 0,222 h^{-1} et 0,276 h^{-1} pour *C. acetobutylicum* en culture pure et consortium, respectivement. Ce profil était caractérisé par une phase de latence avant initiation de la croissance ainsi qu'un effet synergique marqué entre la culture pure de *C. acetobutylicum* et le

consortium. Ainsi, la diminution du nombre de cellules de *C. acetobutylicum* en phase exponentielle de croissance permet de mimer le phénotype obtenu avec des cellules en phase stationnaire. Cette expérience suggère que la différence phénotypique observée selon la phase de croissance de l'inocula est en partie au moins associée au nombre de cellules viables utilisées pour l'inocula. Il serait intéressant de réaliser des tests de viabilité cellulaire sur les inocula en phase stationnaire ainsi que différents inocula avec un nombre de cellules viables déterminé pour vérifier cette hypothèse. Il est toutefois fort probable que la notion de quantité ne soit pas le seul élément, compte tenu de la différence d'état physiologique des bactéries au sein des ces deux phases de croissance.

Un autre facteur pouvant impacter la mise en place d'une interaction au sein d'un consortium est la température. La prolongation de l'incubation après inoculation à 21 °C n'a pas montré d'impact sur la croissance cellulaire en consortium. Ainsi un test de stress thermique, venant s'additionner au stress nutritionnel a été réalisé. Pour cela un choc thermique de 3 heures à 4 °C sur les précultures avant inoculation a été réalisé (figure 67).

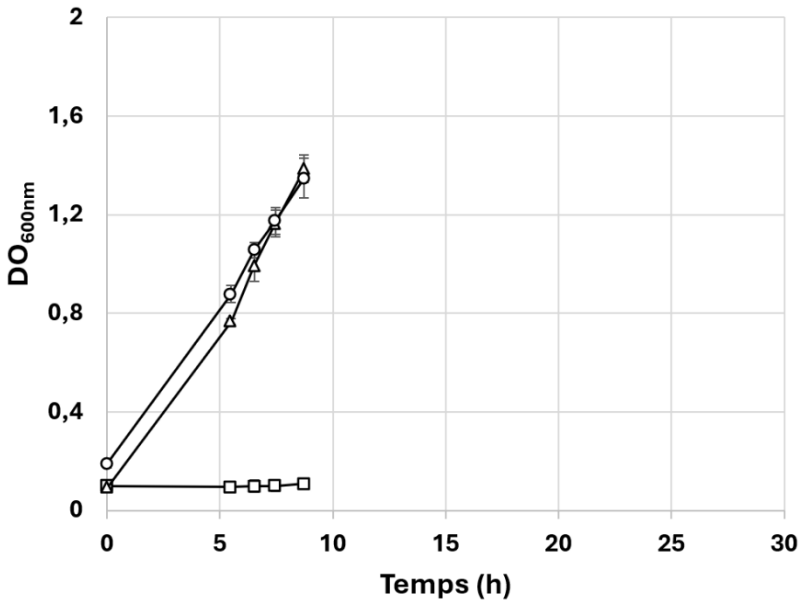


Figure 67 : Impact d'un stress thermique sur la croissance du consortium. Les cellules de *C. acetobutylicum* et *Nv*H ont été incubées à 4 °C pendant 3 heures avant d'inoculer une culture de *C. acetobutylicum*(triangle), *Nv*H (carré) ou de consortium (rond). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (SD) calculés à partir des données expérimentales (n=1).

Aucune différence n'a pu être observée dans ces conditions. Non seulement le stress thermique ne restaure pas le phénotype obtenu avec les cellules en phase stationnaire, mais cette expérience réfute l'hypothèse que n'importe quel stress pourrait induire le comportement observé. D'autres expériences telles que la comparaison entre une culture mise sous agitation

ou non, avec ou sans accumulation de gaz, ou encore avec l'ajout d'une lame permettant la fixation des bactéries ont été réalisées sans montrer de différences significatives.

L'ensemble de ces tests nous a donc permis de définir les conditions standardisées de culture pour réaliser les expériences de transcriptomique. Ainsi, les conditions de cultures choisies sont l'utilisation de précultures en phase stationnaire, lavées deux fois dans du milieux SLY sans glucose, puis inoculées à une DO_{600nm} de 0,1 dans le milieu de consortium (SLY) avant d'être cultivées à 37 °C (Matériels et méthodes).

2. Analyse transcriptomique du consortium bactérien par séquençage nouvelle génération (NGS)

Afin d'approfondir notre compréhension des mécanismes moléculaires mis en place au sein du consortium bactérien *Nv*H / *C. acetobutylicum*, une analyse transcriptomique a été réalisée. Cette approche métatranscriptomique a pour objectif d'identifier les gènes différentiellement exprimés chez *Nv*H en présence et en absence de *C. acetobutylicum*, et inversement pour *C. acetobutylicum*. Pour cela, les étapes d'optimisations précédentes ont été indispensables pour établir les conditions les plus propices à la visualisation de la mise en place des mécanismes d'interaction entre les deux bactéries. Pour étudier le consortium, deux temps ont été choisis. Le premier prélèvement a été réalisé à 5 heures après inoculation, ce qui correspond à la phase de latence des cellules. Ce point a été choisi afin d'observer le processus d'adaptation aux nouvelles conditions de culture et limiter un potentiel biais lié à la croissance des bactéries en milieu riche ainsi qu'aux étapes de lavage et d'inoculation qui n'auraient alors donné que pas ou peu d'informations. Le deuxième temps choisi pour cette étude est celui à environ 15 heures correspondant à une DO_{600nm} de la culture en consortium de 1. Cette condition expérimentale correspond au moment où l'écart de DO est maximal entre la somme des DO des cultures pures et celle du consortium, tout en restant dans la phase de croissance exponentielle. Comme préciser dans la partie Matériels et méthodes à minima 3 réplicats biologiques et 3 réplicats techniques ont été réalisés pour chacun des échantillons analysés.

Dans les deux conditions, les cellules ont été collectées, puis les ARN extraits et purifiés selon la méthode décrite dans la section Matériels et méthodes. Le séquençage NGS a été réalisé par l'entreprise Genewiz avec une profondeur de 100X de séquences pour les échantillons en culture pure et une profondeur de 300X pour les échantillons en consortium, afin d'assurer une profondeur de séquençage suffisante pour détecter les transcrits de *Nv*H qui sont minoritaires en consortium. Les données ont été traitées comme décrit dans Matériels et méthodes. Brièvement, les données ont été analysées de la même manière que pour l'analyse du

séquençage NGS de *Nv*H en présence d'AI-2, mais le choix a été fait d'analyser les gènes exprimés différentiellement de plus d'un "fold change" de 3 afin dans un premier temps de cibler les gènes les plus fortement régulés. Les données ayant été reçues tardivement ou cours de la thèse, nous nous sommes concentrés sur l'analyse du temps à 15 heures.

Comme le montre la figure 68, les résultats obtenus révèlent une modification significative du transcriptome de *Nv*H et de *C. acetobutylicum* en consortium en comparaison à celui des cultures pures. En effet, avec un seuil de différence d'expression (FoldChange) fixé à 3, *C. acetobutylicum* présente une variation d'expression pour 454 gènes dont 263 gènes présentent une régulation négative et 191 une régulation positive (Annexe 6). Pour *Nv*H, 855 gènes apparaissent comme régulés dont 559 négativement et 296 positivement (figure 68) (Annexe 7).

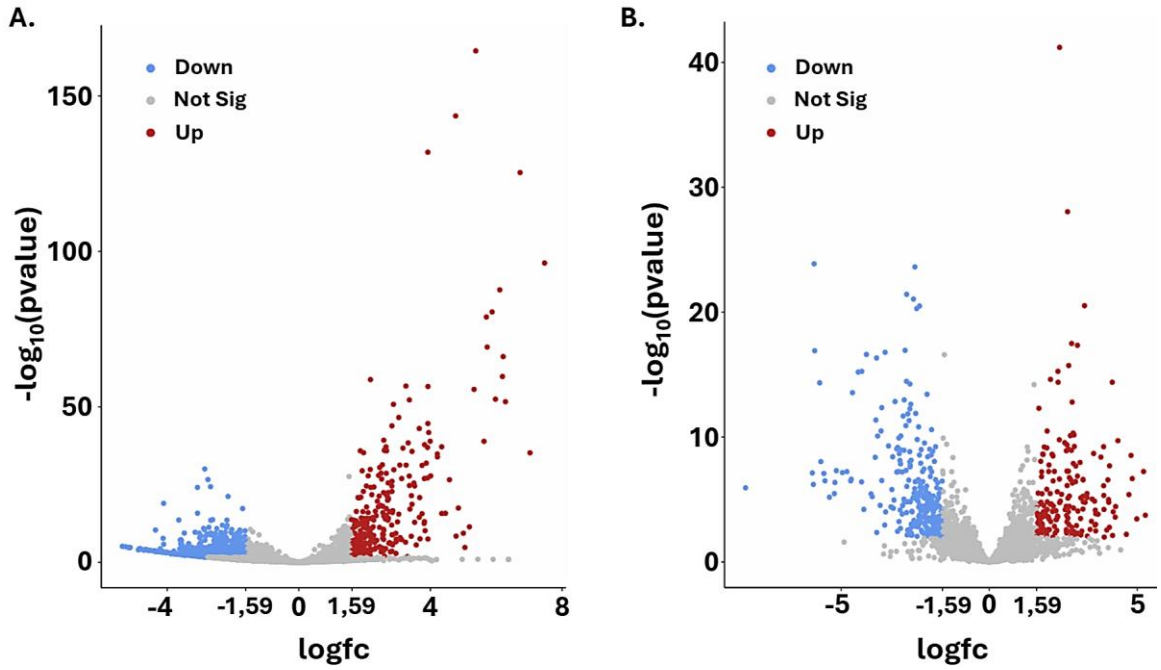


Figure 68 : Analyse des variations d'expression génique représentées sous forme de volcano plot. Chaque point représente un gène. L'axe des abscisses (logfc) indique le log2 du ratio de changement d'expression (log2 fold change) et l'axe des ordonnées (-log10$^{(pvalue)}$) représentant le niveau de significativité statistique (p-value ajustée) de chaque gène de *Nv*H (A) et de *C. acetobutylicum* (B). Les gènes en rouge sont significativement surexprimés ("Up"), tandis que les gènes en bleu sont significativement sous-exprimés ("Down"). Les gènes en gris présentant une différence d'expression inférieur à 3 (logFC compris entre -1,59 et 1,59) et/ou présentant une différence non significative (pvalue ajustée > 0,05) ne montrent pas de variation d'expression significative ("Not Sig"). Les points plus éloignés de l'origine (0 sur l'axe des abscisses) indiquent des gènes avec les changements d'expression plus prononcés et/ou des valeurs p plus significatives.

Ces résultats indiquent un impact fort et réciproque de chaque espèce sur son partenaire, entrainant la régulation de nombreux gènes. Afin de pouvoir isoler des éléments clés régulés, une étude plus restrictive a été initiée avec cette fois un seuil minimum de différence d'expression génique de 10 (Foldchange). De plus, pour exclure les séquences faiblement exprimées qui pourraient fausser les résultats après normalisation, un seuil minimum de 50 a été défini pour la valeur du "baseMean". Ce dernier correspond à la moyenne des séquences comptées et normalisées pour chaque gène sur l'ensemble des échantillons. Ces critères plus stricts ont permis de réduire le jeu de données à 83 gènes très fortement impactés chez *Nv*H et 52 chez *C. acetobutylicum*.

A. Analyse différentielle de l'expression des gènes de *Nv*H

Pour mieux comprendre les mécanismes influencés par la présence de *C. acetobutylicum* sur *NvH*, les gènes différentiellement exprimés entre la co-culture et la culture pure de *Nv*H ont été classés selon leurs catégories COG (Clusters of Orthologous Groups). Cette approche permet de faire ressortir la fonction putative des produits des gènes différentiellement exprimés révélant ainsi de potentiels processus cellulaires activés ou non (figure 69).

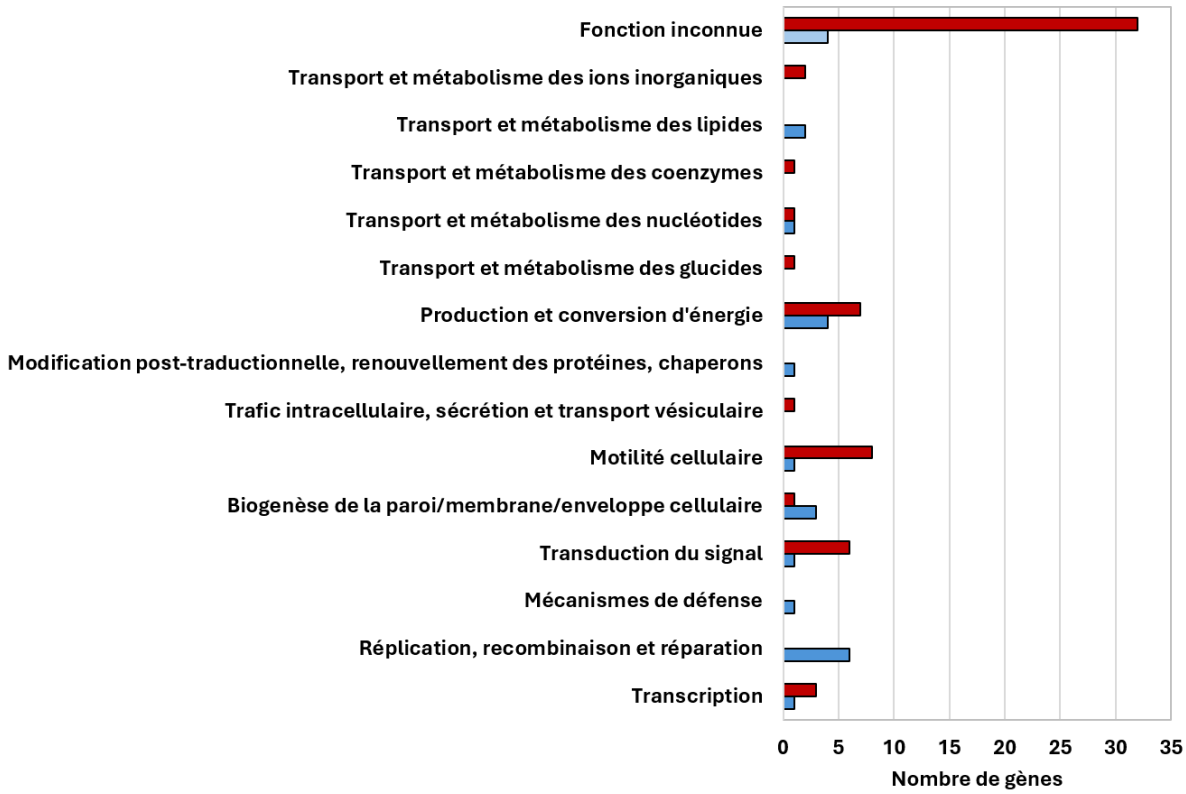


Figure 69 : Répartition fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés en fonction des catégories COG chez *Nv*H. L'axe vertical liste les catégories fonctionnelles. L'axe horizontal représente le nombre de gènes exprimés dans chacune des catégories fonctionnelles. Les barres rouges indiquent les gènes surexprimés, tandis que les barres bleues représentent les gènes sous-exprimés.

La catégorie “Fonction inconnue” présente le plus grand nombre de gènes différentiellement exprimés avec 36 gènes sur 83 tandis que 47 des 83 gènes sont classés dans une des 25 catégories COG attitrées à une fonction connue (Annexe 4). Parmi les 25 catégories de COG de la base de données UniProt, 15 catégories ont été identifiées. Les gènes associés aux COG tels que “Production et conversion d’énergie”, “Motilité cellulaire”, “Transduction du signal” et “Réplication, recombinaison et réparation” sont ceux qui sont les plus fortement impactés en présence de *C. acetobutylicum*.

Pour la suite de l’analyse je me suis donc concentré sur les gènes, différentiellement exprimé de plus d’un facteur 3 (log(fold change) > 1,59), appartenant aux catégories “Motilité cellulaire” et “Production et conversion d’énergie”, qui ont montré ici le plus grand nombre de gènes impactés 9 sur 47 et 11 sur 47, respectivement.

Dans la catégorie “Motilité cellulaire” (N), la majorité des gènes de *Nv*H impactés en présence de *C. acetobutylicum* sont associés aux systèmes flagellaires de ce dernier (tableau 12).

Tableau 12 : Gènes chez *Nv*H différentiellement exprimés en présence de *C. acetobutylicum* et impliqués dans la motilité de *Nv*H.

Gène	COG	Protéine	logFC	P value ajust
DVU_3155	NT	bacteriohemerythrin (DcrH)	-5,17	1,18E-04
DVU_0592	NT	chemotaxis protein (CheW)	-3,30	8,96E-03
DVU_1961	NT	chemotaxis protein (CheW)	-2,99	3,69E-02
DVU_3255	N	CopG family transcriptional regulator	-2,82	3,92E-02
DVU_0639	N	OmpA family protein	-2,58	3,70E-02
DVU_0440	NT	UPF0597 protein DVU_0440	-2,53	6,92E-04
DVU_0591	NT	methyl-accepting chemotaxis protein	-2,52	2,11E-04
DVU_3227	N	flagellar basal body-associated (FliL family protein)	-2,38	1,83E-02
DVU_2608	N	flagellar motor stator protein (MotA)	-2,09	1,48E-03
DVU_1273	U	type IV pilus secretin (PilQ)	-2,08	2,48E-03
DVU_0240	S	PilZ domain-containing protein (PilZ)	-2,08	5,66E-05
DVU_1596	NT	chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	-1,82	1,84E-04
DVU_0519	N	flagellar hook-associated protein (FlgK)	1,63	4,19E-10
DVU_0608	NT	methyl-accepting chemotaxis protein	1,70	3,87E-11
DVU_0512	N	flagellar basal-body rod protein (FlgF)	1,88	1,14E-05
DVU_1445	N	flagellar hook-length control protein (FliK)	1,91	5,20E-06
DVU_0513	N	flagellar basal-body rod protein (FlgG)	1,97	6,94E-11
DVU_1443	N	flagellar hook protein (FlgE)	1,99	1,64E-04
DVU_0314	N	flagellar hook-basal body complex protein (FliE)	1,99	2,24E-05
DVU_1262	NU	type IV pilus twitching motility protein (PilT)	2,28	2,97E-08
DVU_0863	N	flagellar filament capping protein (FliD)	2,54	2,99E-30
DVU_0183	NT	methyl-accepting chemotaxis protein	2,55	1,19E-08
DVU_0044	N	flagellar type III secretion system pore protein (FliP)	2,70	3,78E-19
DVU_0572	S	PilZ domain-containing protein (PilZ)	2,72	1,70E-13
DVU_1444	N	flagellar hook assembly protein (FlgD)	2,76	1,37E-15
DVU_0224	N	type II toxin-antitoxin system HicB family antitoxin (HicB-like)	2,83	1,83E-08
DVU_0518	S	flagellar protein (FlgN)	2,85	2,63E-15
DVUA0029	N	PilZ domain-containing protein	3,06	3,57E-07
DVU_1441	N	flagellin	3,36	9,60E-27
DVU_2444	N	flagellin	3,38	2,24E-16
DVU_0316	N	flagellar basal body rod protein (FlgB)	3,52	1,18E-23
DVU_0043	N	flagellar biosynthesis protein (FliQ)	3,75	4,43E-30
DVU_1442	N	flagellar protein (FlaG)	3,81	6,29E-12
DVU_2893	N	flagellar basal body protein	3,84	1,11E-09
DVU_2082	N	flagellin	3,91	3,93E-26
DVU_3384	NPTU	periplasmic heavy metal sensor	7,03	4,49E-34

L'activation des gènes codant pour des protéines du flagelle est surprenante, car cela suggère une activation de la motilité de *Nv*H. Cependant, les gènes codant les protéines PilZ, et PilT qui sont elles impliquées dans le blocage du moteur flagellaire sont également surexprimées et le gène codant la protéine MotA impliquée dans la rotation du flagelle est réprimé. Les résultats précédemment obtenus par l'équipe montraient une interaction physique entre les deux bactéries mais nous n'avons pas d'information sur le fait que l'une des deux bactéries se déplacent ou pas vers l'autre. De plus, l'hypothèse que le flagelle puisse avoir une fonction autre que la motilité dans le contexte du consortium n'est pas à exclure. En effet, le flagelle a été décrit

chez de nombreuses bactéries comme jouant un rôle dans l'attachement à des supports biotiques ou abiotiques, et dans certains cas, dans le transfert d'énergie (Ding *et al.*, 2021).

De ce fait, ces résultats sont cohérents avec l'étude portant sur la caractérisation du biofilm chez *Nv*H par Melinda E. Clark *et al.* en 2007, qui met en avant le rôle de filaments protéiques, décrits comme étant possiblement des flagelles, dans la formation du biofilm chez *Nv*H (Clark *et al.*, 2007). La présence d'une régulation des gènes tels que *pilZ* codant la protéine PilZ pourrait permettre l'arrêt de la motilité en entravant la rotation du flagelle comme démontré chez *P. aeruginosa* par Amy E. Baker en 2016 (Baker *et al.*, 2016).

Par ailleurs, certaines études suggèrent que les flagelles pourraient également participer au transfert d'électrons en servant de structures conductrices ou en facilitant l'organisation des composants du biofilm. En effet, l'étude de Xing Liu *et al.* a montré que les flagelles pourraient jouer un rôle crucial non seulement dans l'adhésion initiale et la structuration du biofilm, mais aussi dans le transfert d'électrons en optimisant les interactions électrochimiques au sein des biofilms (Liu *et al.*, 2019).

Les 11 gènes présentant un changement d'expression (fold change) supérieur à 10 dans la catégorie "Production et conversion d'énergie" ont été analysés en détail. Afin d'obtenir une vue d'ensemble des voies potentiellement impactées, la stratégie a consisté, au-delà de cette sélection, à examiner également les gènes avec des variations d'expression plus faible, pour identifier si d'autres gènes de la même voie étaient affectés (tableau 13).

Tableau 13 : Gènes différentiellement exprimés impliqués dans la production et conversion d'énergie chez *Nv*H en présence de *C. acetobutylicum*.

Opéron	Gène	COG	Nom des protéines	Log2FC	Pvalue ajustée
Opéron 1	DVU_0429	C	Membrane-bound hydrogenase Ech complex, subunit F	-1,71	1,04E-04
	DVU_0430	C	Membrane-bound hydrogenase Ech complex, subunit E	-2,25	9,33E-08
	DVU_0431	C	Membrane-bound hydrogenase Ech complex, subunit D	-2,49	1,81E-06
	DVU_0432	C	Membrane-bound hydrogenase Ech complex, subunit C	-1,74	1,49E-04
	DVU_0433	C	Membrane-bound hydrogenase Ech complex, subunit B	-2,21	1,19E-07
	DVU_0693	C	Quinone reductase complex QrcDCBA, subunit C	-1,91	9,04E-06
Opéron 2	DVU_0847	C	Adenylyl sulfate reductase, AprAB complex,subunit A	-1,64	5,77E-08
	DVU_0848	C	Quinone oxidoreductase, QmoABC complex, subunit A	-1,84	1,74E-07
	DVU_0849	C	Quinone oxidoreductase, QmoABC complex, subunit B	-2,62	4,51E-13
	DVU_0850	C	Quinone oxidoreductase, QmoABC complex, subunit C	-2,05	1,34E-09
	DVU_0851	C	Quinone oxidoreductase, QmoABC complex ,hypothetical protein	-1,82	1,05E-06
Opéron 3	DVU_1286	C	Dissimilatory sulfite reductase, DsrMKJOP complex, subunit P	-2,01	1,52E-06
	DVU_1287	C	Dissimilatory sulfite reductase, DsrMKJOP complex, subunit O	-2,22	1,63E-06
	DVU_1289	C	Dissimilatory sulfite reductase, DsrMKJOP complex, subunit K	-2,86	6,06E-10
Opéron 4	DVU_1917	C	[NiFeSe]-hydrogenase Hys complex, subunit B	-1,60	1,24E-06
	DVU_1918	C	[NiFeSe]-hydrogenase Hys complex, subunit A	-1,90	9,60E-07
Opéron 5	DVU_2286	CP	Membrane-bound hydrogenase Coo complex, subunit M	5,38	9,76E-162
	DVU_2287	C	Membrane-bound hydrogenase Coo complex, subunit K	5,33	4,97E-54
	DVU_2288	C	Membrane-bound hydrogenase Coo complex, subunit L	5,63	1,39E-37
	DVU_2289	C	Membrane-bound hydrogenase Coo complex, subunit X	6,19	4,79E-58
	DVU_2290	C	Membrane-bound hydrogenase Coo complex, subunit U	5,70	4,95E-77
	DVU_2291	C	Membrane-bound hydrogenase Coo complex, subunit H	5,98	6,57E-51
	DVU_2293	C	Membrane-bound hydrogenase Coo complex, subunit F	3,67	5,05E-20
Opéron 6	DVU_3026	C	L-lactate permease	-1,80	1,24E-05
	DVU_3029	C	Phosphate acetyl transferase	-2,01	1,09E-06
	DVU_3030	F	Acetate kinase	-1,90	1,47E-05
	DVU_3033	C	L-lactate dehydrogenase subunit B	-3,02	6,05E-09

Cette analyse montre que les hydrogénases, enzymes clefs du métabolisme des BSR sont impactées. Le métabolisme de l'hydrogène chez *Nv*H fait intervenir un certain nombre d'hydrogénases qui diffèrent par leur composition en métal, leur localisation dans la cellule et leur rôle physiologique. Ainsi, ici les gènes codant pour les sous-unités du complexe membranaire Ech et l'hydrogénase périplasmique Hys sont régulés négativement en présence de *C. acetobutylicum,* tandis que les sous-unités du complexe membranaire Coo sont régulées positivement dans ces conditions. Les Ech hydrogénases généralement catalysent la réduction des protons à partir de ferrédoxines réduites comme donneur d'électrons. Ce complexe est relativement proche du complexe Coo-hydrogénase qui couple l'oxydation du CO en CO_2 à la réduction des protons en H_2. Il a été proposé que chez *Nv*H, les gènes codant pour Ech hydrogénases soient positivement régulés lorsque la bactérie utilise l'H_2 ou le pyruvate comme donneur d'électrons, alors que les gènes codant pour la Coo hydrogénase sont eux négativement régulés quand l'H_2 est donneur (Pereira *et al.*, 2008). En 2009, Walker et *al*. ont montré que la Coo hydrogénase était positivement régulée lorsque la bactérie *Nv*H est en syntrophie avec une

archée méthanogène. Des expériences de délétion ont permis de proposer que cette enzyme n'était en effet pas impliquée dans la respiration des sulfates mais semblait essentielle en fermentation pour produire de l'hydrogène à partir du lactate (Walker *et al.*, 2009). La Coo hydrogénase étant surexprimée dans nos conditions, on peut donc supposer qu'en syntrophie avec *C. acetobutylicum, Nv*H adopte un métabolisme fermentaire et contribue à la production d'H_2 dans l'écosystème. En effet, de précédentes études au laboratoire avaient pu mettre en évidence que la quantité d'H_2 produit en consortium est plus élevée qu'en culture pure (Benomar *et al.*, 2015). De plus, l'expression du complexe transmembranaire Qrc, impliqué dans le recyclage de l'H_2 chez les BSR lors de la respiration sulfate est également régulée négativement, appuyant l'hypothèse que *Nv*H adopte un métabolisme fermentaire en syntrophie avec *C. acetobutylicum*.

Notre analyse montre également que plusieurs gènes impliqués dans la réduction des sulfates chez *Nv*H sont également impactés. Ainsi, les gènes du complexe QmoABC et DsrMKJOP, donneurs d'électrons des réductases terminales AprAB et DsrABC, sont régulés négativement. Cette diminution d'expression est en accord avec l'absence de sulfate dans le milieu. Les gènes codant pour les protéines directement impliquées dans la réduction des sulfates (SulP, Sat, DsrABC) ne sont eux pas impactés de façon significative du moins dans les limites fixées par l'analyse.

Enfin, plusieurs gènes localisés dans l'opéron *luo* (*DVU_3025-3033*), qui code pour l'ensemble des acteurs impliqués dans l'oxydation du lactate sont également négativement régulés. De façon intéressante, des études ont montré que l'opéron *luo* qui code notamment pour une L-lactate déshydrogénase et une perméase représentée dans cette étude, est fortement exprimé chez la bactérie lors de la respiration lactate/sulfate, tandis que d'autres lactate déshydrogénases telles que la lactate déshydrogénase *DVU_0600*, seraient impliquées dans l'oxydation du lactate en fermentation (Vita *et al.*, 2015). Bien que l'expression de ces gènes ne varie pas significativement dans nos conditions, ce résultat appuie également nos précédentes observations et suggère un métabolisme fermentaire de la bactérie. La diminution de l'expression de ces gènes dans la co-culture suggère que le métabolisme énergétique associé à l'oxydation du lactate lors de la respiration sulfate n'est pas mis en jeu.

La majorité des gènes de *NvH* régulés par l'interaction avec *C. acetobutylicum* diffèrent de ceux observés lors de l'expérience de *NvH* en présence d'AI-2. Cette divergence s'explique par la nature des analyses. Dans l'expérience avec AI-2, nous étudions une phase très précoce (45 minutes) pour observer la réponse à un signal chimique, indépendamment de tout autre facteur.

En revanche, dans le consortium, les deux bactéries sont présentes, introduisant non seulement le signal chimique AI-2 mais aussi d'autres éléments comme des interactions physiques et des produits métaboliques, avec des prélèvements effectués après 15 heures de croissance

B. Analyse différentielle de l'expression des gènes de *C. acetobutylicum*

Dans le cadre de l'analyse de l'expression différentielle des gènes de *C. acetobutylicum* en culture pure et en consortium, l'objectif, comme pour *Nv*H, est d'identifier les mécanismes moléculaires spécifiques activés par *C. acetobutylicum* qui induisent un changement comportemental en présence de *Nv*H.

L'analyse différentielle d'expression des gènes entre le *C. acetobutylicum* en consortium et en culture pure a permis d'identifier comme décrit précédemment 454 gènes dont 263 régulés négativement et 191 régulés positivement. Ce résultat souligne un changement important de l'ensemble de la population de *C. acetobutylicum* en présence de *Nv*H. En première approche, avoir pu détecter un tel nombre de gènes régulés positivement ou négativement peut apparaitre surprenant. En effet, contrairement à *Nv*H, dont la croissance dépend de la présence de *C. acetobutylicum*, notre hypothèse initiale était que toutes les cellules de *C. acetobutylicum* n'étaient pas impactées par la présence de *Nv*H et que seules les *C. acetobutylicum* en contact direct avec *Nv*H ou ayant rencontrées *Nv*H montreraient une différence d'expression génique. Ceci soulève donc la question d'une hétérogénéité d'expression au sein de la population de *C. acetobutylicum* dans le consortium. Ainsi, il pourrait exister à minima deux sous-populations au sein de *C. acetobutylicum* : l'une présentant un transcriptome semblable à celui observé en culture pure et l'autre exprimant un profil spécifique d'interaction avec *Nv*H. Étant donné que seulement une fraction des cellules est en interaction avec *Nv*H dans l'extrait cellulaire total, l'effet de ces interactions pourrait être dilué, rendant l'observation d'effets significatifs plus difficile. L'identification d'un grand nombre de gènes impactés démontre que notre hypothèse d'un processus peu impactant à l'échelle de la communauté n'était pas pertinente. Ce premier résultat semble donc suggérer que même les bactéries n'ayant pas été en contact avec *Nv*H puissent voir l'expression de certains gènes impactées à partir du moment où une partie de la population a été en contact avec *Nv*H.

Comme pour *Nv*H, une première analyse de l'expression différentielle des gènes les plus impactés (foldchange > 10, baseMean > 50 et p value ajustée < 0.05) de *C. acetobutylicum* en présence ou en absence de *Nv*H a été réalisée par l'étude des variations d'expression au sein des différents groupes de COG (figure 70).

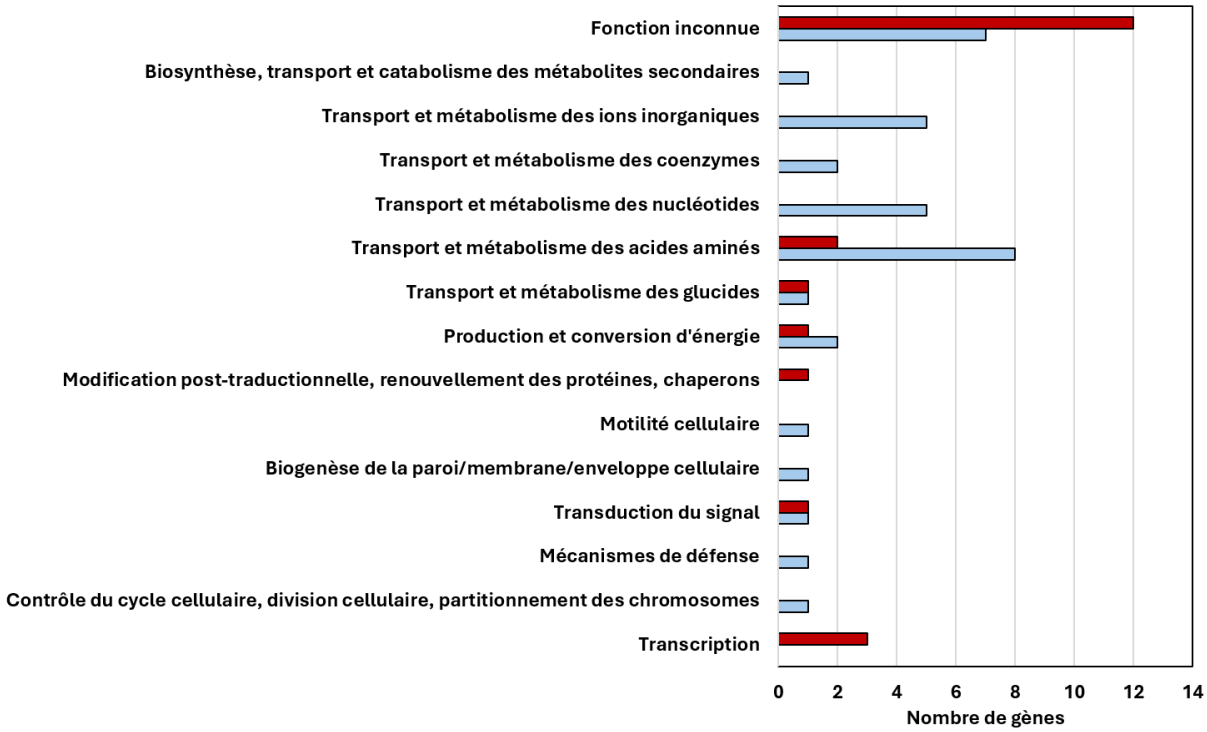


Figure 70 : Répartition fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés en fonction des catégories COG chez *C. acetobutylicum*. L'axe vertical liste les catégories fonctionnelles. L'axe horizontal représente le nombre de gènes exprimés dans chaque catégorie fonctionnelle. Les barres rouges indiquent les gènes surexprimés, tandis que les barres bleues représentent les gènes sous-exprimés. Cette distribution montre les fonctions biologiques affectées entre la condition consortium et culture pure.

L'analyse de la distribution du nombre de gènes selon leur fonction cellulaire (COG) révèle la présence de 19 gènes sur 52 gènes qui n'ont pas de fonction attribuée. Pour les 33 autres gènes, une régulation négative des gènes codant pour les protéines impliquées dans le transport et le métabolisme, notamment celui des acides aminés, les ions inorganiques et les nucléotides, est clairement observée (figure 70). L'annotation fonctionnelle des gènes de *C. acetobutylicum* est incomplète, de ce fait pour analyser les résultats, une fois un gène identifié comme étant régulé positivement ou négativement, nous avons recherché si ces gènes étaient localisé au sein d'opérons afin d'obtenir une vision plus large des voies/complexes potentiellement impliquées. Ainsi 11 unités transcriptionnelles contenant au moins deux des 52 gènes fortement impactés par la présence de *Nv*H ont pu être mises en évidence (tableau 14).

Tableau 14 : Gènes différentiellement exprimés en présence de *Nv*H retrouvés au sein d'unité transcriptionnelle chez *C. acetobutylicum*.

Opéron	Gène	COG	Nom des protéines	Log2FC	Pvalue ajustée
Opéron 1	CA_C0078	KOT	accessory gene regulator ArgB-like protein	4,15	6,36E-13
	CA_C0079	S	Cyclic lactone autoinducer peptide	4,35	1,33E-08
Opéron 2	CA_C0102	E	O-acetylhomoserine sulfhydrylase	-4,23	7,38E-04
	CA_C0103	F	Adenylyl-sulfate kinase (APS kinase)	-5,23	6,50E-05
	CA_C0104	C	Adenylylsulfate reductase, subunit A	-5,94	1,43E-05
	CA_C0105	C	Ferredoxin	-5,39	1,13E-04
	CA_C0106	P	ABC-type probable sulfate transporter, periplasmic binding protein	-5,97	2,17E-06
	CA_C0107	P	ABC-type sulfate transporter, ATPase component	-5,69	3,56E-07
	CA_C0108	P	ABC-type probable sulfate transporter, permease protein	-5,58	2,38E-06
	CA_C0109	EH	Sulfate adenylyltransferase subunit 2 (ATP-sulfurylase small subunit)	-5,55	8,16E-06
	CA_C0110	H	sulfate adenylyltransferase	-5,21	1,03E-05
Opéron 3	CA_C0208	S	Predicted membrane protein CF-20 family	-4,31	1,07E-13
	CA_C0209	S	Predicted membrane protein CF-20 family	-5,73	6,77E-13
Opéron 4	CA_C0929	Q	class I SAM-dependent methyltransferase	-4,62	3,72E-12
	CA_C0930	E	Cystathionine gamma-synthase (metB)	-5,91	1,73E-21
Opéron 5	CA_C1916	S	hypothetical protein	3,59	7,82E-03
	CA_C1917	S	hypothetical protein	3,87	7,49E-04
Opéron 6	CA_C1923	S	hypothetical protein	3,67	1,57E-03
	CA_C1929	S	hypothetical protein	3,87	8,73E-05
	CA_C1934	S	phage replisome organizer N-terminal domain-containing protein	3,48	1,51E-04
	CA_C1938	S	Predicted HD superfamily hydrolase	4,79	1,30E-07
	CA_C1939	S	hypothetical protein	3,58	8,36E-04
Opéron 7	CA_C2652	F	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	-4,31	9,37E-06
	CA_C2653	F	aspartate carbamoyltransferase regulatory subunit	-3,99	6,76E-05
	CA_C2654	F	Aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit	-4,96	2,05E-06
Opéron 8	CA_C3179	E	Oligopeptide ABC transporter, periplasmic binding component	-5,89	3,63E-15
	CA_C3180	P	Oligopeptide ABC transporter, permease component	-3,85	1,73E-07
	CA_C3181	EP	Oligopeptide ABC transporter, permease component	-3,63	7,81E-06
Opéron 9	CA_C3274	M	Possible surface protein, responsible for cell interaction contains cell adhesion domain and ChW-repeats (leucine-rich repeat domain-containing protein)	-4,42	1,16E-13
	CA_C3275	N	Possible surface protein, responsible for cell interaction contains cell adhesion domain and ChW-repeats (Ig-like domain-containing protein)	-3,83	4,09E-10
Opéron 10	CA_C3325	ET	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein	-4,81	1,79E-06
	CA_C3326	E	Amino acid ABC-type transporter, permease component	-4,66	6,58E-06
	CA_C3327	E	Amino acid ABC-type transporter, ATPase component	-4,68	8,16E-06
Opéron 11	CA_C3408	C	NADH oxidase (Two distinct flavin oxidoreductase domains)	3,53	9,88E-08
	CA_C3409	K	Transcriptional regulators, LysR family	3,86	3,59E-08

Cette analyse a permis d'identifier 11 opérons, dont 4 sont régulés positivement (opérons 1, 5, 6 et 11) et les 7 autres régulés négativement.

Parmi les gènes retrouvés au sein des opérons 3, 5 et 6 l'analyses des séquences protéiques correspondantes ne montrent pas d'annotation permettant l'interprétation de leur éventuelle fonction. Parmi les opérons régulés négativement, les opérons 8 et 10 contiennent des gènes codant pour des transporteurs ABC. Une analyse des séquences protéiques correspondantes montre que ces ABC transporteurs seraient associés pour l'un à l'import du

nickel et pour l'autre à celui de la cystine. Ce dernier est décrit chez d'autres bactéries comme important dans l'acquisition de composés soufrés (Zhou and Imlay, 2020; Haft and Gwadz, 2023).

L'opéron 9, est également régulé négativement. Il inclut des gènes codant pour des protéines de surface, potentiellement impliquées dans l'adhésion. L'opéron 11 (*CA_C3408-3409*), quant à lui, contient le gène *CA_C3409*, qui code pour un régulateur transcriptionnel de la famille des protéines LysR. Les régulateurs LysR jouent un rôle clé chez les bactéries, où ils interviennent dans la régulation de gènes liés à des fonctions telles que la virulence, le métabolisme, la motilité et le quorum sensing (Maddocks and Oyston, 2008).

Parmi les 11 unités transcriptionnelles identifiées comme montrant une modulation en présence de *Nv*H, quatre sont impliquées dans le métabolisme de *C. acetobutylicum*. Il s'agit des opérons 2, 4 et 7 (régulés négativement), ainsi que l'opéron 11 (régulé positivement). L'opéron 2 (*CA_C0102-0110*) est impliqué dans l'import du sulfate permettant son utilisation comme source de soufre et en lien avec l'opéron 4 (*CA_C0929-0930*), qui contient des gènes impliqués dans la transformation des S-adénosylméthionine (SAM). Sa régulation négative est à mettre en lien avec la régulation également négative d'un ABC transporteur identifié dans les bases de données comme impliqué dans le transport de la cystine. L'impact négatif sur la voie soufre pourtant indispensable dans la synthèse d'acides aminés soufrés, peut paraitre étonnant. Toutefois, lors de l'analyse de l'impact sur *Nv*H cette fois, nous avions pointé qu'étrangement alors qu'il n'y a pas de composé soufré dans le milieu, la voie cytoplasmique réduisant les composés soufrés n'est pas impactée. Ces résultats font échos à d'autres résultats obtenus récemment dans l'équipe *via* des approches de métaprotéomiques qui montrent le même phénomène ainsi qu'à des premiers résultats issus de modélisation du métabolisme suggérant un possible échange de molécules soufrées entre les deux bactéries.

Enfin, l'opéron 1, comprenant les gènes *CA_C0078* et *CA_C0079*, montre une régulation positive avec un facteur supérieur à 16 entre les conditions de consortium et de culture pure. Cet opéron, décrit dans l'introduction (Partie III, Modèle d'étude), est impliqué dans le quorum sensing (QS) de type AIP chez *C. acetobutylicum* (Steiner *et al.*, 2012). La différence d'expression observée indique un impact de *Nv*H sur le mécanisme de communication intra-espèce de *C. acetobutylicum*. Avant cette expérience, aucune donnée ne permettait de proposer un tel effet en cascade de l'interaction. Cette découverte apporte un éclairage nouveau sur notre constat initial concernant le nombre de gènes impactés par cette interaction. En effet, l'analyse transcriptomique a révélé la présence de nombreux gènes affectés, reflétant un comportement global coordonné de la population de *C. acetobutylicum*, contrairement à notre hypothèse

initiale de l'existence de deux profils distincts (les cellules en contact ou ayant été en contact avec *Nv*H, et celles n'ayant pas été en contact avec *Nv*H). Ce que cette variation suggère c'est que la partie de la population de *C. acetobutylicum* qui communique et interagit avec *Nv*H, impacte l'ensemble de la population de *C. acetobutylicum via* l'activation en cascade du système AIP. Nos résultats qui restent encore à décrypter plus avant ouvrent une nouvelle porte pour la compréhension de cette complexité.

3. Conclusion

Dans cette troisième partie, l'objectif a été de rechercher l'impact de l'interaction entre *C. acetobutylicum* et *Nv*H au niveau moléculaire. La stratégie choisie a été de réaliser une analyse transcriptomique de la co-culture à 2 temps de croissance et de la comparer aux cultures pures de *C. acetobutylicum* et de *Nv*H. La mise en place d'une approche de RNAseq nécessite d'avoir des conditions expérimentales extrêmement bien définies et un phénotype parfaitement reproductible. En effet, ce type d'expérience n'a de sens que si l'analyse statistique est fiable (réplicats biologiques et techniques) et de ce fait nécessite une parfaite maitrise des conditions expérimentales afin d'être parfaitement reproductible. Lors de la mise en place de la stratégie, il est apparu que l'état initial de l'inoculum était très important pour observer un effet sur la co-culture. Ainsi, le suivi de la culture du consortium *C. acetobutylicum* / *Nv*H en fonction de l'état physiologique des inocula utilisés (phase exponentielle versus phase stationnaire) a révélé un fort différentiel concernant l'effet synergique sur la croissance. L'analyse du surnageant de culture et des métabolites présents, vont dans le même sens, soulignant un effet sur la croissance et sur le métabolisme. L'effet le plus visible est la présence d'une phase de latence d'environ 10 heures quand l'inoculum provenant de la phase stationnaire est utilisé. Différentes stratégies ont été mises en place afin de générer cette phase de latence à partir d'un inoculum provenant de la phase stationnaire. Aucune n'a conduit au phénotype observé avec l'inoculum de la phase stationnaire. Il est admis que les bactéries en phase stationnaire n'ont pas le même métabolisme ni même le même état énergétique que les bactéries en phase exponentielle, elles sont dans un système en batch soumises à différents stress : nutritionnel, déséquilibre chimiques lié à l'accumulation de produits du métabolisme, variation du pH, lyse cellulaire etc.... Il est donc très probable que cet état favorise les interactions entre bactéries dans la co-culture. On ne peut toutefois pas éliminer aussi la notion de quantité de bactéries vivantes / viables inoculées qui à densité optique équivalente est probablement plus faible dans les échantillons prélevés en phase stationnaire.

L'utilisation d'un ratio de 1:10 entre *C. acetobutylicum et NvH* a permis de reproduire la phase de latence ainsi qu'une différence de croissance plus élevée entre la croissance de *C. acetobutylicum* en pure culture et en consortium comme cela est observé dans les conditions d'inocula en phase stationnaire. Ce résultat semble confirmer l'hypothèse de l'importance de la quantité de bactéries initialement présente mais n'exclue pas celle de l'état métabolique. En effet, la diminution du ratio induit une phase de latence, indiquant un temps d'adaptation plus long aux conditions de culture en milieu SLY qui n'est pas le milieu optimal car la concentration en glucose est plus faible que celle classiquement utilisée pour les cultures des *Clostridies*. Ce temps d'adaptation est alors raccourci en présence de *Nv*H qui permet un démarrage de croissance plus rapide.

Ces différentes analyses nous ont permis de définir des conditions standardisées en utilisant des cellules issues de la phase stationnaire lors des précultures, et lavées avant inoculation dans un ratio 1/1 dans le milieu SLY. Ces conditions conduisent au phénotype le plus marqué, c'est pourquoi cette condition a été choisie pour l'étude du transcriptome par RNA-seq de *C. acetobutylicum* et *Nv*H en culture pure et en consortium. L'analyse de l'expression différentielle des gènes a permis de visualiser un effet significatif sur l'ensemble de la population, tant pour *Nv*H que pour *C. acetobutylicum*, indiquant un changement de la communauté en présence du partenaire.

Du fait de la quantité de données, nous avons fait le choix de faire une première analyse en ne prenant en compte que les gènes très fortement impactés avec un fold change de 10 permettant un premier tri des mécanismes moléculaires impactés chez *Nv*H et chez *C. acetobutylicum*. Les premières analyses de l'expression différentielle révèlent l'activation des gènes de motilité ainsi qu'une diminution de l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans le métabolisme énergétique chez *Nv*H en présence de *C. acetobutylicum*. On observe notamment une diminution de l'expression des gènes associés à l'oxydation du lactate et d'une hydrogénase décrite comme impliquée dans la voie d'oxydation de l'hydrogène lors de la respiration sulfate. En parallèle la voie associée à la Coo hydrogénase proposée comme étant impliquée dans la dissipation de l'excès d'électrons en fermentation à travers la production d'H_2 est activée. L'ensemble de ces données converge vers un métabolisme fermentaire chez *Nv*H en syntrophie avec *C. acetobutylicum*. De plus, la diminution de l'expression des gènes associés à l'oxydation du lactate chez *Nv*H corrèle avec la diminution de l'expression du gène codant pour la lactate déshydrogénase chez *C. acetobutylicum*, impliquée cette fois dans la production de lactate. Ces résultats pointent donc vers une diminution de production du lactate dans les

surnageants de culture du consortium liée à l'arrêt de la voie lactate et la redistribution des flux métabolique chez *C. acetobutylicum* plutôt qu'à la consommation de lactate par *Nv*H.

Les expériences menées précédemment par l'équipe avaient démontré l'existence d'un échange de molécules carbonées entre les deux bactéries. Notre analyse transcriptomique ne nous a pas permis de montrer un métabolite carboné qui pourrait être échangé entre les deux bactéries mais semble également éliminer l'hypothèse émise d'un échange *via* le lactate.

Du fait de l'absence de sulfate dans le milieu, on pouvait s'attendre à une plus faible expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans la voie de réduction des sulfates chez *Nv*H tant en culture pure qu'en consortium. En revanche, les gènes codant pour le complexe membranaire proposé comme étant le donneur d'électrons de cette voie sont eux moins exprimés en présence de *C. acetobutylicum*. De façon étonnante, chez *C. acetobutylicum*, les gènes codant pour les protéines associées à la voie des composés soufrés et donc associées à la voie de synthèse des acides aminés soufrés sont régulés négativement. Or ces acides aminés sont indispensables au fonctionnement de la bactérie. De plus cette voie, nécessaire au fonctionnement cellulaire, est également couplée à la voie de synthèse de l'AI-2. Ceci suggère que soit il existe un transfert d'acides aminés entre les deux bactéries soit il existe un échange de composés soufrés réduits indispensables à la voie de synthèse des acides aminés soufrés. Une analyse plus poussée des données devrait nous aider à étayer cette hypothèse, sachant que les résultats de l'étude protéomique vont également dans le même sens.

Outre l'hypothèse d'un échange de composés soufrés de *Nv*H vers *C. acetobutylicum*, le résultat qui apparait comme le plus novateur car il ouvre des perspectives majeures pour décrire et comprendre l'inter relation entre les systèmes de communication, est l'activation des gènes associées au QS intra-espèce chez *C. acetobutylicum*. En effet, l'interaction conduit à une augmentation du système de communication spécifique à *C. acetobutylicum*. Cette régulation est un moyen pour les bactéries de l'espèce *C. acetobutylicum* qui ont été en contact avec *Nv*H d'en "informer" le reste de la population et de concerter leur comportement.

L'activation de ces gènes pourrait expliquer l'influence observée sur l'ensemble de la population de *C. acetobutylicum*, bien que toutes les cellules ne soient pas en contact direct avec *Nv*H. Ce résultat soulève de nombreuses questions quant au rôle de ce second mécanisme de communication dans l'établissement de l'interaction entre *Nv*H et *C. acetobutylicum*.

Discussion générale et perspectives

Après les grandes avancées pour comprendre le fonctionnement du vivant en tant qu'entité individuelle, on assite à la nécessaire prise en compte de l'environnement. Cette évolution est visible en Santé où après s'être concentré sur le tissu malade, puis l'organe, puis le malade, on assiste à la prise de conscience que l'environnement : nutrition, qualité de vie, sport ; impacte la réaction au traitement. Cette évolution est par exemple très visible en cancérologie. Elle s'est aussi développée depuis déjà quelques années au sein de la communauté des "végétalistes" avec une vision plus intégrée du végétal en interaction avec son environnement (qui est aussi son substrat direct, le CO_2) mais aussi avec le sol et ses composants vivants et inorganiques. Ces études portées parfois par un intérêt plus appliqué (optimisation des cultures ou des élevages, résistance) sont regroupées sous le terme d'holobionte c'est à dire hôte (animal ou une plante) et son microbiote, c'est-à-dire de la cohorte de microorganismes qui lui est étroitement associée (bactéries, virus, archées, protistes et champignons microscopiques). Dans la communauté des microbiologistes, longtemps deux grands axes se faisaient face. D'un côté la microbiologie dite moléculaire qui à travers l'étude de modèles extrêmement variés a permis de décrypter les bases fondamentales du vivant de son origine à son fonctionnement le plus fin et de l'autre les écologues microbiens, travaillant plus au niveau des populations et des communautés. Afin d'appréhender cette complexité, différentes approches ne nécessitant pas forcément la culture de ces microorganismes, mais étudiant les conséquences de perturbations au sein des communautés ou encore *via* des modélisations mathématiques à partir de données écosystémiques totales ont été mises en place. Cependant, de la même façon que les études en culture pure ont montré leur limite pour appréhender la complexité du monde microbien, la trop grande complexité de ces écosystèmes aux multiples variables à prendre en compte, a nécessité la mise en place d'approches plus contrôlées et contrôlables. Au défi scientifique s'est ajouté un défi technologique : comment étudier à l'échelle moléculaire des systèmes extrêmement complexes. Afin de les caractériser, différentes approches ont vu le jour permettant des études à partir d'échantillons environnementaux. Deux approches se sont distinguées. L'approche dite "Top-down" est basée sur la caractérisation des écosystèmes jusqu'à la compréhension du rôle individuel de chacun des individus tandis qu'en opposition, bien que complémentaire, l'approche dite "Bottom-up" vise à caractériser les organismes en culture pure avant de reconstruire des systèmes complexes à l'aide de ces organismes. Cette dernière stratégie a dans un premier temps été largement mise en œuvre dans un contexte applicatif, pour optimiser la production d'un composé donné *via* un processus biologique. Cette approche repose sur le concept selon lequel la spécialisation des tâches peut améliorer à la fois la productivité et la stabilité des processus (Briones and Raskin, 2003; Bernstein and Carlson, 2012). Un exemple pertinent est la production de biocarburants à partir de la lignocellulose, qui nécessite d'abord

l'hydrolyse de la lignocellulose en sucres solubles, suivie de la conversion de ces sucres en biocarburants. À ce jour, aucun micro-organisme n'est capable d'accomplir l'ensemble de ces étapes de manière autonome. Dans leur étude, Minty *et al.* (2013) ont combiné l'action d'un champignon, *Trichoderma reesei*, connu pour sécréter des cellulases dégradant la lignocellulose en saccharides solubles, avec *E. coli* utilisé ensuite pour transformer ces saccharides en isobutanol (Minty *et al.*, 2013). Un autre exemple des recherches de type Bottom-up porte sur leur impact pour la caractérisation des mécanismes microbiens tels que celui de la communication chez les micro-organismes appelé "Quorum Sensing" (QS). Il a été initialement détaillé comme étant un système de communication intra-espèce permettant la régulation du comportement d'une culture mono-espèce comme la production de la luciférase chez *A. fischeri*. L'évolution des techniques et l'approfondissement des connaissances de l'étude de ce moyen de communication bactérien a permis de découvrir de nombreux mécanismes reposant sur une grande diversité de signaux ainsi que sur de nombreux systèmes de régulation.

En opposition, l'approche "Top-down" a permis la caractérisation de nombreuses souches au sein des différents écosystèmes terrestres ainsi que de définir leur rôle dans différentes fonctions écologiques dans différents systèmes. La combinaison de ces deux stratégies a conduit à l'émergence de ce qui est dénommé l'écologie synthétique. A mi-chemin entre le "Botton-up" et le "Top-down", cette stratégie s'appuie sur la connaissance de consortia naturels pour constituer des consortia synthétiques constitués de bactéries qualifiées "d'intérêt" afin de comprendre le fonctionnement fin du système. Le processus de dégradation de la matière organique constitue un bon modèle. En effet, la dégradation de la matière organique est réalisée par différents organismes lors d'étapes successives. Ce processus nécessite une coordination spatio-temporelle entre les différentes espèces et conduit à la production de méthane et CO_2 en passant par une étape de production d'H_2. Au sein de cet écosystème, 2 espèces ont été choisies par l'équipe pour constituer un consortium synthétique : *C. acetobutylicum*, capable de produire de l'hydrogène, et *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*Nv*H), une bactérie sulfato réductrice décrite par les écologues comme un potentiel interrupteur du métabolisme dans ces consortia. Ces études ont permis de démontrer que la carence nutritionnelle est l'un des leviers de l'interaction physique et métabolique entre ces deux bactéries. Un autre levier est le QS de type AI-2 produit par *C. acetobutylicum* et enfin le dernier est une proximité physique nécessaire. Ainsi en absence de ces leviers, la communication entre *Nv*H et *C. acetobutylicum* est abolie. A la suite de ces études, de nouvelles interrogations ont surgi et ont été à la base de ce projet de thèse. En effet, malgré la détermination d'un effet synergique sur la croissance et le métabolisme ainsi que la présence d'un échange

cytosolique, les mécanismes régissant ces phénotypes n'ont pas été caractérisés. De la même façon, bien que le rôle de l'AI-2 dans la mise en place de l'interaction entre les bactéries ait été démontré, le mécanisme moléculaire restait inconnu.

Le premier objectif de mon projet de thèse a donc porté sur l'identification et la caractérisation *in silico* des acteurs potentiels dans le QS de type AI-2 chez *C. acetobutylicum* et *Nv*H. Cette recherche, basée sur une approche de criblage par homologie de séquences protéiques et utilisant un jeu de données regroupant l'ensemble des protéines décrites comme homologues au système AI-2, a permis d'identifier différents acteurs potentiels. Le QS de type AI-2 est retrouvé chez les bactéries sous la forme de deux systèmes de régulation, le système Lsr chez les *Enterobacteriacea* et Lux chez les *Vibrionaceae* (Meng *et al.*, 2022). En capitalisant sur les avancées technologiques actuelles telles que le séquençage à haut débit, l'amélioration des bases de données ainsi que la mise à disposition des outils bioinformatiques tels que Alphafold, nous avons pu, pour la première fois, identifier la présence d'un système type Lsr chez *C. acetobutylicum* et *Nv*H. L'analyse montre aussi que même si la présence d'acteurs de type Lsr a été retrouvée, toutes les protéines classiquement impliquées dans la machinerie du QS ne sont pas présentes chez ces deux organismes (*e.g.* LsrB chez *Nv*H). Enfin, une particularité est que les gènes identifiés sont retrouvés à différents endroits du génome et ne constituent pas une unité transcriptionnelle comme par exemple chez *E. coli*. A la suite de cette approche *in silico* deux gènes *DVU_3131* (LsrR-like) et *DVU_3134* (LsrK-like) identifiés chez *Nv*H et présents au sein d'une même unité transcriptionnelle ont été investigués par des approches *in vitro*. Chez *C. acetobutylicum,* les gènes identifiés codants pour l'ABC transporteur et le système de réponse (LsrR et LsrK) sont répartis sur le génome en différentes unités transcriptionnelles, suggèrent un système non canonique de perception et de réponse au signal AI-2.

La caractérisation du régulateur transcriptionnel LsrR-like et de la kinase LsrK-like de chez *Nv*H a permis la validation *in vitro* de leur fonctionnalité, avec la capacité de LsrK-like à phosphoryler l'AI-2 alors capable de bloquer l'interaction entre LsrR-like et la région promotrice en amont de son propre gène. Cette validation qui est en corrélation avec les mécanismes de régulation découverts chez les bactéries présentant un mécanisme de QS AI-2 de type Lsr est très atypique. En effet, malgré un mécanisme dans son ensemble proche du fonctionnement du couple LsrK/LsrR classique, chez *Nv*H l'enzyme LsrK-like présente un site actif atypique plus proche des glycérol kinases que des xylulose kinases au sein de la famille protéique FGGY. La notion de promiscuité enzymatique se décline soit sur la catalyse de types différents de réactions soit sur l'utilisation de substrats différents. Les deux effets combinés offrant une plasticité métabolique importante au système comme cela a été démontré chez *E. coli* (D'Ari and

Casadesús, 1998). Cette activité de promiscuité commence à être fortement utilisée dans les développements de la biologie synthétique afin d'implémenter des voies *via* le contrôle de l'activité et moins par l'ajout de voies synthétiques (Glasner *et al.*, 2020). Sa prise en compte dans la compréhension de la régulation des flux métaboliques est beaucoup moins développée, probablement car ce processus est peu connu et maitrisé. La présence d'une activité de promiscuité pour la molécule de QS AI-2 par une glycérol kinase est une découverte permettant la mise en évidence de nouvelles possibilités de communication même pour les bactéries possédant des mécanismes ne présentant pas ou peu d'homologie avec les systèmes Lsr classiques. Au cours de ce travail, nous n'avons pu explorer plus en détail l'impact de cette promiscuité de substrat sur le métabolisme et sa régulation mais nous avons montré que le glycérol phosphorylé n'interférait pas avec l'action de LsrR et donc ne pouvait remplacer l'action de AI-2 phosphorylé. A travers ces résultats, il est également intéressant de questionner la relation entre la voie du glycérol et le mécanisme de communication AI-2 chez *Nv*H. En 2005, Karina B. Xavier et Bonnie L. Bassler ont mis en évidence une régulation indirect de l'opéron *lsr* par le glycérol-3-phosphate issue de la voie du glycérol chez *E. coli* (Xavier and Bassler, 2005). L'investigation de la relation entre ces deux processus, couplés chez *Nv*H, permettrait de déterminer la présence d'un potentiel mécanisme de régulation supplémentaire pour le contrôle du QS AI-2 chez *Nv*H.

A la suite de la caractérisation de la fonctionnalité de ces acteurs protéiques chez *Nv*H, l'impact de la présence de l'AI-2 sur *Nv*H a été investigué par une approche de transcriptomique (séquençage NGS). Nous avons choisi de cibler un temps court après l'ajout de AI-2 dans la culture de *Nv*H. Notre objectif était de détecter les gènes potentiellement impactés dès la détection du signal. Cette approche visant à caractériser des gènes sous régulation du signal QS a permis la mise en évidence de plusieurs opérons positivement et négativement régulés après incubation de *Nv*H avec l'AI-2 synthétique (DPD). Elle révèle ainsi la capacité de *Nv*H à détecter et répondre au signal alors que la bactérie n'est pas dans une condition où elle peut croitre. Les résultats montrent une activation de l'expression de gènes impliqués dans le transport du phosphate, du fer et du métabolisme en particulier par l'activation de l'hydrogènase périplasmique HydA/B et des voies de synthèse de la vitamine B1 (thiamine). La thiamine, ou vitamine B1, intervient dans la transformation du glucose en énergie et dans le métabolisme des acides aminés (Du *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2024). L'activation de la voie de biosynthèse de la thiamine par le quorum sensing a également été retrouvée chez *V. harveyi* cette fois sous le contrôle d'AHL. Néanmoins la raison exacte de son activation n'a pas encore été élucidé (Chaparian *et al.*, 2020). Toutefois, plus largement le rôle des vitamines dans les interactions

entre microorganismes est de plus en plus étudié. Ainsi, dans le cas de la vitamine B12, les travaux récents d'Olivier Berteaux *et al.* suggèrent qu'elle interviendrait dans la communication au sein du microbiote. Il est donc envisageable que la production de thiamine par *Nv*H soit un signal que la bactérie envoie à son environnement en réponse au signal AI-2. L'analyse *in silico* n'a pas permis de mettre en évidence un récepteur canonique potentiel de la molécule AI-2. Comme spécifié dans l'introduction, de plus en plus de récepteurs qualifiés de non conventionnels sont décrits dans la littérature (Armbruster *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2020). Ainsi, certains récepteurs des sucres sont capables d'internaliser AI-2. C'est le cas du transporteur ribose (RbsB) chez *Haemophilus influenzae*. Dans l'analyse de notre étude transcriptomique, nous avons indiqué la surexpression d'un ABC transporteur annoté comme transporteur de phosphate. Bien que n'ayant pas d'arguments expérimentaux nous permettant d'affirmer que ce transporteur soit associé à AI-2, sa surexpression en présence de AI-2 en fait un candidat idéal. Cette hypothèse nécessiterait d'être testée en utilisant par exemple le D-desthiobiotin-AI-2 pour la détection des récepteurs à AI-2 (Miranda *et al.*, 2019).

Le développement de l'approche RNA-seq a nécessité une optimisation et un contrôle poussés afin de standardiser les mises de culture des consortia et des cultures pures. Au-delà de l'obtention de conditions les plus reproductibles possibles, ces expériences nous ont révélé que l'état initial des bactéries lors de l'inoculum est important pour la mise en place d'une interaction "efficace" et que cet état ne peut être facilement mimé. Ainsi la synergie entre les deux bactéries ne semble s'opérer que quand les inocula sont constitués de bactéries recueillies en phase stationnaire de croissance et apparait associée à une phase de latence dans la culture du consortium. Si l'on génère une phase de latence par un stress par exemple, on ne récupère pas la synergie. En revanche si l'on modifie les ratios, on récupère tout ou partie de la synergie. Ces résultats soulignent que la mise en place d'un comportement communautaire est associée à l'état physiologique initial mais aussi à la quantité de bactéries mises en présence

Cette étape de recherche des facteurs impliqués dans l'établissement de l'interaction entre *C. acetobutylicum* et *Nv*H a permis de mettre en évidence que la condition la plus propice pour l'étude métatranscriptomique des deux partenaires par séquençage NGS est celle utilisant les inocula en phase stationnaire. En effet, la présence d'un écart élevé de densité entre celle de *C. acetobutylicum* et du consortium bactérien indique un impact fort de la présence de *Nv*H sur ce système. Il convient de souligner ici que cette étude a aussi nécessité une mise au point optimale d'extraction des ARN dans le cas de la co-culture afin de ne pas biaiser les résultats par une mauvaise préparation des échantillons. Nous avons décidé de prélever des aliquots sur les différentes cultures à 2 temps différents. Cinq heures après l'inoculation afin de détecter les

phases précoces de l'interaction et au milieu de phase exponentielle soit environ après 15 de culture.

Dans un souci d'efficacité nous avons fait le choix d'analyser en détail les résultats obtenus au niveau de la phase exponentielle de croissance. La présence d'un grand nombre de gènes régulés chez les deux bactéries révèle tout d'abord un impact fort et mutuel de l'une sur l'autre. Chez *Nv*H, la régulation positive des gènes impliqués dans la formation du flagelle suggèrerait une augmentation de sa motilité. Cependant, la régulation positive des gènes codant la protéine PilZ et PilT, identifiés chez *B. subtilis* et *P. aeruginosa* comme pouvant bloquer l'effet giratoire du flagelle, semble indiquer que ces protéines flagellaires interviennent plus vraisemblablement dans un mécanisme d'adhésion (Baker *et al.*, 2016). De plus, il apparait clairement que le métabolisme de *Nv*H dans le consortium est affecté. En effet, une forte répression des gènes impliqués dans l'import et l'oxydation du lactate est observée comme par exemple l'opéron *luo* qui est plus de 3 fois moins exprimé dans ces conditions. De façon intéressante, les gènes codant l'hydrogènase Coo sont quant à eux plus de 10 fois plus exprimés dans ces mêmes conditions, indiquant un rôle probable de ce complexe dans la croissance de *Nv*H. En revanche, les gènes des enzymes de transfert d'électrons liées à la voie dissimilatrice du sulfate chez *Nv*H sont réprimés. Bien que toutes les voies métaboliques de *Nv*H lors du couplage avec *C. acetobutylicum* ne soient pas complètement élucidées, nos résultats permettent d'éliminer l'utilisation par *Nv*H du lactate produit par *C. acetobutylicum* lors de la croissance. De plus, les gènes codant la lactate déshydrogénase sont réprimés chez *C. acetobutylicum* en consortium. Ce résultat permet de conclure que la diminution en lactate observé dans le surnageant de co-culture n'est pas due à une consommation de ce dernier par *Nv*H, mais provient d'un changement de métabolisme de *C. acetobutylicum* ("switch" métabolique) conduisant à une diminution de production du lactate en présence de *Nv*H. Pour conclure, l'analyse par séquençage NGS a révélé entre autres une régulation positive des gènes liés au système de QS de type AIP chez *C. acetobutylicum*. Cette découverte inattendue suggère l'existence de plusieurs niveaux de communication au sein du consortium microbien. En effet, il semble y avoir une communication intraspécifique permettant aux cellules de *C. acetobutylicum* de coordonner leur réponse en présence de *Nv*H, ainsi qu'une communication interspécifique facilitant l'interaction entre les différentes espèces du consortium pour optimiser leur synergie. Ces mécanismes distincts, bien que basés sur des modèles de QS connus, restent incomplets et méritent d'être étudiés plus en profondeur. Une meilleure compréhension de ces systèmes pourrait ouvrir la voie au développement d'inhibiteurs ciblés, permettant ainsi de contrôler le fonctionnement du consortium dans des environnements tels que les bioréacteurs.

Plus largement ces résultats, certes réalisés à un autre temps de culture, montrent l'impact de la présence de la bactérie partenaire. Cela apparait comme logique dans le cas de *Nv*H car son substrat qui reste pour l'instant encore inconnu est produit par *C. acetobutylicum*. En revanche, l'impact de la présence de *Nv*H sur *C. acetobutylicum* ouvre le champ des possibles pour comprendre le rôle majeur des bactéries dites minoritaires au sein des écosystèmes.

L'un des verrous dans l'étude des consortia est la quantification absolue des différents organismes qui les constituent. Les techniques connues permettant d'établir un ratio des espèces présentes dans un mélange donné sont basées sur une quantification du nombre de copies du gène de l'ARN 16S. Elles ne permettent cependant pas une quantification absolue du nombre de copies de génomes nécessaires à notre étude. C'est pourquoi nous avons développé une méthode de quantification absolue par digital droplet PCR qui n'avait jusque-là jamais été utilisée pour dénombrer les bactéries de chacune des espèces d'un consortium. Outre l'intérêt du développement technologique, cette approche nous semblait importante dans notre étude car elle apporte une précision sans précédent dans le suivi des espèces au sein du consortium, précision cruciale pour analyser les dynamiques d'interaction. Pour cela, il nous a fallu établir une méthodologie précise afin de détecter les différents organismes de manière spécifique, méthode qui pourra ensuite être élargie à l'étude de consortia synthétiques. La conception et les tests de spécificité et sensibilité mis au point vont faire l'objet d'une publication. L'analyse par ddPCR du nombre de copies de génomes de *C. acetobutylicum* et *Nv*H a permis la quantification jusqu'à une copie de génome dans 1 µL d'échantillon et ce même en présence d'une concentration 10 000 fois supérieure d'ADN génomique du partenaire bactérien. Ces travaux ont permis pour la première fois la détermination du ratio cellulaire entre *C. acetobutylicum* et *Nv*H au cours du consortium avec le passage d'un ratio 1:1 lors de l'inoculum à un ratio 5:1 en fin de phase exponentielle.

Ce résultat intéressant montre que, dans le consortium, la bactérie *C. acetobutylicum* présente un développement rapide, tandis que *Nv*H semble avoir une croissance lente. Cela suggère que *Nv*H s'accroche à *C. acetobutylicum* pour assurer sa survie, comme à une "bouée de sauvetage", en conditions de carence nutritionnel et que le couplage énergétique entre les deux espèces permet à *Nv*H de survivre sans réellement se développer, en attendant des conditions plus favorables. De plus, l'observation d'un ratio de 5:1 en fin de croissant révèle une hétérogénéité de la population des *C. acetobutylicum* au niveau du consortium, avec une sous-population de *C. acetobutylicum* associée à *Nv*H et une sous-population de *C. acetobutylicum* non associée qui est majoritaire. Grâce aux résultats de transcriptomique, nous avons constaté que les deux sous-populations de *C. acetobutylicum* semble communiquer entre elles *via* la

production d'AIP, permettant ainsi aux cellules de *C. acetobutylicum* ayant interagi avec *Nv*H de prévenir la sous-population non associée de la présence de *Nv*H dans l'environnement. L'intérêt de cette communication reste encore à élucider, cependant ce concept est intéressant dans le cadre de la vie en communauté, car il permet à des individus d'une espèce bactérienne de détecter un autre organisme hostile ou amical dans son environnement et d'alerter l'ensemble des membres de l'espèce. Ce type de communication représente un avantage évolutif important pour survire/s'adapter à un milieu où plusieurs organismes peuvent se croiser, en permettant à des individus d'une espèces bactérienne de jouer un rôle de "sentinelle" au sein leur population.

Références bibliographiques

Abbasi, W., French, C.E., Rockowitz, S., Kenna, M.A., and Eliot Shearer, A. (2022) Evaluation of copy number variants for genetic hearing loss: a review of current approaches and recent findings. *Hum Genet* **141**: 387–400.

Alafaci, A. (2021) Implication des interactions Quorum Sensing dépendantes dans la mise en place et la prévalence des co-infections et la virulence de *B. afzelii* et *B. garinii*, agents responsables de la Borréliose de Lyme en Europe.

Albuquerque, P. and Casadevall, A. (2012) Quorum sensing in fungi – a review. *Med Mycol* **50**: 337–345.

Al-Hinai, M.A., Jones, S.W., and Papoutsakis, E.T. (2015) The Clostridium Sporulation Programs: Diversity and Preservation of Endospore Differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**: 19–37.

Allison, C. and Hughes, C. (1991) Bacterial swarming: an example of prokaryotic differentiation and multicellular behaviour. *Sci Prog* **75**: 403–422.

Alnahhas, R.N., Sadeghpour, M., Chen, Y., Frey, A.A., Ott, W., Josić, K., and Bennett, M.R. (2020) Majority sensing in synthetic microbial consortia. *Nat Commun* **11**: 3659.

Alsaker, K.V., Spitzer, T.R., and Papoutsakis, E.T. (2004) Transcriptional Analysis of spo0A Overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and Its Effect on the Cell's Response to Butanol Stress. *Journal of Bacteriology* **186**: 1959–1971.

Al-Shorgani, N.K.N., Isa, M.H.M., Yusoff, W.M.W., Kalil, M.S., and Hamid, A.A. (2016) Isolation of a *Clostridium acetobutylicum* strain and characterization of its fermentation performance on agricultural wastes. *Renewable Energy* **86**: 459–465.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403–410.

Amati, G., Bisicchia, P., and Galizzi, A. (2004) DegU-P Represses Expression of the Motility *fla-che* Operon in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**: 6003–6014.

Anetzberger, C., Reiger, M., Fekete, A., Schell, U., Stambrau, N., Plener, L., et al. (2012) Autoinducers Act as Biological Timers in *Vibrio harveyi*. *PLoS ONE* **7**: e48310.

Armbruster, C.E., Pang, B., Murrah, K., Juneau, R.A., Perez, A.C., Weimer, K.E.D., and Swords, W.E. (2011) RbsB (NTHI_0632) mediates quorum signal uptake in nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 86-028NP: Autoinducer-2 uptake by nontypeable *H. influenzae*. *Molecular Microbiology* **82**: 836–850.

Babel, H., Naranjo-Meneses, P., Trauth, S., Schulmeister, S., Malengo, G., Sourjik, V., and Bischofs, I.B. (2020) Ratiometric population sensing by a pump-probe signaling system in *Bacillus subtilis*. *Nat Commun* **11**: 1176.

Backes, C. (2018) Etude de la communication au sein d'un consortium bactérien producteur de biohydrogène.

Baker, A.E., Diepold, A., Kuchma, S.L., Scott, J.E., Ha, D.G., Orazi, G., et al. (2016) PilZ Domain Protein FlgZ Mediates Cyclic Di-GMP-Dependent Swarming Motility Control in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*.

Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E., and Silverman, M.R. (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi* : sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular Microbiology* **9**: 773–786.

Bassler, B.L., Wright, M., and Silverman, M.R. (1994) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol* **13**: 273–286.

Batmanghelich, F., Li, L., and Seo, Y. (2017) Influence of multispecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Desulfovibrio vulgaris* on the corrosion of cast iron. *Corrosion Science* **121**: 94–104.

Benomar, S., Ranava, D., Cárdenas, M.L., Trably, E., Rafrafi, Y., Ducret, A., et al. (2015) Nutritional stress induces exchange of cell material and energetic coupling between bacterial species. *Nat Commun* **6**: 6283.

Bernard, C., Li, Y., Lopez, P., and Bapteste, E. (2023) Large-Scale Identification of Known and Novel RRNPP Quorum-Sensing Systems by RRNPP_Detector Captures Novel Features of

Bacterial, Plasmidic, and Viral Coevolution. *Molecular Biology and Evolution* **40**: msad062.

Bernstein, H.C. and Carlson, R.P. (2012) MICROBIAL CONSORTIA ENGINEERING FOR CELLULAR FACTORIES: *IN VITRO* TO *IN SILICO* SYSTEMS. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **3**: e201210017.

Beyerinck (1895) Ueber Spirillum desulfuricans als ursache von sulfatreduction. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd* **1**: 1–9.

Bez, C., Covaceuszach, S., Bertani, I., Choudhary, K.S., and Venturi, V. (2021) LuxR Solos from Environmental Fluorescent Pseudomonads. *mSphere* **6**: e01322-20.

Bez, C., Geller, A.M., Levy, A., and Venturi, V. (2023) Cell-Cell Signaling Proteobacterial LuxR Solos: a Treasure Trove of Subgroups Having Different Origins, Ligands, and Ecological Roles. *mSystems* **8**: e01039-22.

Bhargava, N., Sharma, P., and Capalash, N. (2010) Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. *Critical Reviews in Microbiology* **36**: 349–360.

Biebl, H. (1999) *CLOSTRIDIUM | Clostridium Acetobutylicum*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*. Robinson, R.K. (ed). Oxford: Elsevier, pp. 445–451.

Bihary, D., Tóth, M., Kerényi, Á., Venturi, V., and Pongor, S. (2014) Modeling bacterial quorum sensing in open and closed environments: potential discrepancies between agar plate and culture flask experiments. *J Mol Model* **20**: 2248.

Bijtenhoorn, P., Mayerhofer, H., Müller-Dieckmann, J., Utpatel, C., Schipper, C., Hornung, C., et al. (2011) A Novel Metagenomic Short-Chain Dehydrogenase/Reductase Attenuates *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Virulence on *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* **6**: e26278.

Bisson-Boutelliez, C., Massin, F., Dumas, D., Miller, N., and Lozniewski, A. (2010) *Desulfovibrio spp*. survive within KB cells and modulate inflammatory responses. *Molecular Oral Microbiology* **25**: 226–235.

Brameyer, S. and Heermann, R. (2017) Quorum Sensing and LuxR Solos in *Photorhabdus*. In *The Molecular Biology of Photorhabdus Bacteria*. ffrench-Constant, R.H. (ed). Cham: Springer International Publishing, pp. 103–119.

Bridges, A.A. and Bassler, B.L. (2019) The intragenus and interspecies quorum-sensing autoinducers exert distinct control over *Vibrio cholerae* biofilm formation and dispersal. *PLoS Biol* **17**: e3000429.

Briones, A. and Raskin, L. (2003) Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 270–276.

Carbonero, F., Benefiel, A.C., Alizadeh-Ghamsari, A.H., and Gaskins, H.R. (2012) Microbial pathways in colonic sulfur metabolism and links with health and disease. *Front Physiol* **3**:.

Carnes, E.C., Lopez, D.M., Donegan, N.P., Cheung, A., Gresham, H., Timmins, G.S., and Brinker, C.J. (2010) Confinement-induced quorum sensing of individual *Staphylococcus aureus* bacteria. *Nat Chem Biol* **6**: 41–45.

Chaffron, S., Delage, E., Budinich, M., Vintache, D., Henry, N., Nef, C., et al. (2021) Environmental vulnerability of the global ocean epipelagic plankton community interactome. *Sci Adv* **7**: eabg1921.

Chakankar, M. and Hong, H. (2022) Microbial Consortium: A Promising Strategy for Bioleaching of Metals from Industrial Wastes. In *Microbial Metabolism of Metals and Metalloids*. Hurst, C.J. (ed). Cham: Springer International Publishing, pp. 109–134.

Chaparian, R.R., Ball, A.S., and Van Kessel, J.C. (2020) Hierarchical Transcriptional Control of the LuxR Quorum-Sensing Regulon of *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **202**:.

Chen, Y. -R., Zhou, L. -Z., Fang, S. -T., Long, H. -Y., Chen, J. -Y., and Zhang, G. -X. (2019) Isolation of *Desulfovibrio spp*. from human gut microbiota using a next-generation sequencing directed culture method. *Letters in Applied Microbiology* **68**: 553–561.

Cheng, C., Bao, T., and Yang, S.-T. (2019) Engineering *Clostridium* for improved solvent production: recent progress and perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**: 5549–5566.
Choi, O., Lee, Y., Kang, B., and Kim, J. (2023) Toxoflavin contamination in rice samples from rice processing complexes in South Korea. *International Journal of Food Microbiology* **385**: 110014.
Chowdhary, P.K., Keshavan, N., Nguyen, H.Q., Peterson, J.A., González, J.E., and Haines, D.C. (2007) *Bacillus megaterium* CYP102A1 Oxidation of Acyl Homoserine Lactones and Acyl Homoserines. *Biochemistry* **46**: 14429–14437.
Clark, M.E., Edelmann, R.E., Duley, M.L., Wall, J.D., and Fields, M.W. (2007) Biofilm formation in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough is dependent upon protein filaments. *Environmental Microbiology* **9**: 2844–2854.
Clarke, M.B., Hughes, D.T., Zhu, C., Boedeker, E.C., and Sperandio, V. (2006) The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 10420–10425.
Cobb, M. (2017) 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. *PLoS Biol* **15**: e2003243.
Daniels, M., van Vliet, S., and Ackermann, M. (2023) Changes in interactions over ecological time scales influence single-cell growth dynamics in a metabolically coupled marine microbial community. *The ISME Journal* **17**: 406–416.
D'Ari, R. and Casadesús, J. (1998) Underground metabolism. *BioEssays* **20**: 181–186.
De Celis, M., Serrano-Aguirre, L., Belda, I., Liébana-García, R., Arroyo, M., Marquina, D., et al. (2021) Acylase enzymes disrupting quorum sensing alter the transcriptome and phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*, and the composition of bacterial biofilms from wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment* **799**: 149401.
Dessaux, Y. and Faure, D. (2018) Quorum Sensing and Quorum Quenching in *Agrobacterium*: A "Go/No Go System"? *Genes* **9**: 210.
Diallo, M., Kengen, S.W.M., and López-Contreras, A.M. (2021) Sporulation in solventogenic and acetogenic clostridia. *Appl Microbiol Biotechnol* **105**: 3533–3557.
Ding, D., Wang, M., Wu, M., Gan, C., and Wu, P. (2021) Condition-Specific Molecular Network Analysis Revealed That Flagellar Proteins Are Involved in Electron Transfer Processes of *Shewanella piezotolerans* WP3. *Genetics Research* **2021**: 9953783.
Dong, Y.-H., Wang, L.-H., and Zhang, L.-H. (2007) Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Phil Trans R Soc B* **362**: 1201–1211.
Du, Q., Wang, H., and Xie, J. (2011) Thiamin (Vitamin B1) Biosynthesis and Regulation: A Rich Source of Antimicrobial Drug Targets? *International Journal of Biological Sciences* **7**: 41.
Duarte, A.G., Catarino, T., White, G.F., Lousa, D., Neukirchen, S., Soares, C.M., et al. (2018) An electrogenic redox loop in sulfate reduction reveals a likely widespread mechanism of energy conservation. *Nat Commun* **9**: 5448.
Duncker, K.E., Holmes, Z.A., and You, L. (2021) Engineered microbial consortia: strategies and applications. *Microb Cell Fact* **20**: 211.
Eberhard, A. (1972) Inhibition and Activation of Bacterial Luciferase Synthesis. *J Bacteriol* **109**: 1101–1105.
Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., and Oppenheimer, N.J. (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**: 2444–2449.
Elkheloui Raja, Hamadi Fatima, and Mimouni Rachida (2021) *Acinetobacter baumannii* Quorum sensing: A way to communicate and a target to eradicate. *Int J Sci Res Arch* **3**: 134–145.
Engebrecht, J., Nealson, K., and Silverman, M. (1983) Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* **32**: 773–781.
Engel, M., Gemünde, A., Holtmann, D., Müller-Renno, C., Ziegler, C., Tippkötter, N., and Ulber, R. (2020) *Clostridium Acetobutylicum* 's Connecting World: Cell Appendage Formation in Bioelectrochemical Systems. *ChemElectroChem* **7**: 414–420.
Evans, T.D. and Zhang, F. (2020) Bacterial metabolic heterogeneity: origins and applications in engineering and infectious disease. *Current Opinion in Biotechnology* **64**: 183–189.

Fast, W. and Tipton, P.A. (2012) The enzymes of bacterial census and censorship. *Trends in Biochemical Sciences* **37**: 7–14.

Federle, M.J. and Bassler, B.L. (2003) Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* **112**: 1291–1299.

Ferreira, D., Venceslau, S.S., Bernardino, R., Preto, A., Zhang, L., Waldbauer, J.R., et al. (2023) DsrC is involved in fermentative growth and interacts directly with the FlxABCD–HdrABC complex in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Environmental Microbiology* **25**: 962–976.

Foulquier, C., Rivière, A., Heulot, M., Dos Reis, S., Perdu, C., Girbal, L., et al. (2022) Molecular characterization of the missing electron pathways for butanol synthesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Nat Commun* **13**: 4691.

Fuqua, C. and Greenberg, E.P. (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 685–695.

Fuqua, C., Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2001) Regulation of Gene Expression by Cell-to-Cell Communication: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing. *Annual Review of Genetics* **35**: 439–468.

Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994) Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. **176**:.

Gabriel, C.L. (1928) Butanol Fermentation Process [1]. *Ind Eng Chem* **20**: 1063–1067.

Gallegos-Monterrosa, R., Christensen, M.N., Barchewitz, T., Koppenhöfer, S., Priyadarshini, B., Bálint, B., et al. (2021) Impact of Rap-Phr system abundance on adaptation of *Bacillus subtilis*. *Commun Biol* **4**: 468.

Gao, C.-H., Cao, H., Cai, P., and Sørensen, S.J. (2021) The initial inoculation ratio regulates bacterial coculture interactions and metabolic capacity. *The ISME Journal* **15**: 29–40.

Gao, H., Zhang, J., Lou, J., Li, J., Qin, Q., Shi, Q., et al. (2020) Direct Binding and Regulation by Fur and HapR of the Intermediate Regulator and Virulence Factor Genes Within the ToxR Virulence Regulon in *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol* **11**: 709.

George, J., Purushothaman, C.S., and Shouche, Y.S. (2008) Isolation and characterization of sulphate-reducing bacteria *Desulfovibrio vulgaris* from Vajreshwari thermal springs in Maharashtra, India. *World J Microbiol Biotechnol* **24**: 681–685.

Gest, H. (2004) The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society. *Notes Rec R Soc Lond* **58**: 187–201.

van Gestel, J., Bareia, T., Tenennbaum, B., Dal Co, A., Guler, P., Aframian, N., et al. (2021) Short-range quorum sensing controls horizontal gene transfer at micron scale in bacterial communities. *Nat Commun* **12**: 2324.

Ghosh, A., Jayaraman, N., and Chatterji, D. (2020) Small-Molecule Inhibition of Bacterial Biofilm. *ACS Omega* **5**: 3108–3115.

Ghosh, S., Chowdhury, R., and Bhattacharya, P. (2016) Mixed consortia in bioprocesses: role of microbial interactions. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 4283–4295.

Gilmore, S.P., Lankiewicz, T.S., Wilken, St.E., Brown, J.L., Sexton, J.A., Henske, J.K., et al. (2019) Top-Down Enrichment Guides in Formation of Synthetic Microbial Consortia for Biomass Degradation. *ACS Synth Biol* **8**: 2174–2185.

Glasner, M.E., Truong, D.P., and Morse, B.C. (2020) How enzyme promiscuity and horizontal gene transfer contribute to metabolic innovation. *The FEBS Journal* **287**: 1323–1342.

Gregory, A.C., Zayed, A.A., Conceição-Neto, N., Temperton, B., Bolduc, B., Alberti, A., et al. (2019) Marine DNA Viral Macro- and Microdiversity from Pole to Pole. *Cell* **177**: 1109-1123.e14.

Grimalt-Alemany, A., Łężyk, M., Lange, L., Skiadas, I.V., and Gavala, H.N. (2018) Enrichment of syngas-converting mixed microbial consortia for ethanol production and thermodynamics-based design of enrichment strategies. *Biotechnol Biofuels* **11**: 198.

Guo, M., Gamby, S., Zheng, Y., and Sintim, H. (2013) Small Molecule Inhibitors of AI-2 Signaling in Bacteria: State-of-the-Art and Future Perspectives for Anti-Quorum Sensing Agents. *IJMS* **14**: 17694–17728.

Guzzo, F., Scognamiglio, M., Fiorentino, A., Buommino, E., and D'Abrosca, B. (2020) Plant Derived Natural Products against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: Antibiofilm Activity and Molecular Mechanisms. *Molecules* **25**: 5024.

Ha, J.-H., Hauk, P., Cho, K., Eo, Y., Ma, X., Stephens, K., et al. (2018) Evidence of link between quorum sensing and sugar metabolism in *Escherichia coli* revealed via cocrystal structures of LsrK and HPr. *Science Advances* **4**: eaar7063.

Haft, D.H. and Gwadz, M. (2023) Eight Unexpected Selenoprotein Families in Organometallic Biochemistry in *Clostridium difficile*, in ABC Transport, and in Methylmercury Biosynthesis. *Journal of Bacteriology* **205**: e00259-22.

Harris, L.M., Welker, N.E., and Papoutsakis, E.T. (2002) Northern, Morphological, and Fermentation Analysis of *spo0A* Inactivation and Overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol* **184**: 3586–3597.

Haveman, S.A., Brunelle, V., Voordouw, J.K., Voordouw, G., Heidelberg, J.F., and Rabus, R. (2003) Gene Expression Analysis of Energy Metabolism Mutants of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough Indicates an Important Role for Alcohol Dehydrogenase. *J Bacteriol* **185**: 4345–4353.

Hays, S.G., Yan, L.L.W., Silver, P.A., and Ducat, D.C. (2017) Synthetic photosynthetic consortia define interactions leading to robustness and photoproduction. *J Biol Eng* **11**: 4.

He, Li, Hu, Chi, Ma, and Guo (2017) Component analysis of volatile metabolites of cultiirable *Clostridium spp.* isolated from pit muds of Luzhou-flavor liijuor based on HS-SPME-GC-MS. *zzqgxb* **32**: 1–11.

Hendriksen, R.S., Lukjancenko, O., Munk, P., Hjelmsø, M.H., Verani, J.R., Ng'eno, E., et al. (2019) Pathogen surveillance in the informal settlement, Kibera, Kenya, using a metagenomics approach. *PLoS ONE* **14**: e0222531.

Hermann, M., Fayolle, F., Marchal, R., Podvin, L., Sebald, M., and Vandecasteele, J.P. (1985) Isolation and characterization of butanol-resistant mutants of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **50**: 1238–1243.

Hou, P.-F., Chien, C.-H., Chiang-Hsieh, Y.-F., Tseng, K.-C., Chow, C.-N., Huang, H.-J., and Chang, W.-C. (2018) Paddy-upland rotation for sustainable agriculture with regards to diverse soil microbial community. *Sci Rep* **8**: 7966.

Hu, H., Wang, M., Huang, Y., Xu, Z., Xu, P., Nie, Y., and Tang, H. (2022) Guided by the principles of microbiome engineering: Accomplishments and perspectives for environmental use. *mLife* **1**: 382–398.

Huet, S., Romdhane, S., Breuil, M.-C., Bru, D., Mounier, A., Spor, A., and Philippot, L. (2023) Experimental community coalescence sheds light on microbial interactions in soil and restores impaired functions. *Microbiome* **11**: 42.

Hughes, A.M., Darby, J.F., Dodson, E.J., Wilson, S.J., Turkenburg, J.P., Thomas, G.H., and Wilkinson, A.J. (2022) Peptide transport in *Bacillus subtilis* – structure and specificity in the extracellular solute binding proteins OppA and DppE. *Microbiology* **168**:.

Humbel, F., Rieder, J.H., Franc, Y., Juillerat, P., Scharl, M., Misselwitz, B., et al. (2020) Association of Alterations in Intestinal Microbiota With Impaired Psychological Function in Patients With Inflammatory Bowel Diseases in Remission. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **18**: 2019-2029.e11.

Humphreys, J.R., Bean, Z., Twycross, J., and Winzer, K. (2023) The Lanthipeptide Synthetase-like Protein CA_C0082 Is an Effector of Agr Quorum Sensing in *Clostridium acetobutylicum*. *Microorganisms* **11**: 1460.

Jahn, M., Vorpahl, C., Hübschmann, T., Harms, H., and Müller, S. (2016) Copy number variability of expression plasmids determined by cell sorting and Droplet Digital PCR. *Microb Cell Fact* **15**: 211.

Jahn, M., Vorpahl, C., Türkowsky, D., Lindmeyer, M., Bühler, B., Harms, H., and Müller, S. (2014) Accurate Determination of Plasmid Copy Number of Flow-Sorted Cells using Droplet Digital PCR. *Anal Chem* **86**: 5969–5976.

Jang, Y.-S., Lee, J.Y., Lee, Joungmin, Park, J.H., Im, J.A., Eom, M.-H., et al. (2012) Enhanced Butanol Production Obtained by Reinforcing the Direct Butanol-Forming Route in *Clostridium acetobutylicum*. *mBio* **3**: 10.1128/mbio.00314-12.

Jang, Y.-S., Seong, H.J., Kwon, S.W., Lee, Y.-S., Im, J.A., Lee, H.L., et al. (2021) *Clostridium acetobutylicum* atpG-Knockdown Mutants Increase Extracellular pH in Batch Cultures. *Front Bioeng Biotechnol* **9**:.

Janssen, H., Wang, Y., and Blaschek, H.P. (2014) *Clostridium*: *Clostridium acetobutylicum*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Inc., pp. 449–457.

Jawed, K., Yazdani, S.S., and Koffas, M.Ag. (2019) Advances in the development and application of microbial consortia for metabolic engineering. *Metabolic Engineering Communications* **9**: e00095.

Jiménez-Volkerink, S.N., Jordán, M., Smidt, H., Minguillón, C., Vila, J., and Grifoll, M. (2024) Metagenomic insights into the microbial cooperative networks of a benz(a)anthracene-7,12-dione degrading community from a creosote-contaminated soil. *Science of The Total Environment* **907**: 167832.

Jones, D.T. and Woods, D.R. (1986) Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *MICROBIOL REV* **50**:.

Jones, S.W., Tracy, B.P., Gaida, S.M., and Papoutsakis, E.T. (2011) Inactivation of σF in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Blocks Sporulation Prior to Asymmetric Division and Abolishes σE and σG Protein Expression but Does Not Block Solvent Formation. *Journal of Bacteriology* **193**: 2429–2440.

Kaiser, D. and Losick, R. (1993) How and why bacteria talk to each other. *Cell* **73**: 873–885.

Kalia, V.C. (2013) Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances* **31**: 224–245.

Kang, D., Jacquiod, S., Herschend, J., Wei, S., Nesme, J., and Sørensen, S.J. (2020) Construction of Simplified Microbial Consortia to Degrade Recalcitrant Materials Based on Enrichment and Dilution-to-Extinction Cultures. *Front Microbiol* **10**: 3010.

Kawaguchi, T., Chen, Y.P., Norman, R.S., and Decho, A.W. (2008) Rapid Screening of Quorum-Sensing Signal *N* -Acyl Homoserine Lactones by an In Vitro Cell-Free Assay. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3667–3671.

Kazlauskas, R.J. (2005) Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* **9**: 195–201.

Kim, C.S., Gatsios, A., Cuesta, S., Lam, Y.C., Wei, Z., Chen, H., et al. (2020) Characterization of Autoinducer-3 Structure and Biosynthesis in *E. coli*. *ACS Cent Sci* **6**: 197–206.

Kimura, N. (2014) Metagenomic approaches to understanding phylogenetic diversity in quorum sensing. *Virulence* **5**: 433–442.

Koch, Varney, Thompson, Moghissi, Gould, and Payer (2016) International measures of prevention, application, and economics of corrosion technologies study.

Kojabad, A.A., Farzanehpour, M., Galeh, H.E.G., Dorostkar, R., Jafarpour, A., Bolandian, M., and Nodooshan, M.M. (2021) Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives. *Journal of Medical Virology* **93**: 4182–4197.

Konai, M.M., Dhanda, G., and Haldar, J. (2018) Talking Through Chemical Languages: Quorum Sensing and Bacterial Communication. In *Quorum Sensing and its Biotechnological Applications*. Kalia, V.C. (ed). Singapore: Springer Singapore, pp. 17–42.

Kotte, A.-K., Severn, O., Bean, Z., Schwarz, K., Minton, N.P., and Winzer, K. (2020) RRNPP-type quorum sensing affects solvent formation and sporulation in *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology* **166**: 579–592.

Kylilis, N., Tuza, Z.A., Stan, G.-B., and Polizzi, K.M. (2018) Tools for engineering coordinated system behaviour in synthetic microbial consortia. *Nat Commun* **9**: 2677.

Lade, H., Paul, D., and Kweon, J.H. (2014) Quorum Quenching Mediated Approaches for Control of Membrane Biofouling. *Int J Biol Sci* **10**: 550–565.

Larousse, É. Définitions : quorum - Dictionnaire de français Larousse.

LaSarre, B. and Federle, M.J. (2013) Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 73–111.

Lazazzera, B.A. (2003) The extracellular PHR peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *bacillus subtilis*. *Front Biosci* **8**: d32-45.

Le, K.Y. and Otto, M. (2015) Quorum-sensing regulation in *staphylococci*—an overview. *Front Microbiol* **6**:.

Le Roux, J.J., Clusella-Trullas, S., Mokotjomela, T.M., Mairal, M., Richardson, D.M., Skein, L., et al. (2020) Biotic Interactions as Mediators of Biological Invasions: Insights from South Africa. In *Biological Invasions in South Africa*. van Wilgen, B.W., Measey, J., Richardson, D.M., Wilson, J.R., and Zengeya, T.A. (eds). Cham: Springer International Publishing, pp. 387–427.

Lee, K., Yu, H., Zhang, X., and Choo, K.-H. (2018) Quorum sensing and quenching in membrane bioreactors: Opportunities and challenges for biofouling control. *Bioresource Technology* **270**: 656–668.

Lewis, K. (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* **5**: 48–56.

Li, P., Liang, X., Shi, R., Wang, Y., Han, S., and Zhang, Y. (2023) Unraveling the functional instability of bacterial consortia in crude oil degradation via integrated co-occurrence networks. *Front Microbiol* **14**: 1270916.

Li, Q., Mao, S., Wang, H., and Ye, X. (2022) The Molecular Architecture of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Inhibitors. *Marine Drugs* **20**: 488.

Li, X., Jin, J., Zhang, X., Xu, F., Zhong, J., Yin, Z., et al. (2021) Quantifying the optimal strategy of population control of quorum sensing network in *Escherichia coli*. *npj Syst Biol Appl* **7**: 35.

Liu, D., Chen, Y., Ding, F.-Y., Zhao, T., Wu, J.-L., Guo, T., et al. (2014) Biobutanol production in a *Clostridium acetobutylicum* biofilm reactor integrated with simultaneous product recovery by adsorption. *Biotechnol Biofuels* **7**: 5.

Liu, D., Ge, S., Wang, Z., Li, M., Zhuang, W., Yang, P., et al. (2022) Identification of a sensor histidine kinase (BfcK) controlling biofilm formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Chinese Journal of Chemical Engineering* **46**: 84–93.

Liu, D., Yang, Z., Chen, Y., Zhuang, W., Niu, H., Wu, J., and Ying, H. (2018) *Clostridium acetobutylicum* grows vegetatively in a biofilm rich in heteropolysaccharides and cytoplasmic proteins. *Biotechnol Biofuels* **11**: 315.

Liu, S., Greenhut, I.V., Heist, E.P., Heist, M.R., and Moe, L.A. (2023) Bacterial community dynamics during distilled spirit fermentation: influence of mash recipes and fermentation processes. *Microbiol Spectr* **11**: e01624-23.

Liu, X., Wu, M., Sun, D., and Zang, J. (2010) Cloning, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of LsrR from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun* **66**: 913–915.

Liu, X., Zhuo, S., Jing, X., Yuan, Y., Rensing, C., and Zhou, S. (2019) Flagella act as *Geobacter* biofilm scaffolds to stabilize biofilm and facilitate extracellular electron transfer. *Biosensors and Bioelectronics* **146**: 111748.

López-Contreras, A.M., Gabor, K., Martens, A.A., Renckens, B.A.M., Claassen, P.A.M., Van Der Oost, J., and De Vos, W.M. (2004) Substrate-Induced Production and Secretion of Cellulases by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5238–5243.

Lütke-Eversloh, T. and Bahl, H. (2011) Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology* **22**: 634–647.

Maddocks, S.E. and Oyston, P.C.F. (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**: 3609–3623.

Malgaonkar, A. and Nair, M. (2019) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* mediated by RhlR is regulated by a small RNA PhrD. *Sci Rep* **9**: 432.

Mand, J., Park, H.S., Jack, T.R., and Voordouw, G. (2014) The role of acetogens in microbially influenced corrosion of steel. *Front Microbiol* **5**:.

Marbehan, X., Roger, M., Fournier, F., Infossi, P., Guedon, E., Delecourt, L., et al. (2024) Combining metabolic flux analysis with proteomics to shed light on the metabolic flexibility: the case of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Front Microbiol* **15**: 1336360.

Marenda, M., Zanardo, M., Trovato, A., Seno, F., and Squartini, A. (2016) Modeling quorum sensing trade-offs between bacterial cell density and system extension from open boundaries. *Sci Rep* **6**: 39142.

Marietou, A. (2021) Sulfate reducing microorganisms in high temperature oil reservoirs. In *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp. 99–131.

Martins, M. and Pereira, I.A.C. (2013) Sulfate-reducing bacteria as new microorganisms for biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* **38**: 12294–12301.

Mashruwala, A.A. and Bassler, B.L. (2020) The *Vibrio cholerae* Quorum-Sensing Protein VqmA Integrates Cell Density, Environmental, and Host-Derived Cues into the Control of Virulence. *mBio* **11**: e01572-20.

Medina-Sauza, R.M., Álvarez-Jiménez, M., Delhal, A., Reverchon, F., Blouin, M., Guerrero-Analco, J.A., et al. (2019) Earthworms Building Up Soil Microbiota, a Review. *Front Environ Sci* **7**: 81.

Meng, F., Zhao, M., and Lu, Z. (2022) The LuxS/AI-2 system regulates the probiotic activities of lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology* **127**: 272–279.

Michel-Savin, D., Marchal, R., and Vandecasteele, J.P. (1990) Butyrate production in continuous culture of *Clostridium tyrobutyricum*: effect of end-product inhibition. *Appl Microbiol Biotechnol* **33**:.

Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y.-H., Goto, Y., Réfrégiers, M., and Kardos, J. (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: E3095–E3103.

Miller, S.T., Xavier, K.B., Campagna, S.R., Taga, M.E., Semmelhack, M.F., Bassler, B.L., and Hughson, F.M. (2004) *Salmonella typhimurium* Recognizes a Chemically Distinct Form of the Bacterial Quorum-Sensing Signal AI-2. *Molecular Cell* **15**: 677–687.

Minty, J.J., Singer, M.E., Scholz, S.A., Bae, C.-H., Ahn, J.-H., Foster, C.E., et al. (2013) Design and characterization of synthetic fungal-bacterial consortia for direct production of isobutanol from cellulosic biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 14592–14597.

Miranda, V., Torcato, I.M., Xavier, K.B., and Ventura, M.R. (2019) Synthesis of d-desthiobiotin-AI-2 as a novel chemical probe for autoinducer-2 quorum sensing receptors. *Bioorganic Chemistry* **92**: 103200.

Mukherjee, S. and Bassler, B.L. (2019) Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat Rev Microbiol* **17**: 371–382.

Mukhopadhyay, A., Redding, A.M., Joachimiak, M.P., Arkin, A.P., Borglin, S.E., Dehal, P.S., et al. (2007) Cell-Wide Responses to Low-Oxygen Exposure in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Journal of Bacteriology* **189**: 5996–6010.

Muyzer, G. and Stams, A.J.M. (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**: 441–454.

Nealson, K.H. (1977) Autoinduction of bacterial luciferase: Occurrence, mechanism and significance. *Arch Microbiol* **112**: 73–79.

Nealson, K.H., Platt, T., and Hastings, J.W. (1970) Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *J Bacteriol* **104**: 313–322.

Ng, W.-L., Perez, L., Cong, J., Semmelhack, M.F., and Bassler, B.L. (2012) Broad Spectrum Pro-Quorum-Sensing Molecules as Inhibitors of Virulence in *Vibrios*. *PLoS Pathog* **8**: e1002767.

Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M.V., Makarova, K.S., Zeng, Q., Gibson, R., et al. (2001) Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **183**: 4823–4838.

Novick, R.P. and Geisinger, E. (2008) Quorum Sensing in *Staphylococci*. *Annual Review of Genetics* **42**: 541–564.

Ogata, M. and Arihara, K. (1981) D-Lactate Dehydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris*. *J Biochem* **89**:.

Ohtani, K., Hayashi, H., and Shimizu, T. (2002) The *luxS* gene is involved in cell–cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. *Molecular Microbiology* **44**: 171–179.

Olmedillas-López, S., Olivera-Salazar, R., García-Arranz, M., and García-Olmo, D. (2022) Current and Emerging Applications of Droplet Digital PCR in Oncology: An Updated Review. *Mol Diagn Ther* **26**: 61–87.

Omer Bendori, S., Pollak, S., Hizi, D., and Eldar, A. (2015) The RapP-PhrP Quorum-Sensing System of *Bacillus subtilis* Strain NCIB3610 Affects Biofilm Formation through Multiple Targets, Due to an Atypical Signal-Insensitive Allele of RapP. *J Bacteriol* **197**: 592–602.

Oña, L., Giri, S., Avermann, N., Kreienbaum, M., Thormann, K.M., and Kost, C. (2021) Obligate cross-feeding expands the metabolic niche of bacteria. *Nat Ecol Evol* **5**: 1224–1232.

Oultram, J.D., Loughlin, M., Swinfield, T.-J., Brehm, J.K., Thompson, D.E., and Minton, N.P. (1988) Introduction of plasmids into whole cells of *Clostridium acetobutylicum* by electroporation. *FEMS Microbiology Letters* **56**: 83–88.

Owuna, G., Makut, M.D., Ekeleme, I.K., and Obiekezie, S.O. (2018) Isolation, Identification and Production of Biobutanol by Different *Clostridium* species Isolated from Soil Using Waste Paper and Sugar Cane Molasses. *SAJRM* 1–9.

Paredes, C.J., Alsaker, K.V., and Papoutsakis, E.T. (2005) A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nat Rev Microbiol* **3**: 969–978.

Parveen, N. and Cornell, K.A. (2011) Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism. *Molecular Microbiology* **79**: 7–20.

Pereira, C.S., Thompson, J.A., and Xavier, K.B. (2013) AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 156–181.

Pereira, P.M., He, Q., Valente, F.M.A., Xavier, A.V., Zhou, J., Pereira, I.A.C., and Louro, R.O. (2008) Energy metabolism in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: insights from transcriptome analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* **93**: 347–362.

Porschen, R.K. and Chan, P. (1977) Anaerobic *vibrio*-like organisms cultured from blood: *Desulfovibrio desulfuricans* and *Succinivibrio* species. *Journal of Clinical Microbiology* **5**: 444–447.

Postgate, J.R. and Campbell, L.L. (1966) Classification of *Desulfovibrio* species, the nonsporulating sulfate-reducing bacteria. *Bacteriol Rev* **30**: 732–738.

PubMed *PubMed*.

Qi, F., Thakker, C., Zhu, F., Pena, M., San, K.-Y., and Bennett, G.N. (2018) Improvement of butanol production in *Clostridium acetobutylicum* through enhancement of NAD(P)H availability. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **45**: 993–1002.

Qi, Z., Pei, G., Chen, L., and Zhang, W. (2014) Single-cell analysis reveals gene-expression heterogeneity in syntrophic dual-culture of *Desulfovibrio vulgaris* with *Methanosarcina barkeri*. *Sci Rep* **4**: 7478.

R, A., Biswas, R., Sasidharan, G.M., and Das, S. (2020) Uncommon isolation of *Desulfovibrio vulgaris* from a depressed fracture wound on the forehead. *Anaerobe* **65**: 102264.

Rajeev, L., Luning, E.G., Dehal, P.S., Price, M.N., Arkin, A.P., and Mukhopadhyay, A. (2011) Systematic mapping of two component response regulators to gene targets in a model sulfate reducing bacterium. *Genome Biol* **12**: R99.

Ramesh, Ch. and Mohanraju, R. (2019) A Review on Ecology, Pathogenicity, Genetics and Applications of Bioluminescent Bacteria. *JTMR* **3**: 1–32.

Ranava, D. (2016) Etude d'un consortium microbien producteur d'hydrogène : de l'interaction inter-bactérienne au bioréacteur.

Ranava, D., Backes, C., Karthikeyan, G., Ouari, O., Soric, A., Guiral, M., et al. (2021) Metabolic Exchange and Energetic Coupling between Nutritionally Stressed Bacterial Species: Role of Quorum-Sensing Molecules. *mBio* **12**: e02758-20.

Rao, R.M., Pasha, S.N., and Sowdhamini, R. (2016) Genome-wide survey and phylogeny of S-Ribosylhomocysteinase (LuxS) enzyme in bacterial genomes. *BMC Genomics* **17**: 742.

Reyes Ruiz, L.M., Williams, C.L., and Tamayo, R. (2020) Enhancing bacterial survival through phenotypic heterogeneity. *PLoS Pathog* **16**: e1008439.

Rezzonico, F. and Duffy, B. (2008) Lack of genomic evidence of AI-2 receptors suggests a non-quorum sensing role for *luxS* in most bacteria. *BMC Microbiol* **8**: 154.

Roy, V., Fernandes, R., Tsao, C.-Y., and Bentley, W.E. (2010) Cross Species Quorum Quenching Using a Native AI-2 Processing Enzyme. *ACS Chem Biol* **5**: 223–232.

Rutbeek, N.R., Rezasoltani, H., Patel, T.R., Khajehpour, M., and Prehna, G. (2021) Molecular mechanism of quorum sensing inhibition in *Streptococcus* by the phage protein paratox. *Journal of Biological Chemistry* **297**: 100992.

Scarascia, G., Lehmann, R., Machuca, L.L., Morris, C., Cheng, K.Y., Kaksonen, A., and Hong, P.-Y. (2019) Effect of Quorum Sensing on the Ability of *Desulfovibrio vulgaris* To Form Biofilms and To Biocorrode Carbon Steel in Saline Conditions. *Appl Environ Microbiol* **86**: e01664-19.

Schauder, S. and Bassler, B.L. (2001) The languages of bacteria. *Genes Dev* **15**: 1468–1480.

Sela-Adler, M., Ronen, Z., Herut, B., Antler, G., Vigderovich, H., Eckert, W., and Sivan, O. (2017) Co-existence of Methanogenesis and Sulfate Reduction with Common Substrates in Sulfate-Rich Estuarine Sediments. *Front Microbiol* **8**:.

Shahab, M., Danial, M., Khan, T., Liang, C., Duan, X., Wang, D., et al. (2023) In Silico Identification of Lead Compounds for *Pseudomonas aeruginosa* PqsA Enzyme: Computational Study to Block Biofilm Formation. *Biomedicines* **11**: 961.

Shimkets, L.J. (1990) Social and Developmental Biology of the *Myxobacteria*. *MICROBIOL REV* **54**:.

da Silva, S.M., Voordouw, J., Leitão, C., Martins, M., Voordouw, G., and Pereira, I.A.C. (2013) Function of formate dehydrogenases in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough energy metabolism. *Microbiology* **159**: 1760–1769.

Sim, M.S., Wang, D.T., Zane, G.M., Wall, J.D., Bosak, T., and Ono, S. (2013) Fractionation of sulfur isotopes by *Desulfovibrio vulgaris* mutants lacking hydrogenases or type I tetraheme cytochrome c3. *Front Microbiol* **4**:.

Singh, S.B., Carroll-Portillo, A., and Lin, H.C. (2023) *Desulfovibrio* in the Gut: The Enemy within? *Microorganisms* **11**: 1772.

Sivakumar, K., Scarascia, G., Zaouri, N., Wang, T., Kaksonen, A.H., and Hong, P.-Y. (2019) Salinity-Mediated Increment in Sulfate Reduction, Biofilm Formation, and Quorum Sensing: A Potential Connection Between Quorum Sensing and Sulfate Reduction? *Front Microbiol* **10**: 188.

Spacapan, M., Bez, C., and Venturi, V. (2023) Quorum sensing going wild. *iScience* **26**: 108000.

Špacapan, M., Danevčič, T., Štefanic, P., Porter, M., Stanley-Wall, N.R., and Mandic-Mulec, I. (2020) The ComX Quorum Sensing Peptide of *Bacillus subtilis* Affects Biofilm Formation Negatively and Sporulation Positively. *Microorganisms* **8**: 1131.

Steiner, E., Scott, J., Minton, N.P., and Winzer, K. (2012) An *agr* Quorum Sensing System That Regulates Granulose Formation and Sporulation in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **78**: 1113–1122.

Stephens, K. and Bentley, W.E. (2020) Synthetic Biology for Manipulating Quorum Sensing in Microbial Consortia. *Trends in Microbiology* **28**: 633–643.

Stotani, S. (2018) Manuscript: Design and synthesis of Lsrk kinase inhibitors as quorum sensing modulators.

Stothard, P. (2000) The Sequence Manipulation Suite: JavaScript Programs for Analyzing and Formatting Protein and DNA Sequences. *BioTechniques* **28**: 1102–1104.

Sun, J., Daniel, R., Wagner-Döbler, I., and Zeng, A.-P. (2004) Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evol Biol* **4**: 36.

Surette, M.G., Miller, M.B., and Bassler, B.L. (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli* , *Salmonella typhimurium* , and *Vibrio harveyi* : A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1639–1644.

Swem, L.R., Swem, D.L., O'Loughlin, C.T., Gatmaitan, R., Zhao, B., Ulrich, S.M., and Bassler, B.L. (2009) A Quorum-Sensing Antagonist Targets Both Membrane-Bound and Cytoplasmic Receptors and Controls Bacterial Pathogenicity. *Molecular Cell* **35**: 143–153.

Szatmári, D., Sárkány, P., Kocsis, B., Nagy, T., Miseta, A., Barkó, S., et al. (2020) Intracellular ion concentrations and cation-dependent remodelling of bacterial MreB assemblies. *Sci Rep* **10**: 12002.

Tanet, L., Tamburini, C., Baumas, C., Garel, M., Simon, G., and Casalot, L. (2019) Bacterial Bioluminescence: Light Emission in *Photobacterium phosphoreum* Is Not Under Quorum-Sensing Control. *Front Microbiol* **10**: 365.

Terracciano, J.S. and Kashket, E.R. (1986) Intracellular Conditions Required for Initiation of Solvent Production by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*.

Tomasz, A. and Hotchkiss, R.D. (1964) REGULATION OF THE TRANSFORMABILITY OF PNEUMOCOCCAL CULTURES BY MACROMOLECULAR CELL PRODUCTS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **51**: 480.

Traore, A.S., Hatchikian, C.E., Belaich, J.P., and Le Gall, J. (1981) Microcalorimetric studies of the growth of sulfate-reducing bacteria: energetics of *Desulfovibrio vulgaris* growth. *Journal of Bacteriology* **145**: 191–199.

Tripathi, A.K., Samanta, D., Saxena, P., Thakur, P., Rauniyar, S., Goh, K.M., and Sani, R.K. (2023) Identification of AHL Synthase in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough Using an In-Silico Methodology. *Catalysts* **13**: 364.

Tripathi, A.K., Thakur, P., Saxena, P., Rauniyar, S., Gopalakrishnan, V., Singh, R.N., et al. (2021) Gene Sets and Mechanisms of Sulfate-Reducing Bacteria Biofilm Formation and Quorum Sensing With Impact on Corrosion. *Front Microbiol* **12**: 754140.

Urata, T., Kikuchi, M., Hino, T., Yoda, Y., Tamai, K., Kodaira, Y., and Hitomi, S. (2008) Bacteremia caused by *Desulfovibrio fairfieldensis*. *Journal of Infection and Chemotherapy* **14**: 368–370.

Urvoy, M., Labry, C., L'Helguen, S., and Lami, R. (2022) Quorum Sensing Regulates Bacterial Processes That Play a Major Role in Marine Biogeochemical Cycles. *Front Mar Sci* **9**:.

Valle, A. and Bolívar, J. (2021) *Escherichia coli*, the workhorse cell factory for the production of chemicals. In *Microbial Cell Factories Engineering for Production of Biomolecules*. Singh, V. (ed). Academic Press, pp. 115–137.

Van, T.T.B. and Thu, T.V.M. (2023) Isolation of toxic gas-producing bacteria (*Desulfovibrio spp*.) from shrimp ponds and potential of bacteriophages as biocontrol. *J App Biol Biotech* **11**: 59–65.

Vasse, M., Fiegna, F., Kriesel, B., and Velicer, G.J. (2024) Killer prey: Ecology reverses bacterial predation. *PLOS Biology* **22**: e3002454.

Vidal, J.E., Ma, M., Saputo, J., Garcia, J., Uzal, F.A., and McClane, B.A. (2012) Evidence that the Agr-like quorum sensing system regulates the toxin production, cytotoxicity and pathogenicity of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *Molecular Microbiology* **83**: 179–194.

Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., and Lesterlin, C. (2020) Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. *Genes* **11**: 1239.

Visick, K.L. and Fuqua, C. (2005) Decoding Microbial Chatter: Cell-Cell Communication in Bacteria. *J Bacteriol* **187**: 5507–5519.

Vita, N., Valette, O., Brasseur, G., Lignon, S., Denis, Y., Ansaldi, M., et al. (2015) The primary pathway for lactate oxidation in *Desulfovibrio vulgaris*. *Front Microbiol* **6**:.

Voordouw, G. (1995) The genus *desulfovibrio*: the centennial. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2813–2819.

Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G.A., Fischer, E.R., and Otto, M. (2003) Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J INFECT DIS* **188**: 706–718.

Wadhams, G.H. and Armitage, J.P. (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 1024–1037.

Waite, D.W., Chuvochina, M., Pelikan, C., Parks, D.H., Yilmaz, P., Wagner, M., et al. (2020) Proposal to reclassify the proteobacterial classes *Deltaproteobacteria* and *Oligoflexia*, and the phylum *Thermodesulfobacteria* into four phyla reflecting major functional capabilities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **70**: 5972–6016.

Walker, C.B., He, Z., Yang, Z.K., Ringbauer, J.A., He, Q., Zhou, J., et al. (2009) The Electron Transfer System of Syntrophically Grown *Desulfovibrio vulgaris*. *J Bacteriol* **191**: 5793–5801.

Wang, D., Hunt, K.A., Candry, P., Tao, X., Wofford, N.Q., Zhou, J., et al. (2023) Cross-Feedings, Competition, and Positive and Negative Synergies in a Four-Species Synthetic Community for Anaerobic Degradation of Cellulose to Methane. *mBio* **14**: e03189-22.

Wang, D., Wang, S., Du, X., He, Q., Liu, Y., Wang, Z., et al. (2022) ddPCR surpasses classical qPCR technology in quantitating bacteria and fungi in the environment. *Molecular Ecology Resources* **22**: 2587–2598.

Wang, X., Howe, S., Deng, F., and Zhao, J. (2021) Current Applications of Absolute Bacterial Quantification in Microbiome Studies and Decision-Making Regarding Different Biological Questions. *Microorganisms* **9**: 1797.

Wang, Y., Dall'Agnol, R.F., Bertani, I., Bez, C., and Venturi, V. (2024) Identification of synthetic consortia from a set of plant-beneficial bacteria. *Microbial Biotechnology* **17**: e14330.

Wang, Y., Bian, Z., and Wang, Yan (2022) Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing. *Appl Microbiol Biotechnol* **106**: 6365–6381.

Waters, C.M. and Bassler, B.L. (2005) QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319–346.

Wellington, S. and Greenberg, E.P. (2019) Quorum Sensing Signal Selectivity and the Potential for Interspecies Cross Talk. *mBio* **10**: e00146-19.

Wu, L. and Luo, Y. (2021) Bacterial Quorum-Sensing Systems and Their Role in Intestinal Bacteria-Host Crosstalk. *Front Microbiol* **12**: 611413.

Wuster, A. and Babu, M.M. (2008) Conservation and Evolutionary Dynamics of the agr Cell-to-Cell Communication System across *Firmicutes*. *Journal of Bacteriology* **190**: 743–746.

Xavier, K.B. and Bassler, B.L. (2005) Regulation of Uptake and Processing of the Quorum-Sensing Autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **187**: 238–248.

Xian, Z.-N., Yin, C.-F., Zheng, L., Zhou, N.-Y., and Xu, Y. (2023) Biodegradation of additive-free polypropylene by bacterial consortia enriched from the ocean and from the gut of Tenebrio molitor larvae. *Science of The Total Environment* **892**: 164721.

Xu, X., Li, C., Cao, W., Yan, L., Cao, L., Han, Q., et al. (2024) Bacterial growth and environmental adaptation via thiamine biosynthesis and thiamine-mediated metabolic interactions. *The ISME Journal* **18**: wrae157.

Xue, T., Zhao, L., Sun, H., Zhou, X., and Sun, B. (2009) LsrR-binding site recognition and regulatory characteristics in *Escherichia coli* AI-2 quorum sensing. *Cell Res* **19**: 1258–1268.

Yan, L., Allen, M.S., Simpson, M.L., Sayler, G.S., and Cox, C.D. (2007) Direct quantification of N-(3-oxo-hexanoyl)-l-homoserine lactone in culture supernatant using a whole-cell bioreporter. *Journal of Microbiological Methods* **68**: 40–45.

Yang, Z., Wang, Z., Lei, M., Zhu, J., Yang, Y., Wu, S., et al. (2020) Effects of Spo0A on *Clostridium acetobutylicum* with an emphasis on biofilm formation. *World J Microbiol Biotechnol* **36**: 80.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T.L. (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**: 134.

Yu, H., Du, C., Qu, F., He, J., and Rong, H. (2022) Efficient biostimulants for bacterial quorum quenching to control fouling in MBR. *Chemosphere* **286**: 131689.

Yu, L., Li, W., Li, Q., Chen, X., Ni, J., Shang, F., and Xue, T. (2020) Role of LsrR in the regulation of antibiotic sensitivity in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Poultry Science* **99**: 3675–3687.

Yu, X., Lin, S.-W., Kobayashi, M., and Ge, W. (2010) Expression of recombinant zebrafish follicle-stimulating hormone (FSH) in methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Fish Physiol Biochem* **36**: 273–281.

Zhang, Guishan, Zhang, F., Ding, G., Li, J., Guo, X., Zhu, J., et al. (2012) Acyl homoserine lactone-based quorum sensing in a methanogenic archaeon. *The ISME Journal* **6**: 1336–1344.

Zhang, H., Wang, C., and Zhang, L. (2004) The quormone degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p)ppGpp. *Molecular Microbiology* **52**: 1389–1401.

Zhang, H., Yang, P., Wang, Z., Li, M., Zhang, J., Liu, D., et al. (2021) *Clostridium acetobutylicum* Biofilm: Advances in Understanding the Basis. *Front Bioeng Biotechnol* **9**: 658568.

Zhang, L., Li, S., Liu, X., Wang, Z., Jiang, M., Wang, R., et al. (2020) Sensing of autoinducer-2 by functionally distinct receptors in prokaryotes. *Nat Commun* **11**: 5371.

Zhang, Y., Zagnitko, O., Rodionova, I., Osterman, A., and Godzik, A. (2011) The FGGY Carbohydrate Kinase Family: Insights into the Evolution of Functional Specificities. *PLoS Comput Biol* **7**: e1002318.

Zheng, S., Li, M., Liu, Y., and Liu, F. (2021) *Desulfovibrio* feeding *Methanobacterium* with electrons in conductive methanogenic aggregates from coastal zones. *Water Research* **202**: 117490.

Zhou, J., He, Q., Hemme, C.L., Mukhopadhyay, A., Hillesland, K., Zhou, A., et al. (2011) How sulphate-reducing microorganisms cope with stress: lessons from systems biology. *Nat Rev Microbiol* **9**: 452–466.

Zhou, Y. and Imlay, J.A. (2020) *Escherichia coli* K-12 Lacks a High-Affinity Assimilatory Cysteine Importer. *mBio* **11**: 10.1128/mbio.01073-20.

Annexes

Annexe 1 : Script Bash d'extraction des séquences protéiques de la base de données KEGG.

```
Script 1 : Traitement des données KEGG vers Uniprot

# Création d'un dossier nommé KEGG_way et entrée dans ce dossier
mkdir KEGG_way
cd KEGG_way

# Téléchargement du fichier de liens pour le pathway KEGG (ex. ko02024)
wget -O A_RDF_ko.txt https://www.genome.jp/dbget-bin/get_linkdb?-N+path:ko02024

# Extraction de la colonne des liens KEGG et enregistrement dans B_RDF_ko_c3.txt
cut -f 3 A_RDF_ko.txt >> B_RDF_ko_c3.txt

# Nettoyage des caractères "<" et ">" dans le fichier
sed 's/<//g' B_RDF_ko_c3.txt >> C_cutlinkdb1.txt
sed 's/>//g' C_cutlinkdb1.txt >> D_cutlinkdb2.txt

# Modification des liens vers Uniprot et enregistrement dans E_linkKO.txt
sed "s=https://www.kegg.jp/entry/=https://www.genome.jp/kegg-bin/uniprot_list?ko:=" D_cutlinkdb2.txt >> E_linkKO.txt

# Création d'un nouveau dossier KEGG_way1 et déplacement de E_linkKO.txt
mkdir KEGG_way1
mv E_linkKO.txt KEGG_way1/
cd KEGG_way1

# Téléchargement du contenu des URLs de E_linkKO.txt dans testfile.txt
wget -O- -i E_linkKO.txt >> testfile.txt

# Séparation de testfile.txt en fichiers individuels (out*.txt) pour chaque protéine
awk '/DOCTYPE/{n++}{print >"out" n ".txt" }' testfile.txt

# Filtrage pour ne garder que les lignes contenant "uniprot"
find . -type f -print0 | xargs -0 sed -i '/uniprot/!d'

# Nettoyage des fichiers générés : suppression de "<td><a" et "http" vers "https"
find . -type f -print0 | xargs -0 sed -i 's/<td><a//g'
find . -type f -print0 | xargs -0 sed -i "s/  href='http/https/g"

# Suppression des balises HTML "</a> </td>"
find . -type f -print0 | xargs -0 sed -i 's=</a> </td>==g'

# Suppression des éléments après "'" et ajout de l'extension ".fasta"
find . -type f -print0 | xargs -0 sed -i "s:'.*$::"
find . -type f -print0 | xargs -0 sed -i "s:$:.fasta:"
```

Annexe 2 : Script Bash de recherche d'homologie protéique.

```
# Déplace tous les fichiers avec l'extension .fasta dans le dossier bin
# du répertoire ncbi-blast-2.13.0+ où se trouve déjà le fichier .faa
# correspondant a l'organisme étudié.

mv *.fasta ncbi-blast-2.13.0+-x64-linux/ncbi-blast-2.13.0+/bin/

# Se positionne dans le dossier bin de ncbi-blast-2.13.0+ où se trouvent
# les fichiers .fasta et les exécutables BLAST

cd ncbi-blast-2.13.0+-x64-linux/ncbi-blast-2.13.0+/bin/

# Change les permissions pour rendre tous les fichiers du dossier exécutables

chmod +x *

# Crée une base de données BLAST à partir des fichiers .faa
# pour une analyse BLAST de type protéique

# "DB" est le nom de la base de données créée
# "*.faa" correspond aux fichiers d'entrée

./makeblastdb -in *.faa -dbtype prot -out DB

# Exécute une recherche BLAST de type BLASTp (pour protéines)
# en utilisant le fichier "out1.fasta" comme requête

# Recherche dans la base de données "DB" précédemment créée
# et enregistre les résultats dans "output1.txt"

# Les options utilisées :

#   -outfmt 6 : format de sortie tabulaire

#   -evalue 0.000001 : fixe le seuil de l'e-value

#   -max_target_seqs 1 : limite à un seul alignement par séquence cible

./blastp -query out1.fasta -db db.... -out output1.txt -outfmt 6 -evalue 0.000001 -max_target_seqs 1

# la commande a été répété autant de fois que nécessaire pour prendre
# l'ensemble des fichiers présents en adaptant le nom d'entré et de sorti.

./blastp -query out2.fasta -db sortie -out output2.txt -outfmt 6 -evalue 0.000001 -max_target_seqs 1

./blastp -query out3.fasta -db sortie -out output3.txt -outfmt 6 -evalue 0.000001 -max_target_seqs 1

./blastp -query out4.fasta -db sortie -out output4.txt -outfmt 6 -evalue 0.000001 -max_target_seqs 1

./blastp -query out5.fasta -db sortie -out output5.txt -outfmt 6 -evalue 0.000001 -max_target_seqs 1

...

#Fin script 2
```

Annexe 3 : Analyse de la fraction de purification de LsrR-like (*DVU_3131*) par protéomique.

Accession	Description	Coverage [%]	# Peptides	# PSMs	# Unique Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score Sequest HT: Sequest HT	# Peptides (by Search Engine): Sequest HT
123456	Q726H7	98	33	1527	33	329	35,4	6,96	6637,81	33
195927602	Chain A, Beta-lactamase	52	16	189	16	263	28,8	5,67	661,52	16
253978177	D-tagatose 1,6-bisphosphate aldolase 2, subunit [Escherichia coli BL21(DE3)]	82	22	175	22	420	47	5,78	720,65	22
446438280	MULTISPECIES: molecular chaperone DnaK [Proteobacteria]	77	43	91	43	638	69,1	4,97	324,12	43
253976527	beta-D-galactosidase [Escherichia coli BL21(DE3)]	41	30	68	30	1024	116,4	5,5	234,05	30

Annexe 4 : Analyse transcriptomique de *Nv*H en présence d'AI-2.

Gène	Old locus tag	baseMean	log2Fold Change	FC	lfcSE	stat	pvalue	padj
DVU_RS13165	DVU_2809	678,24	-1,97	0,26	0,38	-5,23	1,69E-07	3,30E-05
DVU_RS13180	DVU_2812	2156,29	-1,94	0,26	0,36	-5,39	7,13E-08	1,61E-05
DVU_RS13175	DVU_2811	554,65	-1,78	0,29	0,33	-5,38	7,28E-08	1,61E-05
DVU_RS16865		142,09	-1,65	0,32	0,31	-5,36	8,20E-08	1,70E-05
DVU_RS13170	DVU_2810	497,82	-1,43	0,37	0,31	-4,54	5,63E-06	7,78E-04
DVU_RS02575	DVU_0531	1197,49	-1,23	0,43	0,33	-3,73	1,95E-04	1,82E-02
DVU_RS04475	DVU_0943	5260,13	1,01	2,01	0,25	3,96	7,48E-05	8,26E-03
DVU_RS12905	DVU_2751	95,81	1,31	2,48	0,33	3,92	8,68E-05	8,99E-03
DVU_RS12915	DVU_2753	50,97	1,37	2,58	0,37	3,72	2,00E-04	1,82E-02
DVU_RS08390	DVU_1766	93,04	1,51	2,85	0,43	3,52	4,37E-04	3,81E-02
DVU_RS01335	DVU_0273	1627,82	1,54	2,92	0,42	3,72	2,03E-04	1,82E-02
DVU_RS03615	DVU_0763	111,72	1,60	3,04	0,43	3,76	1,70E-04	1,66E-02
DVU_RS08380	DVU_1764	71,79	1,67	3,18	0,34	4,90	9,70E-07	1,61E-04
DVU_RS01510	DVU_0304	448,63	1,73	3,31	0,42	4,06	4,82E-05	5,71E-03
DVU_RS12040	DVU_2574	684,24	1,75	3,35	0,41	4,28	1,86E-05	2,38E-03
DVU_RS12460	DVU_2663	49,13	1,76	3,38	0,38	4,61	4,00E-06	5,76E-04
DVU_RS08385	DVU_1765	773,21	1,76	3,39	0,27	6,44	1,20E-10	4,99E-08
DVU_RS08395	DVU_1767	59,60	1,78	3,43	0,46	3,84	1,24E-04	1,24E-02
DVU_RS09870	DVU_2092	102,01	1,86	3,63	0,46	4,02	5,84E-05	6,68E-03
DVU_RS08405	DVU_1769	2174,11	1,86	3,63	0,28	6,68	2,43E-11	1,28E-08
DVU_RS00895	DVU_0186	6399,09	1,87	3,65	0,47	3,95	7,89E-05	8,44E-03
DVU_RS09865	DVU_2091	177,62	2,03	4,10	0,49	4,19	2,78E-05	3,42E-03
DVU_RS00865	DVU_0177	3546,23	2,28	4,85	0,44	5,17	2,36E-07	4,13E-05
DVU_RS09875	DVU_2093	397,52	2,36	5,13	0,51	4,63	3,70E-06	5,58E-04
DVU_RS12030	DVU_2571	2639,99	2,36	5,14	0,40	5,90	3,57E-09	1,08E-06
DVU_RS11880	DVU_2540	173,48	2,38	5,22	0,40	6,03	1,69E-09	5,60E-07
DVU_RS08410	DVU_1770	90,14	2,41	5,30	0,40	6,07	1,26E-09	4,64E-07
DVU_RS09885	DVU_2095	1266,32	2,47	5,56	0,58	4,30	1,71E-05	2,26E-03
DVU_RS12470	DVU_2665	30,04	2,52	5,72	0,48	5,21	1,85E-07	3,41E-05
DVU_RS09880	DVU_2094	4270,66	2,55	5,86	0,53	4,77	1,83E-06	2,89E-04
DVU_RS16715	DVU_2573	424,88	2,56	5,88	0,38	6,66	2,70E-11	1,28E-08
DVU_RS12465	DVU_2664	90,14	2,57	5,93	0,37	6,90	5,22E-12	3,46E-09
DVU_RS06650	DVU_1411	11073,66	2,80	6,97	0,48	5,88	4,08E-09	1,13E-06
DVU_RS12035	DVU_2572	943,14	2,98	7,87	0,43	6,99	2,82E-12	2,34E-09
DVU_RS11885	DVU_2541	25,62	3,16	8,92	0,54	5,82	5,92E-09	1,51E-06
DVU_RS01765	DVU_0359	687,01	3,19	9,12	0,27	11,71	1,11E-31	1,23E-28
DVU_RS12910	DVU_2752	4093,83	3,63	12,36	0,30	12,15	5,51E-34	1,83E-30
DVU_RS12480	DVU_2667	2332,22	4,93	30,56	0,42	11,84	2,39E-32	3,97E-29

Annexe 5 : Ensemble des catégories COG.

COG categories	COG Letters
Traduction, structure ribosomale et biogenèse	J
Traitement et modification des ARNs	A
Transcription	K
Réplication, recombinaison et réparation	L
Structure et dynamique de la chromatine	B
Contrôle du cycle cellulaire, division cellulaire, partitionnement des chromo	D
Structure nucléaire	Y
Mécanismes de défense	V
Transduction du signal	T
Biogenèse de la paroi/membrane/enveloppe cellulaire	M
Motilité cellulaire	N
Cytosquelette	Z
Structures extracellulaires	W
Trafic intracellulaire, sécrétion et transport vésiculaire	U
Modification post-traductionnelle, renouvellement des protéines, chaperon	O
Mobilome : Prophage, transposons	X
Production et conversion d'énergie	C
Transport et métabolisme des glucides	G
Transport et métabolisme des acides aminés	E
Transport et métabolisme des nucléotides	F
Transport et métabolisme des coenzymes	H
Transport et métabolisme des lipides	I
Transport et métabolisme des ions inorganiques	P
Biosynthèse, transport et catabolisme des métabolites secondaires	Q
Prédiction de fonction générale uniquement	R
Fonction inconnue	S

Annexe 6 : Analyse transcriptomique de *C. acetobutylicum* en consortium avec *Nv*H.

Gène	Old locus tag	baseMean	log2Fold Change	FC	lfcSE	stat	pvalue	padj
CA_RS04960	CA_C0932	30,18	-8,23	299,76	1,69	-4,86	1,17E-06	2,53E-05
CA_RS00580	CA_C0106	1020,61	-5,97	62,83	1,11	-5,38	7,50E-08	2,17E-06
CA_RS00570	CA_C0104	307,90	-5,94	61,32	1,19	-4,98	6,21E-07	1,43E-05
CA_RS04950	CA_C0930	2667,39	-5,91	60,25	0,58	-10,24	1,34E-24	1,73E-21
CA_RS16320	CA_C3179	422,79	-5,89	59,48	0,69	-8,55	1,22E-17	3,63E-15
CA_RS01175	CA_C0209	3157,26	-5,73	52,90	0,73	-7,84	4,57E-15	6,77E-13
CA_RS00585	CA_C0107	928,12	-5,69	51,49	0,99	-5,74	9,33E-09	3,56E-07
CA_RS00590	CA_C0108	1322,30	-5,58	47,95	1,04	-5,36	8,27E-08	2,38E-06
CA_RS00595	CA_C0109	1214,10	-5,55	46,75	1,09	-5,11	3,20E-07	8,16E-06
CA_RS00575	CA_C0105	144,84	-5,39	42,08	1,20	-4,51	6,56E-06	1,13E-04
CA_RS00565	CA_C0103	310,34	-5,23	37,55	1,13	-4,64	3,41E-06	6,50E-05
CA_RS00600	CA_C0110	829,87	-5,21	37,02	1,03	-5,05	4,36E-07	1,03E-05
CA_RS02255		35,03	-5,16	35,81	0,95	-5,45	4,93E-08	1,63E-06
CA_RS13575	CA_C2654	57214,31	-4,96	31,10	0,92	-5,39	7,02E-08	2,05E-06
CA_RS17110	CA_C3325	7893,19	-4,81	28,00	0,89	-5,42	5,86E-08	1,79E-06
CA_RS17120	CA_C3327	7746,84	-4,68	25,60	0,92	-5,11	3,22E-07	8,16E-06
CA_RS17115	CA_C3326	5852,74	-4,66	25,29	0,90	-5,16	2,42E-07	6,58E-06
CA_RS04945	CA_C0929	677,04	-4,62	24,56	0,61	-7,61	2,80E-14	3,72E-12
CA_RS16850	CA_C3274	5893,86	-4,42	21,46	0,55	-8,08	6,30E-16	1,16E-13
CA_RS13565	CA_C2652	28482,73	-4,31	19,85	0,85	-5,07	3,90E-07	9,37E-06
CA_RS01170	CA_C0208	1319,62	-4,31	19,78	0,53	-8,10	5,55E-16	1,07E-13
CA_RS00560	CA_C0102	839,12	-4,23	18,82	1,06	-4,01	6,18E-05	7,38E-04
CA_RS04065	CA_C0754	390,25	-4,15	17,71	0,49	-8,47	2,44E-17	6,12E-15
CA_RS13570	CA_C2653	6529,38	-3,99	15,89	0,86	-4,63	3,62E-06	6,76E-05
CA_RS13530	CA_C2645	17171,98	-3,95	15,47	0,87	-4,53	5,93E-06	1,03E-04
CA_RS16325	CA_C3180	132,54	-3,85	14,41	0,65	-5,88	4,18E-09	1,73E-07
CA_RS16855	CA_C3275	9720,55	-3,83	14,21	0,55	-6,93	4,35E-12	4,09E-10
CA_RS04050	CA_C0751	25353,74	-3,80	13,97	0,45	-8,40	4,64E-17	1,05E-14
CA_RS00865	CA_Cr010	4,21	-3,80	13,91	1,33	-2,85	4,38E-03	2,50E-02
CA_RS04045	CA_C0750	596,75	-3,77	13,63	0,58	-6,50	8,30E-11	6,15E-09
CA_RS13015	CA_C2540	17,03	-3,68	12,84	0,88	-4,18	2,95E-05	4,05E-04
CA_RS02260	CA_C0403	14542,55	-3,65	12,58	0,55	-6,63	3,29E-11	2,70E-09
CA_RS16330	CA_C3181	178,98	-3,63	12,38	0,71	-5,12	3,04E-07	7,81E-06
CA_RS03810	CA_C0706	9699,07	-3,63	12,37	0,50	-7,24	4,43E-13	4,87E-11
CA_RS10210	CA_C1972	16,50	-3,53	11,54	1,08	-3,26	1,12E-03	8,62E-03
CA_RS17785	CA_C3459	4552,52	-3,52	11,44	0,41	-8,52	1,64E-17	4,51E-15
CA_RS13760	CA_C2668	24,65	-3,50	11,29	0,90	-3,89	9,89E-05	1,08E-03
CA_RS14490	CA_C2816	52,30	-3,40	10,56	0,55	-6,21	5,20E-10	3,23E-08
CA_RS08715	CA_C1676	76,20	-3,32	9,98	0,81	-4,11	3,92E-05	5,05E-04
CA_RS04415	CA_C0824	396,72	-3,29	9,77	0,69	-4,80	1,61E-06	3,37E-05
CA_RS08155	CA_C1563	923,69	-3,26	9,58	0,55	-5,89	3,82E-09	1,62E-07
CA_RS13560	CA_C2651	6003,76	-3,24	9,43	0,80	-4,05	5,02E-05	6,26E-04
CA_RS13555	CA_C2650	14282,20	-3,22	9,29	0,73	-4,39	1,11E-05	1,75E-04
CA_RS12980	CA_C2534	602,27	-3,18	9,07	0,43	-7,39	1,44E-13	1,73E-11
CA_RS02960	CA_C0539	16795,82	-3,12	8,72	0,51	-6,13	8,82E-10	4,82E-08
CA_RS16840	CA_C3272	6089,45	-3,12	8,70	0,58	-5,41	6,32E-08	1,86E-06
CA_RS16715	CA_C3246	31,74	-3,10	8,55	1,06	-2,92	3,55E-03	2,13E-02
CA_RS15720	CA_C3059	1726,49	-3,09	8,51	0,50	-6,17	6,83E-10	3,87E-08
CA_RS12870	CA_C2511	27,94	-3,06	8,34	0,56	-5,42	5,82E-08	1,79E-06

CA_RS10120	CA_C1954	4239,23	-3,05	8,29	0,47	-6,44	1,19E-10	8,65E-09
CA_RS19510	CA_P0058	662,10	-3,05	8,26	0,89	-3,44	5,87E-04	5,08E-03
CA_RS15715	CA_C3058	4413,25	-3,04	8,22	0,51	-5,99	2,10E-09	9,88E-08
CA_RS15710	CA_C3057	1397,90	-3,01	8,08	0,52	-5,78	7,59E-09	2,99E-07
CA_RS08080	CA_C1548	4077,03	-3,01	8,04	0,76	-3,98	6,96E-05	8,15E-04
CA_RS16825	CA_C3269	678,73	-3,00	7,99	0,97	-3,08	2,08E-03	1,41E-02
CA_RS08160	CA_C1564	2815,80	-2,99	7,97	0,53	-5,67	1,40E-08	5,11E-07
CA_RS16655	CA_C3235	877,03	-2,99	7,94	0,49	-6,10	1,08E-09	5,63E-08
CA_RS15705	CA_C3056	1212,49	-2,99	7,92	0,46	-6,50	8,19E-11	6,15E-09
CA_RS13525	CA_C2644	34055,85	-2,94	7,66	0,77	-3,80	1,48E-04	1,53E-03
CA_RS08150	CA_C1562	4261,90	-2,93	7,65	0,54	-5,41	6,25E-08	1,85E-06
CA_RS12590	CA_C2455	50,95	-2,92	7,59	0,70	-4,17	3,04E-05	4,13E-04
CA_RS08140	CA_C1560	7997,60	-2,91	7,49	0,41	-7,03	2,08E-12	2,01E-10
CA_RS14515	CA_C2821	160,22	-2,88	7,37	0,65	-4,43	9,46E-06	1,52E-04
CA_RS07140	CA_C1357	407,89	-2,88	7,34	0,47	-6,09	1,14E-09	5,84E-08
CA_RS12620	CA_C2461	486,74	-2,87	7,32	0,39	-7,43	1,06E-13	1,32E-11
CA_RS11810	CA_C2302	130,37	-2,86	7,26	0,66	-4,31	1,64E-05	2,45E-04
CA_RS00255	CA_C0042	2049,17	-2,84	7,17	0,33	-8,56	1,14E-17	3,63E-15
CA_RS08145	CA_C1561	8464,82	-2,81	7,03	0,42	-6,78	1,22E-11	1,09E-09
CA_RS16335	CA_C3182	165,71	-2,81	7,01	0,51	-5,46	4,69E-08	1,56E-06
CA_RS12970	CA_C2532	126,09	-2,79	6,93	0,35	-7,87	3,48E-15	5,82E-13
CA_RS05485	CA_C1032	95,51	-2,79	6,92	0,72	-3,86	1,13E-04	1,21E-03
CA_RS17780	CA_C3458	1094,16	-2,79	6,91	0,29	-9,68	3,76E-22	2,90E-19
CA_RS08170	CA_C1566	484,58	-2,78	6,88	0,57	-4,91	8,99E-07	1,98E-05
CA_RS03880		20,30	-2,77	6,82	1,02	-2,70	6,87E-03	3,55E-02
CA_RS08720	CA_C1677	243,81	-2,76	6,79	0,64	-4,32	1,55E-05	2,34E-04
CA_RS04530		13,30	-2,75	6,74	0,92	-2,98	2,85E-03	1,82E-02
CA_RS15700	CA_C3055	1314,57	-2,75	6,72	0,39	-7,08	1,39E-12	1,37E-10
CA_RS12770	CA_C2491	259,96	-2,72	6,57	0,53	-5,13	2,83E-07	7,31E-06
CA_RS15695	CA_C3054	488,86	-2,71	6,53	0,39	-6,91	4,82E-12	4,43E-10
CA_RS04435	CA_C0828	295,53	-2,68	6,42	0,44	-6,05	1,48E-09	7,15E-08
CA_RS02965	CA_C0540	15175,22	-2,68	6,41	0,47	-5,73	9,84E-09	3,72E-07
CA_RS03210	CA_C0588	675,30	-2,68	6,40	0,37	-7,21	5,48E-13	5,70E-11
CA_RS17795	CA_C3461	5760,20	-2,68	6,39	0,34	-7,81	5,65E-15	8,06E-13
CA_RS15680	CA_C3051	1088,22	-2,67	6,38	0,48	-5,58	2,42E-08	8,33E-07
CA_RS04330		16,15	-2,67	6,38	0,88	-3,05	2,31E-03	1,53E-02
CA_RS15670	CA_C3049	906,69	-2,67	6,35	0,47	-5,63	1,82E-08	6,50E-07
CA_RS05480	CA_C1031	3219,29	-2,66	6,33	0,62	-4,33	1,49E-05	2,28E-04
CA_RS02365	CA_C0423	415,44	-2,65	6,29	0,98	-2,70	6,88E-03	3,55E-02
CA_RS12625	CA_C2462	411,73	-2,65	6,28	0,36	-7,33	2,35E-13	2,67E-11
CA_RS16650	CA_C3234	1119,18	-2,64	6,23	0,46	-5,78	7,27E-09	2,89E-07
CA_RS08085	CA_C1549	1247,86	-2,63	6,20	0,80	-3,31	9,47E-04	7,51E-03
CA_RS16820	CA_C3268	2099,46	-2,63	6,19	0,94	-2,81	4,95E-03	2,75E-02
CA_RS11820	CA_C2304	43,74	-2,61	6,12	0,67	-3,92	8,93E-05	9,94E-04
CA_RS16830	CA_C3270	141,19	-2,61	6,10	0,97	-2,69	7,15E-03	3,65E-02
CA_RS03885	CA_C0718	3631,31	-2,60	6,08	0,67	-3,90	9,61E-05	1,06E-03
CA_RS16845	CA_C3273	1034,69	-2,58	5,97	0,58	-4,47	7,66E-06	1,27E-04
CA_RS12065	CA_C2354	485,53	-2,57	5,92	0,80	-3,20	1,38E-03	1,03E-02
CA_RS12060	CA_C2353	377,49	-2,56	5,92	0,79	-3,24	1,18E-03	9,00E-03
CA_RS00245	CA_C0040	2901,19	-2,56	5,89	0,27	-9,59	8,96E-22	5,76E-19

CA_RS03490	CA_C0643	422,68	-2,54	5,82	0,73	-3,50	4,69E-04	4,16E-03
CA_RS08165	CA_C1565	1563,61	-2,54	5,80	0,54	-4,66	3,21E-06	6,25E-05
CA_RS03955	CA_C0732	194,49	-2,52	5,72	0,52	-4,83	1,37E-06	2,93E-05
CA_RS16340	CA_C3183	627,57	-2,51	5,69	0,25	-10,18	2,39E-24	2,30E-21
CA_RS04700	CA_C0880	4218,88	-2,51	5,68	0,56	-4,50	6,67E-06	1,13E-04
CA_RS18775	CA_C3650	5660,91	-2,50	5,66	0,49	-5,08	3,78E-07	9,17E-06
CA_RS19785	CA_P0115	23,49	-2,49	5,62	0,77	-3,23	1,25E-03	9,45E-03
CA_RS10195	CA_C1969	154,59	-2,49	5,61	0,74	-3,38	7,18E-04	5,99E-03
CA_RS00265	CA_C0044	173,95	-2,48	5,58	0,35	-7,10	1,29E-12	1,30E-10
CA_RS06945	CA_C1318	3560,81	-2,46	5,49	0,56	-4,42	9,99E-06	1,60E-04
CA_RS18245	CA_C3552	2195,75	-2,45	5,46	0,26	-9,41	5,17E-21	2,22E-18
CA_RS11815	CA_C2303	16,89	-2,44	5,42	0,77	-3,18	1,46E-03	1,08E-02
CA_RS03865	CA_C0717	3252,03	-2,44	5,41	0,71	-3,43	6,13E-04	5,25E-03
CA_RS04965	CA_C0933	5,83	-2,43	5,41	0,93	-2,61	8,95E-03	4,26E-02
CA_RS14520	CA_C2822	381,46	-2,43	5,40	0,38	-6,40	1,58E-10	1,11E-08
CA_RS13325	CA_C2603	84,38	-2,41	5,33	0,76	-3,18	1,49E-03	1,09E-02
CA_RS02445	CA_C0439	284,85	-2,41	5,31	0,52	-4,66	3,23E-06	6,25E-05
CA_RS01180	CA_C0210	697,88	-2,40	5,27	0,55	-4,35	1,36E-05	2,09E-04
CA_RS20030	CA_P0164	125,08	-2,40	5,27	0,73	-3,26	1,11E-03	8,57E-03
CA_RS04695	CA_C0879	1168,04	-2,40	5,26	0,47	-5,15	2,62E-07	6,95E-06
CA_RS08635	CA_C1660	44,31	-2,39	5,26	0,53	-4,54	5,73E-06	1,01E-04
CA_RS12055	CA_C2352	148,38	-2,39	5,25	0,74	-3,22	1,29E-03	9,65E-03
CA_RS13545	CA_C2648	2855,29	-2,38	5,21	0,35	-6,75	1,53E-11	1,34E-09
CA_RS11520	CA_C2242	300,57	-2,38	5,21	0,47	-5,09	3,56E-07	8,80E-06
CA_RS08075	CA_C1547	394,89	-2,38	5,20	0,58	-4,11	4,04E-05	5,19E-04
CA_RS17535	CA_C3410	3127,07	-2,38	5,20	0,65	-3,68	2,33E-04	2,28E-03
CA_RS02685	CA_C0487	387,28	-2,37	5,16	0,69	-3,42	6,15E-04	5,26E-03
CA_RS11570	CA_C2252	967,48	-2,37	5,16	0,67	-3,53	4,09E-04	3,70E-03
CA_RS12635	CA_C2464	98,73	-2,37	5,16	0,46	-5,11	3,26E-07	8,20E-06
CA_RS15685	CA_C3052	954,57	-2,36	5,12	0,40	-5,95	2,72E-09	1,21E-07
CA_RS12945	CA_C2527	140,94	-2,35	5,11	0,25	-9,46	3,22E-21	1,55E-18
CA_RS07895	CA_C1512	256,79	-2,35	5,11	0,63	-3,75	1,76E-04	1,79E-03
CA_RS16925	CA_C3289	38186,15	-2,35	5,10	0,56	-4,19	2,80E-05	3,88E-04
CA_RS20155		1906,27	-2,34	5,05	0,50	-4,71	2,48E-06	4,96E-05
CA_RS00220	CA_C0035	263,41	-2,33	5,04	0,48	-4,89	1,03E-06	2,25E-05
CA_RS03950	CA_C0731	1216,58	-2,31	4,97	0,41	-5,69	1,26E-08	4,67E-07
CA_RS14370	CA_C2792	137,68	-2,31	4,97	0,47	-4,96	7,17E-07	1,64E-05
CA_RS14210	CA_C2759	365,06	-2,31	4,96	0,49	-4,67	2,98E-06	5,90E-05
CA_RS12865	CA_C2510	23,38	-2,30	4,94	0,58	-3,95	7,94E-05	9,14E-04
CA_RS19850	CA_P0128	141,39	-2,30	4,92	0,68	-3,39	6,93E-04	5,83E-03
CA_RS12630	CA_C2463	85,41	-2,30	4,92	0,38	-6,11	1,02E-09	5,39E-08
CA_RS19495	CA_P0055	455,79	-2,29	4,89	0,77	-2,98	2,86E-03	1,82E-02
CA_RS02385	CA_C0427	19,98	-2,27	4,82	0,79	-2,87	4,12E-03	2,38E-02
CA_RS10880	CA_C2112	45722,75	-2,26	4,78	0,62	-3,65	2,65E-04	2,51E-03
CA_RS00645	CA_C0119	90,84	-2,25	4,77	0,46	-4,85	1,22E-06	2,62E-05
CA_RS15665	CA_C3048	1062,97	-2,25	4,76	0,41	-5,43	5,69E-08	1,79E-06
CA_RS15690	CA_C3053	451,71	-2,24	4,73	0,44	-5,08	3,76E-07	9,17E-06
CA_RS03875		691,96	-2,23	4,69	0,55	-4,03	5,59E-05	6,86E-04
CA_RS17205	CA_C3343	6389,23	-2,22	4,67	0,49	-4,50	6,66E-06	1,13E-04
CA_RS15675	CA_C3050	219,52	-2,20	4,60	0,40	-5,51	3,63E-08	1,23E-06

CA_RS20160		383,26	-2,20	4,60	0,53	-4,15	3,37E-05	4,46E-04
CA_RS16920	CA_C3288	7275,55	-2,20	4,59	0,48	-4,56	5,08E-06	9,14E-05
CA_RS13380	CA_C2615	7,33	-2,20	4,58	0,80	-2,76	5,76E-03	3,12E-02
CA_RS10175	CA_C1964	257,83	-2,19	4,56	0,79	-2,78	5,45E-03	2,99E-02
CA_RS00290	CA_C0049	93,06	-2,19	4,55	0,35	-6,30	3,03E-10	1,98E-08
CA_RS02565	CA_C0463	289,73	-2,18	4,53	0,59	-3,68	2,34E-04	2,28E-03
CA_RS04955	CA_C0931	1682,96	-2,18	4,53	0,54	-4,03	5,65E-05	6,89E-04
CA_RS12600	CA_C2457	22,00	-2,17	4,49	0,57	-3,80	1,43E-04	1,48E-03
CA_RS02895	CA_C0528	3062,90	-2,16	4,48	0,48	-4,47	7,92E-06	1,30E-04
CA_RS07965	CA_C1526	13,75	-2,16	4,47	0,67	-3,25	1,15E-03	8,84E-03
CA_RS12975	CA_C2533	392,01	-2,14	4,42	0,45	-4,75	1,99E-06	4,10E-05
CA_RS00635	CA_C0117	291,40	-2,14	4,42	0,62	-3,43	5,93E-04	5,12E-03
CA_RS08390	CA_C1610	2000,39	-2,13	4,38	0,46	-4,60	4,28E-06	7,81E-05
CA_RS00650	CA_C0120	810,15	-2,12	4,36	0,48	-4,46	8,21E-06	1,34E-04
CA_RS16935	CA_C3291	41326,48	-2,12	4,33	0,52	-4,09	4,38E-05	5,60E-04
CA_RS19555	CA_P0067	8510,37	-2,12	4,33	0,77	-2,74	6,16E-03	3,29E-02
CA_RS04690	CA_C0878	2704,64	-2,11	4,33	0,43	-4,92	8,66E-07	1,92E-05
CA_RS16805	CA_C3265	412,34	-2,11	4,31	0,67	-3,14	1,71E-03	1,23E-02
CA_RS19465	CA_P0049	462,29	-2,11	4,31	0,68	-3,11	1,90E-03	1,32E-02
CA_RS02190	CA_C0388	119,84	-2,10	4,29	0,53	-3,93	8,36E-05	9,50E-04
CA_RS00270	CA_C0045	674,23	-2,10	4,28	0,28	-7,57	3,77E-14	4,84E-12
CA_RS13050	CA_C2548	8,66	-2,09	4,26	0,72	-2,91	3,58E-03	2,13E-02
CA_RS19700	CA_P0098	535,79	-2,09	4,25	0,68	-3,08	2,06E-03	1,40E-02
CA_RS08195	CA_C1571	928,09	-2,09	4,24	0,70	-2,99	2,75E-03	1,76E-02
CA_RS04250	CA_C0791	1578,46	-2,08	4,23	0,79	-2,63	8,57E-03	4,15E-02
CA_RS03960	CA_C0733	1479,45	-2,08	4,23	0,49	-4,27	1,97E-05	2,82E-04
CA_RS13265	CA_C2592	122,60	-2,08	4,22	0,35	-5,89	3,77E-09	1,61E-07
CA_RS00655	CA_C0121	138,61	-2,08	4,21	0,48	-4,36	1,30E-05	2,03E-04
CA_RS19560	CA_P0068	13260,91	-2,07	4,21	0,77	-2,71	6,76E-03	3,51E-02
CA_RS18440	CA_Ct064	50,00	-2,07	4,19	0,50	-4,15	3,31E-05	4,45E-04
CA_RS19550	CA_P0066	11221,36	-2,06	4,18	0,76	-2,70	6,95E-03	3,57E-02
CA_RS03965	CA_C0734	962,42	-2,06	4,18	0,50	-4,15	3,34E-05	4,45E-04
CA_RS13755	CA_C2667	440,21	-2,06	4,17	0,72	-2,85	4,32E-03	2,47E-02
CA_RS14460	CA_C2810	410,93	-2,06	4,16	0,71	-2,89	3,79E-03	2,23E-02
CA_RS16930	CA_C3290	12425,17	-2,04	4,12	0,59	-3,47	5,21E-04	4,57E-03
CA_RS05795	CA_C1093	41,41	-2,04	4,12	0,57	-3,61	3,03E-04	2,85E-03
CA_RS02265	CA_C0404	3289,03	-2,04	4,10	0,44	-4,63	3,63E-06	6,76E-05
CA_RS14215	CA_C2760	777,28	-2,03	4,09	0,50	-4,04	5,33E-05	6,59E-04
CA_RS00405	CA_C0072	243,17	-2,02	4,05	0,58	-3,47	5,11E-04	4,50E-03
CA_RS00250	CA_C0041	89,88	-2,01	4,03	0,33	-6,12	9,50E-10	5,08E-08
CA_RS11515	CA_C2241	3003,70	-2,00	4,00	0,44	-4,57	4,96E-06	8,98E-05
CA_RS00260	CA_C0043	128,85	-2,00	4,00	0,36	-5,53	3,14E-08	1,07E-06
CA_RS03710	CA_C0687	1724,60	-2,00	4,00	0,44	-4,50	6,65E-06	1,13E-04
CA_RS00275	CA_C0046	126,52	-1,99	3,97	0,38	-5,26	1,46E-07	4,10E-06
CA_RS09240	CA_C1779	37,43	-1,98	3,95	0,73	-2,72	6,60E-03	3,46E-02
CA_RS15650	CA_C3045	437,38	-1,97	3,92	0,48	-4,12	3,81E-05	4,92E-04
CA_RS00225	CA_C0036	573,79	-1,96	3,89	0,33	-5,95	2,71E-09	1,21E-07
CA_RS19085	CA_C3712	10302,02	-1,96	3,88	0,44	-4,41	1,01E-05	1,61E-04
CA_RS18205	CA_C3544	1069,70	-1,95	3,87	0,44	-4,44	8,88E-06	1,44E-04
CA_RS00230	CA_C0037	494,92	-1,95	3,85	0,29	-6,67	2,55E-11	2,18E-09

CA_RS13550	CA_C2649	4256,74	-1,94	3,85	0,36	-5,42	6,01E-08	1,81E-06
CA_RS03970	CA_C0735	692,75	-1,94	3,84	0,45	-4,29	1,75E-05	2,56E-04
CA_RS20285	CA_C3524	686,07	-1,94	3,83	0,48	-4,05	5,23E-05	6,50E-04
CA_RS13875	CA_C2690	199,88	-1,94	3,83	0,68	-2,85	4,38E-03	2,50E-02
CA_RS06650	CA_C1260	17982,99	-1,93	3,82	0,63	-3,05	2,26E-03	1,50E-02
CA_RS11770	CA_C2293	824,54	-1,93	3,81	0,65	-2,95	3,19E-03	1,97E-02
CA_RS00280	CA_C0047	11,12	-1,92	3,79	0,65	-2,94	3,25E-03	1,99E-02
CA_RS19235	CA_P0002	839,86	-1,92	3,79	0,72	-2,69	7,23E-03	3,68E-02
CA_RS17210	CA_C3344	1269,38	-1,91	3,76	0,48	-4,00	6,41E-05	7,58E-04
CA_RS02135	CA_C0377	19,77	-1,91	3,76	0,57	-3,33	8,57E-04	6,91E-03
CA_RS18030	CA_C3511	292,19	-1,91	3,76	0,32	-6,06	1,36E-09	6,71E-08
CA_RS05710	CA_C1075	562,83	-1,91	3,76	0,70	-2,74	6,06E-03	3,25E-02
CA_RS00400	CA_C0071	127,91	-1,90	3,72	0,51	-3,70	2,12E-04	2,12E-03
CA_RS16940	CA_C3292	7453,40	-1,89	3,71	0,48	-3,91	9,23E-05	1,02E-03
CA_RS18445	CA_Ct065	198,43	-1,89	3,70	0,41	-4,55	5,30E-06	9,50E-05
CA_RS03205	CA_C0587	17,56	-1,88	3,69	0,53	-3,52	4,26E-04	3,81E-03
CA_RS02560	CA_C0462	1629,34	-1,88	3,68	0,48	-3,89	1,02E-04	1,10E-03
CA_RS08190	CA_C1570	1439,23	-1,87	3,66	0,53	-3,56	3,67E-04	3,35E-03
CA_RS00640	CA_C0118	232,20	-1,87	3,65	0,56	-3,36	7,90E-04	6,45E-03
CA_RS04420	CA_C0825	7608,33	-1,86	3,62	0,44	-4,22	2,47E-05	3,48E-04
CA_RS10785	CA_C2092	38,02	-1,85	3,61	0,61	-3,06	2,23E-03	1,48E-02
CA_RS02100	CA_C0370	1013,78	-1,85	3,61	0,32	-5,75	8,87E-09	3,42E-07
CA_RS10115	CA_C1953	276,22	-1,85	3,60	0,55	-3,33	8,79E-04	7,04E-03
CA_RS02180	CA_C0386	3670,66	-1,84	3,59	0,69	-2,66	7,74E-03	3,84E-02
CA_RS13310	CA_C2600	100,73	-1,84	3,59	0,59	-3,11	1,90E-03	1,32E-02
CA_RS05170	CA_C0970	5643,86	-1,84	3,57	0,70	-2,64	8,21E-03	4,01E-02
CA_RS03020	CA_C0551	223,34	-1,83	3,56	0,59	-3,12	1,80E-03	1,26E-02
CA_RS05470	CA_C1029	43,48	-1,83	3,55	0,63	-2,90	3,70E-03	2,18E-02
CA_RS00240	CA_C0039	3834,88	-1,81	3,51	0,29	-6,19	6,05E-10	3,59E-08
CA_RS14480	CA_C2814	60,68	-1,81	3,51	0,45	-4,06	4,96E-05	6,20E-04
CA_RS15660	CA_C3047	887,55	-1,81	3,51	0,35	-5,15	2,57E-07	6,87E-06
CA_RS16815	CA_C3267	286,92	-1,81	3,51	0,70	-2,60	9,23E-03	4,37E-02
CA_RS07970	CA_C1527	289,92	-1,79	3,46	0,42	-4,30	1,69E-05	2,48E-04
CA_RS14310	CA_C2780	956,09	-1,79	3,45	0,63	-2,82	4,76E-03	2,67E-02
CA_RS02275	CA_C0406	1516,96	-1,77	3,41	0,36	-4,87	1,14E-06	2,48E-05
CA_RS04235	CA_C0788	221,01	-1,76	3,38	0,40	-4,38	1,18E-05	1,85E-04
CA_RS03705	CA_C0686	556,75	-1,74	3,35	0,35	-5,04	4,66E-07	1,08E-05
CA_RS02555	CA_C0461	632,05	-1,74	3,34	0,47	-3,67	2,42E-04	2,35E-03
CA_RS07985	CA_C1530	13,36	-1,73	3,33	0,68	-2,56	1,06E-02	4,85E-02
CA_RS03440		33,04	-1,73	3,32	0,50	-3,43	5,98E-04	5,14E-03
CA_RS20280	CA_C3523	508,51	-1,73	3,31	0,42	-4,16	3,17E-05	4,27E-04
CA_RS00295	CA_C0050	26,35	-1,72	3,30	0,59	-2,92	3,54E-03	2,12E-02
CA_RS07960	CA_C1525	40,05	-1,72	3,29	0,38	-4,49	7,26E-06	1,22E-04
CA_RS18805	CA_C3656	43,96	-1,72	3,28	0,64	-2,67	7,67E-03	3,81E-02
CA_RS02450	CA_C0440	770,28	-1,71	3,27	0,38	-4,49	7,15E-06	1,20E-04
CA_RS14305	CA_C2779	155,86	-1,71	3,27	0,63	-2,71	6,63E-03	3,47E-02
CA_RS08090	CA_C1550	121,30	-1,71	3,27	0,48	-3,56	3,72E-04	3,39E-03
CA_RS05465	CA_C1028	2861,00	-1,70	3,26	0,57	-3,01	2,61E-03	1,70E-02
CA_RS19080	CA_C3711	893,35	-1,70	3,24	0,37	-4,64	3,45E-06	6,50E-05
CA_RS18460	CA_Ct068	318,02	-1,69	3,22	0,41	-4,14	3,49E-05	4,60E-04

CA_RS12930	CA_C2524	123,62	-1,69	3,22	0,50	-3,35	8,03E-04	6,53E-03
CA_RS02550	CA_C0460	3569,27	-1,68	3,21	0,51	-3,27	1,06E-03	8,25E-03
CA_RS13495	CA_C2638	413,96	-1,68	3,20	0,62	-2,72	6,58E-03	3,46E-02
CA_RS08200	CA_C1572	1436,31	-1,67	3,17	0,45	-3,69	2,27E-04	2,22E-03
CA_RS11800	CA_C2300	64,87	-1,65	3,15	0,55	-3,03	2,43E-03	1,60E-02
CA_RS01130	CA_C0200	307,39	-1,64	3,13	0,34	-4,80	1,61E-06	3,37E-05
CA_RS10885	CA_C2113	1133,14	-1,64	3,11	0,56	-2,95	3,21E-03	1,98E-02
CA_RS13800	CA_C2676	260,26	-1,64	3,11	0,55	-2,97	2,97E-03	1,88E-02
CA_RS19005	CA_C3697	600,92	-1,63	3,09	0,41	-3,92	8,87E-05	9,91E-04
CA_RS19075	CA_C3710	11578,59	-1,60	3,03	0,40	-4,03	5,70E-05	6,93E-04
CA_RS12925	CA_C2523	432,07	-1,60	3,03	0,46	-3,46	5,40E-04	4,72E-03
CA_RS02240	CA_C0399	435,58	-1,59	3,02	0,48	-3,34	8,46E-04	6,84E-03
CA_RS06660	CA_C1262	3566,44	-1,59	3,01	0,62	-2,57	1,01E-02	4,68E-02
CA_RS13695	CA_Ct038	225,75	-1,59	3,01	0,31	-5,10	3,37E-07	8,38E-06
CA_RS15655	CA_C3046	486,17	-1,58	2,99	0,41	-3,86	1,16E-04	1,23E-03
CA_RS01485	CA_C0267	1419,22	-1,57	2,97	0,55	-2,88	3,93E-03	2,29E-02
CA_RS04325	CA_C0806	1816,75	-1,57	2,97	0,29	-5,44	5,22E-08	1,71E-06
CA_RS14475	CA_C2813	53,88	-1,57	2,97	0,53	-2,95	3,16E-03	1,97E-02
CA_RS13675	CA_Ct034	132,40	-1,56	2,95	0,43	-3,63	2,84E-04	2,69E-03
CA_RS13650	CA_Ct029	423,35	-1,56	2,95	0,29	-5,35	8,83E-08	2,52E-06
CA_RS12935	CA_C2525	651,42	-1,56	2,94	0,39	-3,98	6,83E-05	8,02E-04
CA_RS02295	CA_C0410	750,94	-1,55	2,94	0,24	-6,44	1,22E-10	8,72E-09
CA_RS07770	CA_C1485	512,04	-1,55	2,93	0,33	-4,72	2,37E-06	4,79E-05
CA_RS13490	CA_C2637	13939,43	-1,55	2,93	0,48	-3,25	1,17E-03	8,93E-03
CA_RS15590	CA_C3033	63330,01	-1,54	2,91	0,57	-2,70	6,86E-03	3,55E-02
CA_RS18800	CA_C3655	2470,55	-1,53	2,88	0,49	-3,13	1,77E-03	1,25E-02
CA_RS15110	CA_C2937	858,63	-1,52	2,86	0,18	-8,47	2,54E-17	6,12E-15
CA_RS07775	CA_C1486	45,84	-1,52	2,86	0,51	-2,94	3,23E-03	1,99E-02
CA_RS13045	CA_C2547	220,11	-1,50	2,82	0,41	-3,65	2,64E-04	2,50E-03
CA_RS01905	CA_C0332	1007,80	-1,49	2,81	0,46	-3,25	1,17E-03	8,93E-03
CA_RS02320	CA_C0415	4034,41	-1,49	2,81	0,37	-4,03	5,48E-05	6,74E-04
CA_RS02935	CA_C0534	1588,52	-1,49	2,80	0,54	-2,76	5,81E-03	3,14E-02
CA_RS10170	CA_C1963	184,37	-1,48	2,79	0,56	-2,63	8,59E-03	4,15E-02
CA_RS02325	CA_C0416	3064,75	-1,48	2,78	0,34	-4,34	1,41E-05	2,16E-04
CA_RS15600	CA_C3035	79,71	-1,48	2,78	0,43	-3,42	6,18E-04	5,27E-03
CA_RS16810	CA_C3266	150,53	-1,47	2,78	0,56	-2,62	8,74E-03	4,20E-02
CA_RS19020	CA_C3700	53,49	-1,47	2,77	0,45	-3,28	1,05E-03	8,21E-03
CA_RS00285	CA_C0048	39,43	-1,44	2,72	0,42	-3,44	5,85E-04	5,08E-03
CA_RS13930	CA_C2702	406,24	-1,44	2,72	0,38	-3,82	1,35E-04	1,42E-03
CA_RS18845	CA_C3664	1019,36	-1,44	2,71	0,23	-6,26	3,75E-10	2,41E-08
CA_RS03215	CA_C0589	4464,17	-1,44	2,71	0,46	-3,14	1,69E-03	1,22E-02
CA_RS02925	CA_C0532	81,97	-1,43	2,69	0,56	-2,55	1,09E-02	4,94E-02
CA_RS14905	CA_C2896	139,22	-1,43	2,69	0,51	-2,78	5,36E-03	2,95E-02
CA_RS16955	CA_C3295	12495,57	-1,42	2,68	0,51	-2,79	5,32E-03	2,94E-02
CA_RS01185	CA_C0211	157,80	-1,42	2,68	0,34	-4,17	3,02E-05	4,12E-04
CA_RS16895	CA_C3283	3295,29	-1,42	2,68	0,48	-2,95	3,16E-03	1,97E-02
CA_RS02290	CA_C0409	80,62	-1,41	2,66	0,33	-4,28	1,86E-05	2,67E-04
CA_RS14880	CA_C2891	1938,30	-1,41	2,65	0,53	-2,67	7,63E-03	3,81E-02
CA_RS09500	CA_C1832	5529,64	-1,40	2,65	0,52	-2,68	7,39E-03	3,74E-02
CA_RS12320	CA_C2400	138,70	-1,40	2,65	0,54	-2,62	8,77E-03	4,20E-02

CA_RS13935	CA_C2703	34469,07	-1,40	2,64	0,40	-3,48	4,94E-04	4,37E-03
CA_RS03495	CA_C0644	1362,31	-1,40	2,63	0,50	-2,78	5,46E-03	2,99E-02
CA_RS07805	CA_C1492	174,37	-1,39	2,62	0,51	-2,70	6,97E-03	3,57E-02
CA_RS09535	CA_C1839	23,12	-1,39	2,62	0,52	-2,67	7,66E-03	3,81E-02
CA_RS20195		69,61	-1,39	2,62	0,33	-4,15	3,32E-05	4,45E-04
CA_RS18085	CA_C3521	357,37	-1,38	2,61	0,37	-3,71	2,07E-04	2,07E-03
CA_RS04220	CA_C0785	19,30	-1,38	2,60	0,50	-2,76	5,77E-03	3,12E-02
CA_RS13670	CA_Ct033	93,60	-1,38	2,60	0,43	-3,23	1,23E-03	9,33E-03
CA_RS13255	CA_C2590	29,19	-1,37	2,59	0,48	-2,83	4,59E-03	2,60E-02
CA_RS12125	CA_C2366	51893,37	-1,36	2,57	0,52	-2,62	8,79E-03	4,21E-02
CA_RS06950	CA_C1319	290,72	-1,36	2,56	0,52	-2,59	9,70E-03	4,53E-02
CA_RS00435	CA_C0077	832,01	-1,35	2,54	0,40	-3,41	6,50E-04	5,49E-03
CA_RS03690	CA_C0682	6653,54	-1,35	2,54	0,49	-2,77	5,61E-03	3,06E-02
CA_RS18090	CA_C3522	508,44	-1,35	2,54	0,37	-3,62	2,90E-04	2,73E-03
CA_RS12640	CA_C2465	381,90	-1,35	2,54	0,51	-2,66	7,78E-03	3,84E-02
CA_RS12915	CA_C2521	176,89	-1,34	2,54	0,52	-2,59	9,54E-03	4,47E-02
CA_RS18860	CA_C3667	733,69	-1,32	2,50	0,45	-2,91	3,57E-03	2,13E-02
CA_RS18240	CA_C3551	437,56	-1,32	2,49	0,34	-3,92	8,97E-05	9,96E-04
CA_RS15185	CA_C2952	84,68	-1,31	2,48	0,39	-3,36	7,90E-04	6,45E-03
CA_RS17220	CA_C3346	519,33	-1,30	2,47	0,49	-2,68	7,40E-03	3,74E-02
CA_RS12595	CA_C2456	48,82	-1,30	2,46	0,39	-3,34	8,24E-04	6,67E-03
CA_RS13715	CA_Ct042	176,23	-1,29	2,45	0,30	-4,28	1,85E-05	2,67E-04
CA_RS11755	CA_C2290	58,92	-1,29	2,45	0,35	-3,66	2,55E-04	2,45E-03
CA_RS18770	CA_C3649	459,48	-1,28	2,43	0,34	-3,81	1,40E-04	1,45E-03
CA_RS08710	CA_C1675	4737,63	-1,28	2,42	0,26	-4,95	7,46E-07	1,69E-05
CA_RS08135	CA_C1559	4498,84	-1,27	2,41	0,30	-4,21	2,55E-05	3,58E-04
CA_RS18230	CA_C3549	299,95	-1,27	2,41	0,23	-5,42	5,95E-08	1,80E-06
CA_RS05235	CA_C0983	296,89	-1,26	2,40	0,25	-4,94	7,63E-07	1,72E-05
CA_RS02285	CA_C0408	3229,67	-1,26	2,39	0,28	-4,52	6,23E-06	1,08E-04
CA_RS00355	CA_C0062	5497,58	-1,25	2,38	0,44	-2,86	4,25E-03	2,43E-02
CA_RS18450	CA_Ct066	219,64	-1,25	2,38	0,40	-3,13	1,73E-03	1,23E-02
CA_RS02395	CA_C0429	313,03	-1,25	2,37	0,38	-3,30	9,69E-04	7,67E-03
CA_RS00330	CA_C0057	8960,39	-1,25	2,37	0,41	-3,07	2,14E-03	1,44E-02
CA_RS18250	CA_C3553	1307,96	-1,23	2,34	0,45	-2,72	6,49E-03	3,42E-02
CA_RS08620	CA_C1656	2231,38	-1,23	2,34	0,21	-5,87	4,38E-09	1,80E-07
CA_RS18025	CA_C3510	2248,43	-1,22	2,33	0,31	-3,94	8,25E-05	9,43E-04
CA_RS14315	CA_C2781	1279,74	-1,22	2,33	0,47	-2,59	9,49E-03	4,45E-02
CA_RS15365	CA_C2988	27496,81	-1,21	2,31	0,45	-2,69	7,06E-03	3,61E-02
CA_RS02920	CA_C0531	312,67	-1,20	2,29	0,41	-2,94	3,24E-03	1,99E-02
CA_RS18235	CA_C3550	980,79	-1,19	2,28	0,24	-5,06	4,22E-07	1,00E-05
CA_RS02315	CA_C0414	1689,21	-1,19	2,28	0,37	-3,17	1,50E-03	1,10E-02
CA_RS18455	CA_Ct067	782,78	-1,18	2,27	0,33	-3,60	3,20E-04	2,99E-03
CA_RS03975	CA_C0736	417,93	-1,18	2,27	0,46	-2,60	9,44E-03	4,43E-02
CA_RS07735	CA_C1478	142,83	-1,18	2,26	0,46	-2,57	1,02E-02	4,72E-02
CA_RS16770	CA_C3257	42,16	-1,18	2,26	0,38	-3,13	1,74E-03	1,23E-02
CA_RS17425	CA_C3388	283,57	-1,17	2,25	0,39	-3,00	2,68E-03	1,72E-02
CA_RS13690	CA_Ct037	571,64	-1,17	2,25	0,46	-2,56	1,04E-02	4,76E-02
CA_RS03715	CA_C0688	1146,76	-1,17	2,25	0,38	-3,08	2,08E-03	1,41E-02
CA_RS01490	CA_C0268	1697,59	-1,17	2,25	0,35	-3,36	7,78E-04	6,39E-03
CA_RS00385	CA_C0068	510,10	-1,17	2,24	0,42	-2,75	5,94E-03	3,19E-02

CA_RS18080	CA_C3520	746,83	-1,17	2,24	0,31	-3,74	1,87E-04	1,89E-03
CA_RS02995	CA_C0546	66,25	-1,16	2,24	0,33	-3,57	3,60E-04	3,30E-03
CA_RS17215	CA_C3345	824,92	-1,16	2,24	0,42	-2,74	6,08E-03	3,26E-02
CA_RS02535	CA_C0457	583,79	-1,16	2,23	0,45	-2,58	9,78E-03	4,56E-02
CA_RS14105	CA_C2738	2399,25	-1,14	2,21	0,31	-3,73	1,92E-04	1,93E-03
CA_RS06880	CA_C1305	635,85	-1,14	2,21	0,37	-3,11	1,88E-03	1,31E-02
CA_RS08010	CA_C1535	100,54	-1,13	2,19	0,36	-3,13	1,74E-03	1,23E-02
CA_RS05520	CA_C1039	1022,57	-1,13	2,19	0,35	-3,22	1,29E-03	9,65E-03
CA_RS16685	CA_C3240	57,32	-1,12	2,17	0,38	-2,95	3,20E-03	1,98E-02
CA_RS17275	CA_C3357	184,93	-1,11	2,16	0,34	-3,30	9,75E-04	7,70E-03
CA_RS02620	CA_C0474	2535,73	-1,11	2,16	0,35	-3,14	1,66E-03	1,20E-02
CA_RS18470	CA_C3589	5891,83	-1,11	2,15	0,36	-3,08	2,04E-03	1,40E-02
CA_RS02625	CA_C0475	2742,22	-1,10	2,14	0,24	-4,52	6,27E-06	1,08E-04
CA_RS03720	CA_C0689	1289,22	-1,09	2,14	0,31	-3,53	4,11E-04	3,71E-03
CA_RS08015	CA_C1536	40,70	-1,09	2,13	0,37	-2,94	3,25E-03	1,99E-02
CA_RS15890	CA_C3093	23564,87	-1,08	2,12	0,35	-3,08	2,07E-03	1,41E-02
CA_RS18850	CA_C3665	647,70	-1,07	2,10	0,25	-4,31	1,65E-05	2,46E-04
CA_RS17305	CA_C3363	194,04	-1,07	2,10	0,35	-3,06	2,24E-03	1,49E-02
CA_RS02025	CA_C0355	3564,79	-1,07	2,10	0,23	-4,74	2,11E-06	4,30E-05
CA_RS15295	CA_C2974	809,54	-1,05	2,08	0,39	-2,71	6,63E-03	3,47E-02
CA_RS16860	CA_C3276	231,22	-1,05	2,07	0,36	-2,92	3,55E-03	2,13E-02
CA_RS08885	CA_C1710	2313,80	-1,05	2,06	0,36	-2,91	3,62E-03	2,15E-02
CA_RS02530	CA_C0456	3671,95	-1,05	2,06	0,38	-2,77	5,66E-03	3,08E-02
CA_RS05515	CA_C1038	1031,20	-1,03	2,04	0,32	-3,22	1,28E-03	9,60E-03
CA_RS04060	CA_C0753	141,85	-1,03	2,04	0,40	-2,55	1,09E-02	4,94E-02
CA_RS13725	CA_Ct044	610,03	-1,02	2,02	0,32	-3,15	1,62E-03	1,18E-02
CA_RS11805	CA_C2301	25576,83	-1,01	2,02	0,32	-3,20	1,37E-03	1,02E-02
CA_RS13315	CA_C2601	2047,76	-1,01	2,02	0,35	-2,92	3,48E-03	2,10E-02
CA_RS01495	CA_C0269	5612,51	-1,01	2,01	0,39	-2,57	1,02E-02	4,70E-02
CA_RS15825	CA_C3080	154,88	-1,00	2,00	0,32	-3,09	1,97E-03	1,36E-02
CA_RS07130	CA_C1355	685,85	-0,99	1,99	0,32	-3,09	1,97E-03	1,36E-02
CA_RS12215	CA_C2379	8688,52	-0,99	1,98	0,36	-2,72	6,61E-03	3,46E-02
CA_RS04305	CA_C0802	289,90	-0,98	1,98	0,34	-2,87	4,16E-03	2,40E-02
CA_RS12290	CA_C2394	282,66	-0,98	1,97	0,30	-3,22	1,28E-03	9,61E-03
CA_RS10525	CA_C2039	221,31	-0,97	1,96	0,36	-2,73	6,32E-03	3,35E-02
CA_RS04090	CA_C0759	132,44	-0,97	1,96	0,35	-2,78	5,40E-03	2,97E-02
CA_RS18075	CA_C3519	444,44	-0,97	1,96	0,35	-2,78	5,47E-03	2,99E-02
CA_RS16945	CA_C3293	418,87	-0,97	1,95	0,37	-2,60	9,39E-03	4,42E-02
CA_RS02355	CA_C0421	3856,64	-0,97	1,95	0,33	-2,94	3,33E-03	2,03E-02
CA_RS02245	CA_C0400	735,84	-0,97	1,95	0,36	-2,71	6,72E-03	3,50E-02
CA_RS11535	CA_C2245	95,01	-0,96	1,94	0,36	-2,69	7,25E-03	3,68E-02
CA_RS03730	CA_C0691	3106,45	-0,96	1,94	0,32	-2,96	3,11E-03	1,95E-02
CA_RS16800	CA_C3264	82,21	-0,95	1,93	0,33	-2,89	3,81E-03	2,24E-02
CA_RS02070	CA_C0364	260,76	-0,94	1,92	0,35	-2,69	7,18E-03	3,66E-02
CA_RS19070	CA_C3709	39947,06	-0,94	1,92	0,24	-3,88	1,03E-04	1,11E-03
CA_RS18065	CA_C3517	2318,39	-0,93	1,91	0,30	-3,13	1,73E-03	1,23E-02
CA_RS06750	CA_C1281	520,82	-0,92	1,89	0,32	-2,91	3,60E-03	2,14E-02
CA_RS04555	CA_C0851	361,34	-0,92	1,89	0,32	-2,91	3,64E-03	2,16E-02
CA_RS15635	CA_C3042	4871,44	-0,92	1,89	0,29	-3,17	1,51E-03	1,10E-02
CA_RS00335	CA_C0058	1871,71	-0,90	1,86	0,33	-2,71	6,83E-03	3,54E-02

CA_RS04275	CA_C0796	76,49	-0,89	1,86	0,34	-2,60	9,39E-03	4,42E-02
CA_RS17840	CA_C3471	198,02	-0,89	1,85	0,26	-3,38	7,31E-04	6,08E-03
CA_RS04735	CA_C0887	558,90	-0,89	1,85	0,35	-2,55	1,09E-02	4,94E-02
CA_RS12860	CA_C2509	808,34	-0,88	1,84	0,34	-2,56	1,05E-02	4,81E-02
CA_RS15640	CA_C3043	4813,72	-0,88	1,84	0,22	-3,92	8,87E-05	9,91E-04
CA_RS04490	CA_C0839	579,70	-0,84	1,79	0,28	-2,98	2,85E-03	1,82E-02
CA_RS04840	CA_C0908	4099,14	-0,83	1,78	0,20	-4,08	4,43E-05	5,63E-04
CA_RS03435	CA_C0633	4638,77	-0,83	1,77	0,29	-2,84	4,48E-03	2,54E-02
CA_RS03300	CA_C0606	4641,62	-0,82	1,77	0,31	-2,69	7,05E-03	3,61E-02
CA_RS16755	CA_C3254	13650,00	-0,82	1,77	0,31	-2,67	7,58E-03	3,80E-02
CA_RS00390	CA_C0069	176,07	-0,82	1,76	0,31	-2,65	7,95E-03	3,91E-02
CA_RS05595	CA_C1054	4500,89	-0,82	1,76	0,25	-3,25	1,15E-03	8,84E-03
CA_RS14985	CA_C2912	2542,60	-0,81	1,76	0,29	-2,82	4,73E-03	2,67E-02
CA_RS02510	CA_C0452	24623,75	-0,81	1,75	0,23	-3,58	3,38E-04	3,12E-03
CA_RS03045	CA_C0556	3056,54	-0,81	1,75	0,29	-2,75	5,91E-03	3,18E-02
CA_RS17475	CA_C3398	374,73	-0,81	1,75	0,24	-3,31	9,30E-04	7,39E-03
CA_RS02500	CA_C0450	114,00	-0,81	1,75	0,31	-2,56	1,05E-02	4,82E-02
CA_RS03105	CA_C0567	682,74	-0,80	1,74	0,30	-2,62	8,69E-03	4,19E-02
CA_RS15645	CA_C3044	2978,17	-0,80	1,74	0,17	-4,79	1,69E-06	3,51E-05
CA_RS13780	CA_C2672	7373,59	-0,80	1,74	0,28	-2,89	3,87E-03	2,27E-02
CA_RS12325	CA_C2401	17312,53	-0,77	1,71	0,24	-3,23	1,22E-03	9,25E-03
CA_RS18200	CA_C3543	258,40	-0,76	1,70	0,23	-3,39	7,08E-04	5,92E-03
CA_RS19060	CA_C3707	271,04	-0,76	1,69	0,27	-2,81	4,98E-03	2,76E-02
CA_RS07535	CA_C1435	1554,20	-0,75	1,68	0,28	-2,68	7,43E-03	3,75E-02
CA_RS03940	CA_C0729	2976,74	-0,74	1,68	0,22	-3,31	9,29E-04	7,39E-03
CA_RS18070	CA_C3518	1462,81	-0,74	1,67	0,26	-2,86	4,19E-03	2,41E-02
CA_RS04485	CA_C0838	644,61	-0,74	1,67	0,29	-2,55	1,08E-02	4,91E-02
CA_RS11530	CA_C2244	639,90	-0,73	1,66	0,23	-3,15	1,61E-03	1,17E-02
CA_RS01875	CA_C0326	1712,72	-0,73	1,65	0,28	-2,58	9,88E-03	4,60E-02
CA_RS15485	CA_C3012	3131,73	-0,71	1,64	0,24	-2,95	3,17E-03	1,97E-02
CA_RS18575	CA_C3610	148,36	-0,71	1,63	0,24	-2,92	3,52E-03	2,12E-02
CA_RS13645	CA_Ct028	858,03	-0,70	1,63	0,21	-3,36	7,82E-04	6,41E-03
CA_RS01625	CA_C0290	498,36	-0,70	1,63	0,27	-2,61	9,05E-03	4,30E-02
CA_RS03650	CA_C0674	806,88	-0,70	1,63	0,24	-2,97	2,95E-03	1,87E-02
CA_RS03895	CA_C0719	1326,42	-0,70	1,63	0,24	-2,86	4,19E-03	2,41E-02
CA_RS16470	CA_C3202	48421,68	-0,70	1,62	0,19	-3,59	3,25E-04	3,02E-03
CA_RS19160	CA_C3726	406,48	-0,70	1,62	0,23	-3,00	2,69E-03	1,73E-02
CA_RS06745	CA_C1280	3880,30	-0,69	1,62	0,24	-2,88	3,92E-03	2,29E-02
CA_RS17865	CA_C3476	220,16	-0,68	1,60	0,25	-2,74	6,16E-03	3,29E-02
CA_RS13400	CA_C2619	2384,70	-0,68	1,60	0,25	-2,70	6,94E-03	3,57E-02
CA_RS08890	CA_C1711	6360,84	-0,68	1,60	0,22	-3,02	2,53E-03	1,65E-02
CA_RS17400	CA_C3383	2551,99	-0,67	1,59	0,26	-2,62	8,91E-03	4,24E-02
CA_RS08600	CA_C1652	7815,48	-0,67	1,59	0,24	-2,79	5,25E-03	2,90E-02
CA_RS00525	CA_C0095	536,79	-0,66	1,57	0,26	-2,55	1,07E-02	4,89E-02
CA_RS08905	CA_C1714	1946,21	-0,65	1,57	0,24	-2,72	6,44E-03	3,40E-02
CA_RS08790	CA_C1691	52602,07	-0,65	1,57	0,23	-2,77	5,63E-03	3,07E-02
CA_RS09025	CA_C1738	5262,78	-0,64	1,56	0,24	-2,65	8,15E-03	3,99E-02
CA_RS15095	CA_C2934	429,07	-0,64	1,55	0,21	-3,03	2,45E-03	1,60E-02
CA_RS17880	CA_C3481	428,03	-0,63	1,55	0,21	-3,05	2,30E-03	1,52E-02
CA_RS02805	CA_C0511	5053,72	-0,61	1,53	0,24	-2,57	1,01E-02	4,68E-02

CA_RS02670	CA_C0484	21556,02	-0,60	1,51	0,20	-3,02	2,56E-03	1,67E-02
CA_RS16905	CA_C3285	1307,15	-0,59	1,50	0,23	-2,55	1,09E-02	4,94E-02
CA_RS17310	CA_C3364	289,36	-0,59	1,50	0,23	-2,55	1,08E-02	4,94E-02
CA_RS08900	CA_C1713	11689,64	-0,58	1,49	0,18	-3,13	1,77E-03	1,25E-02
CA_RS12180	CA_C2371	496,43	-0,57	1,49	0,19	-2,97	2,96E-03	1,87E-02
CA_RS19050	CA_C3705	377,22	-0,57	1,49	0,20	-2,91	3,65E-03	2,16E-02
CA_RS12000	CA_C2341	1683,48	-0,55	1,46	0,21	-2,60	9,41E-03	4,42E-02
CA_RS15280	CA_C2971	1817,60	-0,55	1,46	0,18	-2,99	2,83E-03	1,81E-02
CA_RS12500	CA_C2437	3190,03	-0,55	1,46	0,19	-2,81	4,98E-03	2,76E-02
CA_RS12825	CA_C2502	1507,77	-0,53	1,45	0,18	-2,95	3,13E-03	1,96E-02
CA_RS00485	CA_C0087	1446,30	-0,53	1,44	0,19	-2,72	6,53E-03	3,44E-02
CA_RS12175	CA_C2370	4134,96	-0,52	1,44	0,17	-3,15	1,65E-03	1,19E-02
CA_RS12460	CA_C2429	3549,16	-0,46	1,38	0,17	-2,67	7,55E-03	3,79E-02
CA_RS08895	CA_C1712	2832,33	-0,45	1,37	0,16	-2,87	4,07E-03	2,36E-02
CA_RS00965	CA_C0168	1817,34	0,55	1,46	0,21	2,67	7,68E-03	3,81E-02
CA_RS02710	CA_C0492	3348,03	0,57	1,48	0,20	2,88	3,94E-03	2,29E-02
CA_RS03405	CA_C0627	2145,67	0,57	1,48	0,19	3,06	2,19E-03	1,47E-02
CA_RS03850	CA_C0714	7372,07	0,60	1,52	0,21	2,88	4,01E-03	2,33E-02
CA_RS16000	CA_C3115	1457,52	0,61	1,53	0,23	2,67	7,59E-03	3,80E-02
CA_RS00995	CA_C0174	435,55	0,63	1,55	0,23	2,73	6,42E-03	3,40E-02
CA_RS14750	CA_C2865	202397,63	0,64	1,55	0,22	2,94	3,29E-03	2,01E-02
CA_RS08545	CA_C1641	1740,38	0,65	1,57	0,25	2,59	9,67E-03	4,52E-02
CA_RS14755	CA_C2866	122547,85	0,66	1,58	0,25	2,64	8,27E-03	4,03E-02
CA_RS12310	CA_C2398	383,15	0,67	1,59	0,25	2,65	8,12E-03	3,98E-02
CA_RS08070	CA_C1546	5516,63	0,67	1,59	0,25	2,64	8,29E-03	4,04E-02
CA_RS12910	CA_C2520	1665,66	0,67	1,59	0,22	3,07	2,14E-03	1,44E-02
CA_RS07375	CA_C1403	1028,77	0,67	1,60	0,25	2,69	7,09E-03	3,62E-02
CA_RS17085	CA_C3320	1700,76	0,68	1,60	0,22	3,07	2,13E-03	1,44E-02
CA_RS11455	CA_C2229	1658144,00	0,68	1,60	0,18	3,79	1,52E-04	1,57E-03
CA_RS16020	CA_C3119	1262,97	0,68	1,61	0,22	3,07	2,15E-03	1,44E-02
CA_RS18945	CA_C3683	4984,02	0,69	1,62	0,26	2,71	6,68E-03	3,48E-02
CA_RS01600	CA_C0285	1947,68	0,71	1,63	0,25	2,86	4,24E-03	2,43E-02
CA_RS05830	CA_C1100	433,26	0,71	1,63	0,23	3,11	1,86E-03	1,30E-02
CA_RS00450	CA_C0080	1161,04	0,71	1,64	0,23	3,09	2,03E-03	1,39E-02
CA_RS08965	CA_C1726	3360,97	0,71	1,64	0,27	2,66	7,89E-03	3,89E-02
CA_RS07540	CA_C1436	5042,53	0,72	1,65	0,27	2,68	7,36E-03	3,73E-02
CA_RS11340	CA_C2206	1215,12	0,72	1,65	0,28	2,62	8,74E-03	4,20E-02
CA_RS08120	CA_C1556	190,94	0,72	1,65	0,28	2,56	1,06E-02	4,84E-02
CA_RS09490	CA_C1830	454,24	0,73	1,65	0,20	3,60	3,18E-04	2,97E-03
CA_RS04880	CA_C0916	154,94	0,73	1,66	0,26	2,81	4,89E-03	2,73E-02
CA_RS01410	CA_C0252	505,57	0,75	1,68	0,24	3,16	1,60E-03	1,17E-02
CA_RS02665	CA_C0483	1675,66	0,76	1,70	0,24	3,18	1,49E-03	1,10E-02
CA_RS13215	CA_C2582	124,72	0,77	1,70	0,27	2,87	4,15E-03	2,40E-02
CA_RS02700	CA_C0490	1020,43	0,77	1,71	0,24	3,17	1,55E-03	1,13E-02
CA_RS15580	CA_C3031	1737,61	0,78	1,72	0,25	3,09	2,00E-03	1,37E-02
CA_RS12885	CA_C2514	673,95	0,79	1,72	0,31	2,55	1,09E-02	4,94E-02
CA_RS14335	CA_C2785	89,05	0,79	1,73	0,30	2,63	8,59E-03	4,15E-02
CA_RS09570	CA_C1846	308,57	0,79	1,73	0,24	3,24	1,18E-03	8,99E-03
CA_RS03450	CA_C0635	4474,14	0,79	1,73	0,30	2,68	7,38E-03	3,74E-02
CA_RS03060	CA_C0558	554,35	0,80	1,74	0,24	3,27	1,07E-03	8,34E-03

CA_RS14760	CA_C2867	180524,60	0,80	1,74	0,17	4,60	4,15E-06	7,62E-05
CA_RS01865	CA_C0324	18343,42	0,81	1,75	0,23	3,47	5,22E-04	4,57E-03
CA_RS14765	CA_C2868	35343,89	0,81	1,75	0,21	3,84	1,22E-04	1,29E-03
CA_RS03550	CA_C0654	379,36	0,82	1,76	0,22	3,69	2,23E-04	2,20E-03
CA_RS00800	CA_C0147	12113,95	0,82	1,77	0,31	2,66	7,77E-03	3,84E-02
CA_RS13185	CA_C2576	140,34	0,83	1,78	0,25	3,33	8,76E-04	7,04E-03
CA_RS04255	CA_C0792	769,64	0,84	1,79	0,21	4,08	4,57E-05	5,79E-04
CA_RS05535	CA_C1042	554,16	0,84	1,79	0,27	3,14	1,70E-03	1,22E-02
CA_RS13195	CA_C2578	144,85	0,84	1,79	0,30	2,82	4,76E-03	2,67E-02
CA_RS01145	CA_C0203	77,75	0,84	1,79	0,32	2,63	8,62E-03	4,16E-02
CA_RS08980	CA_C1729	1234,15	0,84	1,79	0,27	3,08	2,05E-03	1,40E-02
CA_RS10260	CA_C1982	735,05	0,85	1,80	0,31	2,78	5,37E-03	2,95E-02
CA_RS17825	CA_C3467	761,96	0,85	1,80	0,30	2,86	4,18E-03	2,41E-02
CA_RS12950	CA_C2528	171,92	0,85	1,80	0,27	3,13	1,75E-03	1,24E-02
CA_RS07745	CA_C1480	1010,85	0,86	1,81	0,20	4,33	1,52E-05	2,30E-04
CA_RS12080	CA_C2357	9163,37	0,86	1,82	0,31	2,73	6,26E-03	3,33E-02
CA_RS08675	CA_C1668	583,19	0,87	1,82	0,29	3,04	2,37E-03	1,56E-02
CA_RS08395	CA_C1611	5449,96	0,88	1,84	0,18	4,78	1,78E-06	3,69E-05
CA_RS05210	CA_C0978	533,24	0,89	1,85	0,26	3,41	6,44E-04	5,45E-03
CA_RS20295	CA_C3694	640,18	0,89	1,86	0,21	4,18	2,95E-05	4,05E-04
CA_RS09565	CA_C1845	275,02	0,90	1,87	0,30	2,98	2,93E-03	1,85E-02
CA_RS16430	CA_C3194	642,61	0,90	1,87	0,29	3,12	1,81E-03	1,27E-02
CA_RS01595	CA_C0284	841,33	0,91	1,88	0,26	3,50	4,59E-04	4,08E-03
CA_RS14440	CA_C2806	4444,96	0,91	1,88	0,28	3,26	1,10E-03	8,53E-03
CA_RS07690	CA_C1468	64,79	0,92	1,89	0,36	2,58	1,00E-02	4,63E-02
CA_RS04830	CA_C0906	469,83	0,92	1,89	0,26	3,51	4,43E-04	3,94E-03
CA_RS15515	CA_C3018	5294,58	0,92	1,89	0,35	2,62	8,80E-03	4,21E-02
CA_RS04860	CA_C0912	591,64	0,92	1,89	0,33	2,82	4,87E-03	2,72E-02
CA_RS12075	CA_C2356	19674,99	0,92	1,90	0,34	2,73	6,32E-03	3,35E-02
CA_RS13610	CA_C2661	149,92	0,93	1,90	0,28	3,26	1,12E-03	8,62E-03
CA_RS09085	CA_C1750	95,74	0,94	1,92	0,33	2,82	4,76E-03	2,67E-02
CA_RS02435	CA_C0437	2542,78	0,94	1,92	0,32	2,93	3,41E-03	2,07E-02
CA_RS07005	CA_C1330	452,21	0,94	1,92	0,36	2,63	8,44E-03	4,11E-02
CA_RS14400	CA_C2798	92,40	0,95	1,93	0,35	2,70	6,94E-03	3,57E-02
CA_RS07685	CA_C1467	201,61	0,95	1,93	0,31	3,09	1,98E-03	1,36E-02
CA_RS08945	CA_C1722	90,52	0,95	1,94	0,36	2,62	8,73E-03	4,20E-02
CA_RS08110	CA_C1554	1235,36	0,95	1,94	0,21	4,55	5,39E-06	9,57E-05
CA_RS07380	CA_C1404	191,95	0,96	1,95	0,35	2,71	6,68E-03	3,48E-02
CA_RS12405	CA_C2416	139,65	0,96	1,95	0,27	3,52	4,36E-04	3,89E-03
CA_RS05065	CA_C0953	111,70	0,97	1,95	0,30	3,19	1,44E-03	1,07E-02
CA_RS09485	CA_C1829	1374,35	0,97	1,95	0,29	3,39	7,03E-04	5,89E-03
CA_RS02695	CA_C0489	166,51	0,97	1,96	0,29	3,35	8,01E-04	6,52E-03
CA_RS08305	CA_C1593	573,14	0,97	1,96	0,29	3,39	6,97E-04	5,86E-03
CA_RS07490	CA_C1426	203,77	0,98	1,97	0,31	3,13	1,77E-03	1,25E-02
CA_RS18525	CA_C3600	2114,91	0,98	1,97	0,28	3,53	4,23E-04	3,79E-03
CA_RS16740	CA_C3251	651,17	1,00	2,00	0,27	3,70	2,13E-04	2,12E-03
CA_RS11440	CA_C2226	1780,82	1,00	2,01	0,23	4,37	1,25E-05	1,96E-04
CA_RS15855	CA_C3086	6269,16	1,01	2,01	0,24	4,13	3,57E-05	4,68E-04
CA_RS11445	CA_C2227	683,34	1,01	2,01	0,28	3,65	2,61E-04	2,49E-03
CA_RS15340	CA_C2983	216,22	1,02	2,02	0,37	2,77	5,63E-03	3,07E-02

CA_RS17585	CA_C3419	94,10	1,02	2,02	0,36	2,79	5,33E-03	2,94E-02
CA_RS04875	CA_C0915	234,97	1,03	2,04	0,35	2,95	3,17E-03	1,97E-02
CA_RS01435	CA_C0257	55,53	1,03	2,04	0,39	2,65	7,95E-03	3,91E-02
CA_RS14175	CA_C2752	2921,69	1,04	2,05	0,31	3,33	8,79E-04	7,04E-03
CA_RS15025	CA_C2920	147,90	1,04	2,05	0,36	2,92	3,50E-03	2,11E-02
CA_RS01200	CA_C0214	932,25	1,04	2,06	0,40	2,63	8,53E-03	4,14E-02
CA_RS04865	CA_C0913	205,73	1,05	2,07	0,31	3,43	6,05E-04	5,19E-03
CA_RS16550	CA_C3215	6190,01	1,05	2,07	0,21	5,07	3,92E-07	9,37E-06
CA_RS07505	CA_C1429	3583,94	1,05	2,07	0,34	3,05	2,27E-03	1,50E-02
CA_RS08060	CA_C1544	621,08	1,05	2,07	0,29	3,59	3,25E-04	3,02E-03
CA_RS05510	CA_C1037	2956,33	1,06	2,08	0,27	3,96	7,45E-05	8,60E-04
CA_RS20210	CA_C1640	1696,71	1,06	2,08	0,39	2,74	6,17E-03	3,29E-02
CA_RS20175	CA_C1076	102,06	1,06	2,09	0,32	3,37	7,61E-04	6,30E-03
CA_RS14770	CA_C2869	30113,90	1,07	2,09	0,19	5,48	4,22E-08	1,41E-06
CA_RS07625	CA_C1455	40,53	1,07	2,10	0,38	2,82	4,81E-03	2,69E-02
CA_RS15000	CA_C2915	7251,54	1,07	2,10	0,38	2,84	4,44E-03	2,52E-02
CA_RS03575	CA_C0659	232,12	1,08	2,11	0,32	3,42	6,26E-04	5,32E-03
CA_RS15850	CA_C3085	10255,77	1,08	2,12	0,29	3,69	2,21E-04	2,18E-03
CA_RS15510	CA_C3017	12003,79	1,09	2,12	0,34	3,19	1,43E-03	1,06E-02
CA_RS16875	CA_C3279	3390,95	1,10	2,15	0,40	2,76	5,69E-03	3,09E-02
CA_RS04560	CA_C0852	403,20	1,11	2,16	0,24	4,66	3,10E-06	6,10E-05
CA_RS09700	CA_C1872	749,09	1,12	2,17	0,24	4,68	2,93E-06	5,83E-05
CA_RS07545	CA_C1437	683,18	1,12	2,17	0,43	2,58	9,95E-03	4,62E-02
CA_RS15495	CA_C3014	374,58	1,12	2,18	0,33	3,37	7,65E-04	6,31E-03
CA_RS08255	CA_C1583	5672,21	1,13	2,18	0,43	2,62	8,87E-03	4,23E-02
CA_RS04515	CA_C0844	834,38	1,13	2,18	0,41	2,76	5,80E-03	3,13E-02
CA_RS03585	CA_C0661	305,06	1,13	2,19	0,28	4,06	4,94E-05	6,20E-04
CA_RS14745	CA_C2864	16028,04	1,13	2,19	0,20	5,61	2,04E-08	7,15E-07
CA_RS05195	CA_C0975	549,22	1,14	2,20	0,43	2,65	8,10E-03	3,97E-02
CA_RS10530	CA_C2040	284,20	1,14	2,21	0,26	4,45	8,56E-06	1,39E-04
CA_RS17540	CA_C3411	114,03	1,14	2,21	0,31	3,68	2,34E-04	2,28E-03
CA_RS16880	CA_C3280	2446,89	1,15	2,22	0,32	3,57	3,54E-04	3,26E-03
CA_RS09390	CA_C1809	166,95	1,15	2,22	0,34	3,40	6,78E-04	5,72E-03
CA_RS18275	CA_C3558	644,96	1,15	2,22	0,44	2,60	9,39E-03	4,42E-02
CA_RS17520	CA_C3407	54,36	1,15	2,22	0,45	2,58	9,91E-03	4,61E-02
CA_RS04885	CA_C0917	60,82	1,15	2,22	0,39	2,97	3,03E-03	1,90E-02
CA_RS08320	CA_C1596	190,07	1,15	2,22	0,29	3,92	8,84E-05	9,91E-04
CA_RS07285	CA_C1386	1498,06	1,16	2,23	0,38	3,04	2,34E-03	1,54E-02
CA_RS02690	CA_C0488	175,42	1,16	2,23	0,44	2,66	7,77E-03	3,84E-02
CA_RS08055	CA_C1543	1012,20	1,17	2,25	0,38	3,10	1,95E-03	1,35E-02
CA_RS14345	CA_C2787	461,70	1,17	2,25	0,32	3,66	2,56E-04	2,45E-03
CA_RS05720	CA_C1078	1914,63	1,17	2,25	0,24	4,80	1,55E-06	3,29E-05
CA_RS12095	CA_C2360	1203,83	1,18	2,26	0,35	3,37	7,50E-04	6,22E-03
CA_RS08065	CA_C1545	739,63	1,18	2,27	0,29	4,12	3,73E-05	4,84E-04
CA_RS16305	CA_C3176	5432,40	1,18	2,27	0,40	2,93	3,34E-03	2,03E-02
CA_RS00455	CA_C0081	371,44	1,19	2,28	0,25	4,75	2,00E-06	4,11E-05
CA_RS16555	CA_C3216	3543,96	1,19	2,28	0,46	2,60	9,23E-03	4,37E-02
CA_RS16565	CA_C3218	5714,21	1,19	2,29	0,45	2,63	8,65E-03	4,17E-02
CA_RS17265	CA_C3355	4652,98	1,20	2,29	0,30	3,97	7,21E-05	8,38E-04
CA_RS10300	CA_C1991	108,10	1,20	2,30	0,45	2,67	7,67E-03	3,81E-02

CA_RS01525	CA_C0275	154,38	1,20	2,30	0,30	4,02	5,79E-05	6,99E-04
CA_RS08655	CA_C1664	442,67	1,20	2,30	0,28	4,25	2,15E-05	3,07E-04
CA_RS05375	CA_C1010	7703,52	1,21	2,31	0,35	3,46	5,45E-04	4,75E-03
CA_RS20230	CA_C2024	330,53	1,23	2,35	0,33	3,78	1,54E-04	1,58E-03
CA_RS12230	CA_C2382	114,97	1,23	2,35	0,27	4,53	5,88E-06	1,03E-04
CA_RS05030	CA_C0946	560,49	1,23	2,35	0,32	3,89	1,01E-04	1,10E-03
CA_RS14900	CA_C2895	5014,49	1,24	2,36	0,44	2,84	4,52E-03	2,56E-02
CA_RS15795	CA_C3074	491,10	1,24	2,36	0,32	3,84	1,22E-04	1,29E-03
CA_RS15035	CA_C2922	179,10	1,24	2,36	0,46	2,71	6,67E-03	3,48E-02
CA_RS15030	CA_C2921	265,27	1,26	2,39	0,38	3,31	9,20E-04	7,34E-03
CA_RS18985		288,30	1,26	2,40	0,33	3,78	1,59E-04	1,63E-03
CA_RS02150	CA_C0380	1619,60	1,27	2,41	0,42	3,01	2,65E-03	1,71E-02
CA_RS08705	CA_C1674	7805,76	1,27	2,41	0,27	4,73	2,22E-06	4,50E-05
CA_RS03310	CA_C0608	524,84	1,28	2,42	0,22	5,79	7,03E-09	2,82E-07
CA_RS09555	CA_C1843	111,98	1,28	2,42	0,33	3,82	1,31E-04	1,38E-03
CA_RS06140	CA_C1160	90,82	1,28	2,42	0,47	2,72	6,55E-03	3,45E-02
CA_RS12900	CA_C2518	1255,87	1,28	2,44	0,21	6,18	6,29E-10	3,62E-08
CA_RS08100	CA_C1552	123,91	1,29	2,44	0,50	2,60	9,37E-03	4,42E-02
CA_RS04510	CA_C0843	349,03	1,29	2,44	0,47	2,74	6,19E-03	3,29E-02
CA_RS14445	CA_C2807	2516,35	1,29	2,45	0,28	4,64	3,42E-06	6,50E-05
CA_RS03565	CA_C0656	263,24	1,29	2,45	0,39	3,29	1,01E-03	7,89E-03
CA_RS08270	CA_C1586	120,24	1,30	2,45	0,45	2,86	4,24E-03	2,43E-02
CA_RS13995	CA_C2716	2545,25	1,31	2,48	0,22	6,06	1,37E-09	6,71E-08
CA_RS18620	CA_C3619	543,70	1,34	2,53	0,46	2,92	3,54E-03	2,12E-02
CA_RS10285	CA_C1988	391,27	1,34	2,54	0,40	3,32	8,87E-04	7,09E-03
CA_RS08700	CA_C1673	27999,53	1,34	2,54	0,27	5,05	4,45E-07	1,04E-05
CA_RS15730	CA_C3061	2900,23	1,35	2,54	0,50	2,67	7,50E-03	3,77E-02
CA_RS13225	CA_C2584	3886,19	1,36	2,57	0,33	4,09	4,38E-05	5,60E-04
CA_RS15040	CA_C2923	122,70	1,36	2,57	0,44	3,07	2,13E-03	1,44E-02
CA_RS15790	CA_C3073	2704,24	1,37	2,59	0,35	3,94	8,27E-05	9,43E-04
CA_RS03930	CA_C0727	9637,99	1,38	2,60	0,47	2,91	3,60E-03	2,14E-02
CA_RS15785	CA_C3072	2931,19	1,38	2,60	0,31	4,48	7,62E-06	1,27E-04
CA_RS18625	CA_C3620	515,29	1,38	2,60	0,47	2,94	3,33E-03	2,03E-02
CA_RS15775	CA_C3070	5704,59	1,38	2,60	0,41	3,36	7,68E-04	6,33E-03
CA_RS13200	CA_C2579	86,68	1,38	2,61	0,42	3,29	1,01E-03	7,90E-03
CA_RS05725	CA_C1079	5674,18	1,39	2,63	0,37	3,81	1,39E-04	1,45E-03
CA_RS08530	CA_C1637	261,57	1,41	2,66	0,46	3,08	2,06E-03	1,40E-02
CA_RS14775	CA_C2870	3521,80	1,41	2,66	0,32	4,35	1,35E-05	2,09E-04
CA_RS02975	CA_C0542	1277,87	1,42	2,67	0,35	4,04	5,25E-05	6,51E-04
CA_RS04760	CA_C0892	17255,59	1,42	2,68	0,55	2,58	9,95E-03	4,62E-02
CA_RS16560	CA_C3217	372,83	1,43	2,69	0,34	4,17	3,04E-05	4,13E-04
CA_RS10295	CA_C1990	420,19	1,43	2,70	0,41	3,53	4,22E-04	3,79E-03
CA_RS18870	CA_C3669	79,83	1,45	2,73	0,38	3,82	1,31E-04	1,38E-03
CA_RS02455	CA_C0441	488,18	1,45	2,74	0,47	3,06	2,21E-03	1,47E-02
CA_RS01440	CA_C0258	20,64	1,45	2,74	0,56	2,58	9,82E-03	4,57E-02
CA_RS13890	CA_C2693	83,19	1,46	2,75	0,48	3,02	2,52E-03	1,64E-02
CA_RS13025	CA_C2542	414,94	1,46	2,75	0,55	2,67	7,62E-03	3,81E-02
CA_RS08050	CA_C1542	4982,44	1,47	2,77	0,35	4,19	2,76E-05	3,84E-04
CA_RS10465	CA_C2026	284,31	1,48	2,78	0,29	5,05	4,37E-07	1,03E-05
CA_RS10445	CA_C2021	321,34	1,49	2,82	0,37	4,02	5,89E-05	7,07E-04

CA_RS08030	CA_C1538a	6699,03	1,51	2,84	0,48	3,12	1,83E-03	1,28E-02
CA_RS14325	CA_C2783	4936,69	1,51	2,84	0,51	2,98	2,90E-03	1,84E-02
CA_RS13830	CA_C2682	48,47	1,51	2,85	0,50	3,01	2,62E-03	1,70E-02
CA_RS14450	CA_C2808	2536,72	1,51	2,86	0,19	7,80	6,36E-15	8,76E-13
CA_RS18765	CA_C3648	1126,64	1,52	2,87	0,38	4,01	6,07E-05	7,26E-04
CA_RS15105	CA_C2936	380,23	1,53	2,90	0,26	5,81	6,41E-09	2,60E-07
CA_RS15740	CA_C3063	3186,99	1,55	2,93	0,58	2,65	8,01E-03	3,93E-02
CA_RS12360	CA_C2408	149,62	1,55	2,94	0,37	4,20	2,64E-05	3,69E-04
CA_RS18695	CA_C3634	16198,19	1,57	2,97	0,37	4,28	1,85E-05	2,67E-04
CA_RS04985	CA_C0937	151,57	1,58	3,00	0,51	3,09	2,03E-03	1,39E-02
CA_RS12470	CA_C2431	7788,23	1,59	3,00	0,38	4,18	2,94E-05	4,05E-04
CA_RS09710	CA_C1874	982,11	1,59	3,00	0,39	4,02	5,78E-05	6,99E-04
CA_RS08105	CA_C1553	218,73	1,60	3,03	0,39	4,07	4,67E-05	5,90E-04
CA_RS06965	CA_C1322	26,65	1,61	3,05	0,62	2,61	9,15E-03	4,34E-02
CA_RS01205	CA_C0215	436,51	1,62	3,08	0,56	2,89	3,91E-03	2,29E-02
CA_RS12350	CA_C2406	115,48	1,63	3,09	0,43	3,82	1,31E-04	1,38E-03
CA_RS15770	CA_C3069	1470,67	1,64	3,11	0,44	3,71	2,05E-04	2,06E-03
CA_RS18895	CA_C3674	3081,90	1,64	3,11	0,49	3,37	7,41E-04	6,16E-03
CA_RS18390	CA_C3581	335,58	1,65	3,14	0,35	4,66	3,12E-06	6,10E-05
CA_RS13865		46,43	1,66	3,16	0,57	2,93	3,42E-03	2,07E-02
CA_RS13210	CA_C2581	474,28	1,68	3,20	0,23	7,23	4,97E-13	5,32E-11
CA_RS01210	CA_C0216	107,55	1,68	3,21	0,48	3,54	4,01E-04	3,64E-03
CA_RS04025	CA_C0746	23698,07	1,69	3,22	0,46	3,69	2,21E-04	2,18E-03
CA_RS04785	CA_C0897	2904,40	1,69	3,22	0,65	2,60	9,31E-03	4,40E-02
CA_RS13335	CA_C2606	25,25	1,69	3,22	0,54	3,12	1,80E-03	1,26E-02
CA_RS05695	CA_C1072	131,45	1,69	3,23	0,40	4,23	2,36E-05	3,34E-04
CA_RS18615	CA_C3618	336,06	1,70	3,25	0,47	3,65	2,61E-04	2,49E-03
CA_RS06285	CA_C1187	83,97	1,70	3,26	0,55	3,11	1,89E-03	1,31E-02
CA_RS06185	CA_C1169	53,00	1,71	3,27	0,54	3,15	1,64E-03	1,19E-02
CA_RS12355	CA_C2407	50,20	1,72	3,29	0,49	3,48	5,06E-04	4,46E-03
CA_RS00100	CA_C0015	129,98	1,72	3,30	0,59	2,91	3,65E-03	2,16E-02
CA_RS08535	CA_C1638	42,33	1,72	3,30	0,63	2,75	5,90E-03	3,18E-02
CA_RS15765	CA_C3068	1362,49	1,72	3,31	0,46	3,76	1,68E-04	1,71E-03
CA_RS03570	CA_C0658	252,65	1,74	3,34	0,30	5,75	8,82E-09	3,42E-07
CA_RS10440	CA_C2020	267,98	1,75	3,36	0,41	4,30	1,67E-05	2,48E-04
CA_RS13030	CA_C2543	627,17	1,77	3,40	0,53	3,35	8,07E-04	6,55E-03
CA_RS18705	CA_C3636	6443,18	1,77	3,40	0,34	5,25	1,48E-07	4,14E-06
CA_RS10450	CA_C2022	357,12	1,77	3,41	0,33	5,42	6,08E-08	1,82E-06
CA_RS15755	CA_C3066	893,45	1,77	3,42	0,63	2,82	4,78E-03	2,68E-02
CA_RS06045	CA_C1142	381,92	1,77	3,42	0,60	2,96	3,12E-03	1,95E-02
CA_RS10305	CA_C1992	102,58	1,78	3,42	0,56	3,17	1,54E-03	1,13E-02
CA_RS15620	CA_C3039	40,87	1,78	3,43	0,56	3,19	1,43E-03	1,06E-02
CA_RS03580	CA_C0660	130,65	1,78	3,44	0,38	4,64	3,46E-06	6,50E-05
CA_RS18610	CA_C3617	1176,18	1,80	3,47	0,55	3,29	9,94E-04	7,82E-03
CA_RS16280	CA_C3170	63615,64	1,80	3,48	0,49	3,66	2,52E-04	2,43E-03
CA_RS18715	CA_C3638	9074,15	1,81	3,50	0,30	5,98	2,28E-09	1,06E-07
CA_RS10460	CA_C2025	349,49	1,82	3,54	0,31	5,96	2,49E-09	1,13E-07
CA_RS01820	CA_C0316	458,83	1,82	3,54	0,60	3,06	2,22E-03	1,48E-02
CA_RS12345	CA_C2405	120,95	1,83	3,54	0,47	3,89	9,93E-05	1,08E-03
CA_RS10290	CA_C1989	90,68	1,84	3,59	0,44	4,17	3,06E-05	4,14E-04

CA_RS10535	CA_C2041	49,19	1,86	3,62	0,48	3,87	1,09E-04	1,17E-03
CA_RS16250	CA_C3164	741,27	1,86	3,63	0,30	6,18	6,26E-10	3,62E-08
CA_RS09895	CA_C1910	354,00	1,88	3,67	0,48	3,92	8,82E-05	9,91E-04
CA_RS16290	CA_C3172	8179,50	1,88	3,69	0,48	3,89	9,84E-05	1,07E-03
CA_RS04195	CA_C0780	366,85	1,91	3,75	0,64	2,96	3,12E-03	1,95E-02
CA_RS16285	CA_C3171	36511,04	1,91	3,76	0,51	3,77	1,66E-04	1,70E-03
CA_RS12485	CA_C2434	667,99	1,94	3,82	0,49	3,97	7,25E-05	8,39E-04
CA_RS04780	CA_C0896	3953,54	1,94	3,83	0,68	2,85	4,44E-03	2,52E-02
CA_RS06995		24,37	1,94	3,84	0,73	2,68	7,46E-03	3,76E-02
CA_RS20165		60,11	1,94	3,84	0,74	2,62	8,88E-03	4,23E-02
CA_RS13035	CA_C2544	394,91	1,94	3,85	0,40	4,80	1,55E-06	3,29E-05
CA_RS18710	CA_C3637	6276,74	1,95	3,86	0,32	6,16	7,41E-10	4,14E-08
CA_RS04980	CA_C0936	45,15	1,95	3,86	0,53	3,69	2,25E-04	2,21E-03
CA_RS18700	CA_C3635	3629,34	1,96	3,88	0,29	6,63	3,29E-11	2,70E-09
CA_RS12490	CA_C2435	821,74	1,96	3,88	0,49	4,00	6,24E-05	7,43E-04
CA_RS16275	CA_C3169	20293,73	1,96	3,89	0,45	4,32	1,56E-05	2,34E-04
CA_RS04365	CA_C0813	17,00	1,98	3,93	0,66	3,00	2,66E-03	1,72E-02
CA_RS15625	CA_C3040	775,63	2,00	4,00	0,54	3,67	2,42E-04	2,35E-03
CA_RS17755	CA_C3453	5175,15	2,01	4,02	0,37	5,43	5,75E-08	1,79E-06
CA_RS15310	CA_C2976	14211,07	2,01	4,04	0,56	3,57	3,59E-04	3,30E-03
CA_RS15780	CA_C3071	1352,68	2,02	4,05	0,36	5,64	1,73E-08	6,24E-07
CA_RS04775	CA_C0895	5094,70	2,03	4,09	0,68	3,01	2,63E-03	1,70E-02
CA_RS10355	CA_C2003	2001,30	2,05	4,15	0,48	4,23	2,31E-05	3,29E-04
CA_RS14025	CA_C2722	63,04	2,06	4,16	0,44	4,65	3,36E-06	6,44E-05
CA_RS04375	CA_C0815	1798,00	2,07	4,20	0,26	7,92	2,41E-15	4,23E-13
CA_RS16300	CA_C3174	23856,71	2,08	4,22	0,60	3,44	5,90E-04	5,10E-03
CA_RS16295	CA_C3173	18378,76	2,10	4,28	0,50	4,23	2,33E-05	3,30E-04
CA_RS05735	CA_C1081	2033,79	2,12	4,35	0,36	5,97	2,42E-09	1,11E-07
CA_RS10315	CA_C1994	118,27	2,14	4,39	0,55	3,91	9,09E-05	1,01E-03
CA_RS12495	CA_C2436	1347,25	2,14	4,40	0,54	3,92	8,75E-05	9,89E-04
CA_RS04990	CA_C0938	21,76	2,15	4,43	0,84	2,56	1,04E-02	4,77E-02
CA_RS04685	CA_C0877	5573,10	2,15	4,45	0,36	5,92	3,28E-09	1,42E-07
CA_RS10310	CA_C1993	202,57	2,16	4,46	0,42	5,11	3,28E-07	8,20E-06
CA_RS15375	CA_C2990	7658,07	2,17	4,49	0,52	4,15	3,35E-05	4,46E-04
CA_RS10350	CA_C2002	577,28	2,20	4,59	0,41	5,43	5,63E-08	1,79E-06
CA_RS04505	CA_C0842	16,62	2,20	4,60	0,69	3,19	1,42E-03	1,06E-02
CA_RS03560	CA_C0655	12,33	2,23	4,68	0,79	2,81	4,88E-03	2,73E-02
CA_RS09225	CA_C1776	254,50	2,25	4,77	0,57	3,94	8,01E-05	9,19E-04
CA_RS04770	CA_C0894	3769,78	2,25	4,77	0,64	3,53	4,16E-04	3,74E-03
CA_RS15325	CA_C2979	6573,74	2,27	4,83	0,64	3,54	4,00E-04	3,64E-03
CA_RS13600	CA_C2659	70,48	2,28	4,87	0,77	2,96	3,06E-03	1,92E-02
CA_RS10345	CA_C2001	1284,53	2,30	4,92	0,49	4,72	2,42E-06	4,85E-05
CA_RS04005	CA_C0742	1682,33	2,31	4,95	0,62	3,71	2,11E-04	2,11E-03
CA_RS15315	CA_C2977	7556,73	2,31	4,97	0,63	3,67	2,44E-04	2,35E-03
CA_RS04380	CA_C0816	1308,69	2,32	4,99	0,29	8,10	5,53E-16	1,07E-13
CA_RS10430	CA_C2018	667,78	2,33	5,01	0,30	7,85	4,13E-15	6,36E-13
CA_RS05730	CA_C1080	3043,75	2,37	5,16	0,37	6,39	1,66E-10	1,14E-08
CA_RS10325	CA_C1997	509,48	2,37	5,17	0,46	5,17	2,31E-07	6,31E-06
CA_RS18755	CA_C3646	1645,39	2,38	5,20	0,18	13,57	6,35E-42	2,45E-38
CA_RS10365	CA_C2005	575,78	2,38	5,20	0,55	4,29	1,77E-05	2,57E-04

CA_RS10435	CA_C2019	200,63	2,40	5,29	0,55	4,35	1,36E-05	2,09E-04
CA_RS12480	CA_C2433	14230,30	2,44	5,44	0,53	4,62	3,86E-06	7,16E-05
CA_RS10380	CA_C2008	1437,66	2,55	5,85	0,40	6,31	2,85E-10	1,89E-08
CA_RS01520	CA_C0274	3248,72	2,56	5,91	0,64	4,00	6,46E-05	7,61E-04
CA_RS05865	CA_C1105	186,19	2,60	6,06	0,63	4,13	3,56E-05	4,68E-04
CA_RS13205	CA_C2580	10,92	2,60	6,08	0,87	3,01	2,64E-03	1,71E-02
CA_RS10385	CA_C2009	1314,46	2,60	6,08	0,43	6,07	1,26E-09	6,31E-08
CA_RS05940	CA_C1120	12445,99	2,61	6,09	0,89	2,93	3,40E-03	2,07E-02
CA_RS16215	CA_C3157	989,02	2,61	6,12	0,70	3,73	1,91E-04	1,92E-03
CA_RS05875	CA_C1107	1997,89	2,61	6,12	0,93	2,81	4,92E-03	2,74E-02
CA_RS10540	CA_C2042	77,31	2,62	6,16	0,48	5,44	5,32E-08	1,72E-06
CA_RS03600	CA_C0664	111,70	2,63	6,17	0,77	3,42	6,22E-04	5,29E-03
CA_RS05190	CA_C0974	1053,46	2,63	6,18	0,65	4,03	5,61E-05	6,87E-04
CA_RS10425	CA_C2017	383,47	2,63	6,18	0,42	6,25	4,22E-10	2,66E-08
CA_RS10360	CA_C2004	409,24	2,63	6,20	0,53	4,94	7,74E-07	1,73E-05
CA_RS05860	CA_C1104	1389,68	2,64	6,25	0,67	3,97	7,18E-05	8,36E-04
CA_RS07495	CA_C1427	2162,81	2,64	6,25	0,24	11,13	9,03E-29	1,74E-25
CA_RS16220	CA_C3158	1234,24	2,66	6,30	0,74	3,61	3,08E-04	2,89E-03
CA_RS00505	CA_C0091	41811,15	2,66	6,31	0,59	4,47	7,82E-06	1,29E-04
CA_RS10395	CA_C2011	2946,50	2,67	6,36	0,44	6,13	8,88E-10	4,82E-08
CA_RS15320	CA_C2978	732,90	2,67	6,38	0,69	3,90	9,64E-05	1,06E-03
CA_RS10415	CA_C2015	855,52	2,67	6,39	0,49	5,44	5,42E-08	1,74E-06
CA_RS04370	CA_C0814	2429,24	2,68	6,43	0,33	8,23	1,88E-16	4,03E-14
CA_RS06240	CA_C1178	32,73	2,69	6,47	0,82	3,28	1,04E-03	8,16E-03
CA_RS06210	CA_C1173	49,27	2,71	6,52	0,65	4,13	3,59E-05	4,69E-04
CA_RS10340	CA_C2000	123,80	2,71	6,52	0,59	4,55	5,37E-06	9,57E-05
CA_RS10330	CA_C1998	190,56	2,71	6,53	0,52	5,22	1,78E-07	4,93E-06
CA_RS10390	CA_C2010	1138,07	2,74	6,68	0,42	6,51	7,72E-11	5,95E-09
CA_RS05870	CA_C1106	604,60	2,75	6,74	1,08	2,54	1,10E-02	4,96E-02
CA_RS10405	CA_C2013	681,43	2,76	6,76	0,54	5,15	2,66E-07	7,02E-06
CA_RS05955	CA_C1124	4877,00	2,76	6,77	0,95	2,91	3,65E-03	2,16E-02
CA_RS10375	CA_C2007	860,11	2,78	6,85	0,46	6,09	1,15E-09	5,84E-08
CA_RS18720	CA_C3639	239,51	2,78	6,89	0,32	8,70	3,24E-18	1,25E-15
CA_RS06005	CA_C1134	3464,47	2,79	6,91	0,97	2,89	3,86E-03	2,27E-02
CA_RS05935	CA_C1119	831,28	2,79	6,92	1,05	2,66	7,77E-03	3,84E-02
CA_RS12960	CA_C2530	11,74	2,79	6,92	0,89	3,13	1,73E-03	1,23E-02
CA_RS10370	CA_C2006	213,08	2,80	6,96	0,38	7,38	1,59E-13	1,85E-11
CA_RS03620	CA_C0668	250,67	2,81	7,00	0,56	5,03	4,78E-07	1,10E-05
CA_RS16970	CA_C3298	11042,95	2,83	7,13	0,43	6,58	4,82E-11	3,87E-09
CA_RS00460	CA_C0082	6108,30	2,84	7,16	0,50	5,68	1,32E-08	4,86E-07
CA_RS05185	CA_C0973	671,74	2,85	7,19	0,70	4,06	4,85E-05	6,11E-04
CA_RS10400	CA_C2012	509,20	2,86	7,28	0,44	6,53	6,70E-11	5,27E-09
CA_RS06010	CA_C1135	1857,14	2,87	7,31	1,00	2,88	3,95E-03	2,29E-02
CA_RS10420	CA_C2016	508,82	2,87	7,33	0,46	6,20	5,67E-10	3,47E-08
CA_RS12275	CA_C2391	870,77	2,92	7,55	0,57	5,08	3,70E-07	9,09E-06
CA_RS10410	CA_C2014	134,60	2,92	7,58	0,52	5,60	2,09E-08	7,27E-07
CA_RS05985	CA_C1130	9844,29	2,93	7,61	1,09	2,69	7,16E-03	3,65E-02
CA_RS06000	CA_C1133	3548,34	2,95	7,71	0,91	3,23	1,23E-03	9,33E-03
CA_RS01100	CA_C0194	1920,73	2,98	7,88	0,34	8,66	4,52E-18	1,58E-15
CA_RS12270	CA_C2390	355,45	2,98	7,88	0,57	5,27	1,36E-07	3,85E-06

CA_RS06015	CA_C1136	1943,72	2,98	7,91	1,06	2,80	5,07E-03	2,81E-02
CA_RS16235	CA_C3161	350,67	2,99	7,96	0,76	3,93	8,47E-05	9,60E-04
CA_RS10335	CA_C1999	76,81	3,07	8,38	0,54	5,72	1,09E-08	4,07E-07
CA_RS10025	CA_C1936	167,24	3,08	8,48	0,86	3,59	3,36E-04	3,11E-03
CA_RS16230	CA_C3160	863,53	3,09	8,54	0,69	4,48	7,45E-06	1,24E-04
CA_RS05990	CA_C1131	2378,64	3,10	8,56	1,15	2,70	6,84E-03	3,54E-02
CA_RS05995	CA_C1132	4489,01	3,13	8,74	1,07	2,93	3,40E-03	2,07E-02
CA_RS01515	CA_C0273	13583,80	3,16	8,96	0,79	4,02	5,84E-05	7,04E-04
CA_RS03615	CA_C0667	951,75	3,16	8,97	0,70	4,54	5,67E-06	1,00E-04
CA_RS03590	CA_C0662	857,25	3,17	8,99	0,61	5,16	2,47E-07	6,65E-06
CA_RS11750	CA_C2289	60,24	3,17	9,00	0,62	5,14	2,71E-07	7,06E-06
CA_RS12260	CA_C2388	548,05	3,18	9,04	0,74	4,32	1,56E-05	2,34E-04
CA_RS01095	CA_C0193	4710,87	3,22	9,31	0,34	9,46	3,03E-21	1,55E-18
CA_RS03605	CA_C0665	758,48	3,24	9,43	0,75	4,30	1,69E-05	2,48E-04
CA_RS16245	CA_C3163	948,22	3,30	9,86	0,71	4,65	3,35E-06	6,44E-05
CA_RS16240	CA_C3162	236,97	3,31	9,88	0,74	4,49	7,08E-06	1,20E-04
CA_RS09870	CA_C1906	87,80	3,31	9,92	1,26	2,63	8,52E-03	4,14E-02
CA_RS09980	CA_C1927	16,29	3,41	10,61	1,13	3,02	2,50E-03	1,64E-02
CA_RS10050		31,86	3,45	10,95	1,00	3,45	5,67E-04	4,93E-03
CA_RS10015	CA_C1934	191,94	3,48	11,14	0,78	4,43	9,35E-06	1,51E-04
CA_RS17525	CA_C3408	2926,35	3,53	11,52	0,59	5,99	2,08E-09	9,88E-08
CA_RS10055	CA_C1942	53,42	3,56	11,78	0,82	4,35	1,36E-05	2,09E-04
CA_RS10320	CA_C1996	13,55	3,57	11,87	1,10	3,26	1,12E-03	8,63E-03
CA_RS10035	CA_C1939	59,23	3,58	11,97	0,90	3,97	7,16E-05	8,36E-04
CA_RS09925	CA_C1916	54,40	3,59	12,07	1,09	3,29	9,92E-04	7,82E-03
CA_RS09920	CA_C1915	41,97	3,59	12,08	1,22	2,94	3,26E-03	1,99E-02
CA_RS09970	CA_C1925	46,57	3,60	12,10	0,94	3,81	1,38E-04	1,45E-03
CA_RS09960	CA_C1923	77,22	3,67	12,77	0,97	3,79	1,52E-04	1,57E-03
CA_RS03595	CA_C0663	123,49	3,77	13,64	0,64	5,88	4,03E-09	1,69E-07
CA_RS17530	CA_C3409	3169,54	3,86	14,55	0,62	6,19	5,97E-10	3,59E-08
CA_RS10545	CA_C2043	80,09	3,86	14,56	0,78	4,94	7,96E-07	1,77E-05
CA_RS09990	CA_C1929	113,33	3,87	14,61	0,85	4,57	4,80E-06	8,73E-05
CA_RS09930	CA_C1917	81,18	3,87	14,66	0,97	4,00	6,32E-05	7,49E-04
CA_RS09950	CA_C1921	14,04	3,88	14,76	1,51	2,57	1,03E-02	4,74E-02
CA_RS09910	CA_C1913	63,72	3,97	15,67	1,33	2,99	2,81E-03	1,80E-02
CA_RS03610	CA_C0666	323,71	4,01	16,07	0,78	5,14	2,69E-07	7,05E-06
CA_RS05885	CA_C1109	23,07	4,03	16,31	0,91	4,41	1,03E-05	1,63E-04
CA_RS10070	CA_C1945	48,30	4,04	16,41	0,94	4,30	1,68E-05	2,48E-04
CA_RS09940	CA_C1919	21,97	4,06	16,67	1,29	3,14	1,69E-03	1,22E-02
CA_RS16225	CA_C3159	141,82	4,06	16,72	0,72	5,61	2,03E-08	7,15E-07
CA_RS00440	CA_C0078	2455,79	4,15	17,80	0,53	7,85	4,12E-15	6,36E-13
CA_RS09820	CA_C1898	44,65	4,17	17,94	1,56	2,67	7,60E-03	3,80E-02
CA_RS09965	CA_C1924	39,08	4,19	18,23	1,07	3,90	9,74E-05	1,07E-03
CA_RS06065		11,14	4,25	19,09	1,16	3,65	2,57E-04	2,46E-03
CA_RS10010	CA_C1933	40,94	4,27	19,27	1,03	4,13	3,69E-05	4,80E-04
CA_RS00445	CA_C0079	424,01	4,35	20,34	0,68	6,36	1,96E-10	1,33E-08
CA_RS10005	CA_C1932	8,23	4,63	24,78	1,69	2,74	6,15E-03	3,29E-02
CA_RS10040	CA_C1940	49,63	4,72	26,29	1,02	4,61	4,05E-06	7,47E-05
CA_RS10030	CA_C1938	170,66	4,79	27,66	0,81	5,93	2,98E-09	1,30E-07
CA_RS10080	CA_C1946	181,94	4,83	28,45	0,93	5,19	2,13E-07	5,87E-06

CA_RS10075		19,45	4,98	31,62	1,40	3,57	3,61E-04	3,31E-03
CA_RS12265	CA_C2389	130,92	5,21	37,06	0,96	5,42	5,81E-08	1,79E-06
CA_RS09935	CA_C1918	31,93	5,27	38,65	1,41	3,74	1,84E-04	1,86E-03

Annexe 7 : Analyse transcriptomique de *Nv*H en consortium avec *C. acetobutylicum*.

Gène	Old locus tag	baseMean	log2Fold Change	FC	lfcSE	stat	pvalue	padj
DVU_RS04950	DVU_1047	46,45	-5,36	41,08	1,20	-4,48	7,34E-06	5,18E-05
DVU_RS08560	DVU_1804	43,25	-5,26	38,31	1,19	-4,42	9,84E-06	6,71E-05
DVU_RS14830	DVU_3155	80,62	-5,17	36,10	1,21	-4,28	1,85E-05	1,18E-04
DVU_RS15920	DVUA0005	39,90	-5,14	35,34	1,20	-4,28	1,88E-05	1,20E-04
DVU_RS14940	DVU_3179	39,36	-5,12	34,86	1,19	-4,29	1,76E-05	1,14E-04
DVU_RS14620	DVU_3107	67,18	-4,87	29,33	1,25	-3,89	1,00E-04	5,19E-04
DVU_RS14255	DVU_3031	32,47	-4,84	28,74	1,19	-4,08	4,51E-05	2,57E-04
DVU_RS08490	DVU_1789	65,07	-4,83	28,39	1,18	-4,10	4,18E-05	2,40E-04
DVU_RS07615	DVU_1608	64,55	-4,82	28,24	1,17	-4,12	3,85E-05	2,23E-04
DVU_RS07830	DVU_1648	31,45	-4,80	27,85	1,19	-4,03	5,63E-05	3,12E-04
DVU_RS01510	DVU_0304	29,59	-4,71	26,16	1,23	-3,84	1,22E-04	6,14E-04
DVU_RS06845	DVU_1455	58,21	-4,66	25,28	1,18	-3,96	7,48E-05	4,04E-04
DVU_RS04960	DVU_1049	57,89	-4,65	25,13	1,18	-3,93	8,53E-05	4,53E-04
DVU_RS13710	DVU_2921	27,76	-4,62	24,54	1,19	-3,88	1,03E-04	5,32E-04
DVU_RS01935	DVU_0397	27,21	-4,59	24,04	1,20	-3,84	1,25E-04	6,23E-04
DVU_RS05750	DVU_1217	26,25	-4,54	23,24	1,20	-3,80	1,46E-04	7,13E-04
DVU_RS11530	DVU_2462	25,04	-4,47	22,19	1,19	-3,75	1,79E-04	8,56E-04
DVU_RS02790	DVU_0584	23,81	-4,40	21,07	1,19	-3,70	2,13E-04	1,00E-03
DVU_RS09125	DVU_1925	23,75	-4,39	20,99	1,19	-3,68	2,34E-04	1,08E-03
DVU_RS10485	DVU_2224	48,24	-4,38	20,77	1,17	-3,74	1,84E-04	8,79E-04
DVU_RS13735	DVU_2925	207,25	-4,35	20,45	0,66	-6,60	4,23E-11	7,11E-10
DVU_RS15615	DVU_3324	23,06	-4,35	20,37	1,23	-3,55	3,92E-04	1,71E-03
DVU_RS11365	DVU_2425	22,19	-4,30	19,67	1,20	-3,60	3,23E-04	1,45E-03
DVU_RS04280	DVU_0903	44,46	-4,25	19,06	1,18	-3,59	3,31E-04	1,48E-03
DVU_RS10425	DVU_2209	21,42	-4,24	18,93	1,19	-3,56	3,77E-04	1,66E-03
DVU_RS02475	DVU_0511	42,70	-4,24	18,83	1,19	-3,57	3,54E-04	1,57E-03
DVU_RS01655	DVU_0337	77,97	-4,21	18,53	1,03	-4,08	4,54E-05	2,58E-04
DVU_RS04270	DVU_0901	73,70	-4,19	18,31	1,06	-3,97	7,19E-05	3,91E-04
DVU_RS09140	DVU_1928	20,65	-4,19	18,26	1,19	-3,52	4,29E-04	1,84E-03
DVU_RS07610	DVU_1607	20,13	-4,16	17,84	1,20	-3,46	5,42E-04	2,25E-03
DVU_RS13230	DVU_2827	20,07	-4,15	17,73	1,20	-3,47	5,27E-04	2,19E-03
DVU_RS07605	DVU_1606	19,88	-4,14	17,63	1,20	-3,44	5,88E-04	2,39E-03
DVU_RS14515	DVU_3089	19,83	-4,13	17,55	1,20	-3,46	5,46E-04	2,26E-03
DVU_RS00805	DVU_0165	40,82	-4,13	17,46	1,17	-3,52	4,36E-04	1,87E-03
DVU_RS05690	DVU_1204	142,64	-4,12	17,42	0,73	-5,61	2,00E-08	2,24E-07
DVU_RS03685	DVU_0776	517,27	-4,11	17,24	0,45	-9,08	1,12E-19	3,62E-18
DVU_RS07835	DVU_1649	106,07	-4,11	17,22	0,86	-4,80	1,57E-06	1,27E-05
DVU_RS02765	DVU_0579	18,95	-4,07	16,77	1,19	-3,41	6,41E-04	2,58E-03
DVU_RS16760		18,50	-4,04	16,40	1,20	-3,35	7,96E-04	3,12E-03
DVU_RS13000	DVU_2772	18,47	-4,03	16,38	1,21	-3,34	8,35E-04	3,25E-03
DVU_RS07685	DVU_1622	38,42	-4,03	16,34	1,17	-3,44	5,75E-04	2,35E-03
DVU_RS10925	DVU_2329	36,88	-4,01	16,15	1,17	-3,42	6,18E-04	2,50E-03
DVU_RS13830	DVU_2945	18,14	-4,01	16,07	1,19	-3,37	7,50E-04	2,95E-03
DVU_RS04595	DVU_0971	37,39	-3,99	15,84	1,18	-3,39	7,07E-04	2,81E-03
DVU_RS06175	DVU_1311	17,83	-3,98	15,76	1,19	-3,34	8,23E-04	3,21E-03
DVU_RS14640	DVU_3111	16,91	-3,91	15,00	1,20	-3,24	1,17E-03	4,37E-03
DVU_RS00700	DVU_0144	16,57	-3,88	14,68	1,19	-3,26	1,13E-03	4,25E-03
DVU_RS15265	DVU_3246	34,78	-3,88	14,68	1,25	-3,09	2,01E-03	6,89E-03
DVU_RS04850	DVU_1026	16,51	-3,87	14,62	1,19	-3,24	1,19E-03	4,42E-03

DVU_RS04200	DVU_0887	33,14	-3,86	14,48	1,19	-3,23	1,23E-03	4,55E-03
DVU_RS00300	DVU_0063	16,33	-3,86	14,48	1,20	-3,23	1,26E-03	4,63E-03
DVU_RS02570	DVU_0530	16,26	-3,85	14,38	1,19	-3,23	1,23E-03	4,52E-03
DVU_RS07460	DVU_1577	16,22	-3,84	14,32	1,20	-3,20	1,40E-03	5,08E-03
DVU_RS04600	DVU_0972	33,45	-3,82	14,11	1,17	-3,25	1,14E-03	4,29E-03
DVU_RS07530	DVU_1590	58,07	-3,79	13,88	1,04	-3,65	2,60E-04	1,20E-03
DVU_RS16540	DVUA0124	15,61	-3,79	13,84	1,21	-3,13	1,76E-03	6,16E-03
DVU_RS00585	DVU_0117	15,56	-3,79	13,79	1,19	-3,17	1,50E-03	5,38E-03
DVU_RS08590	DVU_1810	15,35	-3,77	13,60	1,23	-3,06	2,19E-03	7,44E-03
DVU_RS10015	DVU_2122	31,73	-3,74	13,32	1,20	-3,12	1,83E-03	6,35E-03
DVU_RS08835	DVU_1862	30,30	-3,72	13,19	1,18	-3,16	1,55E-03	5,54E-03
DVU_RS05140	DVU_1086	14,91	-3,72	13,19	1,19	-3,13	1,76E-03	6,14E-03
DVU_RS00960	DVU_0200	14,35	-3,66	12,67	1,23	-2,98	2,85E-03	9,32E-03
DVU_RS12955	DVU_2762	29,97	-3,65	12,52	1,20	-3,04	2,33E-03	7,86E-03
DVU_RS04965	DVU_1050	284,27	-3,65	12,52	0,48	-7,62	2,52E-14	5,72E-13
DVU_RS07700	DVU_1625	14,08	-3,64	12,48	1,19	-3,06	2,23E-03	7,54E-03
DVU_RS02640	DVU_0548	14,08	-3,64	12,44	1,21	-3,00	2,71E-03	8,97E-03
DVU_RS10920	DVU_2328	13,95	-3,62	12,31	1,19	-3,03	2,42E-03	8,11E-03
DVU_RS06745	DVU_1432	76,97	-3,62	12,29	0,89	-4,05	5,03E-05	2,83E-04
DVU_RS05670	DVU_1200	28,05	-3,60	12,16	1,17	-3,07	2,16E-03	7,34E-03
DVU_RS05100	DVU_1078	126,01	-3,60	12,14	0,67	-5,39	7,02E-08	7,21E-07
DVU_RS09720	DVU_2063	103,49	-3,59	12,03	0,74	-4,84	1,27E-06	1,04E-05
DVU_RS13730	DVU_2924	125,88	-3,58	11,97	0,66	-5,43	5,57E-08	5,79E-07
DVU_RS01025	DVU_0213	13,54	-3,58	11,95	1,21	-2,96	3,06E-03	9,92E-03
DVU_RS07575	DVU_1600	13,46	-3,57	11,89	1,21	-2,95	3,19E-03	1,03E-02
DVU_RS08485	DVU_1788	141,95	-3,57	11,84	0,67	-5,29	1,23E-07	1,19E-06
DVU_RS15775	DVU_3362	13,35	-3,57	11,84	1,19	-2,99	2,82E-03	9,24E-03
DVU_RS15560	DVU_3309	13,34	-3,56	11,80	1,19	-2,99	2,77E-03	9,11E-03
DVU_RS16535	DVUA0123	13,26	-3,56	11,76	1,21	-2,94	3,30E-03	1,05E-02
DVU_RS09715	DVU_2062	103,14	-3,55	11,71	0,75	-4,73	2,21E-06	1,73E-05
DVU_RS02920	DVU_0611	13,01	-3,53	11,54	1,19	-2,96	3,09E-03	9,99E-03
DVU_RS08775	DVU_1849	12,99	-3,52	11,51	1,19	-2,96	3,06E-03	9,92E-03
DVU_RS06795	DVU_1446	26,54	-3,52	11,48	1,18	-2,98	2,87E-03	9,39E-03
DVU_RS12510	DVU_2672	12,92	-3,52	11,46	1,20	-2,93	3,42E-03	1,09E-02
DVU_RS04955	DVU_1048	48,03	-3,50	11,29	1,04	-3,36	7,66E-04	3,00E-03
DVU_RS11090	DVU_2367	69,49	-3,49	11,25	0,86	-4,07	4,80E-05	2,71E-04
DVU_RS07550	DVU_1595	49,52	-3,49	11,22	1,06	-3,29	9,97E-04	3,79E-03
DVU_RS16505	DVUA0118	25,82	-3,48	11,15	1,21	-2,88	3,94E-03	1,23E-02
DVU_RS05030	DVU_1064	197,10	-3,48	11,14	0,56	-6,26	3,97E-10	5,84E-09
DVU_RS08385	DVU_1765	12,61	-3,48	11,13	1,20	-2,90	3,75E-03	1,19E-02
DVU_RS10715	DVU_2281	25,49	-3,46	11,01	1,26	-2,74	6,12E-03	1,77E-02
DVU_RS03935	DVU_0832	12,26	-3,44	10,85	1,19	-2,89	3,84E-03	1,21E-02
DVU_RS03815	DVU_0807	26,26	-3,44	10,84	1,18	-2,91	3,58E-03	1,14E-02
DVU_RS16515		12,21	-3,44	10,83	1,22	-2,81	4,89E-03	1,48E-02
DVU_RS16765		24,95	-3,43	10,75	1,19	-2,89	3,87E-03	1,21E-02
DVU_RS09175	DVU_1935	26,06	-3,43	10,75	1,18	-2,89	3,79E-03	1,20E-02
DVU_RS01695	DVU_0346	44,30	-3,42	10,67	1,04	-3,30	9,73E-04	3,72E-03
DVU_RS11795	DVU_2522	12,03	-3,41	10,63	1,19	-2,86	4,17E-03	1,29E-02
DVU_RS13160	DVU_2808	108,25	-3,40	10,59	0,78	-4,39	1,13E-05	7,60E-05
DVU_RS07305	DVU_1550	11,91	-3,40	10,57	1,20	-2,83	4,62E-03	1,41E-02

DVU_RS05105	DVU_1079	24,46	-3,40	10,53	1,20	-2,83	4,62E-03	1,41E-02
DVU_RS11125	DVU_2375	46,07	-3,38	10,42	1,03	-3,28	1,02E-03	3,88E-03
DVU_RS03645	DVU_0768	88,63	-3,37	10,32	0,73	-4,59	4,52E-06	3,34E-05
DVU_RS14260	DVU_3032	45,61	-3,37	10,31	1,04	-3,25	1,17E-03	4,36E-03
DVU_RS09075	DVU_1912	25,01	-3,36	10,26	1,19	-2,83	4,67E-03	1,42E-02
DVU_RS04940	DVU_1045	112,20	-3,35	10,16	0,68	-4,90	9,61E-07	7,96E-06
DVU_RS08980	DVU_1892	23,60	-3,34	10,13	1,17	-2,85	4,40E-03	1,36E-02
DVU_RS05705	DVU_1207	64,46	-3,34	10,11	0,85	-3,95	7,84E-05	4,21E-04
DVU_RS07250	DVU_1538	11,35	-3,33	10,05	1,19	-2,79	5,27E-03	1,57E-02
DVU_RS07875	DVU_1657	24,39	-3,32	9,97	1,18	-2,81	5,03E-03	1,51E-02
DVU_RS02610	DVU_0540	64,84	-3,31	9,93	0,85	-3,89	9,88E-05	5,14E-04
DVU_RS05605	DVU_1187	42,58	-3,31	9,88	1,03	-3,20	1,37E-03	5,01E-03
DVU_RS02830	DVU_0592	44,74	-3,30	9,88	1,10	-3,00	2,71E-03	8,96E-03
DVU_RS02840	DVU_0594	43,45	-3,29	9,78	1,03	-3,19	1,44E-03	5,18E-03
DVU_RS09120	DVU_1924	22,64	-3,28	9,70	1,18	-2,78	5,42E-03	1,60E-02
DVU_RS14920	DVU_3175	22,58	-3,27	9,68	1,18	-2,78	5,39E-03	1,60E-02
DVU_RS13340	DVU_2849	10,91	-3,27	9,64	1,19	-2,74	6,23E-03	1,79E-02
DVU_RS02985	DVU_0628	23,59	-3,27	9,62	1,18	-2,76	5,77E-03	1,69E-02
DVU_RS04920	DVU_1041	60,84	-3,25	9,50	0,85	-3,84	1,22E-04	6,14E-04
DVU_RS04360	DVU_0919	82,07	-3,25	9,49	0,75	-4,32	1,53E-05	1,01E-04
DVU_RS00795	DVU_0163	10,64	-3,23	9,42	1,19	-2,71	6,74E-03	1,91E-02
DVU_RS03905	DVU_0826	42,06	-3,23	9,40	1,04	-3,11	1,86E-03	6,43E-03
DVU_RS10790	DVU_2297	10,58	-3,22	9,34	1,22	-2,64	8,22E-03	2,26E-02
DVU_RS00945	DVU_0197	10,49	-3,21	9,25	1,23	-2,61	8,94E-03	2,42E-02
DVU_RS14345	DVU_3051	10,41	-3,20	9,19	1,19	-2,68	7,30E-03	2,05E-02
DVU_RS12105	DVU_2581	10,34	-3,19	9,15	1,19	-2,67	7,49E-03	2,09E-02
DVU_RS06555	DVU_1389	58,49	-3,19	9,11	0,87	-3,68	2,34E-04	1,08E-03
DVU_RS16790		10,20	-3,18	9,05	1,19	-2,66	7,79E-03	2,16E-02
DVU_RS03345	DVU_0704	59,38	-3,17	9,00	0,85	-3,72	1,97E-04	9,31E-04
DVU_RS00020	DVU_0004	192,64	-3,15	8,88	0,50	-6,35	2,16E-10	3,37E-09
DVU_RS16255	DVUA0074	38,54	-3,15	8,88	1,03	-3,05	2,27E-03	7,65E-03
DVU_RS15275	DVU_3248	58,41	-3,14	8,80	0,93	-3,38	7,26E-04	2,87E-03
DVU_RS01505	DVU_0303	9,94	-3,13	8,78	1,22	-2,56	1,05E-02	2,74E-02
DVU_RS08735	DVU_1841	56,56	-3,13	8,77	0,85	-3,69	2,25E-04	1,05E-03
DVU_RS10410	DVU_2205	520,01	-3,13	8,76	0,86	-3,64	2,76E-04	1,26E-03
DVU_RS01670	DVU_0340	75,34	-3,11	8,65	0,74	-4,21	2,52E-05	1,56E-04
DVU_RS08555	DVU_1803	38,55	-3,10	8,56	1,03	-3,00	2,72E-03	9,00E-03
DVU_RS13520	DVU_2884	77,60	-3,09	8,53	0,75	-4,15	3,37E-05	2,01E-04
DVU_RS06480	DVU_1371	20,04	-3,09	8,51	1,18	-2,63	8,59E-03	2,35E-02
DVU_RS13755	DVU_2928	624,13	-3,08	8,45	0,30	-10,28	8,39E-25	3,34E-23
DVU_RS09145	DVU_1929	9,55	-3,08	8,44	1,19	-2,58	9,76E-03	2,60E-02
DVU_RS11115	DVU_2373	341,64	-3,08	8,44	0,37	-8,25	1,61E-16	4,37E-15
DVU_RS07710	DVU4008	19,87	-3,08	8,44	1,18	-2,61	9,13E-03	2,47E-02
DVU_RS05060	DVU_1070	38,09	-3,07	8,39	1,03	-2,98	2,87E-03	9,39E-03
DVU_RS15610	DVU_3323	70,45	-3,06	8,34	0,82	-3,72	2,02E-04	9,54E-04
DVU_RS16705	DVU_1865	9,35	-3,05	8,30	1,20	-2,55	1,08E-02	2,82E-02
DVU_RS00535	DVU_0106	20,72	-3,05	8,29	1,18	-2,59	9,60E-03	2,57E-02
DVU_RS03200	DVU_0674	37,66	-3,05	8,26	1,04	-2,94	3,33E-03	1,06E-02
DVU_RS07680		9,31	-3,04	8,25	1,20	-2,54	1,10E-02	2,86E-02
DVU_RS07950	DVU_1672	9,28	-3,04	8,20	1,19	-2,55	1,08E-02	2,82E-02

DVU_RS06855	DVU_tRNA-Met-2	9,23	-3,02	8,14	1,20	-2,52	1,16E-02	2,99E-02
DVU_RS14265	DVU_3033	179,71	-3,02	8,12	0,48	-6,25	4,19E-10	6,05E-09
DVU_RS16245	DVUA0072	74,21	-3,02	8,12	0,74	-4,10	4,13E-05	2,38E-04
DVU_RS07495	DVU_1583	106,46	-3,02	8,09	0,63	-4,82	1,44E-06	1,17E-05
DVU_RS16520	DVUA0120	19,04	-3,01	8,06	1,19	-2,53	1,14E-02	2,95E-02
DVU_RS02470	DVU_0510	143,06	-3,01	8,06	0,53	-5,70	1,16E-08	1,36E-07
DVU_RS15925	DVUA0006	35,32	-3,01	8,03	1,04	-2,89	3,91E-03	1,23E-02
DVU_RS09295	DVU_1961	8,97	-2,99	7,97	1,23	-2,43	1,50E-02	3,69E-02
DVU_RS01715	DVU_0350	51,64	-2,99	7,93	0,85	-3,53	4,22E-04	1,82E-03
DVU_RS04285	DVU_0904	84,69	-2,98	7,87	0,66	-4,50	6,78E-06	4,85E-05
DVU_RS13575	DVU_2896	172,64	-2,97	7,86	0,50	-5,90	3,58E-09	4,42E-08
DVU_RS09080	DVU_1913	125,63	-2,97	7,84	0,58	-5,11	3,14E-07	2,81E-06
DVU_RS07325	DVU_1554	8,82	-2,97	7,81	1,20	-2,48	1,32E-02	3,31E-02
DVU_RS10475	DVU_2222	89,34	-2,96	7,79	0,67	-4,45	8,49E-06	5,88E-05
DVU_RS14875	DVU_3165	19,53	-2,96	7,77	1,20	-2,46	1,40E-02	3,47E-02
DVU_RS16770	DVU_1088	8,63	-2,93	7,65	1,21	-2,43	1,51E-02	3,70E-02
DVU_RS04740	DVU_0999	69,42	-2,93	7,62	0,77	-3,80	1,43E-04	7,00E-04
DVU_RS06225	DVU_1321	19,29	-2,93	7,61	1,18	-2,49	1,27E-02	3,22E-02
DVU_RS14430	DVU_3069	34,92	-2,93	7,60	1,03	-2,84	4,57E-03	1,40E-02
DVU_RS11650	DVU_2491	66,85	-2,92	7,58	0,75	-3,88	1,04E-04	5,37E-04
DVU_RS15735	DVU_3353	66,78	-2,92	7,55	0,75	-3,91	9,29E-05	4,90E-04
DVU_RS16220	DVUA0068	69,71	-2,91	7,53	0,74	-3,93	8,36E-05	4,45E-04
DVU_RS12540	DVU_2678	31,69	-2,91	7,51	1,07	-2,72	6,51E-03	1,86E-02
DVU_RS05005	DVU_1059	8,51	-2,91	7,51	1,20	-2,43	1,50E-02	3,69E-02
DVU_RS03955	DVU_0836	67,95	-2,91	7,50	0,75	-3,89	1,02E-04	5,27E-04
DVU_RS08730	DVU_1840	49,11	-2,91	7,50	0,85	-3,43	6,13E-04	2,48E-03
DVU_RS03985	DVU_0842	34,69	-2,91	7,50	1,04	-2,81	4,99E-03	1,50E-02
DVU_RS15000	DVU_3191	32,98	-2,89	7,43	1,04	-2,78	5,42E-03	1,60E-02
DVU_RS10490	DVU_2225	240,44	-2,89	7,42	0,43	-6,77	1,25E-11	2,22E-10
DVU_RS01650	DVU_0336	84,61	-2,89	7,40	0,68	-4,27	1,97E-05	1,25E-04
DVU_RS04485	DVU_0945	48,32	-2,88	7,36	0,86	-3,33	8,59E-04	3,33E-03
DVU_RS15825	DVU_3374	17,46	-2,88	7,35	1,18	-2,44	1,48E-02	3,65E-02
DVU_RS10415	DVU_2206	50,42	-2,88	7,34	1,05	-2,75	5,92E-03	1,73E-02
DVU_RS03365	DVU_0710	8,24	-2,87	7,31	1,21	-2,37	1,77E-02	4,23E-02
DVU_RS15780	DVU_3363	64,87	-2,87	7,30	0,74	-3,88	1,06E-04	5,44E-04
DVU_RS05870	DVU_1245	33,85	-2,87	7,30	1,03	-2,77	5,58E-03	1,64E-02
DVU_RS13395	DVU_2859	8,26	-2,87	7,29	1,22	-2,35	1,89E-02	4,44E-02
DVU_RS06080	DVU_1289	238,58	-2,86	7,28	0,43	-6,62	3,58E-11	6,06E-10
DVU_RS00980	DVU_0204	8,22	-2,86	7,25	1,25	-2,29	2,20E-02	4,99E-02
DVU_RS03680	DVU_0775	1256,17	-2,86	7,25	0,25	-11,53	9,86E-31	6,04E-29
DVU_RS04295	DVU_0906	8,18	-2,86	7,24	1,19	-2,40	1,66E-02	3,99E-02
DVU_RS05700	DVU_1206	128,50	-2,85	7,23	0,53	-5,37	7,92E-08	8,08E-07
DVU_RS00040	DVU_0009	17,05	-2,84	7,16	1,18	-2,41	1,61E-02	3,90E-02
DVU_RS08740	DVU_1842	64,93	-2,83	7,13	0,73	-3,87	1,11E-04	5,62E-04
DVU_RS15565	DVU_3310	81,62	-2,83	7,13	0,66	-4,27	1,98E-05	1,26E-04
DVU_RS01010	DVU_0210	31,77	-2,83	7,10	1,07	-2,65	8,07E-03	2,23E-02
DVU_RS11690	DVU_2500	189,32	-2,83	7,10	0,48	-5,91	3,42E-09	4,25E-08
DVU_RS03080	DVU_0648	16,95	-2,82	7,08	1,18	-2,40	1,66E-02	3,98E-02
DVU_RS13835	DVU_2946	8,04	-2,82	7,08	1,22	-2,32	2,01E-02	4,64E-02
DVU_RS15315	DVU_3255	18,03	-2,82	7,08	1,17	-2,40	1,62E-02	3,92E-02

DVU_RS10940	DVU_2332	32,68	-2,82	7,07	1,03	-2,74	6,17E-03	1,78E-02
DVU_RS10825	DVU_2307	7,97	-2,82	7,07	1,20	-2,35	1,87E-02	4,39E-02
DVU_RS12895		78,08	-2,82	7,06	0,68	-4,17	3,04E-05	1,83E-04
DVU_RS02565	DVU_0529	7,96	-2,81	7,02	1,20	-2,35	1,86E-02	4,39E-02
DVU_RS08680	DVU_1828	46,21	-2,81	7,02	0,86	-3,26	1,11E-03	4,18E-03
DVU_RS05145	DVU_1087	17,98	-2,81	7,02	1,19	-2,37	1,79E-02	4,26E-02
DVU_RS14930	DVU_3177	7,86	-2,80	6,98	1,20	-2,34	1,91E-02	4,47E-02
DVU_RS14340	DVU_3050	7,90	-2,80	6,97	1,20	-2,34	1,93E-02	4,51E-02
DVU_RS15835	DVU_3376	17,73	-2,79	6,93	1,19	-2,35	1,90E-02	4,44E-02
DVU_RS13145	DVU2805	818,26	-2,79	6,92	0,46	-6,13	8,74E-10	1,20E-08
DVU_RS04515	DVU_0952	29,63	-2,79	6,91	1,04	-2,69	7,15E-03	2,02E-02
DVU_RS15410	DVU_3273	17,65	-2,79	6,91	1,19	-2,35	1,89E-02	4,43E-02
DVU_RS10800	DVU_2299	17,69	-2,79	6,90	1,20	-2,33	1,98E-02	4,58E-02
DVU_RS01780	DVU_0362	17,74	-2,78	6,89	1,17	-2,37	1,76E-02	4,20E-02
DVU_RS11085	DVU_2365	30,64	-2,78	6,87	1,06	-2,63	8,62E-03	2,35E-02
DVU_RS12525	DVU_2675	45,22	-2,78	6,85	0,85	-3,26	1,13E-03	4,25E-03
DVU_RS01795	DVU_0365	16,38	-2,77	6,84	1,17	-2,36	1,80E-02	4,29E-02
DVU_RS16745	DVU_0220	29,13	-2,77	6,82	1,06	-2,60	9,27E-03	2,50E-02
DVU_RS00965	DVU_0201	17,50	-2,77	6,82	1,21	-2,30	2,17E-02	4,93E-02
DVU_RS11465	DVU_2449	198,97	-2,77	6,80	0,45	-6,11	1,01E-09	1,37E-08
DVU_RS09390	DVU_1983	46,33	-2,76	6,80	0,85	-3,27	1,08E-03	4,09E-03
DVU_RS11360	DVU_2424	16,25	-2,76	6,79	1,18	-2,34	1,94E-02	4,51E-02
DVU_RS08695	DVU_1833	830,86	-2,76	6,78	0,25	-10,83	2,42E-27	1,14E-25
DVU_RS10650	DVU_2260	43,53	-2,76	6,77	0,86	-3,22	1,30E-03	4,76E-03
DVU_RS15505	DVU_3298	7,62	-2,75	6,74	1,20	-2,30	2,12E-02	4,85E-02
DVU_RS13720	DVU_2922	74,98	-2,75	6,74	0,68	-4,03	5,50E-05	3,05E-04
DVU_RS16530	DVUA0122	17,16	-2,74	6,69	1,18	-2,33	2,01E-02	4,63E-02
DVU_RS13740	DVU_2926	221,18	-2,73	6,65	0,40	-6,88	5,94E-12	1,09E-10
DVU_RS04605	DVU_0973	45,32	-2,73	6,62	0,85	-3,20	1,36E-03	4,97E-03
DVU_RS11410		42,53	-2,72	6,59	0,85	-3,19	1,42E-03	5,14E-03
DVU_RS01390	DVU_0280	57,66	-2,72	6,58	0,75	-3,62	2,91E-04	1,32E-03
DVU_RS04275	DVU_0902	90,11	-2,72	6,57	0,61	-4,49	7,26E-06	5,13E-05
DVU_RS03910	DVU_0827	58,81	-2,71	6,55	0,75	-3,62	3,00E-04	1,35E-03
DVU_RS02220	DVU_0457	29,30	-2,70	6,49	1,06	-2,56	1,06E-02	2,76E-02
DVU_RS13665	DVU_2914	72,39	-2,69	6,47	0,67	-4,00	6,43E-05	3,51E-04
DVU_RS07905	DVU_1663	44,39	-2,69	6,44	0,86	-3,11	1,88E-03	6,50E-03
DVU_RS03690	DVU_0777	1166,35	-2,68	6,41	0,26	-10,33	4,91E-25	2,03E-23
DVU_RS06075	DVU_1288	42,70	-2,68	6,40	0,86	-3,11	1,89E-03	6,51E-03
DVU_RS03675	DVU_0774	355,79	-2,67	6,38	0,35	-7,60	2,94E-14	6,42E-13
DVU_RS10430	DVU_2210	67,78	-2,67	6,38	0,70	-3,82	1,34E-04	6,62E-04
DVU_RS00480	DVU_0095	172,47	-2,67	6,38	0,44	-6,06	1,38E-09	1,83E-08
DVU_RS03695	DVU_0778	216,98	-2,67	6,37	0,43	-6,27	3,62E-10	5,41E-09
DVU_RS02770	DVU_0580	41,09	-2,67	6,35	0,85	-3,13	1,73E-03	6,06E-03
DVU_RS06465	DVU_1368	58,41	-2,66	6,32	0,74	-3,59	3,32E-04	1,48E-03
DVU_RS03715	DVU_0785	58,75	-2,65	6,29	0,76	-3,47	5,18E-04	2,16E-03
DVU_RS12270	DVU_2616	87,88	-2,65	6,29	0,68	-3,90	9,80E-05	5,11E-04
DVU_RS13525	DVU_2885	44,74	-2,65	6,28	0,85	-3,12	1,83E-03	6,35E-03
DVU_RS14575	DVU_3102	42,94	-2,64	6,22	0,85	-3,11	1,85E-03	6,41E-03
DVU_RS04970	DVU_1051	80,63	-2,64	6,22	0,67	-3,96	7,59E-05	4,09E-04
DVU_RS13615	DVU_2904	28,09	-2,63	6,20	1,03	-2,55	1,09E-02	2,83E-02

DVU_RS10975	DVU_2339	29,15	-2,63	6,17	1,03	-2,55	1,09E-02	2,83E-02
DVU_RS15020	DVU_3195	54,64	-2,63	6,17	0,75	-3,50	4,57E-04	1,94E-03
DVU_RS04010	DVU_0849	964,49	-2,62	6,14	0,34	-7,65	1,96E-14	4,51E-13
DVU_RS00815	DVU_0167	42,48	-2,62	6,14	0,85	-3,08	2,09E-03	7,13E-03
DVU_RS10945	DVU_2333	26,50	-2,61	6,11	1,04	-2,52	1,17E-02	3,01E-02
DVU_RS03565	DVU_0752	106,43	-2,59	6,04	0,56	-4,67	2,99E-06	2,29E-05
DVU_RS11910	DVU_2547	52,25	-2,59	6,04	0,74	-3,48	4,96E-04	2,07E-03
DVU_RS04810	DVU_1018	80,80	-2,59	6,04	0,62	-4,18	2,88E-05	1,75E-04
DVU_RS12265	DVU_2615	43,98	-2,58	5,98	0,92	-2,81	4,94E-03	1,49E-02
DVU_RS04045	DVU_0856	152,74	-2,58	5,97	0,48	-5,33	9,89E-08	9,83E-07
DVU_RS03040	DVU_0639	27,13	-2,58	5,97	1,06	-2,43	1,51E-02	3,70E-02
DVU_RS07625	DVU_1610	81,36	-2,58	5,96	0,62	-4,14	3,45E-05	2,04E-04
DVU_RS16260	DVUA0075	68,84	-2,58	5,96	0,66	-3,91	9,29E-05	4,90E-04
DVU_RS08925	DVU_1882	193,71	-2,57	5,95	0,44	-5,90	3,56E-09	4,41E-08
DVU_RS03570	DVU_0753	40,13	-2,57	5,95	0,85	-3,04	2,39E-03	8,01E-03
DVU_RS07520	DVU_1588	27,10	-2,57	5,94	1,03	-2,49	1,27E-02	3,22E-02
DVU_RS00285	DVU_0060	95,48	-2,57	5,93	0,57	-4,51	6,42E-06	4,63E-05
DVU_RS01660	DVU_0338	54,10	-2,57	5,92	0,74	-3,49	4,85E-04	2,03E-03
DVU_RS07855	DVU_1653	76,75	-2,56	5,90	0,61	-4,20	2,70E-05	1,65E-04
DVU_RS12550	DVU_2680	53,83	-2,55	5,87	0,78	-3,25	1,14E-03	4,28E-03
DVU_RS03555	DVU_0750	28,14	-2,54	5,84	1,03	-2,46	1,38E-02	3,45E-02
DVU_RS00455	DVU_0090	84,83	-2,54	5,83	0,62	-4,07	4,65E-05	2,63E-04
DVU_RS09245	DVU_1950	51,75	-2,54	5,81	0,75	-3,40	6,70E-04	2,68E-03
DVU_RS02645	DVU_0549	28,10	-2,53	5,78	1,07	-2,36	1,84E-02	4,34E-02
DVU_RS00290	DVU_0061	190,06	-2,53	5,78	0,41	-6,22	5,01E-10	7,13E-09
DVU_RS02010	DVU_0412	40,52	-2,53	5,78	0,86	-2,96	3,09E-03	9,99E-03
DVU_RS02135	DVU_0440	67,05	-2,53	5,77	0,66	-3,81	1,40E-04	6,92E-04
DVU_RS06415	DVU_1358	27,63	-2,53	5,77	1,04	-2,43	1,52E-02	3,72E-02
DVU_RS10830	DVU_2308	87,54	-2,52	5,75	0,61	-4,13	3,57E-05	2,10E-04
DVU_RS02825	DVU_0591	176,02	-2,52	5,73	0,61	-4,13	3,59E-05	2,11E-04
DVU_RS05865	DVU_1244	52,19	-2,51	5,69	0,77	-3,28	1,04E-03	3,96E-03
DVU_RS08975	DVU_1891	37,21	-2,50	5,67	0,85	-2,94	3,24E-03	1,04E-02
DVU_RS00685	DVU_0141	81,07	-2,50	5,67	0,74	-3,37	7,49E-04	2,95E-03
DVU_RS08595	DVU_1811	53,82	-2,50	5,64	0,80	-3,13	1,77E-03	6,17E-03
DVU_RS13150	DVU_2806	204,25	-2,49	5,63	0,58	-4,33	1,52E-05	1,00E-04
DVU_RS02095	DVU_0431	157,50	-2,49	5,63	0,48	-5,20	1,96E-07	1,81E-06
DVU_RS02590	DVU_0535	227,34	-2,49	5,62	0,37	-6,76	1,42E-11	2,50E-10
DVU_RS13620	DVU_2905	25,60	-2,48	5,57	1,04	-2,38	1,73E-02	4,14E-02
DVU_RS00485	DVU_0096	39,04	-2,47	5,54	0,85	-2,89	3,80E-03	1,20E-02
DVU_RS07510	DVU_1586	26,78	-2,47	5,54	1,04	-2,38	1,71E-02	4,09E-02
DVU_RS04365	DVU_0920	63,14	-2,47	5,52	0,66	-3,71	2,04E-04	9,62E-04
DVU_RS09240	DVU_1949	104,54	-2,46	5,51	0,54	-4,59	4,46E-06	3,30E-05
DVU_RS09255	DVU_1952	76,07	-2,46	5,51	0,61	-4,04	5,41E-05	3,01E-04
DVU_RS06835	DVU_1454	25,47	-2,46	5,50	1,03	-2,38	1,75E-02	4,18E-02
DVU_RS03730	DVU_0788	38,82	-2,46	5,49	0,85	-2,88	4,04E-03	1,25E-02
DVU_RS14925	DVU_3176	124,71	-2,45	5,47	0,50	-4,94	7,71E-07	6,52E-06
DVU_RS00140	DVU_0030	26,64	-2,45	5,47	1,06	-2,31	2,07E-02	4,76E-02
DVU_RS08955	DVU_1888	37,31	-2,45	5,47	0,85	-2,88	4,03E-03	1,25E-02
DVU_RS14570	DVU_3101	91,33	-2,44	5,44	0,56	-4,36	1,32E-05	8,79E-05
DVU_RS00820	DVU_0168	26,39	-2,44	5,44	1,03	-2,37	1,78E-02	4,25E-02

DVU_RS03240	DVU_0683	196,22	-2,44	5,43	0,43	-5,63	1,85E-08	2,08E-07
DVU_RS03340	DVU_0703	119,59	-2,44	5,41	0,53	-4,63	3,57E-06	2,69E-05
DVU_RS00305	DVU_0064	86,92	-2,43	5,40	0,56	-4,31	1,65E-05	1,07E-04
DVU_RS16510	DVUA0119	59,40	-2,43	5,39	0,73	-3,33	8,78E-04	3,39E-03
DVU_RS14870	DVU_3164	24,97	-2,43	5,39	1,05	-2,32	2,01E-02	4,64E-02
DVU_RS09690	DVU_2055	122,75	-2,43	5,38	0,50	-4,84	1,32E-06	1,08E-05
DVU_RS02465	DVU_0509	24,83	-2,43	5,38	1,04	-2,34	1,92E-02	4,49E-02
DVU_RS10495	DVU_2226	187,98	-2,42	5,35	0,45	-5,34	9,28E-08	9,31E-07
DVU_RS09915	DVU_2102	97,21	-2,41	5,32	0,55	-4,37	1,24E-05	8,31E-05
DVU_RS06240	DVU_1324	143,77	-2,41	5,30	0,47	-5,11	3,15E-07	2,81E-06
DVU_RS10605	DVU_2247	266,14	-2,40	5,29	0,41	-5,85	4,87E-09	5,92E-08
DVU_RS04355	DVU_0918	157,90	-2,40	5,27	0,46	-5,22	1,77E-07	1,65E-06
DVU_RS08440	DVU_1778	74,89	-2,39	5,26	0,64	-3,77	1,66E-04	8,05E-04
DVU_RS07440	DVU_1574	157,60	-2,39	5,23	0,42	-5,64	1,65E-08	1,87E-07
DVU_RS06030	DVU_1279	23,06	-2,39	5,22	1,04	-2,29	2,20E-02	4,99E-02
DVU_RS15175	DVU_3227	37,15	-2,38	5,22	0,87	-2,73	6,39E-03	1,83E-02
DVU_RS04040	DVU_0855	158,82	-2,38	5,22	0,46	-5,21	1,84E-07	1,71E-06
DVU_RS00560	DVU_0112	50,06	-2,38	5,22	0,76	-3,16	1,60E-03	5,67E-03
DVU_RS13595	DVU_2900	34,22	-2,38	5,19	0,86	-2,76	5,86E-03	1,71E-02
DVU_RS14360	DVU_3054	36,86	-2,37	5,15	0,86	-2,74	6,21E-03	1,79E-02
DVU_RS06180	DVU_1312	72,05	-2,37	5,15	0,61	-3,90	9,57E-05	5,01E-04
DVU_RS02460	DVU_0508	455,61	-2,36	5,15	0,37	-6,33	2,47E-10	3,82E-09
DVU_RS04090	DVU_0864	48,12	-2,36	5,14	0,79	-2,99	2,81E-03	9,21E-03
DVU_RS14355	DVU_3053	70,54	-2,36	5,14	0,61	-3,84	1,23E-04	6,18E-04
DVU_RS00365	DVU_0076	80,91	-2,35	5,10	0,58	-4,06	4,92E-05	2,77E-04
DVU_RS08610	DVU_1814	36,41	-2,35	5,10	0,87	-2,70	6,91E-03	1,96E-02
DVU_RS07715	DVU_1627	46,13	-2,35	5,09	0,76	-3,10	1,94E-03	6,66E-03
DVU_RS14350	DVU_3052	60,91	-2,34	5,06	0,66	-3,54	3,99E-04	1,73E-03
DVU_RS06435	DVU_1362	45,78	-2,34	5,05	0,75	-3,12	1,80E-03	6,26E-03
DVU_RS03980	DVU_0841	108,11	-2,33	5,03	0,50	-4,62	3,86E-06	2,88E-05
DVU_RS04520	DVU_0953	110,92	-2,33	5,02	0,51	-4,61	4,07E-06	3,03E-05
DVU_RS11685	DVU_2499	394,35	-2,32	4,99	0,33	-7,11	1,19E-12	2,37E-11
DVU_RS16380	DVUA0099	82,35	-2,32	4,98	0,60	-3,86	1,12E-04	5,69E-04
DVU_RS05685	DVU_1203	259,13	-2,30	4,93	0,37	-6,17	6,87E-10	9,56E-09
DVU_RS15820	DVU_3373	95,67	-2,30	4,92	0,56	-4,14	3,53E-05	2,08E-04
DVU_RS13045	DVU_2784	297,34	-2,30	4,92	0,48	-4,84	1,32E-06	1,08E-05
DVU_RS06040	DVU_1281	58,29	-2,30	4,91	0,68	-3,37	7,55E-04	2,96E-03
DVU_RS15770	DVU_3361	36,43	-2,29	4,90	0,84	-2,71	6,63E-03	1,88E-02
DVU_RS11845	DVU_2533	154,03	-2,29	4,90	0,46	-4,98	6,30E-07	5,41E-06
DVU_RS08830	DVU_1861	48,76	-2,29	4,89	0,74	-3,11	1,85E-03	6,41E-03
DVU_RS03230	DVU_0681	56,79	-2,29	4,89	0,66	-3,44	5,73E-04	2,35E-03
DVU_RS08495	DVU_1790	111,57	-2,27	4,82	0,51	-4,48	7,38E-06	5,18E-05
DVU_RS06165	DVU_1309	169,11	-2,27	4,82	0,41	-5,48	4,29E-08	4,60E-07
DVU_RS13840	DVU_2947	253,02	-2,27	4,82	0,41	-5,55	2,92E-08	3,23E-07
DVU_RS11225	DVU_2395	105,49	-2,26	4,80	0,59	-3,85	1,18E-04	5,97E-04
DVU_RS07445	DVU_1575	90,53	-2,26	4,80	0,53	-4,29	1,77E-05	1,14E-04
DVU_RS02090	DVU_0430	387,72	-2,25	4,76	0,39	-5,77	7,87E-09	9,33E-08
DVU_RS09730	DVU_2066	33,04	-2,25	4,76	0,85	-2,65	8,02E-03	2,22E-02
DVU_RS03110	DVU_0654	57,10	-2,25	4,76	0,71	-3,18	1,46E-03	5,24E-03
DVU_RS02900	DVU_0607	126,24	-2,25	4,75	0,50	-4,49	7,10E-06	5,05E-05

DVU_RS05160	DVU_1091	44,84	-2,25	4,75	0,75	-2,99	2,78E-03	9,15E-03
DVU_RS03560	DVU_0751	35,66	-2,24	4,71	0,87	-2,58	9,90E-03	2,63E-02
DVU_RS00785	DVU_0161	114,53	-2,23	4,71	0,48	-4,62	3,93E-06	2,93E-05
DVU_RS00015	DVU_0003	265,68	-2,23	4,70	0,35	-6,34	2,35E-10	3,65E-09
DVU_RS08850	DVU_1866	54,69	-2,23	4,69	0,67	-3,32	9,08E-04	3,49E-03
DVU_RS13140	DVU_2804	1711,37	-2,23	4,69	0,41	-5,41	6,19E-08	6,41E-07
DVU_RS13190	DVU_2816	31,09	-2,22	4,67	0,88	-2,52	1,17E-02	3,00E-02
DVU_RS11120	DVU_2374	44,27	-2,22	4,66	0,74	-3,01	2,64E-03	8,75E-03
DVU_RS06070	DVU_1287	159,70	-2,22	4,65	0,42	-5,23	1,74E-07	1,63E-06
DVU_RS00625	DVU_0127	44,15	-2,21	4,64	0,76	-2,93	3,36E-03	1,07E-02
DVU_RS07430	DVU_1572	50,05	-2,21	4,64	0,95	-2,33	1,97E-02	4,57E-02
DVU_RS13725	DVU_2923	146,68	-2,21	4,64	0,42	-5,24	1,63E-07	1,54E-06
DVU_RS04820	DVU_1020	147,20	-2,21	4,63	0,47	-4,66	3,16E-06	2,40E-05
DVU_RS02105	DVU_0433	255,75	-2,21	4,62	0,39	-5,73	1,00E-08	1,19E-07
DVU_RS00755	DVU_0155	113,71	-2,21	4,62	0,85	-2,58	9,75E-03	2,60E-02
DVU_RS08600	DVU_1812	143,49	-2,21	4,61	0,49	-4,49	7,22E-06	5,11E-05
DVU_RS08615	DVU_1815	138,22	-2,20	4,61	0,51	-4,32	1,54E-05	1,01E-04
DVU_RS13760	DVU_2929	661,81	-2,20	4,60	0,32	-6,87	6,27E-12	1,14E-10
DVU_RS03520	DVU_0743	99,03	-2,20	4,58	0,54	-4,05	5,17E-05	2,90E-04
DVU_RS16250	DVUA0073	167,17	-2,19	4,57	0,41	-5,36	8,17E-08	8,28E-07
DVU_RS00825	DVU_0169	835,66	-2,18	4,55	0,29	-7,60	2,88E-14	6,34E-13
DVU_RS03210	DVU_0676	105,87	-2,18	4,54	0,55	-3,96	7,40E-05	4,01E-04
DVU_RS03245	DVU_0684	390,37	-2,18	4,53	0,31	-7,09	1,39E-12	2,72E-11
DVU_RS02195	DVU_0451	61,69	-2,17	4,51	0,62	-3,51	4,44E-04	1,89E-03
DVU_RS02670		44,80	-2,17	4,51	0,79	-2,76	5,76E-03	1,69E-02
DVU_RS13825	DVU_2944	132,46	-2,17	4,49	0,70	-3,08	2,06E-03	7,04E-03
DVU_RS03525	DVU_0744	65,54	-2,16	4,46	0,63	-3,40	6,76E-04	2,70E-03
DVU_RS08950	DVU_1887	96,24	-2,15	4,44	0,51	-4,23	2,33E-05	1,45E-04
DVU_RS12145	DVU_2590	173,37	-2,15	4,43	0,40	-5,32	1,06E-07	1,05E-06
DVU_RS04350	DVU_0917	939,67	-2,15	4,43	0,22	-9,62	6,54E-22	2,33E-20
DVU_RS10955	DVU_2335	42,27	-2,15	4,43	0,76	-2,83	4,67E-03	1,42E-02
DVU_RS14900	DVU_3170	33,67	-2,14	4,42	0,86	-2,50	1,26E-02	3,20E-02
DVU_RS16490		51,61	-2,14	4,41	0,76	-2,81	4,88E-03	1,47E-02
DVU_RS01785	DVU_0363	29,51	-2,13	4,37	0,85	-2,49	1,27E-02	3,22E-02
DVU_RS13155	DVU_2807	46,78	-2,12	4,34	0,80	-2,66	7,88E-03	2,18E-02
DVU_RS11405	DVU_2437	39,05	-2,12	4,34	0,75	-2,83	4,66E-03	1,42E-02
DVU_RS00760	DVU_0156	97,82	-2,12	4,34	0,52	-4,08	4,47E-05	2,55E-04
DVU_RS02425	DVU_0501	54,03	-2,12	4,33	0,66	-3,20	1,36E-03	4,98E-03
DVU_RS07275	DVU_1543	29,32	-2,11	4,32	0,85	-2,49	1,28E-02	3,22E-02
DVU_RS01645	DVU_0335	53,73	-2,11	4,31	0,66	-3,19	1,43E-03	5,18E-03
DVU_RS08890	DVU_1875	59,77	-2,10	4,28	0,71	-2,95	3,15E-03	1,02E-02
DVU_RS02740	DVU_0574	106,30	-2,10	4,28	0,51	-4,08	4,53E-05	2,58E-04
DVU_RS07470	DVU_1578	72,65	-2,10	4,27	0,57	-3,69	2,24E-04	1,05E-03
DVU_RS12230	DVU_2608	75,71	-2,09	4,25	0,58	-3,59	3,30E-04	1,48E-03
DVU_RS06000	DVU_1273	62,81	-2,08	4,24	0,61	-3,43	6,11E-04	2,48E-03
DVU_RS01165	DVU_0240	121,17	-2,08	4,23	0,47	-4,46	8,16E-06	5,66E-05
DVU_RS04425	DVU_0933	29,63	-2,07	4,19	0,86	-2,40	1,63E-02	3,93E-02
DVU_RS04415	DVU_0931	40,25	-2,06	4,17	0,75	-2,75	5,98E-03	1,74E-02
DVU_RS05150	DVU_1089	299,00	-2,05	4,15	0,33	-6,30	3,04E-10	4,61E-09
DVU_RS04575	DVU_0967	41,53	-2,05	4,15	0,74	-2,78	5,38E-03	1,60E-02

DVU_RS04015	DVU_0850	568,39	-2,05	4,14	0,32	-6,49	8,35E-11	1,34E-09
DVU_RS11285	DVU_2409	42,98	-2,05	4,14	0,77	-2,67	7,52E-03	2,10E-02
DVU_RS13030	DVU_2780	30,67	-2,05	4,13	0,85	-2,40	1,65E-02	3,97E-02
DVU_RS11305	DVU_2413	78,83	-2,04	4,12	0,53	-3,82	1,32E-04	6,57E-04
DVU_RS11230	DVU_2396	96,61	-2,04	4,11	0,61	-3,33	8,61E-04	3,33E-03
DVU_RS15320	DVU_3256	30,67	-2,04	4,10	0,85	-2,39	1,70E-02	4,08E-02
DVU_RS06265	DVU_1329	317,20	-2,04	4,10	0,31	-6,66	2,77E-11	4,77E-10
DVU_RS15035	DVU_3198	174,19	-2,04	4,10	0,46	-4,40	1,06E-05	7,20E-05
DVU_RS01720	DVU_0351	91,38	-2,04	4,10	0,50	-4,08	4,56E-05	2,59E-04
DVU_RS11540	DVU_2464	50,44	-2,03	4,08	0,66	-3,07	2,14E-03	7,30E-03
DVU_RS09365	DVU_1978	42,40	-2,03	4,08	0,74	-2,75	5,95E-03	1,73E-02
DVU_RS09340	DVU_1973	62,49	-2,03	4,08	0,62	-3,27	1,07E-03	4,06E-03
DVU_RS08840	DVU_1863	31,92	-2,03	4,07	0,86	-2,35	1,85E-02	4,37E-02
DVU_RS10030	DVU_2125	42,52	-2,03	4,07	0,78	-2,60	9,44E-03	2,54E-02
DVU_RS08630	DVU_1818	126,58	-2,03	4,07	0,42	-4,79	1,64E-06	1,32E-05
DVU_RS15500	DVU_3297	31,90	-2,02	4,07	0,88	-2,31	2,09E-02	4,79E-02
DVU_RS06375	DVU_1350	88,10	-2,02	4,06	0,51	-3,94	8,10E-05	4,33E-04
DVU_RS09805	DVU_2079	46,59	-2,02	4,06	0,75	-2,68	7,41E-03	2,07E-02
DVU_RS02720	DVU_0569	39,45	-2,02	4,05	0,74	-2,73	6,30E-03	1,81E-02
DVU_RS11940	DVU_2554	38,03	-2,02	4,05	0,78	-2,58	9,78E-03	2,60E-02
DVU_RS15795	DVU_3366	30,18	-2,02	4,05	0,88	-2,30	2,17E-02	4,93E-02
DVU_RS14245	DVU_3029	176,64	-2,01	4,04	0,38	-5,31	1,12E-07	1,09E-06
DVU_RS13130		211,38	-2,01	4,04	0,52	-3,90	9,47E-05	4,97E-04
DVU_RS15140	DVU_3220	77,21	-2,01	4,04	0,54	-3,75	1,78E-04	8,53E-04
DVU_RS06065	DVU_1286	187,97	-2,01	4,03	0,38	-5,24	1,60E-07	1,52E-06
DVU_RS06800	DVU_1447	49,86	-2,01	4,03	0,68	-2,95	3,21E-03	1,03E-02
DVU_RS06430	DVU_1361	63,82	-2,01	4,03	0,63	-3,20	1,39E-03	5,05E-03
DVU_RS11220	DVU_2394	113,14	-2,01	4,03	0,53	-3,80	1,45E-04	7,09E-04
DVU_RS02450	DVU_0506	40,43	-2,01	4,02	0,74	-2,72	6,60E-03	1,88E-02
DVU_RS07525	DVU_1589	57,34	-2,00	4,00	0,61	-3,26	1,10E-03	4,16E-03
DVU_RS15740	DVU4021	29,90	-2,00	4,00	0,86	-2,33	1,97E-02	4,57E-02
DVU_RS00490	DVU_0097	49,69	-2,00	4,00	0,67	-2,97	2,95E-03	9,61E-03
DVU_RS13600	DVU_2901	40,81	-2,00	4,00	0,79	-2,53	1,14E-02	2,94E-02
DVU_RS03105	DVU_0653	59,97	-2,00	3,99	0,62	-3,19	1,40E-03	5,08E-03
DVU_RS16465	DVUA0112	114,54	-1,99	3,98	0,55	-3,63	2,83E-04	1,29E-03
DVU_RS12995	DVU_2771	235,79	-1,99	3,98	0,37	-5,42	5,94E-08	6,16E-07
DVU_RS14365	DVU_3055	72,19	-1,98	3,94	0,57	-3,45	5,64E-04	2,32E-03
DVU_RS02955	DVU_0621	39,79	-1,98	3,94	0,74	-2,67	7,60E-03	2,11E-02
DVU_RS11525	DVU_2461	37,30	-1,97	3,93	0,74	-2,67	7,53E-03	2,10E-02
DVU_RS07210	DVU_1530	94,30	-1,97	3,91	0,49	-4,04	5,36E-05	2,99E-04
DVU_RS12505	DVU_2671	263,54	-1,97	3,91	0,33	-6,04	1,56E-09	2,02E-08
DVU_RS08635	DVU_1819	224,40	-1,96	3,90	0,35	-5,68	1,31E-08	1,51E-07
DVU_RS16640	DVUA0148	98,73	-1,95	3,86	0,54	-3,62	2,91E-04	1,32E-03
DVU_RS01665	DVU_0339	163,62	-1,95	3,85	0,38	-5,13	2,91E-07	2,61E-06
DVU_RS11695	DVU_2501	46,01	-1,93	3,80	0,69	-2,81	4,98E-03	1,50E-02
DVU_RS05095	DVU_1077	191,37	-1,93	3,80	0,37	-5,26	1,41E-07	1,36E-06
DVU_RS06670	DVU_1415	65,99	-1,92	3,79	0,58	-3,33	8,61E-04	3,33E-03
DVU_RS01395	DVU_0281	103,37	-1,92	3,78	0,46	-4,14	3,52E-05	2,08E-04
DVU_RS03290	DVU_0693	260,22	-1,91	3,77	0,39	-4,87	1,10E-06	9,04E-06
DVU_RS11415		40,16	-1,91	3,77	0,75	-2,55	1,09E-02	2,84E-02

DVU_RS11265	DVU_2403	943,14	-1,91	3,76	0,46	-4,12	3,75E-05	2,19E-04
DVU_RS03660	DVU_0771	45,45	-1,91	3,75	0,70	-2,71	6,72E-03	1,91E-02
DVU_RS07870	DVU_1656	80,03	-1,91	3,75	0,51	-3,77	1,65E-04	8,00E-04
DVU_RS06665	DVU_1414	88,75	-1,90	3,74	0,54	-3,50	4,60E-04	1,95E-03
DVU_RS09165	DVU_1933	39,86	-1,90	3,74	0,74	-2,56	1,06E-02	2,76E-02
DVU_RS09275	DVU_1956	38,18	-1,90	3,74	0,74	-2,58	9,87E-03	2,62E-02
DVU_RS14250	DVU_3030	141,93	-1,90	3,73	0,40	-4,77	1,84E-06	1,47E-05
DVU_RS07560	DVU_1597	153,81	-1,90	3,72	0,40	-4,72	2,39E-06	1,86E-05
DVU_RS09095	DVU_1918	1700,03	-1,90	3,72	0,36	-5,33	9,59E-08	9,60E-07
DVU_RS03720	DVU_0786	73,31	-1,89	3,71	0,53	-3,57	3,54E-04	1,57E-03
DVU_RS04255	DVU_0898	58,61	-1,89	3,69	0,60	-3,12	1,81E-03	6,28E-03
DVU_RS03420	DVU_0722	93,29	-1,88	3,68	0,54	-3,49	4,84E-04	2,03E-03
DVU_RS09910	DVU_2101	175,62	-1,88	3,67	0,41	-4,60	4,24E-06	3,14E-05
DVU_RS00010	DVU_0002	136,06	-1,88	3,67	0,40	-4,67	2,97E-06	2,28E-05
DVU_RS15455	DVU_3284	884,30	-1,87	3,67	0,30	-6,25	4,09E-10	5,96E-09
DVU_RS06205	DVU_1317	91,03	-1,87	3,66	0,49	-3,80	1,44E-04	7,04E-04
DVU_RS06210	DVU_1318	201,93	-1,87	3,65	0,36	-5,23	1,70E-07	1,59E-06
DVU_RS11260	DVU_2402	1909,55	-1,87	3,65	0,37	-5,07	4,01E-07	3,54E-06
DVU_RS07945	DVU_1671	69,82	-1,87	3,65	0,54	-3,48	4,95E-04	2,07E-03
DVU_RS02435	DVU_0503	293,03	-1,87	3,64	0,31	-5,98	2,29E-09	2,91E-08
DVU_RS03765	DVU_0794	96,03	-1,86	3,63	0,49	-3,82	1,34E-04	6,62E-04
DVU_RS00495	DVU_0098	73,43	-1,86	3,62	0,54	-3,46	5,50E-04	2,27E-03
DVU_RS05675	DVU_1201	34,68	-1,86	3,62	0,75	-2,48	1,31E-02	3,28E-02
DVU_RS06025	DVU_1278	400,13	-1,86	3,62	0,31	-5,94	2,90E-09	3,64E-08
DVU_RS06820	DVU_1451	45,90	-1,85	3,62	0,68	-2,74	6,13E-03	1,77E-02
DVU_RS14725	DVU_3133	1471,57	-1,85	3,61	0,41	-4,50	6,91E-06	4,93E-05
DVU_RS10930	DVU_2330	89,94	-1,85	3,60	0,50	-3,69	2,21E-04	1,04E-03
DVU_RS13135	DVU_2803	1595,74	-1,84	3,59	0,44	-4,17	3,06E-05	1,84E-04
DVU_RS04005	DVU_0848	466,33	-1,84	3,58	0,33	-5,66	1,52E-08	1,74E-07
DVU_RS16545	DVUA0125	35,60	-1,84	3,58	0,76	-2,42	1,54E-02	3,76E-02
DVU_RS06190	DVU_1314	65,68	-1,84	3,57	0,58	-3,17	1,53E-03	5,47E-03
DVU_RS09840	DVU_2085	271,08	-1,83	3,57	0,36	-5,13	2,85E-07	2,56E-06
DVU_RS10580	DVU_2243	123,78	-1,83	3,55	0,47	-3,87	1,09E-04	5,55E-04
DVU_RS01900	DVU_0390	72,39	-1,83	3,54	0,53	-3,42	6,34E-04	2,55E-03
DVU_RS07555	DVU_1596	131,25	-1,82	3,54	0,44	-4,17	3,06E-05	1,84E-04
DVU_RS04020	DVU_0851	374,88	-1,82	3,53	0,34	-5,32	1,07E-07	1,05E-06
DVU_RS06185	DVU_1313	99,39	-1,82	3,53	0,46	-3,98	6,77E-05	3,69E-04
DVU_RS14690	DVU_3125	43,44	-1,82	3,53	0,68	-2,69	7,24E-03	2,04E-02
DVU_RS09020	DVU_1900	131,57	-1,82	3,53	0,40	-4,49	6,97E-06	4,96E-05
DVU_RS08905	DVU_1878	38,03	-1,81	3,50	0,75	-2,41	1,61E-02	3,90E-02
DVU_RS00280	DVU_0059	129,17	-1,80	3,49	0,40	-4,51	6,45E-06	4,65E-05
DVU_RS12835	DVU_2736	37,62	-1,80	3,49	0,74	-2,43	1,52E-02	3,72E-02
DVU_RS11240	DVU_2398	527,13	-1,80	3,48	0,38	-4,72	2,33E-06	1,82E-05
DVU_RS15145	DVU_3221	132,09	-1,80	3,48	0,41	-4,43	9,38E-06	6,42E-05
DVU_RS14230	DVU_3026	366,43	-1,80	3,48	0,37	-4,81	1,54E-06	1,24E-05
DVU_RS02575	DVU_0531	326,05	-1,79	3,46	0,27	-6,58	4,56E-11	7,63E-10
DVU_RS08825	DVU_1860	52,30	-1,79	3,46	0,62	-2,91	3,59E-03	1,14E-02
DVU_RS01240	DVU_0256	125,08	-1,79	3,45	0,42	-4,27	1,92E-05	1,22E-04
DVU_RS10645	DVU_2259	103,92	-1,79	3,45	0,46	-3,85	1,17E-04	5,91E-04
DVU_RS06735	DVU_1430	392,91	-1,78	3,45	0,44	-4,04	5,38E-05	2,99E-04

DVU_RS09135	DVU_1927	340,44	-1,78	3,44	0,28	-6,31	2,78E-10	4,25E-09
DVU_RS11835	DVU_2531	60,02	-1,78	3,44	0,56	-3,16	1,55E-03	5,54E-03
DVU_RS02305	DVU_0479	50,62	-1,78	3,44	0,62	-2,89	3,86E-03	1,21E-02
DVU_RS15135	DVU_3219	34,77	-1,78	3,43	0,75	-2,37	1,78E-02	4,25E-02
DVU_RS00460	DVU_0091	73,90	-1,78	3,43	0,55	-3,21	1,34E-03	4,92E-03
DVU_RS01985	DVU_0407	135,82	-1,78	3,43	0,53	-3,33	8,58E-04	3,33E-03
DVU_RS16265	DVUA0076	68,85	-1,77	3,42	0,55	-3,24	1,21E-03	4,48E-03
DVU_RS13090	DVU_2795	66,71	-1,77	3,41	0,59	-2,98	2,88E-03	9,41E-03
DVU_RS12960	DVU_2763	105,74	-1,76	3,40	0,45	-3,89	9,88E-05	5,14E-04
DVU_RS01675	DVU_0341	135,22	-1,76	3,39	0,41	-4,30	1,69E-05	1,09E-04
DVU_RS08715	DVU_1837	114,85	-1,76	3,38	0,43	-4,09	4,25E-05	2,43E-04
DVU_RS12545	DVU_2679	100,55	-1,75	3,37	0,49	-3,60	3,21E-04	1,44E-03
DVU_RS02815	DVU_0589	69,64	-1,75	3,36	0,55	-3,20	1,37E-03	5,01E-03
DVU_RS13785	DVU_2934	60,15	-1,74	3,34	0,61	-2,86	4,26E-03	1,31E-02
DVU_RS02100	DVU_0432	163,75	-1,74	3,34	0,41	-4,22	2,40E-05	1,49E-04
DVU_RS00790	DVU_0162	260,91	-1,74	3,34	0,30	-5,70	1,18E-08	1,38E-07
DVU_RS04250	DVU_0897	51,86	-1,73	3,33	0,61	-2,83	4,70E-03	1,43E-02
DVU_RS10130	DVU_2147	35,10	-1,73	3,33	0,74	-2,35	1,87E-02	4,40E-02
DVU_RS11850	DVU_2534	60,62	-1,72	3,29	0,57	-3,03	2,47E-03	8,25E-03
DVU_RS05165	DVU_1092	69,38	-1,71	3,28	0,54	-3,15	1,63E-03	5,76E-03
DVU_RS06145	DVU_1305	77,17	-1,71	3,28	0,53	-3,24	1,18E-03	4,38E-03
DVU_RS04895	DVU_1036	44,73	-1,71	3,28	0,70	-2,45	1,44E-02	3,58E-02
DVU_RS02085	DVU_0429	158,96	-1,71	3,27	0,40	-4,31	1,60E-05	1,04E-04
DVU_RS16335	DVUA0091	197,63	-1,71	3,27	0,41	-4,16	3,18E-05	1,90E-04
DVU_RS06120	DVU_1300	785,48	-1,71	3,26	0,20	-8,65	5,13E-18	1,52E-16
DVU_RS01705	DVU_0348	117,57	-1,71	3,26	0,41	-4,12	3,75E-05	2,19E-04
DVU_RS13605	DVU_2902	75,48	-1,70	3,26	0,55	-3,10	1,97E-03	6,75E-03
DVU_RS11460	DVU_2448	69,31	-1,70	3,24	0,56	-3,03	2,41E-03	8,08E-03
DVU_RS00750	DVU_0153	40,61	-1,69	3,23	0,69	-2,46	1,39E-02	3,46E-02
DVU_RS14025	DVU_2984	221,77	-1,69	3,23	0,37	-4,52	6,09E-06	4,41E-05
DVU_RS09170	DVU_1934	44,42	-1,69	3,23	0,67	-2,51	1,20E-02	3,07E-02
DVU_RS06195	DVU_1315	153,70	-1,69	3,22	0,37	-4,55	5,28E-06	3,87E-05
DVU_RS08785	DVU_1851	166,73	-1,69	3,22	0,41	-4,12	3,82E-05	2,22E-04
DVU_RS04645	DVU_0981	339,20	-1,69	3,22	0,35	-4,76	1,94E-06	1,54E-05
DVU_RS09250	DVU_1951	194,09	-1,68	3,21	0,36	-4,74	2,14E-06	1,69E-05
DVU_RS06905	DVU_1466	67,09	-1,68	3,21	0,55	-3,08	2,10E-03	7,17E-03
DVU_RS12455	DVU_2662	38,70	-1,68	3,21	0,71	-2,35	1,85E-02	4,37E-02
DVU_RS06170	DVU_1310	126,85	-1,68	3,20	0,41	-4,10	4,06E-05	2,34E-04
DVU_RS08945	DVU_1886	40,34	-1,68	3,20	0,67	-2,52	1,18E-02	3,04E-02
DVU_RS01490	DVU_0299	237,45	-1,68	3,19	0,33	-5,05	4,45E-07	3,90E-06
DVU_RS02760	DVU_0578	57,61	-1,66	3,16	0,57	-2,90	3,72E-03	1,18E-02
DVU_RS16230	DVUA0069	86,89	-1,65	3,15	0,46	-3,58	3,38E-04	1,50E-03
DVU_RS02915	DVU_0610	37,08	-1,65	3,14	0,68	-2,44	1,46E-02	3,62E-02
DVU_RS11385	DVU_2432	140,62	-1,65	3,13	0,47	-3,49	4,80E-04	2,02E-03
DVU_RS00695	DVU_0143	125,83	-1,64	3,12	0,41	-4,01	6,02E-05	3,31E-04
DVU_RS15675	DVU_3339	197,29	-1,64	3,12	0,64	-2,58	9,87E-03	2,62E-02
DVU_RS07600	DVU_1605	73,25	-1,64	3,11	0,50	-3,27	1,09E-03	4,12E-03
DVU_RS04000	DVU_0847	6824,58	-1,64	3,11	0,28	-5,86	4,73E-09	5,77E-08
DVU_RS14080	DVU_2995	40,82	-1,64	3,11	0,68	-2,41	1,62E-02	3,91E-02
DVU_RS08700	DVU_1834	640,67	-1,64	3,11	0,25	-6,51	7,40E-11	1,19E-09

DVU_RS06850	DVU_1456	48,89	-1,63	3,09	0,61	-2,66	7,80E-03	2,16E-02
DVU_RS00635	DVU_0129	57,94	-1,63	3,09	0,63	-2,59	9,46E-03	2,54E-02
DVU_RS05645	DVU_1195	41,46	-1,61	3,05	0,67	-2,41	1,60E-02	3,88E-02
DVU_RS09780	DVU_2075	85,95	-1,61	3,05	0,51	-3,13	1,72E-03	6,03E-03
DVU_RS05890	DVU_1249	87,25	-1,61	3,04	0,46	-3,52	4,25E-04	1,83E-03
DVU_RS09035	DVU_1903	242,25	-1,60	3,04	0,38	-4,21	2,54E-05	1,57E-04
DVU_RS06260	DVU_1328	209,79	-1,60	3,03	0,31	-5,14	2,79E-07	2,52E-06
DVU_RS09090	DVU_1917	1103,93	-1,60	3,02	0,30	-5,28	1,29E-07	1,24E-06
DVU_RS10480	DVU_2223	35,77	-1,59	3,02	0,69	-2,32	2,03E-02	4,68E-02
DVU_RS15085	DVU_3207	85,49	-1,59	3,01	0,51	-3,14	1,69E-03	5,95E-03
DVU_RS05650	DVU_1196	261,61	-1,59	3,00	0,34	-4,66	3,23E-06	2,44E-05
DVU_RS00850	DVU_0173	106,86	-1,58	2,99	0,46	-3,42	6,23E-04	2,51E-03
DVU_RS13780	DVU_2933	65,13	-1,58	2,99	0,57	-2,75	6,03E-03	1,75E-02
DVU_RS01480	DVU_0298	53,37	-1,57	2,98	0,65	-2,43	1,49E-02	3,67E-02
DVU_RS09115	DVU_1923	57,76	-1,57	2,98	0,56	-2,81	4,92E-03	1,48E-02
DVU_RS11930	DVU_2552	108,16	-1,57	2,96	0,44	-3,53	4,21E-04	1,81E-03
DVU_RS12830	DVU_2735	125,32	-1,57	2,96	0,40	-3,93	8,36E-05	4,45E-04
DVU_RS10085	DVU_2137	119,96	-1,57	2,96	0,43	-3,68	2,31E-04	1,07E-03
DVU_RS04345	DVU_0916	100,99	-1,56	2,96	0,44	-3,56	3,66E-04	1,61E-03
DVU_RS05035	DVU_1065	286,79	-1,56	2,95	0,30	-5,14	2,79E-07	2,52E-06
DVU_RS11865	DVU_2537	114,09	-1,55	2,94	0,43	-3,64	2,70E-04	1,23E-03
DVU_RS16555	DVUA202	296,90	-1,55	2,94	0,41	-3,80	1,42E-04	6,98E-04
DVU_RS03700	DVU_0779	421,89	-1,55	2,93	0,37	-4,14	3,44E-05	2,04E-04
DVU_RS12900	DVU_2750	41,45	-1,55	2,93	0,67	-2,31	2,11E-02	4,82E-02
DVU_RS04410	DVU_0930	43,16	-1,55	2,92	0,63	-2,44	1,47E-02	3,63E-02
DVU_RS06490	DVU_1373	80,81	-1,55	2,92	0,47	-3,32	9,04E-04	3,48E-03
DVU_RS14935	DVU_3178	44,38	-1,54	2,92	0,61	-2,51	1,20E-02	3,08E-02
DVU_RS09355	DVU_1976	993,00	-1,54	2,91	0,63	-2,46	1,40E-02	3,47E-02
DVU_RS11300	DVU_2412	62,48	-1,54	2,91	0,54	-2,88	4,03E-03	1,25E-02
DVU_RS03205	DVU_0675	121,62	-1,54	2,91	0,43	-3,55	3,80E-04	1,67E-03
DVU_RS04525	DVU_0954	210,02	-1,54	2,90	0,33	-4,67	3,00E-06	2,29E-05
DVU_RS14730	DVU_3134	3764,66	-1,54	2,90	0,28	-5,52	3,48E-08	3,79E-07
DVU_RS09750	DVU_2069	42,91	-1,54	2,90	0,62	-2,48	1,31E-02	3,28E-02
DVU_RS03325	DVU_0700	71,81	-1,53	2,90	0,65	-2,36	1,82E-02	4,32E-02
DVU_RS14650	DVU_3113	74,35	-1,53	2,89	0,48	-3,20	1,38E-03	5,04E-03
DVU_RS14615	DVU_3106	56,64	-1,53	2,88	0,60	-2,54	1,10E-02	2,85E-02
DVU_RS05995	DVU_1272	53,44	-1,52	2,87	0,59	-2,60	9,24E-03	2,50E-02
DVU_RS16525	DVUA0121	59,17	-1,52	2,87	0,62	-2,45	1,44E-02	3,57E-02
DVU_RS15330	DVU_3258	65,78	-1,52	2,86	0,50	-3,01	2,58E-03	8,58E-03
DVU_RS12130	DVU_2586	245,88	-1,52	2,86	0,31	-4,96	6,89E-07	5,88E-06
DVU_RS00360	DVU_0075	164,75	-1,51	2,85	0,35	-4,32	1,56E-05	1,02E-04
DVU_RS04905	DVU_1038	97,70	-1,51	2,85	0,46	-3,25	1,15E-03	4,29E-03
DVU_RS01970	DVU_0404	154,78	-1,51	2,85	0,37	-4,12	3,85E-05	2,23E-04
DVU_RS15765	DVU_3360	46,20	-1,50	2,83	0,62	-2,41	1,58E-02	3,84E-02
DVU_RS14240	DVU_3028	214,23	-1,50	2,83	0,39	-3,88	1,06E-04	5,44E-04
DVU_RS03085	DVU_0649	43,38	-1,50	2,83	0,63	-2,39	1,67E-02	4,01E-02
DVU_RS11245	DVU_2399	1220,82	-1,50	2,82	0,30	-5,00	5,70E-07	4,93E-06
DVU_RS16305	DVUA0086	51,08	-1,50	2,82	0,62	-2,41	1,62E-02	3,91E-02
DVU_RS08885	DVU_1874	708,86	-1,49	2,80	0,36	-4,17	3,00E-05	1,82E-04
DVU_RS04840	DVU_1024	84,14	-1,48	2,80	0,46	-3,20	1,39E-03	5,05E-03

DVU_RS03285	DVU_0692	489,41	-1,48	2,79	0,35	-4,20	2,63E-05	1,61E-04
DVU_RS06270	DVU_1330	264,23	-1,48	2,78	0,30	-4,98	6,31E-07	5,41E-06
DVU_RS07425	DVU_1571	61,43	-1,47	2,78	0,53	-2,79	5,25E-03	1,56E-02
DVU_RS01960	DVU_0402	2422,81	-1,47	2,78	0,22	-6,66	2,80E-11	4,79E-10
DVU_RS01740	DVU_0355	86,56	-1,47	2,77	0,48	-3,04	2,36E-03	7,93E-03
DVU_RS15310	DVU_3254	73,27	-1,47	2,76	0,48	-3,06	2,20E-03	7,46E-03
DVU_RS03315	DVU_0699	118,39	-1,45	2,74	0,42	-3,44	5,77E-04	2,36E-03
DVU_RS16785	DVU_1382	267,29	-1,45	2,74	0,44	-3,32	8,91E-04	3,44E-03
DVU_RS11585	DVU_2476	108,95	-1,45	2,74	0,46	-3,15	1,62E-03	5,71E-03
DVU_RS05880	DVU_1247	66,01	-1,45	2,73	0,52	-2,79	5,20E-03	1,55E-02
DVU_RS13770	DVU_2931	67,03	-1,44	2,71	0,51	-2,82	4,83E-03	1,46E-02
DVU_RS11550	DVU_2467	305,90	-1,43	2,69	0,30	-4,70	2,64E-06	2,05E-05
DVU_RS06155	DVU_1307	48,30	-1,43	2,69	0,57	-2,50	1,23E-02	3,13E-02
DVU_RS15585	DVU_3315	111,72	-1,43	2,69	0,41	-3,44	5,73E-04	2,35E-03
DVU_RS16390	DVUA0100	95,86	-1,42	2,68	0,45	-3,14	1,72E-03	6,03E-03
DVU_RS15590	DVU_3316	110,31	-1,42	2,68	0,40	-3,54	3,95E-04	1,72E-03
DVU_RS09195	DVU_1940	164,17	-1,42	2,68	0,37	-3,86	1,15E-04	5,82E-04
DVU_RS07665	DVU_1619	108,07	-1,42	2,67	0,42	-3,39	6,88E-04	2,74E-03
DVU_RS09085	DVU_1914	156,86	-1,41	2,65	0,36	-3,94	8,31E-05	4,44E-04
DVU_RS00690	DVU_0142	149,34	-1,41	2,65	0,41	-3,39	7,06E-04	2,81E-03
DVU_RS12285	DVU_2620	47,81	-1,40	2,64	0,57	-2,47	1,33E-02	3,34E-02
DVU_RS02595	DVU_0536	462,30	-1,40	2,64	0,22	-6,38	1,74E-10	2,75E-09
DVU_RS16240	DVUA0071	198,07	-1,40	2,64	0,31	-4,45	8,77E-06	6,05E-05
DVU_RS06740	DVU_1431	177,15	-1,39	2,63	0,44	-3,19	1,42E-03	5,12E-03
DVU_RS03975	DVU_0840	141,50	-1,39	2,62	0,59	-2,34	1,91E-02	4,47E-02
DVU_RS14715	DVU_3131	375,38	-1,38	2,61	0,32	-4,32	1,56E-05	1,02E-04
DVU_RS04660	DVU_0984	71,95	-1,38	2,60	0,51	-2,69	7,10E-03	2,01E-02
DVU_RS10875	DVU_2318	698,59	-1,38	2,60	0,32	-4,26	2,06E-05	1,30E-04
DVU_RS14420	DVU_3067	66,07	-1,38	2,60	0,49	-2,81	4,90E-03	1,48E-02
DVU_RS04135	DVU_0873	189,71	-1,38	2,60	0,32	-4,34	1,40E-05	9,30E-05
DVU_RS00190	DVU_0041	288,42	-1,37	2,59	0,32	-4,27	1,91E-05	1,22E-04
DVU_RS07695	DVU_1624	73,08	-1,37	2,59	0,53	-2,60	9,30E-03	2,51E-02
DVU_RS11270	DVU_2404	676,12	-1,37	2,58	0,46	-2,94	3,23E-03	1,04E-02
DVU_RS08900	DVU_1877	57,10	-1,37	2,58	0,53	-2,56	1,04E-02	2,72E-02
DVU_RS11730	DVU_2508	92,95	-1,36	2,57	0,46	-2,94	3,32E-03	1,06E-02
DVU_RS11250	DVU_2400	891,33	-1,36	2,57	0,34	-3,96	7,63E-05	4,10E-04
DVU_RS14020	DVU_2983	141,20	-1,36	2,56	0,39	-3,50	4,66E-04	1,97E-03
DVU_RS04715	DVU_0996	68,00	-1,36	2,56	0,51	-2,66	7,74E-03	2,15E-02
DVU_RS04050	DVU_0857	320,92	-1,35	2,56	0,44	-3,10	1,92E-03	6,59E-03
DVU_RS14720	DVU_3132	1376,89	-1,35	2,55	0,32	-4,24	2,19E-05	1,38E-04
DVU_RS06220	DVU_1320	267,93	-1,35	2,55	0,33	-4,14	3,50E-05	2,07E-04
DVU_RS08020	DVU_1686	49,10	-1,35	2,54	0,58	-2,33	1,99E-02	4,59E-02
DVU_RS08940	DVU_1885	134,92	-1,34	2,53	0,36	-3,68	2,35E-04	1,09E-03
DVU_RS06135	DVU_1303	219,82	-1,34	2,53	0,30	-4,47	7,68E-06	5,35E-05
DVU_RS09540	DVU_2020	77,63	-1,33	2,51	0,46	-2,86	4,22E-03	1,30E-02
DVU_RS10600	DVU_2246	63,26	-1,32	2,50	0,51	-2,58	9,97E-03	2,64E-02
DVU_RS03465	DVU_0732	265,25	-1,32	2,50	0,29	-4,54	5,70E-06	4,13E-05
DVU_RS00345	DVU_0072	223,02	-1,32	2,50	0,35	-3,79	1,51E-04	7,35E-04
DVU_RS09410	DVU_1987	350,44	-1,32	2,50	0,38	-3,44	5,84E-04	2,39E-03
DVU_RS06215	DVU_1319	139,20	-1,32	2,49	0,37	-3,54	3,96E-04	1,73E-03

DVU_RS15355	DVU_3262	200,80	-1,31	2,47	0,33	-3,94	8,02E-05	4,30E-04
DVU_RS02605	DVU_0539	50,88	-1,30	2,46	0,56	-2,30	2,14E-02	4,89E-02
DVU_RS03895	DVU_0823	52,65	-1,29	2,45	0,53	-2,43	1,51E-02	3,70E-02
DVU_RS04930	DVU_1043	279,37	-1,29	2,45	0,31	-4,15	3,38E-05	2,02E-04
DVU_RS05535	DVU_1169	216,67	-1,29	2,44	0,34	-3,75	1,75E-04	8,40E-04
DVU_RS04935	DVU_1044	275,13	-1,29	2,44	0,29	-4,40	1,09E-05	7,37E-05
DVU_RS06305	DVU_1337	903,36	-1,29	2,44	0,36	-3,55	3,83E-04	1,68E-03
DVU_RS06085	DVU_1290	189,00	-1,28	2,43	0,37	-3,51	4,47E-04	1,90E-03
DVU_RS07415	DVU_1569	329,46	-1,28	2,43	0,40	-3,16	1,58E-03	5,60E-03
DVU_RS07420	DVU_1570	144,22	-1,28	2,42	0,50	-2,58	1,00E-02	2,65E-02
DVU_RS03295	DVU_0694	991,84	-1,27	2,42	0,26	-4,90	9,40E-07	7,82E-06
DVU_RS05520	DVU_1165	73,58	-1,27	2,41	0,51	-2,50	1,23E-02	3,13E-02
DVU_RS04035	DVU_0854	76,55	-1,27	2,41	0,47	-2,67	7,54E-03	2,10E-02
DVU_RS06690	DVU_1421	96,01	-1,27	2,41	0,42	-3,01	2,59E-03	8,60E-03
DVU_RS03155	DVU_0663	192,64	-1,26	2,39	0,33	-3,76	1,70E-04	8,21E-04
DVU_RS13095	DVU_2796	67,33	-1,25	2,38	0,54	-2,33	1,96E-02	4,55E-02
DVU_RS02055	DVU_0422	157,40	-1,25	2,37	0,42	-2,99	2,76E-03	9,11E-03
DVU_RS15405	DVU_3272	136,28	-1,24	2,36	0,38	-3,25	1,15E-03	4,29E-03
DVU_RS11080	DVU_2364	88,90	-1,24	2,36	0,46	-2,72	6,54E-03	1,86E-02
DVU_RS15240	DVU_3240	81,46	-1,24	2,36	0,44	-2,79	5,28E-03	1,57E-02
DVU_RS14580	DVU_3103	245,23	-1,24	2,36	0,28	-4,46	8,08E-06	5,62E-05
DVU_RS02635	DVU_0547	147,37	-1,24	2,36	0,46	-2,69	7,13E-03	2,01E-02
DVU_RS06235	DVU_1323	372,12	-1,23	2,35	0,29	-4,30	1,68E-05	1,09E-04
DVU_RS12515	DVU_2673	103,65	-1,22	2,33	0,44	-2,77	5,66E-03	1,66E-02
DVU_RS07475	DVU_1579	220,94	-1,21	2,32	0,30	-4,08	4,45E-05	2,55E-04
DVU_RS13745	DVU_2927	239,51	-1,21	2,32	0,29	-4,24	2,26E-05	1,42E-04
DVU_RS01965	DVU_0403	2294,05	-1,21	2,31	0,20	-6,05	1,48E-09	1,92E-08
DVU_RS02710	DVU_0567	107,51	-1,20	2,30	0,39	-3,10	1,92E-03	6,62E-03
DVU_RS07535	DVU_1592	185,63	-1,20	2,29	0,38	-3,19	1,41E-03	5,10E-03
DVU_RS16270	DVUA0077	64,16	-1,19	2,28	0,49	-2,45	1,45E-02	3,58E-02
DVU_RS04640	DVU_0980	141,71	-1,19	2,28	0,42	-2,80	5,18E-03	1,55E-02
DVU_RS15220	DVU_3236	87,77	-1,18	2,27	0,44	-2,69	7,24E-03	2,04E-02
DVU_RS02585	DVU_0534	265,04	-1,18	2,27	0,48	-2,47	1,35E-02	3,36E-02
DVU_RS03475	DVU_0734	177,12	-1,18	2,26	0,31	-3,76	1,67E-04	8,09E-04
DVU_RS06925	DVU_1470	125,01	-1,17	2,25	0,38	-3,08	2,10E-03	7,17E-03
DVU_RS05580	DVU_1181	78,65	-1,16	2,24	0,45	-2,60	9,42E-03	2,54E-02
DVU_RS10450	DVU_2215	253,05	-1,16	2,24	0,27	-4,36	1,27E-05	8,51E-05
DVU_RS05695	DVU_1205	67,40	-1,16	2,23	0,49	-2,38	1,71E-02	4,10E-02
DVU_RS14510	DVU_3088	144,34	-1,14	2,20	0,34	-3,38	7,35E-04	2,90E-03
DVU_RS14030	DVU_2985	388,72	-1,14	2,20	0,24	-4,66	3,10E-06	2,36E-05
DVU_RS14915	DVU_3174	83,83	-1,13	2,19	0,44	-2,59	9,68E-03	2,59E-02
DVU_RS16235	DVUA0070	136,20	-1,13	2,19	0,39	-2,88	4,01E-03	1,25E-02
DVU_RS06440	DVU_1363	103,59	-1,13	2,18	0,40	-2,79	5,28E-03	1,57E-02
DVU_RS11130	DVU_2376	199,15	-1,13	2,18	0,43	-2,63	8,43E-03	2,31E-02
DVU_RS06515	DVU_1378	474,34	-1,12	2,18	0,43	-2,59	9,52E-03	2,55E-02
DVU_RS09005	DVU_1897	133,47	-1,12	2,17	0,37	-3,06	2,25E-03	7,60E-03
DVU_RS02110	DVU_0434	788,41	-1,12	2,17	0,28	-4,00	6,43E-05	3,51E-04
DVU_RS15350	DVU_3261	93,45	-1,11	2,16	0,42	-2,65	8,07E-03	2,23E-02
DVU_RS10560	DVU_2239	119,55	-1,11	2,16	0,40	-2,78	5,41E-03	1,60E-02
DVU_RS12250	DVU_2612	191,12	-1,11	2,16	0,32	-3,44	5,80E-04	2,37E-03

DVU_RS08415	DVU_1771	68,37	-1,11	2,16	0,46	-2,40	1,66E-02	3,99E-02
DVU_RS07505	DVU_1585	178,84	-1,11	2,15	0,32	-3,45	5,66E-04	2,33E-03
DVU_RS05665	DVU_1199	154,71	-1,10	2,15	0,32	-3,42	6,26E-04	2,52E-03
DVU_RS10100	DVU_2140	106,58	-1,09	2,13	0,40	-2,73	6,41E-03	1,83E-02
DVU_RS09190	DVU_1939	140,60	-1,09	2,13	0,41	-2,64	8,28E-03	2,27E-02
DVU_RS08420	DVU_1772	79,95	-1,09	2,13	0,42	-2,58	1,00E-02	2,65E-02
DVU_RS08745	DVU_1843	81,59	-1,09	2,13	0,44	-2,46	1,39E-02	3,46E-02
DVU_RS15255	DVU_3243	135,75	-1,08	2,12	0,38	-2,88	3,96E-03	1,24E-02
DVU_RS14705	DVU_3127	119,72	-1,08	2,12	0,39	-2,80	5,06E-03	1,51E-02
DVU_RS15415	DVU_3274	75,93	-1,08	2,11	0,46	-2,33	1,96E-02	4,55E-02
DVU_RS08585	DVU_1809	166,20	-1,07	2,10	0,31	-3,42	6,18E-04	2,50E-03
DVU_RS04510	DVU_0951	82,43	-1,06	2,09	0,46	-2,33	1,98E-02	4,58E-02
DVU_RS05710	DVU_1208	121,79	-1,05	2,08	0,37	-2,87	4,14E-03	1,28E-02
DVU_RS03970	DVU_0839	263,23	-1,04	2,06	0,36	-2,91	3,64E-03	1,15E-02
DVU_RS01210	DVU_0248	101,72	-1,03	2,05	0,41	-2,51	1,21E-02	3,09E-02
DVU_RS11705	DVU_2503	118,38	-1,03	2,05	0,41	-2,49	1,29E-02	3,24E-02
DVU_RS06390	DVU_1353	110,68	-1,02	2,03	0,37	-2,77	5,62E-03	1,65E-02
DVU_RS08515	DVU_1795	196,85	-1,02	2,03	0,32	-3,18	1,47E-03	5,28E-03
DVU_RS06115	DVU_1299	128,30	-1,02	2,03	0,34	-3,03	2,48E-03	8,25E-03
DVU_RS13080	DVU_2793	126,52	-1,01	2,02	0,42	-2,41	1,59E-02	3,87E-02
DVU_RS03780	DVU_0797	1776,77	-1,00	2,00	0,23	-4,42	9,76E-06	6,67E-05
DVU_RS15655	DVU_3335	155,28	-0,99	1,99	0,35	-2,83	4,64E-03	1,42E-02
DVU_RS13015	DVU_2776	1863,34	-0,98	1,97	0,21	-4,75	1,99E-06	1,58E-05
DVU_RS15090	DVU_3208	91,40	-0,98	1,97	0,41	-2,41	1,58E-02	3,84E-02
DVU_RS13705	DVU_2920	2171,13	-0,97	1,97	0,27	-3,64	2,76E-04	1,26E-03
DVU_RS04565	DVU_0964	544,55	-0,97	1,96	0,33	-2,95	3,23E-03	1,04E-02
DVU_RS09535	DVU_2019	93,43	-0,97	1,96	0,40	-2,41	1,61E-02	3,90E-02
DVU_RS15395	DVU_3270	477,46	-0,97	1,96	0,30	-3,25	1,17E-03	4,36E-03
DVU_RS05175	DVU_1094	204,19	-0,96	1,95	0,34	-2,84	4,57E-03	1,40E-02
DVU_RS08545	DVU_1801	234,69	-0,96	1,95	0,32	-3,03	2,45E-03	8,19E-03
DVU_RS05625	DVU_1191	252,48	-0,96	1,95	0,27	-3,50	4,58E-04	1,94E-03
DVU_RS15340	DVU_3259	103,23	-0,95	1,94	0,37	-2,57	1,03E-02	2,70E-02
DVU_RS13945	DVU_2968	170,88	-0,95	1,94	0,39	-2,46	1,37E-02	3,42E-02
DVU_RS09440	DVU_1993	278,15	-0,95	1,93	0,41	-2,32	2,03E-02	4,68E-02
DVU_RS05620	DVU_1190	200,89	-0,95	1,93	0,30	-3,16	1,56E-03	5,56E-03
DVU_RS10885	DVU_2320	200,70	-0,95	1,93	0,28	-3,35	8,12E-04	3,17E-03
DVU_RS06880	DVU_1461	93,85	-0,95	1,93	0,39	-2,42	1,54E-02	3,76E-02
DVU_RS02180	DVU_0449	143,71	-0,94	1,92	0,39	-2,40	1,64E-02	3,95E-02
DVU_RS03305	DVU_0697	109,22	-0,93	1,91	0,36	-2,58	9,97E-03	2,64E-02
DVU_RS11565	DVU_2471	200,20	-0,93	1,91	0,29	-3,22	1,29E-03	4,73E-03
DVU_RS11625	DVU_2485	203,34	-0,93	1,91	0,32	-2,88	3,92E-03	1,23E-02
DVU_RS06255	DVU_1327	209,01	-0,93	1,90	0,29	-3,25	1,17E-03	4,37E-03
DVU_RS14410	DVU_3065	122,42	-0,93	1,90	0,37	-2,51	1,22E-02	3,10E-02
DVU_RS13610	DVU_2903	355,26	-0,93	1,90	0,23	-4,02	5,88E-05	3,24E-04
DVU_RS11110	DVU_2371	146,39	-0,93	1,90	0,33	-2,77	5,55E-03	1,64E-02
DVU_RS09030	DVU_1902	117,86	-0,90	1,86	0,38	-2,33	1,96E-02	4,55E-02
DVU_RS13795	DVU_2937	235,28	-0,90	1,86	0,26	-3,46	5,46E-04	2,26E-03
DVU_RS15400	DVU_3271	670,00	-0,89	1,86	0,23	-3,88	1,04E-04	5,35E-04
DVU_RS11615	DVU_2483	403,06	-0,89	1,85	0,35	-2,52	1,19E-02	3,05E-02
DVU_RS11255	DVU_2401	1504,47	-0,88	1,84	0,32	-2,77	5,58E-03	1,64E-02

DVU_RS09150	DVU_1930	189,77	-0,88	1,84	0,28	-3,15	1,64E-03	5,77E-03
DVU_RS11740	DVU_2510	215,01	-0,87	1,83	0,37	-2,33	1,96E-02	4,55E-02
DVU_RS02025	DVU_0415	178,69	-0,86	1,82	0,31	-2,80	5,09E-03	1,52E-02
DVU_RS02855	DVU_0597	160,21	-0,86	1,82	0,31	-2,80	5,14E-03	1,54E-02
DVU_RS00465	DVU_0092	290,80	-0,86	1,81	0,31	-2,73	6,37E-03	1,82E-02
DVU_RS07630	DVU_1611	121,95	-0,86	1,81	0,36	-2,36	1,84E-02	4,35E-02
DVU_RS06045	DVU_1282	183,48	-0,86	1,81	0,32	-2,65	8,14E-03	2,24E-02
DVU_RS13580	DVU_2897	177,83	-0,85	1,81	0,33	-2,59	9,70E-03	2,59E-02
DVU_RS06140	DVU_1304	363,55	-0,85	1,81	0,35	-2,45	1,41E-02	3,51E-02
DVU_RS14950	DVU_3181	394,58	-0,85	1,80	0,26	-3,31	9,21E-04	3,53E-03
DVU_RS14995	DVU_3190	665,01	-0,84	1,79	0,20	-4,27	1,92E-05	1,22E-04
DVU_RS13120	DVU_2801	188,55	-0,84	1,78	0,28	-3,00	2,70E-03	8,96E-03
DVU_RS11905	DVU_2546	143,57	-0,83	1,78	0,36	-2,30	2,16E-02	4,91E-02
DVU_RS06230	DVU_1322	157,56	-0,83	1,78	0,32	-2,59	9,50E-03	2,55E-02
DVU_RS05885	DVU_1248	201,55	-0,83	1,78	0,30	-2,73	6,36E-03	1,82E-02
DVU_RS11870	DVU_2538	266,29	-0,82	1,77	0,24	-3,37	7,44E-04	2,93E-03
DVU_RS15595	DVU_3319	984,36	-0,81	1,76	0,21	-3,90	9,77E-05	5,10E-04
DVU_RS03005	DVU_0633	214,34	-0,81	1,75	0,30	-2,72	6,58E-03	1,87E-02
DVU_RS08720	DVU_1838	193,17	-0,81	1,75	0,31	-2,61	8,93E-03	2,42E-02
DVU_RS04465	DVU_0941	358,65	-0,80	1,74	0,35	-2,29	2,19E-02	4,97E-02
DVU_RS06510	DVU_1377	216,48	-0,80	1,74	0,30	-2,64	8,27E-03	2,27E-02
DVU_RS09185	DVU_1937	281,10	-0,79	1,73	0,30	-2,67	7,56E-03	2,10E-02
DVU_RS15015	DVU_3194	291,66	-0,78	1,72	0,25	-3,06	2,24E-03	7,57E-03
DVU_RS03090	DVU_0650	178,19	-0,74	1,67	0,29	-2,56	1,03E-02	2,71E-02
DVU_RS15045	DVU_3200	170,10	-0,74	1,67	0,29	-2,56	1,04E-02	2,72E-02
DVU_RS11610	DVU_2482	1314,52	-0,71	1,63	0,28	-2,52	1,16E-02	2,99E-02
DVU_RS15065	DVU_3204	344,63	-0,71	1,63	0,29	-2,41	1,60E-02	3,88E-02
DVU_RS14015	DVU_2982	572,91	-0,68	1,60	0,26	-2,62	8,73E-03	2,37E-02
DVU_RS06110	DVU_1298	296,30	-0,67	1,59	0,25	-2,72	6,44E-03	1,84E-02
DVU_RS07280	DVU_1544	485,32	-0,67	1,59	0,21	-3,15	1,64E-03	5,78E-03
DVU_RS06300	DVU_1336	287,91	-0,66	1,58	0,29	-2,30	2,13E-02	4,87E-02
DVU_RS15850	DVU_3379	372,49	-0,65	1,57	0,23	-2,76	5,82E-03	1,70E-02
DVU_RS14225	DVU_3025	2484,65	-0,60	1,51	0,17	-3,54	4,08E-04	1,77E-03
DVU_RS06105	DVU_1295	3380,05	-0,40	1,32	0,16	-2,53	1,13E-02	2,91E-02
DVU_RS14810	DVU_3150	1046,35	0,41	1,33	0,16	2,53	1,13E-02	2,91E-02
DVU_RS04795	DVU_1012	5333,65	0,48	1,39	0,12	3,93	8,46E-05	4,50E-04
DVU_RS02395	DVU_0496	353,00	0,55	1,47	0,24	2,31	2,09E-02	4,79E-02
DVU_RS02995	DVU_0631	303,35	0,56	1,48	0,23	2,42	1,56E-02	3,80E-02
DVU_RS14960	DVU_3183	1042,17	0,62	1,54	0,20	3,09	1,98E-03	6,77E-03
DVU_RS03965	DVU_0838	343,53	0,63	1,55	0,25	2,51	1,22E-02	3,11E-02
DVU_RS07255	DVU_1539	484,50	0,64	1,55	0,20	3,11	1,86E-03	6,43E-03
DVU_RS14970	DVU_3185	880,92	0,64	1,55	0,14	4,62	3,83E-06	2,87E-05
DVU_RS16370	DVUA0097	458,20	0,64	1,56	0,20	3,13	1,72E-03	6,03E-03
DVU_RS00220	DVU_0047	127,47	0,65	1,57	0,28	2,32	2,04E-02	4,69E-02
DVU_RS03165	DVU_0665	555,98	0,68	1,60	0,29	2,34	1,95E-02	4,53E-02
DVU_RS11420	DVU_2439	223,75	0,69	1,61	0,29	2,34	1,92E-02	4,49E-02
DVU_RS06710	DVU_1425	259,22	0,69	1,61	0,27	2,59	9,61E-03	2,57E-02
DVU_RS04825	DVU_1021	279,92	0,69	1,62	0,23	2,95	3,18E-03	1,02E-02
DVU_RS16575	DVUA0132	117,08	0,69	1,62	0,28	2,43	1,50E-02	3,69E-02
DVU_RS03135	DVU_0659	103,81	0,69	1,62	0,30	2,30	2,13E-02	4,87E-02

DVU_RS12920	DVU_2754	181,02	0,70	1,62	0,27	2,57	1,02E-02	2,69E-02
DVU_RS04770	DVU_1005	500,71	0,71	1,64	0,22	3,18	1,46E-03	5,25E-03
DVU_RS09510	DVU_2014	317,07	0,71	1,64	0,23	3,05	2,29E-03	7,74E-03
DVU_RS02205	DVU_0453	556,14	0,75	1,68	0,21	3,56	3,64E-04	1,60E-03
DVU_RS15425	DVU_3278	234,55	0,75	1,68	0,25	2,94	3,29E-03	1,05E-02
DVU_RS04235	DVU_0894	219,27	0,75	1,68	0,30	2,47	1,34E-02	3,35E-02
DVU_RS15420	DVU_3276	617,27	0,75	1,68	0,17	4,48	7,48E-06	5,23E-05
DVU_RS14540	DVU_3094	445,55	0,75	1,69	0,20	3,83	1,29E-04	6,45E-04
DVU_RS01555	DVU_0313	99,50	0,75	1,69	0,32	2,34	1,93E-02	4,51E-02
DVU_RS11470	DVU_2450	253,63	0,76	1,69	0,31	2,44	1,47E-02	3,62E-02
DVU_RS11480	DVU_2455	119,03	0,76	1,70	0,29	2,63	8,61E-03	2,35E-02
DVU_RS02850	DVU_0596	175,35	0,76	1,70	0,30	2,59	9,69E-03	2,59E-02
DVU_RS14905	DVU_3171	1599,81	0,77	1,70	0,23	3,38	7,35E-04	2,90E-03
DVU_RS11515	DVU_2459	99,78	0,77	1,70	0,31	2,51	1,21E-02	3,08E-02
DVU_RS00765	DVU_0157	144,12	0,77	1,71	0,30	2,58	9,76E-03	2,60E-02
DVU_RS03605	DVU_0761	202,64	0,78	1,71	0,26	2,97	2,97E-03	9,65E-03
DVU_RS14220	DVU_3023	115,29	0,78	1,72	0,28	2,74	6,20E-03	1,79E-02
DVU_RS00070	DVU_0015	130,53	0,78	1,72	0,27	2,89	3,81E-03	1,20E-02
DVU_RS15480	DVU_3293	584,10	0,78	1,72	0,23	3,41	6,52E-04	2,62E-03
DVU_RS02225	DVU_0460	130,46	0,79	1,73	0,27	2,89	3,85E-03	1,21E-02
DVU_RS12490	DVU_2669	199,00	0,79	1,73	0,34	2,36	1,85E-02	4,36E-02
DVU_RS10390	DVU_2201	817,97	0,80	1,74	0,19	4,19	2,82E-05	1,72E-04
DVU_RS07650	DVU_1615	300,54	0,80	1,74	0,28	2,83	4,66E-03	1,42E-02
DVU_RS15430	DVU_3279	112,37	0,80	1,74	0,32	2,52	1,16E-02	2,99E-02
DVU_RS08005	DVU_1683	193,78	0,80	1,74	0,35	2,30	2,15E-02	4,90E-02
DVU_RS15485	DVU_3294	381,37	0,80	1,75	0,31	2,63	8,43E-03	2,31E-02
DVU_RS14280	DVU_3037	146,38	0,80	1,75	0,33	2,42	1,54E-02	3,76E-02
DVU_RS07970	DVU_1676	104,88	0,81	1,75	0,30	2,68	7,33E-03	2,06E-02
DVU_RS01410	DVU_0284	163,73	0,81	1,75	0,29	2,80	5,05E-03	1,51E-02
DVU_RS14675	DVU_3119	94,21	0,82	1,76	0,35	2,36	1,82E-02	4,31E-02
DVU_RS11645	DVU_2490	111,03	0,82	1,76	0,31	2,68	7,37E-03	2,07E-02
DVU_RS09405	DVU_1986	172,30	0,83	1,78	0,32	2,57	1,01E-02	2,65E-02
DVU_RS01365	DVU_0276	196,18	0,83	1,78	0,23	3,63	2,88E-04	1,30E-03
DVU_RS04785	DVU_1008	87,03	0,83	1,78	0,33	2,49	1,26E-02	3,20E-02
DVU_RS04540	DVU_0957	95,62	0,85	1,80	0,34	2,50	1,25E-02	3,17E-02
DVU_RS08875	DVU_1871	110,66	0,85	1,80	0,29	2,95	3,22E-03	1,03E-02
DVU_RS15745	DVU_3355	184,62	0,85	1,81	0,26	3,33	8,72E-04	3,37E-03
DVU_RS06035	DVU_1280	74,42	0,86	1,82	0,36	2,42	1,53E-02	3,75E-02
DVU_RS12450	DVU_2661	84,52	0,87	1,82	0,33	2,65	8,16E-03	2,25E-02
DVU_RS04175	DVU_0883	145,67	0,87	1,82	0,31	2,76	5,77E-03	1,69E-02
DVU_RS05590	DVU_1183	70,93	0,87	1,83	0,34	2,54	1,12E-02	2,89E-02
DVU_RS06695	DVU_1422	4675,29	0,87	1,83	0,21	4,21	2,59E-05	1,59E-04
DVU_RS15200	DVU_3232	102,17	0,87	1,83	0,33	2,64	8,20E-03	2,26E-02
DVU_RS15760	DVU_3359	114,08	0,88	1,84	0,33	2,63	8,56E-03	2,34E-02
DVU_RS05170	DVU_1093	272,48	0,88	1,84	0,25	3,57	3,62E-04	1,60E-03
DVU_RS01155	DVU_0237	479,81	0,88	1,84	0,20	4,33	1,48E-05	9,83E-05
DVU_RS01605	DVU_0325	187,02	0,88	1,84	0,29	3,03	2,45E-03	8,19E-03
DVU_RS01685	DVU_0343	419,65	0,89	1,85	0,34	2,58	9,85E-03	2,62E-02
DVU_RS14815	DVU_3151	119,58	0,89	1,85	0,28	3,16	1,58E-03	5,61E-03
DVU_RS14495	DVU_3085	61,23	0,89	1,85	0,39	2,29	2,19E-02	4,98E-02

DVU_RS12535	DVU_2677	104,87	0,89	1,85	0,34	2,60	9,29E-03	2,50E-02
DVU_RS01440	DVU_0290	106,28	0,89	1,85	0,28	3,18	1,50E-03	5,36E-03
DVU_RS15445	DVU_3282	221,02	0,89	1,85	0,31	2,86	4,18E-03	1,29E-02
DVU_RS08360	DVU_1758	177,09	0,89	1,86	0,36	2,49	1,28E-02	3,23E-02
DVU_RS15720	DVU_3350	55,06	0,90	1,86	0,38	2,37	1,79E-02	4,25E-02
DVU_RS05545	DVU_1173	87,07	0,90	1,87	0,34	2,68	7,47E-03	2,09E-02
DVU_RS16470	DVUA0113	371,32	0,90	1,87	0,35	2,60	9,21E-03	2,49E-02
DVU_RS12370	DVU_2638	53,65	0,91	1,87	0,38	2,37	1,77E-02	4,22E-02
DVU_RS12365	DVU_2637	181,04	0,91	1,88	0,36	2,54	1,11E-02	2,89E-02
DVU_RS09215	DVU_1944	181,96	0,91	1,88	0,26	3,53	4,15E-04	1,79E-03
DVU_RS09725	DVU_2064	290,90	0,92	1,89	0,33	2,81	4,90E-03	1,48E-02
DVU_RS13070	DVU_2791	203,88	0,92	1,89	0,36	2,57	1,02E-02	2,69E-02
DVU_RS06345	DVU_1344	230,07	0,92	1,90	0,23	3,96	7,53E-05	4,06E-04
DVU_RS09860	DVU_2090	97,02	0,93	1,90	0,39	2,39	1,71E-02	4,09E-02
DVU_RS15440	DVU_3281	108,23	0,93	1,91	0,31	3,04	2,37E-03	7,97E-03
DVU_RS13790	DVU_2935	401,39	0,94	1,92	0,38	2,48	1,30E-02	3,27E-02
DVU_RS01175	DVU_0242	252,04	0,94	1,92	0,27	3,47	5,19E-04	2,16E-03
DVU_RS11370	DVU_2427	575,99	0,94	1,92	0,21	4,38	1,16E-05	7,81E-05
DVU_RS08575	DVU_1807	137,53	0,94	1,92	0,35	2,69	7,15E-03	2,02E-02
DVU_RS06725	DVU_1428	224,33	0,95	1,93	0,29	3,24	1,19E-03	4,42E-03
DVU_RS07260	DVU_1540	140,21	0,95	1,93	0,25	3,74	1,85E-04	8,82E-04
DVU_RS14000	DVU_2979	215,31	0,96	1,94	0,24	3,91	9,35E-05	4,92E-04
DVU_RS04390	DVU_0925	54,16	0,96	1,94	0,39	2,43	1,52E-02	3,72E-02
DVU_RS00210	DVU_0045	51,45	0,96	1,95	0,41	2,34	1,94E-02	4,53E-02
DVU_RS02520	DVU_0520	212,43	0,97	1,96	0,39	2,50	1,23E-02	3,13E-02
DVU_RS10810	DVU_2303	111,58	0,97	1,96	0,30	3,29	9,96E-04	3,79E-03
DVU_RS08465	DVU_1784	211,74	0,98	1,97	0,24	4,06	4,89E-05	2,76E-04
DVU_RS08460	DVU_1783	198,62	0,98	1,97	0,34	2,92	3,45E-03	1,10E-02
DVU_RS06545	DVU_1387	82,20	0,99	1,98	0,32	3,06	2,19E-03	7,43E-03
DVU_RS04315	DVU_0910	166,19	0,99	1,99	0,23	4,26	2,01E-05	1,27E-04
DVU_RS10115	DVU_2143	448,50	0,99	1,99	0,33	2,99	2,78E-03	9,15E-03
DVU_RS04470	DVU_0942	147,52	0,99	1,99	0,26	3,79	1,48E-04	7,23E-04
DVU_RS14135	DVU_3006	74,98	0,99	1,99	0,36	2,77	5,58E-03	1,64E-02
DVU_RS12930	DVU_2756	166,43	0,99	1,99	0,28	3,60	3,13E-04	1,40E-03
DVU_RS00125	DVU_0028	67,11	1,00	2,00	0,36	2,74	6,09E-03	1,77E-02
DVU_RS16010	DVUA0023	124,70	1,00	2,00	0,26	3,81	1,40E-04	6,92E-04
DVU_RS06810	DVU_1449	69,01	1,01	2,01	0,35	2,87	4,11E-03	1,28E-02
DVU_RS08765	DVU_1847	280,21	1,01	2,01	0,24	4,12	3,81E-05	2,22E-04
DVU_RS09980		94,35	1,01	2,01	0,39	2,56	1,03E-02	2,71E-02
DVU_RS13955	DVU_2970	447,18	1,01	2,02	0,18	5,65	1,63E-08	1,85E-07
DVU_RS16060	DVUA0037	53,49	1,01	2,02	0,40	2,56	1,06E-02	2,76E-02
DVU_RS12065	DVU_2578	69,46	1,02	2,03	0,41	2,47	1,34E-02	3,35E-02
DVU_RS10515	DVU_2230	144,85	1,03	2,04	0,25	4,17	3,10E-05	1,86E-04
DVU_RS05795	DVU_1228	736,80	1,03	2,05	0,22	4,70	2,66E-06	2,06E-05
DVU_RS13970	DVU_2973	382,58	1,03	2,05	0,45	2,32	2,04E-02	4,70E-02
DVU_RS09055	DVU_1908	212,26	1,04	2,05	0,35	2,97	2,97E-03	9,65E-03
DVU_RS12925	DVU_2755	93,10	1,04	2,06	0,29	3,62	3,00E-04	1,35E-03
DVU_RS13305	DVU_2841	71,78	1,05	2,07	0,37	2,85	4,43E-03	1,36E-02
DVU_RS09640	DVU_2042	88,88	1,05	2,07	0,31	3,43	5,93E-04	2,41E-03
DVU_RS03495	DVU_0738	215,46	1,05	2,07	0,45	2,36	1,85E-02	4,36E-02

DVU_RS09105	DVU_1921	550,53	1,06	2,08	0,41	2,61	9,04E-03	2,45E-02
DVU_RS14120	DVU_3003	100,27	1,06	2,08	0,31	3,43	6,05E-04	2,45E-03
DVU_RS08780	DVU_1850	240,18	1,07	2,10	0,31	3,50	4,60E-04	1,95E-03
DVU_RS04455	DVU_0939	171,27	1,08	2,11	0,36	2,99	2,84E-03	9,29E-03
DVU_RS15290	DVU_3250	62,31	1,08	2,11	0,46	2,36	1,83E-02	4,34E-02
DVU_RS08475	DVU_1786	106,48	1,08	2,11	0,31	3,53	4,10E-04	1,77E-03
DVU_RS04765	DVU_1004	77,63	1,08	2,11	0,32	3,40	6,83E-04	2,72E-03
DVU_RS04495	DVU_0947	32,13	1,09	2,12	0,47	2,33	1,96E-02	4,55E-02
DVU_RS09505	DVU_2013	805,10	1,09	2,13	0,27	4,02	5,76E-05	3,18E-04
DVU_RS15010	DVU_3193	197,55	1,09	2,13	0,28	3,87	1,08E-04	5,54E-04
DVU_RS09350	DVU_1975	268,12	1,10	2,14	0,29	3,78	1,57E-04	7,62E-04
DVU_RS10620	DVU_2252	126,50	1,10	2,14	0,30	3,65	2,64E-04	1,21E-03
DVU_RS10060	DVU_2131	84,35	1,11	2,15	0,33	3,31	9,28E-04	3,56E-03
DVU_RS11590	DVU_2477	250,73	1,11	2,16	0,47	2,36	1,82E-02	4,32E-02
DVU_RS03855	DVU_0815	309,31	1,11	2,16	0,21	5,24	1,57E-07	1,49E-06
DVU_RS06625	DVU_1406	286,38	1,13	2,18	0,21	5,31	1,09E-07	1,07E-06
DVU_RS14770	DVU_3142	52,39	1,13	2,19	0,38	2,95	3,18E-03	1,02E-02
DVU_RS10655	DVU_2261	68,80	1,13	2,19	0,34	3,29	9,87E-04	3,77E-03
DVU_RS04155	DVU_0878	56,53	1,13	2,19	0,45	2,49	1,27E-02	3,22E-02
DVU_RS03020	DVU_0636	103,70	1,13	2,19	0,36	3,15	1,62E-03	5,71E-03
DVU_RS11765	DVU_2515	201,41	1,13	2,19	0,30	3,74	1,85E-04	8,82E-04
DVU_RS14370	DVU_3056	81,19	1,13	2,19	0,33	3,38	7,25E-04	2,87E-03
DVU_RS04550	DVU_0959	135,19	1,14	2,20	0,29	3,97	7,24E-05	3,93E-04
DVU_RS11010	DVU_2348	140,16	1,14	2,21	0,29	4,01	6,01E-05	3,31E-04
DVU_RS11855	DVU_2535	292,23	1,15	2,21	0,20	5,81	6,12E-09	7,37E-08
DVU_RS00900	DVU_0187	71,02	1,15	2,23	0,44	2,63	8,62E-03	2,35E-02
DVU_RS12000	DVU_2565	38,92	1,16	2,23	0,47	2,48	1,31E-02	3,28E-02
DVU_RS12120	DVU_2584	291,92	1,17	2,24	0,29	4,00	6,22E-05	3,40E-04
DVU_RS06050	DVU_1283	401,93	1,17	2,24	0,23	5,17	2,40E-07	2,18E-06
DVU_RS02335	DVU_0485	50,48	1,17	2,25	0,42	2,75	5,97E-03	1,74E-02
DVU_RS00740	DVU_0152	201,31	1,17	2,25	0,21	5,49	3,92E-08	4,23E-07
DVU_RS12275	DVU_2617	76,31	1,17	2,26	0,33	3,51	4,44E-04	1,89E-03
DVU_RS03515	DVU_0742	196,34	1,18	2,27	0,28	4,21	2,61E-05	1,60E-04
DVU_RS13055	DVU_2787	86,72	1,19	2,28	0,31	3,82	1,36E-04	6,72E-04
DVU_RS12290	DVU_2621	630,45	1,19	2,28	0,23	5,19	2,12E-07	1,95E-06
DVU_RS09815	DVU4018	40,83	1,19	2,28	0,44	2,74	6,14E-03	1,77E-02
DVU_RS01525	DVU_0307	85,63	1,19	2,29	0,42	2,83	4,61E-03	1,41E-02
DVU_RS00885	DVU_0182	131,31	1,20	2,29	0,31	3,84	1,24E-04	6,22E-04
DVU_RS02650	DVU_0550	80,06	1,20	2,29	0,35	3,40	6,77E-04	2,70E-03
DVU_RS01580	DVU_0319	549,29	1,20	2,30	0,24	4,90	9,40E-07	7,82E-06
DVU_RS01285	DVU_0260	81,49	1,20	2,30	0,34	3,54	4,04E-04	1,75E-03
DVU_RS03275	DVU_0690	128,48	1,20	2,30	0,25	4,74	2,09E-06	1,65E-05
DVU_RS05900	DVU_1251	53,91	1,21	2,31	0,44	2,74	6,12E-03	1,77E-02
DVU_RS11035	DVU_2353	147,19	1,21	2,31	0,29	4,22	2,49E-05	1,54E-04
DVU_RS14980	DVU_3187	1045,92	1,22	2,33	0,19	6,52	7,01E-11	1,14E-09
DVU_RS13670	DVU_2916	39,35	1,22	2,33	0,46	2,68	7,38E-03	2,07E-02
DVU_RS04670	DVU_0987	325,60	1,23	2,34	0,23	5,34	9,17E-08	9,23E-07
DVU_RS07640	DVU_1613	239,10	1,23	2,34	0,22	5,47	4,41E-08	4,68E-07
DVU_RS04450	DVU_0938	285,98	1,23	2,35	0,24	5,05	4,53E-07	3,96E-06
DVU_RS13860	DVU_2951	430,57	1,23	2,35	0,20	6,03	1,62E-09	2,07E-08

DVU_RS14180	DVU_3015	62,78	1,24	2,36	0,38	3,24	1,21E-03	4,46E-03
DVU_RS02130	DVU_0439	38,52	1,24	2,37	0,44	2,83	4,72E-03	1,43E-02
DVU_RS16725	DVU_3173	54,19	1,25	2,37	0,38	3,28	1,05E-03	3,99E-03
DVU_RS08310	DVU_1748	33,75	1,26	2,39	0,49	2,57	1,01E-02	2,65E-02
DVU_RS09740	DVU_2068	101,45	1,26	2,39	0,30	4,24	2,21E-05	1,38E-04
DVU_RS01310	DVU_0265	23,68	1,27	2,40	0,52	2,44	1,45E-02	3,59E-02
DVU_RS02365	DVU_0490	549,59	1,27	2,41	0,43	2,98	2,91E-03	9,50E-03
DVU_RS08425	DVU_1774	116,41	1,27	2,41	0,35	3,68	2,31E-04	1,07E-03
DVU_RS00410	DVU_0085	153,38	1,27	2,42	0,25	5,05	4,36E-07	3,83E-06
DVU_RS00065	DVU_0014	37,75	1,27	2,42	0,48	2,68	7,38E-03	2,07E-02
DVU_RS13060	DVU_2788	71,42	1,27	2,42	0,36	3,58	3,41E-04	1,51E-03
DVU_RS12935	DVU_2757	201,37	1,28	2,43	0,23	5,50	3,90E-08	4,22E-07
DVU_RS11310	DVU_2414	247,80	1,28	2,44	0,20	6,46	1,05E-10	1,66E-09
DVU_RS02355	DVU_0489	199,23	1,29	2,44	0,24	5,33	9,85E-08	9,82E-07
DVU_RS13675	DVU_2917	1094,94	1,29	2,45	0,35	3,73	1,89E-04	8,96E-04
DVU_RS16445	DVUA0109	303,34	1,29	2,45	0,47	2,75	5,95E-03	1,73E-02
DVU_RS08860	DVU_1868	836,82	1,29	2,45	0,29	4,44	9,16E-06	6,29E-05
DVU_RS00615	DVU_0125	119,32	1,30	2,45	0,34	3,85	1,17E-04	5,90E-04
DVU_RS14470	DVU_3079	68,25	1,30	2,46	0,37	3,47	5,16E-04	2,15E-03
DVU_RS08725	DVU_1839	1031,25	1,30	2,46	0,21	6,25	4,11E-10	5,96E-09
DVU_RS10935	DVU_2331	286,03	1,30	2,47	0,24	5,52	3,37E-08	3,68E-07
DVU_RS15125	DVU_3217	592,34	1,30	2,47	0,48	2,70	6,96E-03	1,97E-02
DVU_RS01280	DVU_0259	74,32	1,31	2,47	0,36	3,65	2,63E-04	1,21E-03
DVU_RS03575	DVU_0755	469,48	1,31	2,47	0,26	4,97	6,79E-07	5,81E-06
DVU_RS13800	DVU_2938	696,69	1,31	2,48	0,20	6,63	3,27E-11	5,56E-10
DVU_RS11840	DVU_2532	89,40	1,32	2,49	0,29	4,56	5,12E-06	3,76E-05
DVU_RS09260	DVU_1953	316,36	1,32	2,50	0,23	5,67	1,43E-08	1,64E-07
DVU_RS09060	DVU_1909	44,31	1,32	2,50	0,44	3,03	2,45E-03	8,19E-03
DVU_RS11375	DVU_2428	698,81	1,32	2,50	0,22	5,91	3,41E-09	4,25E-08
DVU_RS01465	DVU_0295	133,83	1,32	2,50	0,25	5,29	1,21E-07	1,17E-06
DVU_RS13935	DVU_2966	262,35	1,34	2,52	0,25	5,44	5,44E-08	5,69E-07
DVU_RS04875	DVU_1032	114,50	1,34	2,54	0,28	4,73	2,22E-06	1,74E-05
DVU_RS07020	DVU4002	27,05	1,34	2,54	0,52	2,57	1,02E-02	2,69E-02
DVU_RS01275	DVU_0258	305,09	1,35	2,55	0,25	5,31	1,10E-07	1,07E-06
DVU_RS10145	DVU_2150	213,98	1,36	2,56	0,22	6,05	1,44E-09	1,87E-08
DVU_RS04475	DVU_0943	40,08	1,36	2,56	0,41	3,34	8,32E-04	3,24E-03
DVU_RS11055	DVU_2357	554,08	1,36	2,56	0,22	6,18	6,40E-10	8,99E-09
DVU_RS00390	DVU_0081	314,64	1,36	2,57	0,26	5,15	2,66E-07	2,42E-06
DVU_RS01760	DVU_0358	31,13	1,37	2,58	0,48	2,84	4,53E-03	1,39E-02
DVU_RS11900	DVU_2545	352,18	1,37	2,58	0,20	6,97	3,23E-12	6,18E-11
DVU_RS01730	DVU_0353	957,93	1,37	2,58	0,22	6,25	3,99E-10	5,84E-09
DVU_RS03115	DVU_0655	163,45	1,37	2,58	0,28	4,93	8,07E-07	6,81E-06
DVU_RS09680	DVU_2052	67,40	1,38	2,60	0,36	3,81	1,42E-04	6,96E-04
DVU_RS12395	DVU_2643	1884,98	1,38	2,60	0,49	2,82	4,81E-03	1,45E-02
DVU_RS05075	DVU_1073	85,17	1,38	2,60	0,51	2,68	7,32E-03	2,05E-02
DVU_RS03330	DVU_0701	831,15	1,38	2,61	0,22	6,19	6,07E-10	8,57E-09
DVU_RS12560	DVU_2682	87,63	1,39	2,62	0,33	4,22	2,44E-05	1,51E-04
DVU_RS10635	DVU_2256	41,70	1,40	2,64	0,40	3,49	4,81E-04	2,02E-03
DVU_RS11380	DVU_2430	179,14	1,40	2,65	0,32	4,32	1,55E-05	1,02E-04
DVU_RS08085	DVU_1700	41,49	1,41	2,66	0,50	2,83	4,72E-03	1,43E-02

DVU_RS06760	DVU_1438	343,91	1,42	2,67	0,22	6,56	5,25E-11	8,69E-10
DVU_RS14660	DVU_3116	107,11	1,42	2,68	0,50	2,82	4,81E-03	1,45E-02
DVU_RS05570	DVU_1179	5528,45	1,42	2,68	0,22	6,48	8,95E-11	1,43E-09
DVU_RS04220	DVU_0891	679,40	1,42	2,68	0,20	6,99	2,71E-12	5,26E-11
DVU_RS12325	DVU_2630	144,68	1,42	2,68	0,27	5,23	1,68E-07	1,58E-06
DVU_RS01385	DVU_0279	62,98	1,43	2,69	0,34	4,18	2,86E-05	1,73E-04
DVU_RS07375		38,88	1,43	2,70	0,43	3,33	8,58E-04	3,33E-03
DVU_RS00030	DVU_0006	432,11	1,43	2,70	0,25	5,69	1,29E-08	1,49E-07
DVU_RS03580	DVU_0756	101,90	1,43	2,70	0,39	3,65	2,64E-04	1,21E-03
DVU_RS14820	DVU_3152	619,69	1,44	2,71	0,32	4,51	6,56E-06	4,71E-05
DVU_RS11570	DVU_2472	674,20	1,44	2,71	0,32	4,55	5,31E-06	3,88E-05
DVU_RS14800	DVU_3148	252,93	1,44	2,71	0,24	6,04	1,57E-09	2,02E-08
DVU_RS03335	DVU_0702	121,65	1,44	2,72	0,27	5,44	5,31E-08	5,58E-07
DVU_RS10685	DVU_2272	214,55	1,45	2,72	0,35	4,16	3,19E-05	1,90E-04
DVU_RS11335	DVU_2419	196,56	1,45	2,74	0,42	3,44	5,87E-04	2,39E-03
DVU_RS11030	DVU_2352	132,71	1,45	2,74	0,30	4,77	1,84E-06	1,47E-05
DVU_RS14200	DVU_3019	150,11	1,46	2,74	0,32	4,55	5,33E-06	3,88E-05
DVU_RS07940	DVU_1670	40,24	1,46	2,75	0,41	3,57	3,56E-04	1,57E-03
DVU_RS07480	DVU_1580	194,05	1,46	2,75	0,32	4,51	6,59E-06	4,73E-05
DVU_RS02500	DVU_0516	135,55	1,46	2,75	0,28	5,24	1,61E-07	1,52E-06
DVU_RS14585	DVU_3104	5480,75	1,46	2,75	0,25	5,78	7,60E-09	9,05E-08
DVU_RS01885	DVU_0387	88,71	1,46	2,75	0,33	4,48	7,37E-06	5,18E-05
DVU_RS02505	DVU_0517	205,52	1,46	2,76	0,42	3,52	4,32E-04	1,85E-03
DVU_RS10730	DVU_2285	26,78	1,47	2,77	0,59	2,48	1,30E-02	3,27E-02
DVU_RS07205	DVU_1529	212,08	1,47	2,77	0,24	6,26	3,92E-10	5,83E-09
DVU_RS00860	DVU_0176	130,99	1,48	2,79	0,30	5,01	5,50E-07	4,78E-06
DVU_RS14550	DVU_3097	409,65	1,49	2,80	0,19	7,68	1,55E-14	3,62E-13
DVU_RS13010	DVU_2774	476,57	1,50	2,82	0,45	3,31	9,20E-04	3,53E-03
DVU_RS10915		184,31	1,50	2,83	0,23	6,57	5,20E-11	8,64E-10
DVU_RS02715	DVU_0568	41,25	1,50	2,84	0,41	3,69	2,25E-04	1,05E-03
DVU_RS02615	DVU_0542	55,63	1,51	2,84	0,41	3,68	2,30E-04	1,07E-03
DVU_RS03610	DVU_0762	124,51	1,51	2,85	0,34	4,42	1,01E-05	6,85E-05
DVU_RS14130	DVU_3005	113,07	1,52	2,86	0,48	3,16	1,59E-03	5,62E-03
DVU_RS15250	DVU_3242	306,12	1,52	2,86	0,43	3,50	4,60E-04	1,95E-03
DVU_RS13295	DVU_2839	361,81	1,53	2,88	0,41	3,69	2,25E-04	1,05E-03
DVU_RS04555	DVU_0961	965,75	1,53	2,89	0,14	11,04	2,59E-28	1,32E-26
DVU_RS03180	DVU_0668	184,19	1,54	2,91	0,25	6,25	3,99E-10	5,84E-09
DVU_RS03870	DVU_0818	113,00	1,54	2,91	0,36	4,31	1,64E-05	1,07E-04
DVU_RS03950	DVU_0835	604,93	1,54	2,92	0,20	7,91	2,48E-15	6,27E-14
DVU_RS11355	DVU_2423	102,05	1,55	2,92	0,30	5,08	3,78E-07	3,35E-06
DVU_RS00170	DVU_0037	103,39	1,55	2,92	0,40	3,87	1,10E-04	5,62E-04
DVU_RS09100	DVU_1919	43,98	1,55	2,92	0,57	2,69	7,13E-03	2,01E-02
DVU_RS02070	DVU_0425	358,94	1,55	2,92	0,28	5,44	5,21E-08	5,50E-07
DVU_RS15450	DVU_3283	145,53	1,55	2,93	0,47	3,31	9,48E-04	3,63E-03
DVU_RS00335	DVU_0070	109,97	1,55	2,93	0,26	6,03	1,60E-09	2,05E-08
DVU_RS03775	DVU_0796	315,54	1,55	2,94	0,23	6,81	9,63E-12	1,73E-10
DVU_RS06720	DVU_1427	200,08	1,56	2,94	0,24	6,37	1,87E-10	2,94E-09
DVU_RS02495	DVU_0515	128,81	1,56	2,95	0,29	5,31	1,10E-07	1,07E-06
DVU_RS12700	DVU_2708	21,02	1,57	2,96	0,55	2,86	4,19E-03	1,30E-02
DVU_RS05455	DVU_1148	23,80	1,57	2,97	0,55	2,84	4,54E-03	1,40E-02

DVU_RS11860	DVU_2536	175,85	1,57	2,97	0,42	3,77	1,61E-04	7,82E-04
DVU_RS13985	DVU_2976	243,26	1,57	2,97	0,29	5,40	6,66E-08	6,86E-07
DVU_RS12575	DVU_2686	71,42	1,57	2,98	0,35	4,54	5,52E-06	4,01E-05
DVU_RS01735	DVU_0354	388,07	1,57	2,98	0,26	6,09	1,16E-09	1,55E-08
DVU_RS00085	DVU_0019	1146,68	1,58	3,00	0,29	5,37	7,80E-08	7,98E-07
DVU_RS09760	DVU_2071	162,82	1,59	3,02	0,43	3,68	2,36E-04	1,09E-03
DVU_RS16180	DVUA0061	19,57	1,60	3,03	0,61	2,63	8,56E-03	2,34E-02
DVU_RS00405	DVU_0084	302,09	1,60	3,04	0,21	7,66	1,92E-14	4,46E-13
DVU_RS10905	DVU_2325	35,52	1,60	3,04	0,59	2,73	6,32E-03	1,81E-02
DVU_RS14765	DVU_3141	274,86	1,61	3,05	0,43	3,74	1,83E-04	8,76E-04
DVU_RS09480	DVU_2004	18,00	1,61	3,05	0,62	2,58	9,98E-03	2,64E-02
DVU_RS05125	DVU_1083	95,22	1,61	3,06	0,36	4,45	8,65E-06	5,98E-05
DVU_RS11045	DVU_2355	64,74	1,61	3,06	0,35	4,66	3,22E-06	2,44E-05
DVU_RS00150	DVU_0032	22,89	1,62	3,07	0,69	2,35	1,87E-02	4,39E-02
DVU_RS16150	DVUA0055	21,11	1,62	3,08	0,59	2,74	6,11E-03	1,77E-02
DVU_RS07890	DVU_1660	131,70	1,63	3,09	0,31	5,21	1,92E-07	1,78E-06
DVU_RS02515	DVU_0519	303,05	1,63	3,09	0,24	6,68	2,42E-11	4,19E-10
DVU_RS11660	DVU_2493	98,42	1,63	3,10	0,33	4,92	8,50E-07	7,15E-06
DVU_RS16680		77,96	1,64	3,12	0,31	5,29	1,23E-07	1,19E-06
DVU_RS03885	DVU_0822	29,81	1,65	3,13	0,47	3,47	5,20E-04	2,16E-03
DVU_RS13765	DVU_2930	62,29	1,65	3,14	0,37	4,42	9,93E-06	6,76E-05
DVU_RS07815	DVU_1645	16,61	1,66	3,15	0,72	2,31	2,07E-02	4,74E-02
DVU_RS16615	DVUA0143	20,55	1,66	3,15	0,60	2,77	5,53E-03	1,63E-02
DVU_RS00120	DVU_0027	227,85	1,67	3,19	0,22	7,61	2,83E-14	6,29E-13
DVU_RS14385	DVU_3059	329,32	1,69	3,23	0,24	7,09	1,30E-12	2,57E-11
DVU_RS00865	DVU_0177	58,80	1,69	3,23	0,56	3,00	2,73E-03	9,01E-03
DVU_RS12045	DVU_2575	173,18	1,69	3,23	0,24	6,92	4,38E-12	8,17E-11
DVU_RS08225	DVU_1730	43,78	1,69	3,23	0,43	3,92	8,76E-05	4,64E-04
DVU_RS02905	DVU_0608	525,32	1,70	3,24	0,24	7,04	1,99E-12	3,87E-11
DVU_RS12110	DVU_2582	102,09	1,70	3,25	0,31	5,44	5,43E-08	5,69E-07
DVU_RS01620	DVU_0328	268,54	1,70	3,25	0,35	4,91	9,03E-07	7,57E-06
DVU_RS13810	DVU_2941	207,14	1,70	3,26	0,23	7,48	7,36E-14	1,57E-12
DVU_RS00240	DVU_0051	134,08	1,71	3,27	0,27	6,22	4,90E-10	7,01E-09
DVU_RS08040	DVU_1692	339,81	1,72	3,30	0,66	2,62	8,73E-03	2,37E-02
DVU_RS07635	DVU_1612	483,69	1,73	3,31	0,25	6,98	3,05E-12	5,87E-11
DVU_RS10395	DVU_2202	143,57	1,73	3,31	0,43	4,05	5,15E-05	2,89E-04
DVU_RS16120	DVUA0049	18,35	1,73	3,32	0,60	2,88	4,01E-03	1,25E-02
DVU_RS09420	DVU_1990	209,07	1,74	3,34	0,45	3,87	1,08E-04	5,51E-04
DVU_RS06425	DVU_1360	799,27	1,74	3,34	0,37	4,65	3,34E-06	2,52E-05
DVU_RS06495	DVU_1374	195,25	1,74	3,35	0,23	7,54	4,83E-14	1,05E-12
DVU_RS02860	DVU_0598	6557,37	1,75	3,36	0,45	3,91	9,09E-05	4,81E-04
DVU_RS10615	DVU_2251	205,86	1,75	3,36	0,21	8,40	4,47E-17	1,28E-15
DVU_RS04705	DVU_0994	436,24	1,75	3,37	0,46	3,84	1,22E-04	6,14E-04
DVU_RS00780	DVU_0160	220,53	1,76	3,38	0,49	3,59	3,32E-04	1,48E-03
DVU_RS16055	DVUA0036	36,52	1,76	3,39	0,41	4,27	1,99E-05	1,26E-04
DVU_RS08960	DVU_1889	135,37	1,77	3,41	0,34	5,24	1,57E-07	1,49E-06
DVU_RS04500	DVU_0948	32,01	1,77	3,41	0,54	3,26	1,11E-03	4,19E-03
DVU_RS03845	DVU_0813	769,87	1,78	3,42	0,31	5,70	1,19E-08	1,39E-07
DVU_RS04055	DVU_0858	132,56	1,78	3,43	0,48	3,67	2,44E-04	1,12E-03
DVU_RS07155	DVU_1519	24,62	1,78	3,44	0,56	3,17	1,53E-03	5,46E-03

DVU_RS09755	DVU_2070	296,64	1,79	3,45	0,49	3,61	3,01E-04	1,35E-03
DVU_RS10840	DVU_2310	513,73	1,79	3,46	0,49	3,66	2,51E-04	1,15E-03
DVU_RS01815	DVU_0371	35,86	1,80	3,47	0,43	4,13	3,59E-05	2,11E-04
DVU_RS16135	DVUA0052	10,99	1,80	3,48	0,78	2,32	2,06E-02	4,73E-02
DVU_RS04535	DVU_0956	267,60	1,80	3,48	0,19	9,54	1,48E-21	5,05E-20
DVU_RS02660	DVU_0552	133,49	1,80	3,48	0,49	3,69	2,26E-04	1,06E-03
DVU_RS01160	DVU_0238	378,96	1,81	3,50	0,47	3,83	1,30E-04	6,47E-04
DVU_RS03375	DVU_0712	1591,41	1,81	3,50	0,30	5,94	2,81E-09	3,54E-08
DVU_RS05260	DVU_1109	57,30	1,81	3,52	0,57	3,16	1,59E-03	5,62E-03
DVU_RS01450	DVU_0292	137,09	1,82	3,53	0,25	7,16	7,85E-13	1,58E-11
DVU_RS02320	DVU_0482	333,50	1,82	3,54	0,25	7,32	2,40E-13	4,93E-12
DVU_RS00670	DVU_0138	374,14	1,83	3,55	0,19	9,50	2,10E-21	7,06E-20
DVU_RS02845	DVU_0595	413,65	1,83	3,56	0,35	5,18	2,18E-07	2,00E-06
DVU_RS15700	DVU4007	63,43	1,85	3,61	0,49	3,76	1,72E-04	8,26E-04
DVU_RS16115	DVUA0048	21,02	1,86	3,64	0,55	3,40	6,72E-04	2,69E-03
DVU_RS16075	DVUA0040	14,63	1,86	3,64	0,71	2,62	8,90E-03	2,42E-02
DVU_RS10855	DVU_2313	593,84	1,87	3,65	0,15	12,63	1,46E-36	1,18E-34
DVU_RS14175	DVU_3014	189,50	1,87	3,66	0,29	6,52	6,87E-11	1,12E-09
DVU_RS07230	DVU_1534	360,43	1,88	3,67	0,35	5,36	8,15E-08	8,28E-07
DVU_RS16690		76,73	1,88	3,67	0,31	6,07	1,30E-09	1,73E-08
DVU_RS11435	DVU_2442	505,67	1,88	3,68	0,65	2,89	3,79E-03	1,20E-02
DVU_RS02080	DVU_0428	82,37	1,88	3,68	0,32	5,79	6,84E-09	8,20E-08
DVU_RS02480	DVU_0512	159,02	1,88	3,69	0,39	4,83	1,40E-06	1,14E-05
DVU_RS14055	DVU_2990	920,23	1,89	3,70	0,20	9,56	1,13E-21	3,96E-20
DVU_RS00645	DVU_0132	3731,27	1,89	3,70	0,39	4,81	1,55E-06	1,25E-05
DVU_RS09415	DVU_1988	21,55	1,89	3,70	0,54	3,48	4,95E-04	2,07E-03
DVU_RS10710	DVU_2280	62,07	1,89	3,71	0,46	4,12	3,87E-05	2,24E-04
DVU_RS05070	DVU_1072	129,34	1,90	3,73	0,64	2,97	3,01E-03	9,78E-03
DVU_RS01290	DVU_0261	296,22	1,90	3,73	0,24	7,81	5,54E-15	1,37E-13
DVU_RS05960	DVU_1265	201,86	1,90	3,74	0,31	6,17	6,75E-10	9,43E-09
DVU_RS06790	DVU_1445	47,12	1,91	3,75	0,38	4,99	6,03E-07	5,20E-06
DVU_RS16440	DVUA0108	397,47	1,91	3,77	0,41	4,62	3,79E-06	2,84E-05
DVU_RS05320	DVU_1121	164,70	1,92	3,77	0,26	7,32	2,47E-13	5,05E-12
DVU_RS13990	DVU_2977	159,58	1,92	3,79	0,39	4,95	7,46E-07	6,33E-06
DVU_RS03125	DVU_0657	200,72	1,92	3,79	0,44	4,39	1,13E-05	7,60E-05
DVU_RS01635	DVU_0333	339,57	1,93	3,80	0,17	11,41	3,71E-30	2,14E-28
DVU_RS09595	DVU_2032	11,01	1,94	3,83	0,78	2,49	1,27E-02	3,21E-02
DVU_RS01535	DVU_0309	35,42	1,94	3,83	0,43	4,48	7,45E-06	5,22E-05
DVU_RS00675	DVU_0139	243,83	1,95	3,86	0,23	8,38	5,18E-17	1,45E-15
DVU_RS11280	DVU_2407	132,62	1,95	3,86	0,26	7,39	1,47E-13	3,06E-12
DVU_RS16050		51,33	1,95	3,86	0,43	4,57	4,81E-06	3,54E-05
DVU_RS09315	DVU_1967	11,15	1,95	3,88	0,79	2,48	1,30E-02	3,26E-02
DVU_RS08535	DVU4005	143,83	1,96	3,89	0,25	7,76	8,27E-15	1,98E-13
DVU_RS14535	DVU_3093	426,05	1,96	3,89	0,20	9,99	1,64E-23	6,44E-22
DVU_RS01170	DVU_0241	283,95	1,97	3,91	0,29	6,89	5,39E-12	1,00E-10
DVU_RS04870	DVU_1030	472,00	1,97	3,91	0,26	7,65	2,00E-14	4,57E-13
DVU_RS04710	DVU_0995	1034,30	1,97	3,91	0,16	12,52	5,50E-36	4,21E-34
DVU_RS02485	DVU_0513	135,84	1,97	3,92	0,28	6,95	3,65E-12	6,94E-11
DVU_RS03670	DVU_0773	528,35	1,98	3,94	0,32	6,12	9,63E-10	1,32E-08
DVU_RS10470	DVU_2220	40,66	1,98	3,94	0,42	4,75	2,00E-06	1,59E-05

DVU_RS13925	DVU_2964	86,74	1,98	3,95	0,74	2,66	7,71E-03	2,14E-02
DVU_RS14425	DVU_3068	426,75	1,98	3,96	0,32	6,11	1,01E-09	1,37E-08
DVU_RS06780	DVU_1443	182,52	1,99	3,97	0,47	4,20	2,69E-05	1,64E-04
DVU_RS02800	DVU_0586	31,48	1,99	3,97	0,51	3,90	9,60E-05	5,02E-04
DVU_RS01560	DVU_0314	35,28	1,99	3,98	0,43	4,68	2,91E-06	2,24E-05
DVU_RS11770	DVU_2516	176,82	1,99	3,98	0,35	5,70	1,22E-08	1,41E-07
DVU_RS14295	DVU_3041	429,26	2,00	3,99	0,59	3,38	7,12E-04	2,82E-03
DVU_RS05850	DVU_1241	725,94	2,01	4,03	0,81	2,49	1,27E-02	3,22E-02
DVU_RS16320	DVUA0088	169,16	2,01	4,04	0,35	5,79	6,86E-09	8,20E-08
DVU_RS04400	DVU_0928	279,34	2,02	4,05	0,33	6,11	1,02E-09	1,38E-08
DVU_RS11560	DVU_2470	946,73	2,02	4,05	0,42	4,81	1,49E-06	1,21E-05
DVU_RS10895	DVU_2323	107,20	2,02	4,06	0,40	5,00	5,60E-07	4,85E-06
DVU_RS00545	DVU_0109	170,35	2,04	4,12	0,27	7,49	6,97E-14	1,50E-12
DVU_RS09265	DVU_1954	140,11	2,05	4,13	0,30	6,78	1,23E-11	2,18E-10
DVU_RS09880	DVU_2094	27,26	2,05	4,14	0,57	3,59	3,25E-04	1,45E-03
DVU_RS06680	DVU_1419	263,35	2,06	4,16	0,20	10,39	2,89E-25	1,23E-23
DVU_RS14525	DVU_3091	296,84	2,06	4,17	0,23	8,78	1,69E-18	5,18E-17
DVU_RS06460	DVU_1367	98,56	2,07	4,19	0,27	7,78	7,36E-15	1,77E-13
DVU_RS16090	DVUA0043	12,12	2,07	4,20	0,64	3,23	1,24E-03	4,55E-03
DVU_RS03620	DVU_0764	465,02	2,08	4,21	0,28	7,34	2,15E-13	4,46E-12
DVU_RS15385	DVU_3268	417,82	2,08	4,24	0,31	6,74	1,58E-11	2,76E-10
DVU_RS06715	DVU_1426	184,11	2,09	4,24	0,30	6,89	5,58E-12	1,03E-10
DVU_RS05040	DVU_1066	128,65	2,11	4,31	0,25	8,30	1,08E-16	2,97E-15
DVU_RS03510	DVU_0741	343,06	2,11	4,31	0,19	11,08	1,53E-28	8,19E-27
DVU_RS16105	DVUA0046	20,20	2,12	4,35	0,55	3,88	1,05E-04	5,39E-04
DVU_RS08060	DVU_1695	18,01	2,12	4,36	0,60	3,53	4,08E-04	1,77E-03
DVU_RS10815	DVU_2305	68,02	2,13	4,37	0,34	6,29	3,21E-10	4,84E-09
DVU_RS05805	DVU_1232	112,91	2,13	4,37	0,43	4,90	9,63E-07	7,96E-06
DVU_RS01855	DVU_0379	18,49	2,14	4,40	0,61	3,50	4,73E-04	1,99E-03
DVU_RS11060	DVU_2359	68,97	2,15	4,44	0,36	6,05	1,42E-09	1,86E-08
DVU_RS06320	DVU_1339	73,45	2,15	4,44	0,34	6,31	2,80E-10	4,26E-09
DVU_RS11675	DVU_2496	981,24	2,15	4,44	0,45	4,78	1,72E-06	1,38E-05
DVU_RS01575	DVU_0318	319,21	2,16	4,46	0,34	6,27	3,62E-10	5,41E-09
DVU_RS08105	DVU_1704	576,07	2,16	4,48	0,37	5,84	5,10E-09	6,17E-08
DVU_RS09950	DVU_2109	242,70	2,17	4,49	0,34	6,32	2,57E-10	3,95E-09
DVU_RS05725	DVU_1211	575,45	2,17	4,50	0,28	7,76	8,81E-15	2,09E-13
DVU_RS14035	DVU_2986	400,49	2,17	4,50	0,80	2,72	6,48E-03	1,85E-02
DVU_RS01930	DVU_0396	414,37	2,17	4,51	0,19	11,49	1,40E-30	8,41E-29
DVU_RS11665	DVU_2494	1627,94	2,17	4,52	0,42	5,20	2,03E-07	1,87E-06
DVU_RS15150	DVU_3222	905,02	2,18	4,52	0,13	16,27	1,69E-59	4,31E-57
DVU_RS02535	DVU_0523	43,68	2,18	4,53	0,54	4,05	5,22E-05	2,92E-04
DVU_RS15755	DVU_3358	125,81	2,18	4,53	0,35	6,16	7,42E-10	1,03E-08
DVU_RS04230	DVU_0893	320,77	2,19	4,55	0,21	10,29	8,06E-25	3,24E-23
DVU_RS10075	DVU_2135	16,12	2,19	4,57	0,59	3,74	1,86E-04	8,86E-04
DVU_RS16045	DVUA0034	119,79	2,21	4,64	0,33	6,79	1,09E-11	1,95E-10
DVU_RS04395	DVU_0927	296,83	2,22	4,65	0,23	9,75	1,79E-22	6,69E-21
DVU_RS08430	DVU_1775	160,73	2,23	4,70	0,29	7,78	7,16E-15	1,74E-13
DVU_RS06675	DVU_1418	377,02	2,24	4,73	0,29	7,85	4,08E-15	1,02E-13
DVU_RS00395	DVU_0082	1390,68	2,26	4,77	0,40	5,59	2,23E-08	2,49E-07
DVU_RS11450	DVU_2446	286,44	2,26	4,79	0,33	6,94	3,98E-12	7,48E-11

DVU_RS16175	DVUA0060	39,64	2,27	4,81	0,41	5,48	4,33E-08	4,63E-07
DVU_RS02750	DVU_0576	413,48	2,27	4,82	0,41	5,57	2,57E-08	2,86E-07
DVU_RS07235	DVU_1535	217,38	2,28	4,84	0,30	7,61	2,66E-14	5,99E-13
DVU_RS05945	DVU_1262	98,21	2,28	4,84	0,38	5,97	2,35E-09	2,97E-08
DVU_RS03120	DVU_0656	234,66	2,28	4,87	0,22	10,32	5,96E-25	2,43E-23
DVU_RS13200	DVU_2819	106,20	2,31	4,96	0,58	4,01	6,18E-05	3,39E-04
DVU_RS03550	DVU_0749	131,01	2,31	4,97	0,46	5,05	4,31E-07	3,80E-06
DVU_RS10525	DVU_2232	146,73	2,33	5,01	0,28	8,42	3,83E-17	1,10E-15
DVU_RS04620	DVU_0976	43,44	2,34	5,05	0,55	4,22	2,43E-05	1,51E-04
DVU_RS01380	DVU_0278	455,52	2,35	5,11	0,29	8,02	1,07E-15	2,76E-14
DVU_RS14775	DVU_3143	53,92	2,37	5,17	0,44	5,36	8,48E-08	8,57E-07
DVU_RS12140	DVU_2588	482,14	2,39	5,24	0,26	9,24	2,36E-20	7,70E-19
DVU_RS14170	DVU_3013	333,87	2,42	5,34	0,27	8,80	1,42E-18	4,38E-17
DVU_RS11760	DVU_2514	1389,97	2,43	5,37	0,22	11,11	1,11E-28	6,06E-27
DVU_RS03195	DVU_0671	183,94	2,44	5,43	0,25	9,64	5,36E-22	1,93E-20
DVU_RS03665	DVU_0772	3384,42	2,45	5,46	0,56	4,35	1,37E-05	9,09E-05
DVU_RS11430	DVU_2441	733,61	2,45	5,47	0,55	4,44	8,91E-06	6,13E-05
DVU_RS13865	DVU_2952	91,52	2,45	5,48	0,36	6,88	6,03E-12	1,10E-10
DVU_RS02060	DVU_0423	549,84	2,46	5,50	0,21	11,62	3,16E-31	1,97E-29
DVU_RS11350	DVU_2422	296,99	2,49	5,61	0,28	8,91	5,07E-19	1,60E-17
DVU_RS11575	DVU_2474	219,65	2,50	5,66	0,22	11,25	2,22E-29	1,26E-27
DVU_RS00880	DVU_0181	11,80	2,50	5,66	0,71	3,53	4,19E-04	1,80E-03
DVU_RS05640	DVU_1194	175,70	2,52	5,73	0,23	10,87	1,64E-27	7,84E-26
DVU_RS09935	DVU_2106	121,28	2,53	5,78	0,60	4,22	2,39E-05	1,49E-04
DVU_RS04085	DVU_0863	300,02	2,54	5,81	0,22	11,79	4,40E-32	2,99E-30
DVU_RS16030	DVUA0030	50,25	2,55	5,84	0,45	5,63	1,81E-08	2,05E-07
DVU_RS00890	DVU_0183	97,97	2,55	5,85	0,42	6,13	8,62E-10	1,19E-08
DVU_RS15905	DVUA0002	107,69	2,55	5,86	0,29	8,84	9,65E-19	3,02E-17
DVU_RS10070	DVU_2133	97,21	2,56	5,88	0,31	8,29	1,09E-16	2,98E-15
DVU_RS16110	DVUA0047	37,47	2,57	5,93	0,42	6,08	1,22E-09	1,63E-08
DVU_RS16125	DVUA0050	17,36	2,57	5,95	0,70	3,69	2,21E-04	1,04E-03
DVU_RS12500		829,36	2,57	5,96	0,39	6,68	2,41E-11	4,19E-10
DVU_RS13510	DVU_2882	142,50	2,58	5,96	0,26	9,90	4,10E-23	1,55E-21
DVU_RS00145	DVU_0031	100,22	2,58	5,98	0,47	5,48	4,37E-08	4,66E-07
DVU_RS15490	DVU_3295	606,12	2,58	5,99	0,20	13,23	5,57E-40	6,81E-38
DVU_RS14545	DVU_3095	485,46	2,58	5,99	0,39	6,56	5,29E-11	8,71E-10
DVU_RS06500	DVU_1375	309,92	2,59	6,00	0,32	7,99	1,39E-15	3,55E-14
DVU_RS14125	DVU_3004	393,07	2,60	6,07	0,21	12,66	1,02E-36	8,69E-35
DVU_RS08370	DVU_1760	189,90	2,60	6,08	1,01	2,57	1,02E-02	2,69E-02
DVU_RS06945	DVU_1475	331,02	2,61	6,11	0,21	12,68	7,49E-37	6,55E-35
DVU_RS14745	DVU_3137	484,41	2,62	6,16	0,21	12,72	4,62E-37	4,16E-35
DVU_RS14780	DVU_3144	109,24	2,63	6,20	0,34	7,72	1,14E-14	2,69E-13
DVU_RS16095	DVUA0044	19,00	2,64	6,23	0,64	4,11	3,95E-05	2,28E-04
DVU_RS11915	DVU_2548	1268,78	2,65	6,27	0,21	12,86	7,61E-38	7,52E-36
DVU_RS05515	DVU_1164	72,74	2,66	6,31	0,31	8,65	5,11E-18	1,52E-16
DVU_RS14300	DVU_3042	362,56	2,66	6,31	0,24	11,25	2,45E-29	1,36E-27
DVU_RS02330	DVU_0484	101,98	2,66	6,32	0,27	9,75	1,89E-22	6,97E-21
DVU_RS13930	DVU_2965	1257,05	2,66	6,33	0,33	8,05	8,20E-16	2,13E-14
DVU_RS07265	DVU_1541	382,09	2,67	6,35	0,21	12,63	1,38E-36	1,14E-34
DVU_RS00205	DVU_0044	90,41	2,70	6,49	0,29	9,32	1,15E-20	3,78E-19

DVU_RS03850	DVU_0814	215,38	2,71	6,52	0,28	9,54	1,38E-21	4,80E-20
DVU_RS00650	DVU_0133	2385,87	2,71	6,53	0,36	7,61	2,80E-14	6,27E-13
DVU_RS15460	DVU_3287	172,15	2,71	6,56	0,27	9,91	3,92E-23	1,50E-21
DVU_RS08660	DVU_1824	162,91	2,72	6,57	0,26	10,60	2,84E-26	1,28E-24
DVU_RS02730	DVU_0572	285,88	2,72	6,60	0,35	7,79	6,93E-15	1,70E-13
DVU_RS14205	DVU_3020	111,62	2,73	6,62	0,29	9,42	4,34E-21	1,44E-19
DVU_RS16670	DVU_0035	148,42	2,74	6,67	0,55	4,95	7,39E-07	6,28E-06
DVU_RS06785	DVU_1444	64,57	2,76	6,76	0,33	8,39	4,85E-17	1,37E-15
DVU_RS06315		19,79	2,76	6,76	0,55	5,03	4,79E-07	4,18E-06
DVU_RS05435	DVU_1143	22,28	2,78	6,87	0,78	3,54	3,97E-04	1,73E-03
DVU_RS15890	DVU4001	118,97	2,81	6,99	0,57	4,91	9,16E-07	7,66E-06
DVU_RS02115	DVU_0436	216,14	2,82	7,08	0,40	7,12	1,07E-12	2,14E-11
DVU_RS06505	DVU_1376	4368,43	2,83	7,10	0,27	10,38	2,97E-25	1,25E-23
DVU_RS02000	DVU_0410	359,24	2,83	7,11	0,20	14,01	1,28E-44	1,78E-42
DVU_RS16435	DVUA203	1297,82	2,83	7,12	0,28	9,99	1,69E-23	6,56E-22
DVU_RS05765	DVU_1220	133,52	2,83	7,12	0,26	10,71	9,11E-27	4,16E-25
DVU_RS01115	DVU_0230	8,75	2,83	7,12	0,78	3,64	2,77E-04	1,26E-03
DVU_RS01080	DVU_0224	114,15	2,83	7,14	0,47	6,06	1,39E-09	1,83E-08
DVU_RS02510	DVU_0518	134,97	2,85	7,19	0,34	8,31	9,45E-17	2,63E-15
DVU_RS16100	DVUA0045	32,87	2,85	7,21	0,47	6,05	1,42E-09	1,86E-08
DVU_RS13915	DVU_2962	394,04	2,85	7,22	0,61	4,71	2,49E-06	1,93E-05
DVU_RS11680	DVU_2497	1498,54	2,86	7,24	0,34	8,47	2,50E-17	7,29E-16
DVU_RS15105	DVU_3213	260,90	2,88	7,34	0,19	15,10	1,57E-51	2,52E-49
DVU_RS07270	DVU_1542	2081,76	2,89	7,40	0,25	11,48	1,75E-30	1,03E-28
DVU_RS09905	DVU_2100	3528,12	2,95	7,72	0,47	6,22	5,10E-10	7,22E-09
DVU_RS05360	DVU_1129	4,82	2,95	7,74	0,93	3,19	1,44E-03	5,18E-03
DVU_RS16675	DVU_0420	423,35	2,96	7,77	0,57	5,17	2,35E-07	2,15E-06
DVU_RS03435	DVU_0725	1180,44	2,96	7,78	0,54	5,51	3,68E-08	3,99E-07
DVU_RS15975	DVUA0016	74,66	3,00	7,99	0,40	7,44	1,02E-13	2,16E-12
DVU_RS09920	DVU_2103	158,83	3,04	8,21	0,37	8,16	3,42E-16	8,96E-15
DVU_RS08565	DVU_1805	327,15	3,04	8,21	0,21	14,45	2,61E-47	4,00E-45
DVU_RS16025		30,53	3,06	8,34	0,55	5,53	3,25E-08	3,57E-07
DVU_RS11950	DVU_2556	560,05	3,07	8,39	0,26	11,77	5,40E-32	3,59E-30
DVU_RS05475	DVU_1152	50,36	3,08	8,46	0,54	5,71	1,16E-08	1,36E-07
DVU_RS13920	DVU_2963	120,57	3,12	8,71	0,57	5,46	4,78E-08	5,06E-07
DVU_RS01995	DVU_0409	108,34	3,13	8,74	0,29	10,90	1,14E-27	5,64E-26
DVU_RS09375	DVU_1980	1502,09	3,17	8,97	0,25	12,79	1,87E-37	1,74E-35
DVU_RS02865	DVU_0599	312,20	3,24	9,48	0,64	5,09	3,49E-07	3,11E-06
DVU_RS12355	DVU_2635	789,41	3,25	9,55	0,20	15,97	2,12E-57	4,99E-55
DVU_RS07725	DVU_1629	1566,94	3,26	9,58	0,28	11,77	5,56E-32	3,62E-30
DVU_RS08245	DVU_1737	5,46	3,30	9,88	1,35	2,44	1,46E-02	3,60E-02
DVU_RS02935	DVU_0616	295,84	3,32	10,02	0,25	13,08	4,02E-39	4,39E-37
DVU_RS06770	DVU_1441	744,02	3,36	10,24	0,30	11,07	1,85E-28	9,60E-27
DVU_RS10595	DVU4006	1205,10	3,36	10,27	0,22	15,32	5,93E-53	1,07E-50
DVU_RS01925	DVU_0395	1135,08	3,36	10,28	0,32	10,42	2,09E-25	9,15E-24
DVU_RS11445	DVU_2444	756,57	3,38	10,39	0,39	8,61	7,62E-18	2,24E-16
DVU_RS13910	DVU_2961	72,55	3,42	10,68	0,58	5,88	4,18E-09	5,11E-08
DVU_RS01585	DVU_0320	139,41	3,42	10,72	0,35	9,68	3,81E-22	1,39E-20
DVU_RS05540	DVU_1170	507,74	3,44	10,85	0,38	9,00	2,21E-19	7,06E-18
DVU_RS11820	DVU_2527	279,99	3,44	10,86	0,27	12,60	2,20E-36	1,73E-34

DVU_RS16035	DVUA0031	103,50	3,50	11,30	0,33	10,59	3,22E-26	1,43E-24
DVU_RS01570	DVU_0316	105,38	3,52	11,47	0,34	10,39	2,74E-25	1,18E-23
DVU_RS16700	DVU_1675	32,83	3,52	11,48	0,48	7,40	1,40E-13	2,93E-12
DVU_RS09925	DVU_2104	184,59	3,57	11,87	0,76	4,69	2,73E-06	2,10E-05
DVU_RS03655	DVU_0770	5312,25	3,66	12,66	0,26	13,87	9,44E-44	1,26E-41
DVU_RS09335	DVU_1971	1462,41	3,66	12,68	0,47	7,88	3,31E-15	8,31E-14
DVU_RS10770	DVU_2293	663,73	3,67	12,76	0,39	9,54	1,49E-21	5,05E-20
DVU_RS14045	DVU_2988	6874,82	3,68	12,86	0,66	5,55	2,85E-08	3,17E-07
DVU_RS11075	DVU_2363	629,94	3,75	13,41	0,46	8,20	2,34E-16	6,18E-15
DVU_RS00200	DVU_0043	89,64	3,75	13,43	0,32	11,75	6,94E-32	4,43E-30
DVU_RS06775	DVU_1442	382,98	3,81	14,03	0,52	7,29	3,10E-13	6,29E-12
DVU_RS12425	DVU_2652	530,36	3,82	14,09	0,35	10,90	1,19E-27	5,77E-26
DVU_RS09210	DVU_1943	1385,78	3,82	14,10	0,51	7,47	8,15E-14	1,73E-12
DVU_RS16040	DVUA0032	134,49	3,82	14,17	0,29	12,98	1,53E-38	1,62E-36
DVU_RS13565	DVU_2893	1605,25	3,84	14,29	0,59	6,53	6,78E-11	1,11E-09
DVU_RS02940	DVU_0617	205,18	3,87	14,66	0,33	11,89	1,31E-32	9,14E-31
DVU_RS09825	DVU_2082	1584,53	3,91	15,04	0,36	10,93	7,84E-28	3,93E-26
DVU_RS02950	DVU_0620	1631,89	3,91	15,05	0,30	12,83	1,13E-37	1,08E-35
DVU_RS15875	DVU_3387	611,20	3,92	15,15	0,16	24,51	1,27E-132	1,29E-129
DVU_RS00705	DVU_0145	132,47	3,92	15,17	0,28	14,13	2,31E-45	3,37E-43
DVU_RS15870	DVU_3386	6237,09	3,92	15,18	0,71	5,52	3,30E-08	3,62E-07
DVU_RS09945	DVU_2108	129,20	3,93	15,20	0,25	15,95	2,87E-57	6,27E-55
DVU_RS08800	DVU_1854	108,70	3,95	15,44	0,29	13,66	1,80E-42	2,29E-40
DVU_RS08915	DVU_1880	292,63	3,99	15,92	0,30	13,18	1,15E-39	1,35E-37
DVU_RS00730	DVU_0150	205,86	4,01	16,08	0,36	11,07	1,66E-28	8,78E-27
DVU_RS02340	DVU_0486	1137,09	4,21	18,51	0,34	12,45	1,47E-35	1,07E-33
DVU_RS00710	DVU_0146	153,95	4,21	18,55	0,34	12,27	1,25E-34	8,90E-33
DVU_RS00715	DVU_0147	77,55	4,34	20,29	0,34	12,86	7,21E-38	7,35E-36
DVU_RS13905	DVU_2960	827,11	4,34	20,32	0,53	8,22	2,01E-16	5,36E-15
DVU_RS00720	DVU_0148	374,25	4,46	21,95	0,54	8,24	1,75E-16	4,69E-15
DVU_RS00725	DVU_0149	739,15	4,58	23,90	0,42	10,82	2,71E-27	1,26E-25
DVU_RS08805	VU_tmRNA	324472,04	4,77	27,23	0,19	25,58	2,73E-144	4,17E-141
DVU_RS00610	DVU_0123	325,44	4,78	27,47	0,81	5,89	3,84E-09	4,72E-08
DVU_RS10765	DVU_2292	45,09	4,85	28,83	0,56	8,69	3,60E-18	1,09E-16
DVU_RS13900	DVU_2959	550,26	5,00	32,02	0,80	6,24	4,42E-10	6,35E-09
DVU_RS11485	DV_r01	5,04	5,05	33,08	1,17	4,30	1,70E-05	1,10E-04
DVU_RS13895	DVU_2958	1255,67	5,19	36,39	0,75	6,94	3,91E-12	7,39E-11
DVU_RS10740	DVU_2287	327,55	5,33	40,13	0,34	15,82	2,44E-56	4,97E-54
DVU_RS10735	DVU_2286	917,11	5,38	41,57	0,20	27,39	3,19E-165	9,76E-162
DVU_RS10745	DVU_2288	84,76	5,63	49,47	0,43	13,17	1,23E-39	1,39E-37
DVU_RS10755	DVU_2290	149,96	5,70	52,02	0,30	18,89	1,29E-79	4,95E-77
DVU_RS15860	DVU_3382	2347,04	5,73	52,90	0,32	17,68	5,88E-70	2,00E-67
DVU_RS09940	DVU_2107	306,06	5,87	58,63	0,31	19,09	3,04E-81	1,33E-78
DVU_RS10760	DVU_2291	242,14	5,98	62,97	0,39	15,35	3,44E-53	6,57E-51
DVU_RS06600	DVU_1401	533,76	6,11	68,94	0,31	19,93	2,34E-88	1,19E-85
DVU_RS10750	DVU_2289	242,59	6,19	72,94	0,38	16,41	1,72E-60	4,79E-58
DVU_RS16325	DVUA0089	429,02	6,21	74,04	0,36	17,28	6,91E-67	2,11E-64
DVU_RS09930	DVU_2105	1252,47	6,28	77,70	0,41	15,23	2,24E-52	3,81E-50
DVU_RS15855	DVU_3381	2321,74	6,72	105,76	0,28	23,89	4,38E-126	3,35E-123
DVU_RS15865	DVU_3384	121484,73	7,03	130,32	0,56	12,52	6,01E-36	4,49E-34
DVU_RS12420	DVU_2650	366,66	7,47	177,15	0,36	20,90	5,55E-97	3,40E-94

Résumé

Les microorganismes vivent dans des communautés complexes, perçoivent leur environnement et y répondent en échangent des signaux et des ressources. Cette complexité et interconnexion confèrent à l'ensemble de nouvelles fonctions et des performances accrues non prévisibles par la simple analyse des génomes des espèces présentes. Les consortia synthétiques, inspirés des écosystèmes naturels, offrent un modèle précieux pour explorer, décrypter et contrôler en vue d'applications potentielles les interactions inter-espèce en conditions simplifiées. Ce travail se concentre sur un consortium modèle associant *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*Nv*H) et *Clostridium acetobutylicum*. Au sein de ce système, en condition de stress nutritionnel des interactions métaboliques et physiques se mettent en place conduisant à une production de bio-hydrogène plus importante. Si la nécessaire présence de molécules de quorum-sensing de type AI-2 a été démontrée dans la mise en place des interactions, l'objectif de la thèse a été de décrypter les bases moléculaires de cette interaction. Une approche *in silico* a été définie et mise en place afin d'identifier les acteurs des acteurs potentiels du QS AI-2 chez *C. acetobutylicum* et *Nv*H. Les résultats ont permis de proposer des voies de QS de type Lsr non canonique et jusqu'alors non caractérisées chez ces bactéries. Des approches *in vitro* ont elles démontré la fonction des protéines LsrK-like et LsrR-like chez *Nv*H et donc leur rôle dans la signalisation de type AI-2. Ainsi LsrK-like est une kinase présentant la double fonction de phosphoryler l'AI-2 et le glycérol et LsrR-like, un régulateur se fixant sur l'ADN et répondant au signal de l'AI-2 phosphorylé. Par la suite, *via* des approches de transcriptomique les gènes de *Nv*H régulés par AI-2 ont été identifiés. Ainsi, en culture pure, nous avons mis en évidence des systèmes de réponse au signal AI-2 chez *Nv*H tel qu'un transporteur pouvant être impliqué dans l'import d'AI-2 ou encore la voie de synthèse de la thiamine. En parallèle, une analyse méta-transcriptomique a permis d'étudier les gènes régulés au sein du consortium pointant des voies métaboliques significativement impactées par l'interaction entre les deux bactéries. Ainsi les résultats pointent des modifications dans les voies de production de certains amino-acides ou encore dans d'autres voies de quorum sensing chez *C. acetobutylicum*. Ces travaux ont nécessité la mise au point d'une nouvelle méthode de quantification absolue par digital droplet PCR pour évaluer le ratio cellulaire au sein d'un consortium synthétique. Ces travaux soulignent l'importance des systèmes de communication intra- et interspécifiques dans la régulation des interactions au sein du consortium, et ouvrent des pistes pour de futures études sur le contrôle des systèmes microbiens.

Mots clés : Consortium, Interactions métaboliques, Quorum sensing, Transcriptome, Biohydrogène