

Dossier présenté pour l'obtention de l'Habilitation à Diriger des Recherches

Ecologie des phages des matrices d'intérêt alimentaire

Dr Marion DALMASSO

Unité de Recherche Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements (UR4651 ABTE)

Maître de Conférences dans l'Equipe de Recherche Matrices ALimentaires et Microbiotes (MALIM)

Soutenance le 1^{er} juin 2023 devant le jury composé de

M. Benoit FOLIGNE	Professeur des universités Université de Lille	Rapporteur
Mme Claire LE HENAFF-LE MARREC	Professeur des universités ISVV, Bordeaux INP	Rapporteuse
Mme Anne THIERRY	Chargée de recherche HDR UMR1253 (STLO), INRAE Institut Agro	Rapporteuse
M. Alain RINCE	Professeur des universités Université de Caen Normandie	Membre du jury
M. Eric BEUVIER	Ingénieur de recherche HDR INRAE-URTAL	Membre du jury
Mme Nathalie DESMASURES	Professeur des universités Université de Caen Normandie	Membre du jury Garante d'HDR

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury ;

A mes collègues de l'équipe MALIM et de l'UR4651 ABTE ;

A Nathalie Desmasures tout particulièrement, pour ton soutien, tes conseils et ta bienveillance. Merci de m'avoir permis de « déployer mes ailes » au labo ;

A Pierre Ledormand, pour ce travail de thèse formidable que tu as mené et qui a contribué à faire décoller cette thématique phages au labo ; Un grand merci à toi pour tout !

A Fabien, Thibault et Martin, les trois hommes de ma vie, je vous aime ;

A toi, maman, pour ton soutien indéfectible ;

A mon frère Guillaume, et Hang, Sophie et Léa, parce que vous êtes toujours présents et que votre gentillesse est infiniment importante pour moi ;

A mon papa, dans mon cœur pour toujours.

SOMMAIRE

I- Curriculum vitae	1
I.1 Etat civil	1
I.2 Diplômes.....	1
I.3 Parcours de recherche.....	1
I.4 Bourses et distinctions	2
I.5 Enseignement.....	2
I.6 Responsabilités administratives et collectives.....	2
I.7 Implication dans des projets et réseaux scientifiques	3
I.8 Encadrement	4
I.9 Expertise	5
II- Communications scientifiques	9
II.1 Communications orales à des conférences.....	9
II.2 Communications affichées à des conférences	10
II.3 Publications dans des revues internationales à comités de lecture	11
II. 4 Brevets.....	15
III- Travaux de recherche	19
III.1- Préambule : parcours de recherche et résumé des faits marquants.....	19
III.2- Introduction : les phages et leur place dans les écosystèmes microbiens	21
III.3 – Utilisation des phages contre les salmonelles dans la filière des fromages AOP au lait cru de Normandie.....	27
III.4 – Rôle du phageome dans la modulation du microbiote intestinal	36
III.5 – Interactions phages-bactéries dans les matrices d'intérêt cidricole.....	40
IV- Projet de recherche.....	57
IV. 1 Objectifs scientifiques	57
IV. 2 Projet SURPHAGES : Rôle des phages des bactéries non acidifiantes dans l'affinage des fromages.....	57
IV.3 Interactions phages-bactéries dans les matrices végétales fermentées (Projet VégéPhage) ...	60
IV.4 Perspectives de recherche à plus long terme	63
V- Intégration dans le paysage local, moyens financiers et humains, et collaborations stratégiques	64
VI- Conclusion	66
VII- Références bibliographiques	69

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Parcours de recherche depuis ma thèse jusqu'à ma prise de poste en tant que Maître de Conférences à l'Université de Caen Normandie.....	19
Figure 2 : Principales familles et ordres de bactériophages ciblant les bactéries ainsi que les différents virus d'Archées.....	22
Figure 3 : Etapes de l'injection de l'ADN phagique dans la cellule hôte par le phage T4.	23
Figure 4 : Le cycle lytique et le cycle lysogénique des phages.	24
Figure 5 : Modèle « kill the winner » de l'impact écologique des phages dans un écosystème.	26
Figure 6 : Exemples de phages isolés dans cette étude observés par microscopie électronique en transmission.	28
Figure 7 : Clustering des profils de lyse des phages de cette étude en fonction de leur spectre d'hôte.....	30
Figure 8 : Exemples de suivis de l'efficacité du cocktail de phages sur des souches de terrain et des souches de référence en milieu LB, à 37°C.....	32
Figure 9 : Concentration en particules phagiques pour le phage UCMA 21064 après 24 heures d'incubation à différents pH.	34
Figure 10 : Evolution de la concentration en particules phagiques sur 24 h du phage UCMA 21064 aux températures de 4°C, 15°C, 30°C, 37°C, 50°C, et 70°C.....	34
Figure 11 : Effet du cocktail de phages sur les souches S. Ohio UCMA 19862 (A), S. Montevideo UCMA 17813 (B), S. Montevideo UCMA 19867 (C) et S. Montevideo UCMA 19887 (D) dans du lait entier UHT.....	35
Figure 12 : Représentation PCoA des distances unweighted UniFrac pour tous les points et tous les groupes de l'étude 1.	37
Figure 13 : Représentation PCoA des distances unweighted UniFrac pour tous les points et tous les groupes de l'étude 2.	38
Figure 14: Analyse métagénomique de l'ADN isolé des virus extraits des échantillons de fèces de souris de l'étude 1 (A) et de l'étude 2 (B)	39
Figure 15 : Procédé de fabrication du cidre.....	41
Figure 16 : Heatmap montrant les dynamiques des prophages les plus abondants retrouvés pendant le premier mois de fermentation chez le producteur B.	45
Figure 17 : Suivi de la communauté modèle à 25°C.	47
Figure 18 : Suivi de la communauté modèle à 15°C.	48
Figure 19 : Morphologie du phage UCMA 21115 obtenue par microscopie électronique en transmission.	50
Figure 20 : Principales fonctions de L. mali UCMA 16447 impactées pendant l'infection par le phage UCMA 21115 à deux temps de l'infection par RNA-Seq.	51
Figure 21 : Voie d'Embden-Meyerhof chez la souche L. mali UCMA 16447 pendant l'infection par le phage UCMA 21115.....	52
Figure 22 : Organisation et contenu des volets (WP) du projet SURPHAGES.	59
Figure 23 : Organigramme fonctionnel pour la réalisation de mon projet de recherche	64

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Répartition des phages selon des fermes et le type d'échantillon</i>	<i>29</i>
<i>Tableau 2 : Bactériophages utilisés dans l'élaboration du cocktail de phages</i>	<i>31</i>
<i>Tableau 3 : Echantillons de cidre collectés pour l'étude des phageomes et des prophages</i>	<i>43</i>
<i>Tableau 4 : Conditions testées pour la concentration du phageome du cidre</i>	<i>43</i>

CURRICULUM VITAE





I- Curriculum vitae

I.1 Etat civil

Marion DALMASSO

Née le 23 février 1982, à Cannes (06), Nationalité française – Pacsée, 2 enfants

Situation professionnelle actuelle : Maître de Conférences, classe normale, échelon 6

Université de Caen Normandie, Unité de Recherche Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements (UR4651 ABTE), Equipe Matrices Alimentaires et Microbiotes (ER MALIM), Campus 1, Bâtiment M, Université de Caen Normandie, Esplanade de la Paix, 14032 CAEN Cedex

Tél : +33 (0)2 31 56 51 56 ; Mail : marion.dalmasso@unicaen.fr

I.2 Diplômes

- 2006 - 2009 **Doctorat de biologie appliquée**
Université de Savoie, France/ Isara-Lyon, unité BIODYMIA, France
Directeur de thèse : Prof René MOLETTA ; co-encadrant : Dr. Yann DEMARIGNY
- 2004 - 2005 **Master Recherche de Nutrition, spé. Sciences des Aliments**
Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France
- 2002 - 2005 **Ingénieur des Travaux Agricoles, option Qualité et Gestion Alimentaires**
ENITAC (VetAgro Sup), Clermont-Ferrand, France

I.3 Parcours de recherche

Depuis Sept. 2015 : **Maître de conférences** à l'Université de Caen Normandie.

UR4651 ABTE, ER MALIM / Composante d'enseignement : ESIX Normandie
département Agroalimentaire

- 2013 - 2015 **Chercheuse post-doctorante : Etude des communautés de bactériophages de l'intestin humain**
University College Cork – APC Microbiome Ireland, Cork, Irlande
Superviseurs : Prof. Colin Hill; Prof. R. Paul Ross
- 2012 - 2013 **Chercheuse post-doctorante : Persistance de *Listeria monocytogenes* chez des producteurs fromagers fermiers**
TEAGASC, Moorepark – Fermoy, Co. Cork, Irlande
Superviseur : Dr. Kieran JORDAN ; Projet PROMISE – EU 7th Framework programme
- Juillet 2013 **Programme d'échange avec l'Université d'Athènes (Grèce) – Virulence chez *L. monocytogenes***
Superviseur : Pr. Panagiotis N. Skandamis ; Projet PROMISE
- 2009 - 2012 **Chercheuse post-doctorante : MLST et étude transcriptomique de *Propionibacterium freudenreichii***
INRA, AGROCAMPUS OUEST – UMR1253 STLO – Rennes, France
Superviseur : Dr. Anne THIERRY ; Projet en partenariat avec Valio Ltd (Helsinki, Finlande)
- 2006 - 2009 **Doctorat : diversité microbienne des lactosérums levains de fromagerie**
Université de Savoie, France/ Isara-Lyon, unité BIODYMIA, France
Directeur de thèse : Prof René MOLETTA ; co-encadrant : Dr. Yann DEMARIGNY



I.4 Bourses et distinctions

- 2013 Exchange programme grant 2013 (PROMISE, EU 7th Framework Programme)
2011 Bourse IDF-FIL France « meilleur post-doc », invitation à présenter une conférence au IDF World Dairy Summit 2011 - International Dairy Federation (Parme, Italie)
2010 Prix du Poster 2010 au 6e Congrès de la Société Française de Microbiologie (Marseille, France)

I.5 Enseignement

Composante : Ecole d'Ingénieurs ESIX Normandie, département Agroalimentaire :

- Enseignements en 3^e année étudiants et apprentis :
 - CM/TD dans l'UE 5.1 Bases générales et scientifiques pour l'ingénieur / Biologie
 - CM/TD/TP dans l'UE 5.2 Sciences des aliments 1/ Microbiologie des écosystèmes alimentaires 1
 - TP dans l'UE 6.2 Sciences des aliments 2/ Microbiologie des écosystèmes alimentaires 2
- Enseignements en 4^e année étudiants et apprentis :
 - CM/TP dans l'UE 7.2 Qualité, Sécurité et Environnement / Détection des fraudes alimentaires
- Tutorat de groupes projets étudiants de 3^e, 4^e et 5^e
- Tutorat d'un groupe Ecotrophéla de 5^e année
- Tutorat d'apprentis sur les 3 années de la formation

Enseignements dans d'autres composantes ou établissements :

- Master 2 Microbiologie, Université de Caen Normandie (2h CM en 2018, 2019 et 2020)
- Master 2 Biologie santé - parcours Nutrition, Santé, Innovation (Master international Food Identity, VetAgroSup) (2h CM en 2020)

I.6 Responsabilités administratives et collectives

I.6.1 En enseignement :

Depuis 2021 : Co-responsable du suivi des projets Ecotrophéla en cinquième année de l'ESIX Département Agroalimentaire

Depuis 2020 : Responsable pédagogique d'unités d'enseignement à l'ESIX Normandie Département Agroalimentaire

Depuis 2016 : Co-responsable pédagogique de la quatrième année pour les formations Etudiants et Apprentis de l'ESIX Normandie Département Agroalimentaire

Depuis 2015 : Membre élue du conseil de département agroalimentaire de l'ESIX Normandie

I.6.2 En recherche :

Depuis 2022 : co-animatrice du groupe de travail transversal « échange de bonnes pratiques » de l'UR ABTE (3 équipes de recherche regroupant près de 70 personnes dont 41 enseignants-chercheurs titulaires, et 5 personnels techniques titulaires)

2017-2019 : Membre suppléante élue de la commission nationale CNU68

2019 : Membre du comité d'organisation du 22^e colloque du CBL (12-14 juin 2019, Caen)

2017-2019 : Membre du conseil de gestion de l'UR ABTE

Depuis 2018 : Sauveteur Secouriste du Travail

Depuis 2017 : Responsable de la base qualité des protocoles du laboratoire MALIM et accueil H&S des nouveaux arrivants au laboratoire



I.7 Implication dans des projets et réseaux scientifiques

Période	Projet	Implication	Partenaires du projet	Financement
2023-2026	SURPHAGES	Participante et responsable scientifique pour l'UR ABTE Pilotage de 3 actions du projet	CNIEL, INRAE Sayfood, Actalia	CNIEL - PNDAR (déposé en fév 2023) 195,7 k€ pour l'équipe (total 600 k€)
2023-2026	cAnOPee	Supervision de la tâche 3.1, implication dans sous-tâche 2.2.3 / Analyse des données de métagénétique	UR 4651 ABTE, UMR 1286 Infinite (Université Lille), UMR INRAE-UNICAEN 950 EVA, UMR 6266 IDEES (Unicaen), UMR 6590 ESO (Unicaen), Association de Gestion des ODG laitiers normands	ANR 288,6 k€ pour l'équipe (total 827 k€)
2022- 2024	Aeronef	Participation à la réalisation du projet	UR 4651 ABTE (MALIM), Association de Gestion des ODG laitiers normands	FEADER - Région Normandie 241 k€ pour l'équipe (total 254 k€)
2022-2023	PROSE	Participation à la réalisation du projet	UR 4651 ABTE (MALIM), GAEC du Champ secret	FEADER - Région Normandie 125 k€ pour équipe (total 140 k€)
2019-2022	ADAMOS	Responsable scientifique partenaire pour le projet / Membre du COPIL du projet	Ceraq, CNAOL, Actalia, ENILV, Pôle fromager AOP Massif central, Fromages Comtois (CFCT), CIGC, INRAE UMR0782 GMPA, INRAE UMR545 Fromage, INRAE URTAL Poligny, Genoscope, École d'Ingénieurs de Purpan, Unicaen (MALIM)	Casdar 3 k€ pour l'équipe, total 874,7 k€
2017-2020	CESam	Participante Responsable scientifique d'un volet du projet	MALIM (Unicaen), Gillot SAS	FEDER Innovation - Région Normandie 189 k€ pour l'équipe (total 420 k€)
2016-2018	RNAmb	Responsable scientifique d'un volet du projet	LMSM EA4312, UR 4651 ABTE (MALIM), UMR 6270 CNRS, PFT N2S	FEDER/FSE - RIN Recherche Région Normandie Total 785,8 k€
2016-2018	Microphyllos	Participation aux manipulations (prélèvements terrain, microbiologie, métagénétique, etc.) et à la valorisation	UR ABTE (MALIM), UMR INRAE-UNICAEN 950 EVA Plateforme de microscopie UNICAEN CMAbio ³	Projet émergent Région Normandie 106,7 K€ pour l'équipe (total 150 k€)

Depuis 2015 : participation au RMT Fromages de terroir (<https://www.rmtfromagesdeterroirs.com/>)

Depuis 2016 : membre du Réseau Bactériophages France (<https://site.phages.fr/>)

Depuis 2022 : membre du comité scientifique du GIS AOP Laitières de Normandie GALAN



I.8 Encadrement

I.8.1 Encadrement de doctorants

2019-2022 : Pierre Ledormand – « Diversité des bactériophages et interactions au sein des communautés microbiennes de matrices cidricoles ». Co-encadrement 50% avec le Pr Nathalie Desmasures.

I.8.2 Encadrement d'étudiants de Master 2

2021 : Sarah Sacoman, Master 2 Sciences, Technologies, Sante – Parcours Microbiologie Fondamentale et Appliquée, Université de Rennes 1 - Université de Bretagne occidentale / formation d'ingénieur ESIAB (Stage 6 mois, encadrement 50%)

2020 : Yohan Huitric, Master 2 Microbiologie Université de Caen Normandie (Stage 6 mois, encadrement 50%)

2019 : Erwan Renard, Master 2 Microbiologie Université de Caen Normandie (Stage 6 mois, encadrement 100%)

2016 : Antoine Avis, Master 2 Microbiologie Université de Brest (Stage 6 mois, encadrement 100%)

2014 : Vivek Sonu, Master 2, University College Cork (stage 6 mois, encadrement 100%)

2007 : Claire Moignard, Master 2 Microbiologie Université de Lyon (Stage 6 mois, encadrement 50%)

I.8.3 Encadrement d'étudiants de Master 1

2023 : Yasmine Boujerfaoui, Master 1, Université de Caen Normandie (stage 2 mois)

2014 : Eric de Haas, Master 1, University College Cork (stage 3 mois)

I.8.4 Encadrement d'étudiants ingénieurs

2018 : Estefania Bernay, Stage ingénieur ESIX, UR ABTE (stage 2 mois)

2014 : Agathe Chouët, Elève ingénieure ESIX 2e année, University College Cork (stage 2 mois)

2006 : Elise Denis, Elève ingénieure 4e année Isara-Lyon (stage 3 mois)

I.8.5 Encadrement d'étudiants de DUT

2015 : Juliette Bougnon, IUT (équivalent), CIT Cork (stage 2 mois)

2012 : Perrine Lapray, IUT (équivalent), CIT Cork (stage 2 mois)

I.8.6 Encadrement d'étudiants de Licence

2016 : Alexandra Grondin, L3 Microbiologie Université de Caen Normandie (Stage 1 semaine)

2013 : Marie McSweeney, 4th year, University College Cork (stage 2 mois)

2013 : Tracy Leonard, 4th year, University College Cork (stage 2 mois)

I.8.7 Encadrement d'étudiants de BTS

2020 : Morgane Duvivier, BTS Bioanalyses et Contrôles, Lycée Jean Rostand, Caen (6 semaines)

I.8.8 Encadrement de personnels d'appui à la recherche

2019-2020 : Céline Caillard, Ingénieure d'Etudes sur le projet RNAMB, UR ABTE (8 mois)

2019-2020 : Erwan Renard, Ingénieur d'Etudes sur le projet RNAMB, UR ABTE (4 mois)

2017-2019 : Virginie Lelièvre, Ingénieure d'Etudes sur le projet Cesam, UR ABTE (24 mois)

2009-2010 : Nolwenn Brunet, Ingénieure d'études, INRAE Rennes (10 mois)



I.9 Expertise

I.9.1 Membre de comités de thèses

2019-2022 :

- Thomas Paillet, INRAE SayFood – Directeurs de thèse : Prof Marie-Agnès Petit et Dr Eric Dugat-Bony

2017-2020 :

- Antoine Culot, AgroCampus Ouest (Rennes) – Directeur de thèse : Prof Michel Gautier
- Olivier Harlé, UMR1253 AgroCampus Ouest- INRAE STLO (Rennes) – Directrice de thèse : Dr Stéphanie-Marie Deutsch

I.9.2 Membre de jury de thèse

- 17 décembre 2020 : Examinatrice pour la thèse d'Olivier Harlé, « Identification des interactions positives entre bactéries lactiques en fermentation de jus de soja » - UMR1253 AgroCampus Ouest- INRAE STLO (Rennes) – Directrice de thèse : Dr Stéphanie-Marie Deutsch

I.9.3 Activités d'expertise

2023 : Membre du jury du concours externe 2023 INRAE Techniciens de Recherche biologistes

2022 : Expert scientifique de trois dossiers pour l'obtention de bourses de recherche dans le cadre de « INSPIRE, a Marie Skłodowska-Curie Cofund fellowship at APC Microbiome Ireland ».

2022 : Expert étranger pour le manuscrit de thèse de Muhammad Nadeem Khan (Study on microbial communities modulation to mitigate obesity related gut microbiota dysbiosis. University of Islamabad, Pakistan).

2022 : Reviewer d'un article scientifique dans *International Microbiology*.

2020 : Expert étranger pour le manuscrit de thèse de Shahid Zaman (Development of microbial based probiotic feed supplement and evaluation of its Impact on growth, production and health of dairy cattle. University of Islamabad, Pakistan).

2019 : Expert étranger pour le manuscrit de thèse de Hafiz Arbab Sakandar (Synchronous degradation of gliadin and phytic acid by potential microbiota of indigenously fermented sourdough and its application in wheat dough fermentation. University of Islamabad, Pakistan).

2019 : Evaluation d'un dossier de demande de financement de thèse pour le concours de l'école doctorale ABIES (AgroParisTech)

2019 : Reviewer d'un article scientifique dans *Microorganisms* (Md. Sharifull Islama et al. 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020247>)

2018 : Reviewer d'un article scientifique dans *Nutrients* (Ricci et al. 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11020213>)

I.9. 4 Autre

- Intervention de 2h le 24/09/21 dans le cadre d'une formation IDELE : stage de perfectionnement des techniciens « produits laitiers fermiers » sur le thème « La métagénomique et son intérêt pour les produits laitiers ».
- Invitation à donner une présentation le 7/12/22 sur le thème « Les phages comme moyen de lutte contre les bactéries pathogènes dans la filière laitière » devant la commission Sécurité des aliments et le groupe de travail Pathogènes du CNIEL.





COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES





II- Communications scientifiques

Depuis mes débuts en thèse il y a 17 ans (2006), j'ai publié 26 articles de recherche dont 11 en tant que première auteure, 3 en dernière auteure et 4 en tant que « corresponding author ». Le détail de mes publications orales, affichées et écrites, est présenté ci-dessous.

II.1 Communications orales à des conférences

13 conférences, dont 7 en tant qu'orateur

- Ledormand P[‡], Desmasures N, Schlusshuber M, Sesboué A, Ledauphin J, **Dalmasso M. 2022.** Impact of phages on the dynamics and metabolism of a model microbial community inspired from a fermented beverage. 27^{ème} congrès international FoodMicro2022, 28-31 août 2022, Athènes, Grèce
- Ledormand P[‡], Desmasures N, Schlusshuber M, Sesboué A, Ledauphin J, **Dalmasso M. 2022.** Rôle des phages sur la dynamique et le métabolisme d'une communauté microbienne modèle inspirée du cidre. 23^{ème} colloque national du Club des Bactéries Lactiques, 8-10 juin, Rennes, France
- Ledormand P[‡], Desmasures N, Bernay B, Rué O, Midoux C, Monnet C, **Dalmasso M. 2021.** Transcriptomic and proteomic response of a *Liquorilactobacillus mali* strain from cider to a lytic phage infection. 16^e congrès national de la SFM Microbes 2021, 22-24 sept., Nantes, France.
- Ledormand P[‡], Desmasures N, Monnet C, **Dalmasso M. 2021.** The transcriptomic response of a *Liquorilactobacillus mali* strain from French cider to a lytic phage infection. SFM Weblactic, 1er avril 2021.
- Desmasures N[‡], Lelièvre V, Besnard A, Schlusshuber M, **Dalmasso M, 2019.** *Salmonella* phage diversity in French dairy farms and their potential as biocontrol agents, 15^e congrès national de la SFM, 30 sept-2 oct, Paris, France
- **Dalmasso M[‡]**, Lelièvre V, Besnard A, Schlusshuber M, Desmasures D. **2018.** Anti-*Salmonella* bacteriophages for insuring the safety of soft cheeses. 10th Cheese Symposium, Rennes, France.
- **Dalmasso M[‡]**, Morvan-Bertrand A, Chagnot C, Meuriot F, Goux D, Schlusshuber M, Noiraud-Romy N, Prud'homme MP, Elie N, Desmasures N, Crétenet M. **2017.** Microbiota diversity of pastures: from the grass to the milk. 13^{ème} congrès de la SFM, Paris, France.
- Morvan-Bertrand A[‡], Meuriot F, Parquet C, Goux D, **Dalmasso M**, Schlusshuber M, Noiraud-Romy N, Prud'homme MP, Elie N, Desmasures N, Crétenet M. **2016.** Phylloplane microbiome diversity in fructan- and non-fructan accumulating grassland species and its relationship with carbohydrate metabolism of the host plant. 8th International Fructan Symposium. Oaxaca, Mexico.
- **Dalmasso M, 2016[‡].** Development of anti-*Salmonella* phage for use in dairies. The Science of Artisan Cheese, North Cadbury Court, Somerset, UK. (**Oratrice invitée**)
- **Dalmasso M, 2013[‡].** Detection of *Listeria monocytogenes* in processing facilities across Europe. Safefood *Listeria* Knowledge Network Annual Conference, Dublin, Ireland.
- **Dalmasso M[‡]**, Falentin H, Deutsch S.M, Jan G, Parayre S, Thierry A, **2011.** Cold adaptation of the cheese ripening bacterium *Propionibacterium freudenreichii*. IDF World Dairy Summit, Parma, Italy.
- **Dalmasso M[‡]**, Nicolas P, Falentin H, Tanskanen J, Thierry A, **2010.** First multilocus sequence typing scheme to study *Propionibacterium freudenreichii* population structure. 3rd international symposium on Propionibacteria and Bifidobacteria, Oviedo, Spain.

[‡] Orateur



- **Dalmasso M[‡]**, Moignard F, Duc C, Prestoz S, Rigobello V, Demarigny Y, **2007**. Influence de la flore du lait cru sur la complexité d'un levain naturel : étude préliminaire du lait cru. 7e congrès de la SFM, Nantes, France.

II.2 Communications affichées à des conférences

19 posters

- **Dalmasso M**, Morvan-Bertrand A, Chagnot C, Goux D, Sesboué A, Meuriot F, Schlusshuber M, Prud'homme MP, Elie N, Desmasures N, Launay F, Noiraud-Romy N, Cretenet M, **2022**. Microbiota diversity of the grassland phyllosphere. 29th EGF general meeting: Grassland at the heart of circular and sustainable food systems, 26-30 Juin 2022, Caen, France.
- Lone Sang H, Chagnot C, **Dalmasso M**, Goux D, Elie N, Morvan-Bertrand A, Cretenet M, Noiraud-Romy N, Meuriot F, Prud'homme MP, **2022**. Phyllospheric bacteria modify the sugar transporter (LpSUT1) expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). 29th EGF general meeting: Grassland at the heart of circular and sustainable food systems, 26-30 Juin 2022, Caen, France.
- Ledormand P, Desmasures N, Caillard C, Renard E, Goux D, Midoux C, Rué O, **Dalmasso M**, **2021**. Le cidre est une matrice délicate pour l'étude des bactériophages et des phageomes. 16e congrès national de la SFM MICROBES, 22-24 sept, Nantes, France.
- Ledormand P, Desmasures N, Goux D, Midoux C, Rué O, **Dalmasso M**, **2021**. Bacteriophage ecology of cider, an alcoholic fermented beverage: phages, are you there? 11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria (LAB13), 23-25 August 2021, Egmond aan Zee, the Netherlands (Webconference).
- **Dalmasso M**, Caillard C, Crétenet M, Desmasures N, **2019**. Study of phage communities in Normandy ciders. 15e congrès national de la SFM, 30 sept-2 oct, Paris, France
- Lone Sang H, Chagnot C, **Dalmasso M**, Goux D, Elie N, Schlusshuber M, Desmasures D, Morvan-Bertrand A, Cretenet M, Noiraud-Romy N, Meuriot F, Prud'homme MP, **2018**. Phyllosphere bacteria could influence sugar transport in Rye-grass (*Lolium perenne* L.). SFR NorVege, Deauville, France.
- Morvan-Bertrand A, Meuriot F, Parquet C, Goux D, **Dalmasso M**, Schlusshuber M, Noiraud-Romy N, Prud'homme MP, Elie N, Desmasures N, Cretenet M. **2016**. De l'herbe au lait : impact de la composition floristique et biochimique de l'herbe sur les communautés microbiennes de la surface des feuilles. Prairiales Normandie, Saint Pierre sur Dives, France.
- **Dalmasso M**, De Haas E, Ross RP, Hill C, **2014**. Exploiting human host bacteriophages to control *Streptococcus mutans*. 11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, the Netherlands.
- **Dalmasso M**, Jordan K, **2013**. Process environment sampling can help to reduce the occurrence of *Listeria monocytogenes* in food processing facilities. Safefood *Listeria* Knowledge Network Annual Conference, Dublin, Ireland.
- Bolocan AS, Oniciuc EA, **Dalmasso M**, Alvarez-Ordóñez A, Jordan K, Nicolau AI, **2013**. The necessity of changing legislation for *Listeria monocytogenes* control in meat industry. Safefood *Listeria* Knowledge Network Annual Conference, Dublin, Ireland.
- **Dalmasso M**, Jordan K, **2012**. Assessment of the environment-borne *Listeria monocytogenes* risk in cheesemaking facilities. Global Food Safety Conference 2012, Dublin, Ireland.



- **Dalmasso M**, Falentin H, Deutsch S.M, Jan G, Parayre S, Thierry A, **2011**. Cold adaptation of the cheese ripening bacterium *Propionibacterium freudenreichii*. 8th Cheese symposium, Cork, Ireland.
- **Dalmasso M**, Nicolas P, Falentin H, Tanskanen J, Thierry A, **2010**. First multilocus sequence typing scheme to study *Propionibacterium freudenreichii* population structure. 3rd international symposium on Propionibacteria and Bifidobacteria, Oviedo, Spain.
- **Dalmasso M**, Nicolas P, Falentin H, Valence F, Tanskanen J, Thierry A, **2010**. Lineages with broad dairy biotope ranges and phenotypic variability in *Propionibacterium freudenreichii* revealed by multilocus sequence typing. 12th International Conference on Culture Collections, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.
- Valence F, Bouvet P, Jardin J, **Dalmasso M**, et al. **2010**. Evaluation of the diversity in two species of the genus *Propionibacterium*: mass spectrometry versus triple-locus sequence analysis for 40 strains of *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium freudenreichii*. 12th International Conference on Culture Collections, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.
- **Dalmasso M**, Guyot P, Bouton Y, Demarigny Y, **2010**. Influence du repiquage sur la diversité des lactosérums levains. 8e congrès de la SFM, Marseille, France.
- **Dalmasso M**, Moignard F, Duc C, Prestoz S, Rigobello V, Demarigny Y, **2007**. Influence de la flore du lait cru sur la complexité d'un levain naturel : étude préliminaire du lait cru. 7e congrès de la SFM, Nantes, France.
- **Dalmasso M**, Duc C, Prestoz S, Rigobello V, Demarigny Y, **2007**. Incidence de la flore lactique du lait cru sur la dynamique des lactosérums levains utilisés pour la fabrication de fromages à pâte pressée non cuite. 15e congrès du CBL, Rennes, France.
- **Dalmasso M**, Demarigny, Y. **2006**. Etude de l'évolution d'un levain complexe au cours de fabrications fromagères successives. 14e congrès du CBL, Paris, France.

II.3 Publications dans des revues internationales à comités de lecture

II.3.1 Articles de recherche

27 articles dont 11 en tant que première auteure, 3 en dernière auteure et 4 en tant que « corresponding author » (*).

- Ritz NL, Draper LA, Bastiaanssen TFS, Turkington CJR, Peterson VL, van de Wouw M, Vlckova K, Fulling C, Guzzetta KE, Burokas A, Harris H, **Dalmasso M**, Crispie F, Cotter PD, Shkoporov AN, Moloney GM, Dinan TG, Hill C, Cryan JF, **2023**. The gut virome regulates the effects of chronic stress. Nature, soumis en janvier 2023.
- Ledormand P, Desmaures N, Schlusshuber M, Sesboüé A, Ledauphin J, **Dalmasso M***, **2022**. Phages shape microbial dynamics and metabolism of a model community mimicking cider, a fermented beverage. Viruses, 14(10), 2283; <https://doi.org/10.3390/v14102283>
- Ledormand P, Desmaures N, Midoux C, Rué O, **Dalmasso M***, **2022**. Investigation of the phageome and prophages in French Cider, a fermented beverage. Microorganisms, 10 :1203. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061203>.
- Ledormand P, Desmaures N, Bernay B, Goux D, Rué O, Midoux C, Monnet C, **Dalmasso M***, **2022**. Molecular approaches to uncover phage-lactic acid bacteria interactions in a model community



- Besnard A, Desmasures N, Voisin-Anastasie A, Gréau L, Lelièvre V, Bré JM, **Dalmasso M**, Schlusshuber M, **2021**. *Aerococcus* sp., a promising genus as a source of anti-*Salmonella* bioprotective agents for the dairy industry revealed by an *in vitro* miniaturized screening method. International Dairy Journal, 116:104949
- Draper LA, Ryan FJ, **Dalmasso M**, Casey PG, McCann A, Vimalkumar V, Ross RP, Hill C, **2020**. Autochthonous faecal virome transplantation (FVT) reshapes the murine microbiome after antibiotic perturbation. BMC Biology, 18(1):173. doi: 10.1186/s12915-020-00906-0.
- Cousin FJ, Le Guellec R, Chuat V, **Dalmasso M**, Laplace JM, Cretenet M, **2019**. Multiplex PCR for rapid identification of major lactic acid bacteria genera in cider and other fermented foods. International Journal of Food Microbiology, 291: 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.004>
- Cousin FJ, Le Guellec R, Chagnot C, Goux D, **Dalmasso M**, Cretenet M, **2019**. *Oenococcus siceræ* sp. nov., isolated from French cider. Systematic and Applied Microbiology, 42: 302-308. doi.org/10.1016/j.syapm.2018.12.006
- Stockdale SR, Ryan FJ, McCann A, **Dalmasso M**, Ross RP, Hill C, **2018**. Viral dark matter in the gut virome of elderly humans. Preprints, doi: 10.20944/preprints201807.0101.v1
- McCann A, Stockdale SR, Ryan F, **Dalmasso M**, Blake T, Ryan CA, Stanton C, Mills S, Ross RP, Hill C, **2018**. Viromes of one year old infants reveal the impact of birth mode on microbiome diversity. PeerJ, 6:e4694. DOI 10.7717/peerj.4694.
- Shkoporov AN, Ryan FJ, Draper LA, Forde A, Stockdale SR, Daly KM, McDonnell SA, Nolan JA, Sutton TDS, **Dalmasso M**, McCann A, Ross RP, Hill C, **2018**. Reproducible protocols for metagenomic analysis of human faecal phageomes. Microbiome, 6:68. doi.org/10.1186/s40168-018-0446-z
- Poimenidou S, **Dalmasso M**, Papadimitriou K, Fox E, Skandamis P, Jordan K, **2018**. Virulence gene sequencing highlights similarities and differences in sequences in *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains of clinical and food origin from 3 different geographic locations. Frontiers in Microbiology, 9:1103. doi: 10.3389/fmicb.2018.01103.
- Cousin FJ, Lynch DB, Chuat V, Casey PG, Dalmasso M, Harris HMB, McCann A, O'Toole PW, **2017**. A long and abundant non-coding RNA (lancRNA) in *Lactobacillus salivarius*. Microbial Genomics, 3(9):e000126. doi: 10.1099/mgen.0.000126
- **Dalmasso M**, Strain R, Neve H, Franz M.A.P.C, Cousin FJ, Ross RP, Hill C, **2016**. Three new *Escherichia coli* phages from the human gut show promising potential for phage therapy. PLoS ONE, 11(6):e0156773. doi.org/10.1371/journal.pone.0156773
- **Dalmasso M**, de Haas E, Neve H, Strain R, Cousin FJ, Stockdale SR, Ross RP, Hill C, **2015**. Isolation of a novel phage with activity against *Streptococcus mutans* biofilms. PLoS ONE, 10(9):e0138651.
- Muhterem M, **Dalmasso M**, Bolocan A, Hernandez M, Kapetanidou AE, Kuchta T, Manios SG, Melero B, Minarovičová J, Nicolau A, Rovira J, Skandamis PN, Jordan K, Rodríguez-Lázaro D, Stessl B, Wagner M, **2015**. Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. Food Control, 51: 94-107.



- Tiwari U, Cummins E, Valero A, Walsh D, **Dalmasso M**, Jordan K, Duffy G, **2015**. Farm to fork quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* contamination in raw and pasteurized milk cheese in Ireland. *Risk Analysis*, 35(6):1140-1153.
- **Dalmasso M**, Bolocan A, Hernandez M, Kapetanakou A. E., Kuchta T, Manios S.G., Melero B, Minarovičová J, Muhterem M, Nicolau A, Rovira J, Skandamis P. N., Stessl B, Wagner M, Jordan K, Rodríguez-Lázaro D, **2014**. Comparison of Polymerase Chain Reaction methods and plating for analysis of enriched cultures of *Listeria monocytogenes* when using the ISO11290-1 method. *Journal of Microbiological Methods*, 98: 8–14.
- **Dalmasso M**, Jordan K, **2014**. Absence of growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 81(1): 46-53.
- **Dalmasso M**, Jordan K, **2013**. Process environment sampling can help to reduce the occurrence of *Listeria monocytogenes* in food processing facilities. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 52: 93–100.
- **Dalmasso M**, Aubert J, Even S, Falentin H, Maillard MB, Parayre S, Loux V, Tanskanen J, Thierry A, **2012**. Accumulation of intracellular glycogen and trehalose by *Propionibacterium freudenreichii* under conditions mimicking cheese ripening in the cold. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17):6357-6364.
- **Dalmasso M**, Aubert J, Briard-Bion V, Chuat V, Deutsch S-M, Even S, Falentin H, Jan G, Jardin J, Maillard M-B, Parayre S, Piot M, Tanskanen J, Thierry A, **2012**. A temporal -omic study of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1^T adaptation strategies in conditions mimicking cheese ripening in the cold. *PLoS ONE*, 7(1): e29083.
- **Dalmasso M**, Nicolas P, Falentin H, Valence F, Tanskanen J, Jatila H, Salusjärvi T, Thierry A, **2011**. Multilocus sequence typing of *Propionibacterium freudenreichii*. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 113-120.
- Demarigny Y, **Dalmasso M**, Tonleu A, Rigobello V, Beuvier E, Ly-Chatain MH, Bouton Y. **2011**. Influence of the backslopping practice on the microbial diversity of *Lactococcus* in a model cheesemaking. *Food and Nutrition Sciences*, 2(6): 618-627.
- **Dalmasso M**, Hennequin D, Duc C, Demarigny Y, **2009**. Influence of backslopping on the acidifications curves of "Tomme" type cheeses made during ten successive days. *Journal of Food Engineering*, 92: 50–55.
- **Dalmasso M**, Prestoz S, Rigobello V, Demarigny Y, **2008**. Behavior of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* in a four *Lactococcus* strain starter during successive milk cultures. *Food Science and Technology International*, 14: 469 - 477.
- **Dalmasso M***, Prestoz S, Rigobello V, Demarigny Y, **2008**. Evolution of the raw cow milk microflora, especially lactococci, enterococci, leuconostocs and lactobacilli over a successive 12-day milking regime. *International Journal of Dairy Science*, 3 (3): 117-130



II.3.2 Revues

7 revues dont 1 en tant que première auteure, 2 en dernière auteure et 2 en tant que « corresponding author » (*)

- Ledormand P, Desmasures N, **Dalmasso M***. **2021**. Phage community involvement in fermented beverages: an open door to technological advances? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61:17, 2911-2920. DOI: 10.1080/10408398.2020.1790497
- Lelièvre V, Besnard A, Schlusshuber M, Desmasures N, **Dalmasso M***. **2019**. Phages for biocontrol in foods: what opportunities for the control of *Salmonella* sp. along the dairy food chain? *Food Microbiology*, 78: 89-98
- Cousin FJ, Le Guellec R, **Dalmasso M**, Schlusshuber M, Cretenet M, Laplace JM. **2017**. Apple fermented beverages: past, present, and future. *Microorganisms*, 5, 39. doi: 10.3390/microorganisms5030039
- **Dalmasso M**, Hill C, Ross RP, **2014**. Exploiting gut bacteriophages for human health. *Trends in Microbiology*, 22(7):399-405.
- Jordan K, **Dalmasso M**, Zentec J, Mader A, Bruggerman G, Wallace J, De Medici D, Fiore A, Prukner-Radovic E, Lukac M, Axelsson L, Holk A, Ingmer H, Malakauskas M, **2014**. Microbes versus microbes: control of pathogens in the food chain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(15):3079-89.
- Halberg Larsen M, **Dalmasso M**, Ingmer H, Langsrud S, Malakauskas M, Mader A, Møretrø T, Smole Možina S, Rychli K, Wagner M, Wallace RJ, Zentek J, Jordan K. **2014**. Persistence of foodborne pathogens and their control in primary and secondary food production chains. *Food Control*, 44: 92-109.
- Thierry A, Deutsch S-M, Falentin H, **Dalmasso M**, Cousin F.J, Jan G, **2011**. New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1): 19-27.

II.3.3 Editeur invité pour une Special Issue

Microorganisms Special Issue: Phages from the fermented products, Mai 2022 – Co-éditrice invitée avec Nathalie Desmasures.

https://www.mdpi.com/journal/microorganisms/special_issues/phages_fermented

II.3.4 Chapitres de livres

5 chapitres de livres

- Jordan K, Hunt K, **Dalmasso M**, **2016**. *Listeria monocytogenes* in milk products. In: *Microbes in Food and Health*, pp.289-315, Springer.
- Chuat V, **Dalmasso M**, **2015**. Pulsed-Field Gel Electrophoresis for *Leuconostoc mesenteroides* and *L. pseudomesenteroides*. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1301:241-51.
- **Dalmasso M**, Jordan K, **2015**. PFGE as a tool to track *Listeria monocytogenes* in food processing facilities: Case studies. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1301:29-34. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1301:265-75.



- Chuat V, de Freitas R, **Dalmasso M**, **2015**. Pulsed Field Gel Electrophoresis for dairy propionibacteria. In: Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 1301:265-75.
- **Dalmasso M**, Jordan K, **2014**. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes*. In: Jordan et al. (Eds), *Listeria monocytogenes: methods and protocols*, Methods in Molecular Biology, Vol. 1157, Humana Press, USA. pp:63-72.

II.3.5 Livres (éditrice invitée)

- Pulsed-Field Gel electrophoresis. **2015**. **Dalmasso M**, Jordan K (eds). Methods in Molecular Biology, Humana Press, USA.

II. 4 Brevets

Une déclaration d'invention avec le Dr Guillaume Dalmasso de l'unité M2iSH, Inserm U1071, USC-INRAE 2018 Université Clermont Auvergne est déposée depuis février 2022 en vue d'un futur dépôt de brevet.





TRAVAUX DE RECHERCHE





III- Travaux de recherche

III.1- Préambule : parcours de recherche et résumé des faits marquants

Mon parcours de recherche s'est construit depuis ma thèse et mes diverses expériences de post-doctorat en France et à l'étranger, avant d'intégrer l'Université de Caen Normandie en tant que maître de conférences dans l'équipe Matrices alimentaires et microbiotes (MALIM) de l'UR4651 ABTE (Figure 1). Les principales étapes et faits marquants de mon parcours de recherche seront présentés ici, avant de développer plus en détail les résultats concernant ma thématique de recherche actuelle.

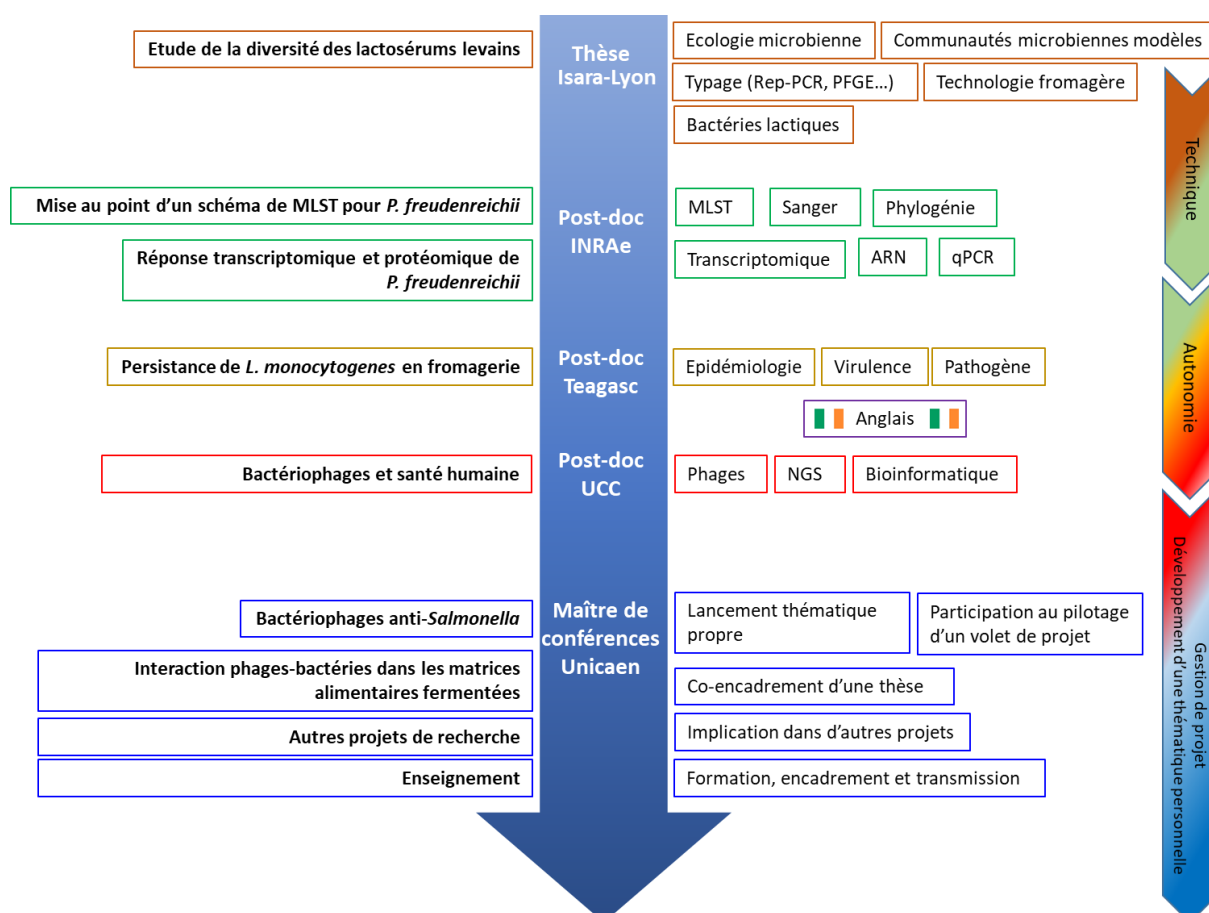


Figure 1 : Parcours de recherche depuis ma thèse jusqu'à ma prise de poste en tant que Maître de Conférences à l'Université de Caen Normandie.

J'ai effectué ma thèse à l'Isara-Lyon, dans le département de microbiologie alimentaire (unité BIODYMIA actuelle). Ce travail portait sur l'évolution de la diversité des bactéries lactiques des levains utilisés en fabrications fromagères basées sur la méthode de pied de cuve, appelée aussi repiquage, ou encore backslopping. Cette méthode consiste à récupérer le lactosérum d'une fabrication et de s'en servir de levain naturel pour ensemercer le lait de la fabrication suivante. Ce travail a montré l'importance de cette pratique sur l'évolution des bactéries lactiques, et en particulier des lactocoques en systèmes modèles (Dalmasso et al., 2009, 2008a, 2008b; Demarigny et al., 2011). En effet, dans un modèle de fabrications fromagères de type pâte presse non cuite au lait cru, il est apparu que le repiquage influait sur les aptitudes technologiques des souches de lactocoques, en particulier sur leur potentiel acidifiant. Par cette pratique, le levain naturel acquérait une spécificité rapidement, ce qui a été également vérifié sur un modèle lactique. La richesse en genres bactériens des levains naturels était plus importante en technologie lactique qu'en technologie pâte pressée non cuite. Dès les



premiers repiquages, il est apparu que les souches de lactocoques semblaient subir des modifications rapides visibles notamment par profils PFGE et Rep-PCR des souches du modèle.

J'ai ensuite réalisé une première expérience post-doctorale à l'UMR1253 (STLO), INRAE Institut Agro (Rennes), pendant laquelle j'ai mis au point le premier schéma de MLST (Multilocus sequence typing) pour une bactérie d'affinage du fromage, *Propionibacterium freudenreichii* (Dalmasso et al., 2011). Il est apparu que la répartition des souches de *P. freudenreichii* sur la base de leurs sequence types (ST) de ce schéma MLST ne se faisait pas selon le biotope des souches, puisqu'un même ST pouvait regrouper des souches provenant de plusieurs habitats, et même de plusieurs pays. Ce schéma a également mis en évidence une hétérogénéité des ST lorsque les deux sous-espèces décrites à l'époque (*freudenreichii* and *shermani*) étaient considérées. Il est à noter que la classification de ce genre a été révisée en 2016, et que les sous-espèces *freudenreichii* et *shermani* ont été supprimées (Scholz and Kilian, 2016). Au cours de ce post-doctorat, j'ai également étudié la réponse transcriptomique et protéomique de *P. freudenreichii* en conditions d'affinage (Dalmasso et al., 2012a, 2012b). Ce travail a montré que, dans un modèle mimant les températures en cave froide pendant l'affinage de fromages de type Emmental, le métabolisme général de *P. freudenreichii* ralentissait. De nombreux gènes impliqués dans la néoglucogenèse et la synthèse de glycogène étaient surexprimés, montrant l'aptitude de cette espèce à rester active à basse température via l'induction de voies métaboliques contribuant à sa survie sur le long-terme. Il a également été intéressant de constater que l'expression de gènes responsables de la formation de composés d'arômes dans les fromages restaient inchangée à 4°C. Cette première expérience post-doctorale m'a permis de consolider mes savoirs en biologie moléculaire et en transcriptomique, ceci contribuant à étoffer mes compétences relatives aux écosystèmes des produits fermentés et au métabolisme des bactéries d'intérêt alimentaire.

Puis, j'ai travaillé en tant qu'ingénieure de recherche au Teagasc Food Research Center (Moorepark, Irlande) sur la persistance de *Listeria monocytogenes* en fromagerie pendant 15 mois (Dalmasso et al., 2014a; Dalmasso and Jordan, 2013, 2014; Muhterem-Uyar et al., 2015; Poimenidou et al., 2018; Tiwari et al., 2015). Ces travaux ont permis de mettre en évidence la persistance de *L. monocytogenes* dans plusieurs fromageries partenaires du projet (PROMISE, EU 7th Framework) au moyen notamment de méthodes de PFGE et de PCR. J'ai d'ailleurs pu contribuer à mettre au point une méthode de PCR quantitative pour la détection rapide de *L. monocytogenes* après la première phase d'enrichissement (gain de 3 jours en moyenne sur la norme ISO). Au cours d'une autre phase du projet, j'ai également participé à l'étude phylogénétique de souches de *L. monocytogenes* issus d'aliments ou de cas cliniques, et originaires d'Irlande, d'Australie et de Grèce. L'étude des séquences des gènes du cluster *prfA* (c'est-à-dire les gènes *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, et *plcB*) le principal îlot de virulence chez *L. monocytogenes*, a montré que les souches irlandaises de serotype 4b se distinguaient des autres souches sur la base de la séquence du gène *hly*. Les souches australiennes avaient moins de diversité de séquences pour les gènes *plcB* et *mpl* comparé aux autres souches. Il a été constaté que des mutations de séquences, en particulier pour les gènes *prfA*, *actA*, et *plcB*, étaient observées entre souches d'origines alimentaires et souches cliniques. Cette première expérience à l'étranger m'a permis de renforcer mon réseau professionnel à l'international, et d'acquérir un volet scientifique axé sur la sécurité sanitaire des aliments.

J'ai ensuite orienté mes recherches sur la problématique des bactériophages (phages), en tant que chercheuse post-doctorante dans l'équipe du Pr Colin Hill au APC Microbiome Institute Ireland (University College Cork, Irlande) pendant 24 mois (participation à 7 publications). Une partie de mon travail s'est attaché à la recherche de nouveaux phages pour lutter contre des bactéries pathogènes de l'Homme. Plusieurs de ces phages ont d'ailleurs fait l'objet de publications (Dalmasso et al., 2016, 2015). Un autre volet de mon travail s'intéressait aux communautés de phages de l'intestin humain et une partie des résultats obtenus sera développée dans la suite de ce chapitre.



J'ai intégré en septembre 2015 l'UR4651 ABTE de l'Université de Caen en tant que maître de conférences (participation à 9 publications de l'équipe). Depuis mon arrivée dans le laboratoire MALIM, je développe une thématique de recherche dédiée aux phages dans les matrices alimentaires. Ainsi, j'ai par exemple contribué à la mise en place d'un laboratoire dédié aux manipulations sur les phages (projet RNamb) et initié les premiers travaux sur cette thématique dans l'équipe (projet CESam). J'ai également co-organisé et co-animé avec Sarah Chuzeville (Actalia produits laitiers) un atelier « Phages » lors de la 22^e édition du CBL 2019 à Caen. De plus, depuis mon arrivée, l'équipe MALIM fait partie du Réseau Bactériophage France.

La suite de ce document sera donc centrée sur la synthèse de certains de mes travaux dédiés aux phages réalisés en Irlande et ensuite en France dans l'UR ABTE, car ils sont le cœur de ma thématique actuelle, que je souhaite poursuivre et développer pour mes recherches futures.

III.2- Introduction : les phages et leur place dans les écosystèmes microbiens

Les bactériophages, ou phages, sont des virus n'infectant que les bactéries. Chaque phage est très spécifique d'une espèce bactérienne, et même de quelques souches au sein de l'espèce la plupart du temps. La découverte des phages remonte au début du XX^e siècle, et est attribuée à Félix d'Hérelle qui observa pour la première fois l'inhibition du bacille dysentérique *Shigella dysenteriae* par des phages (Duckworth, 1976; Publications service, 2007). Les phages sont à cette époque utilisés pour lutter contre des infections bactériennes, et en particulier dans les pays de l'URSS. Leur utilisation en Europe occidentale a été rapidement abandonnée avec la découverte des antibiotiques. Ils sont toujours largement employés dans les pays de l'Est et notamment en République de Géorgie, à des fins de traitement d'infections bactériennes.

III.2.1 Constitution d'un phage et cycle de vie

III.2.1.1 Description et classification

Les phages ne font pas partie du domaine du vivant et sont considérés comme des « entités biologiques », mesurant entre 50 à 100 nm en moyenne. Ils sont des parasites intracellulaires obligatoires, devant se servir de la machinerie cellulaire de leur hôte pour assurer leur propagation. Les phages sont constitués d'une tête comprenant une enveloppe protéique ou parfois lipoprotéique, la capside, contenant le matériel génétique, et d'une queue de nature protéique.

Les phages contiennent généralement de l'ADN double brin, et plus rarement de l'ADN simple brin ou de l'ARN simple ou double brin (Figure 2). La taille des génomes phagiques est variable, et généralement comprise entre 30 et 300 kpb. Les génomes des phages sont organisés en unités génétiques fonctionnelles distinctes (Desiere et al., 2002) qui correspondent à la réplication et l'emballage des acides nucléiques, à la synthèse des protéines phagiques, à l'assemblage des protéines participant à la morphologie du phage, comme les protéines de la tête, de la queue ou des fibres caudales, mais aussi à la lyse bactérienne, à la régulation de la transcription ou encore au contrôle de la lysogénie. Cependant, de nombreux gènes sont encore de fonctions inconnues et leur proportion peut parfois représenter plus de la moitié des gènes d'un génome de phage.

La classification des phages est assurée par l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Les phages ne possédant pas de marqueurs génétiques universels, leur classification repose sur le type d'acide nucléique qu'ils transportent (ADN double ou simple brin, ARN), et leur morphologie (Ackermann, 2011; Ackermann and Prangishvili, 2012) (Figure 2). Plus récemment, la classification a été remaniée et les phages sont classés sur des critères de composition de leur génome plutôt que selon leur morphologie (Evseev et al., 2020). En 2021 (dernier rapport de l'ICTV), il existait 65 ordres, 8 sous-ordres et 233 familles de virus (phages et autres virus confondus). A l'heure actuelle, la majorité des phages connus (96%) appartient à la classe des *Caudoviricetes* (ancien ordre des *Caudovirales* reclassifié en 2021) (Turner et al., 2021). Cette classe



est composée de 4 ordres, 47 familles, 97 sous-familles, 1197 genres et 3601 espèces (données de septembre 2022). Les phages les plus décrits dans la littérature sont des siphophages (phages à longue queue non contractile, ancien ordre des *Siphoviridae*), des myophages (phages à queue contractile, ancien ordre des *Myoviridae*) et des podophages (phages à queue très courte, ancien ordre des *Podoviridae*).

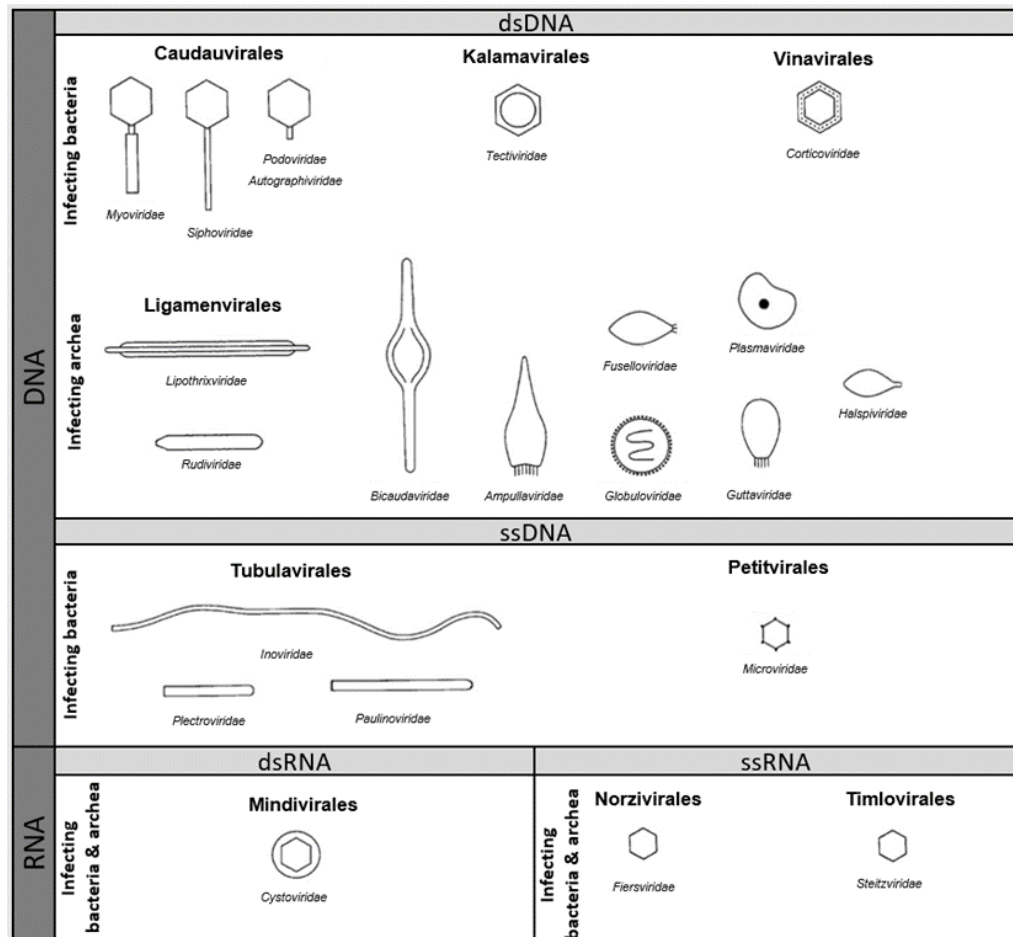


Figure 2 : Principales familles et ordres de bactériophages ciblant les bactéries ainsi que les différents virus d'Archées. Schéma adapté de (Ackermann and Prangishvili, 2012), et de la source International Committee on Taxonomy of Viruses <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.

III.2.1.1 Cycle de vie

Lors d'une infection phagique la première étape est l'adsorption du phage à la surface de la cellule hôte. Plusieurs composants de la surface bactérienne peuvent être des récepteurs pour la fixation des phages. Dans le cas des bactéries à Gram négatif, peuvent jouer le rôle de récepteurs des protéines de porines comme FepA, FhuA, OmpA ou TolC, des polysaccharides comme les LPS et des organelles cellulaires comme les flagelles (Abdelsattar et al., 2021). Pour les bactéries à Gram positif, les acides teichoïques et lipoteichoïques sont largement ciblés mais le peptidoglycane ou des protéines de la membrane cytoplasmique peuvent également être des récepteurs aux phages (Abdelsattar et al., 2021). L'ADN du phage est ensuite injecté dans la cellule hôte (Figure 3).



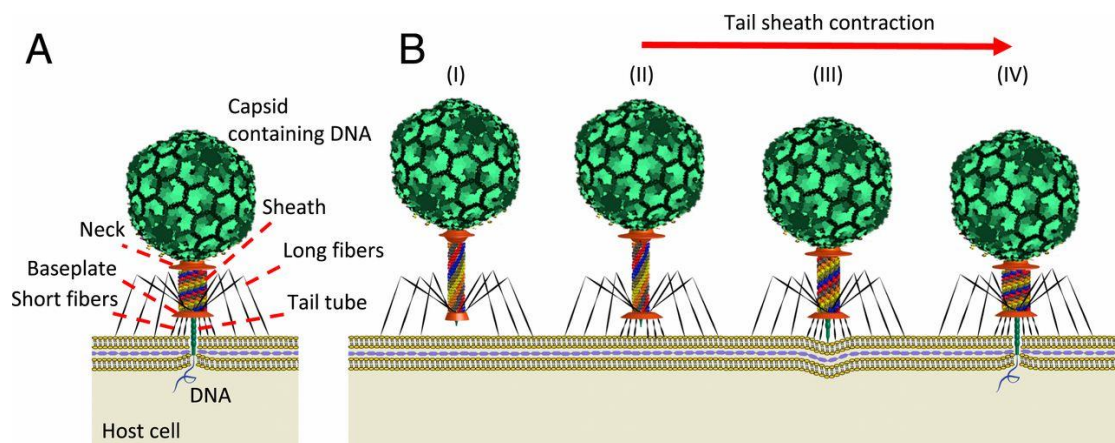
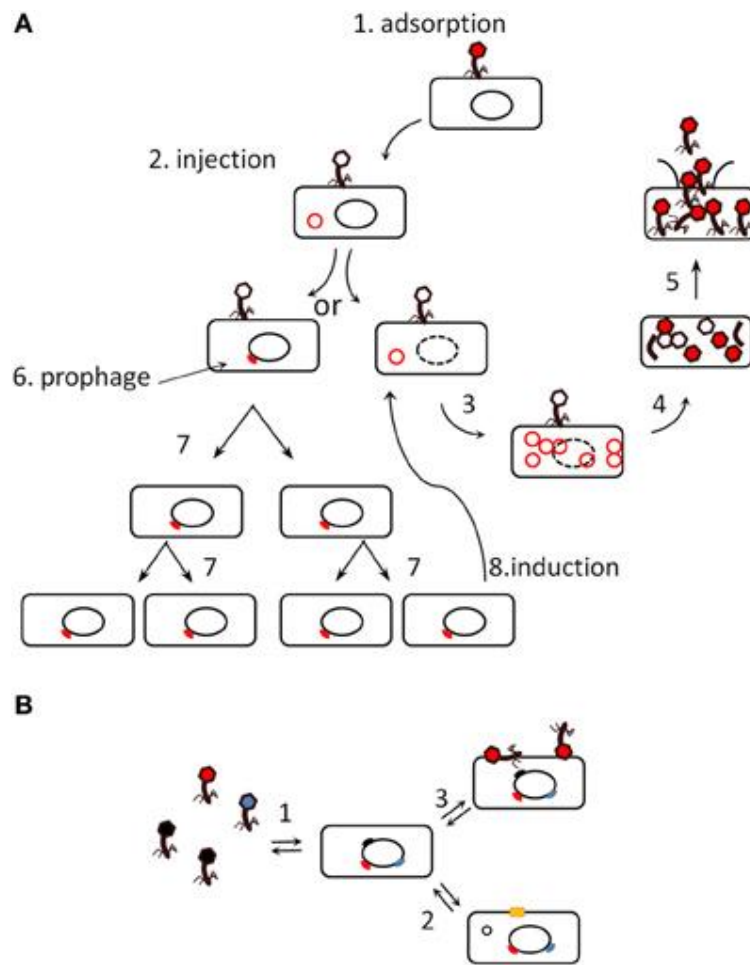


Figure 3 : Etapes de l'injection de l'ADN phagique dans la cellule hôte par le phage T4. A) Eléments structuraux principaux du phage T4. (B) Schéma de l'infection par le phage T4. (I) Le phage T4 reconnaît la cellule hôte et s'attache à la membrane de la cellule grâce aux fibres longues de sa queue. (II) La plaque basale subit un important changement de conformation passant d'une structure en forme de dôme à une forme étoilée, et les fibres courtes s'attachent irréversiblement à la cellule. (III) La gaine se contracte. (IV) Pendant la contraction de la gaine, le tube rigide de la queue perce la membrane et permet ainsi l'initiation de la translocation de l'ADN du phage dans son hôte. (Maghssoodi et al., 2019).

Deux cycles majoritaires de reproduction des phages existent alors : le cycle lytique et le cycle tempéré ou lysogène (Figure 4 A) (De Paepe et al., 2014). Dans le premier cas, une fois l'ADN du phage injecté dans la cellule hôte, la machinerie cellulaire va être détournée au profit de la réplication de l'ADN phagique et de la synthèse de protéines virales pour l'assemblage de nouveaux virions à l'intérieur de la cellule. Une fois les nouveaux phages assemblés, une protéine de lyse, l'endolysine, permet la lyse cellulaire et la libération des nouveaux phages dans le milieu extérieur. Lors d'un cycle lytique, entre 30 et 300 nouveaux phages peuvent ainsi être libérés par cellule infectée.

Dans le cas du cycle tempéré, l'ADN du phage s'intègre au chromosome bactérien (Figure 4 A). Il est alors appelé prophage et répliqué en même temps que le chromosome bactérien lors de la division cellulaire. La survenue d'un stress bactérien peut induire l'excision du prophage qui entame alors un cycle lytique classique, pour aller à nouveau intégrer un chromosome bactérien hôte lors d'une prochaine infection.





The phage-bacterium mixture of a polylysogen strain

Figure 4 : A- Le cycle lytique et le cycle lysogénique des phages. Les phages virulents réalisent le cycle lytique (étapes 1 à 5). Ils s'adsorbent à la surface de la bactérie (1), injectent leur ADN (2), le répliquent (3), produisent des protéines (capside et queue) qui s'assemblent (4), et lysent leur hôte (5). Les phages tempérés peuvent faire de même ou basculer sur un cycle lysogène (6), pendant lequel ils sont à l'état de prophages (généralement intégrés au chromosome bactérien) et sont répliqués passivement par la machinerie bactérienne (7). Un événement stochastique rare ou un stress peuvent induire les prophages (8), qui reviennent alors à un cycle lytique. **B- Les différents états d'une souche poly-lysogène.** La plupart des souches sont poly-lysogènes, c'est-à-dire qu'elles portent plus qu'un prophage. En conséquence, une population peut se différencier en plusieurs états : (1) elle peut produire des virions en continu à faible niveau, (2) exciser des prophages et arborer un nouveau phénotype par restauration d'un gène anciennement interrompu par les prophages (produisant ainsi, par exemple, une protéine de surface [carré jaune]), (3) adsorber des virions et les utiliser comme facteurs de virulence (De Paepe et al., 2014).

Il faut noter que de nombreuses souches bactériennes sont poly-lysogènes, c'est-à-dire portant plusieurs prophages différents (Figure 4 B).

D'autres cycles peuvent également être observés. Ainsi, il existe un cycle dit pseudo-lysogénique intermédiaire entre le cycle lytique et le cycle tempéré. L'ADN phagique se maintient à l'intérieur de la cellule hôte sans se répliquer et sans pour autant s'intégrer au chromosome, tout en pouvant potentiellement induire la production de virions, si les conditions s'y prêtent (Miller and Ripp, 2002). Le cycle chronique, fréquent chez les phages de la famille des *Inoviridae* (par exemple le phage M13 d'*Escherichia coli*), correspond à la production de virions en continu pendant la phase de croissance de la bactérie hôte, sans pour autant entraîner la lyse cellulaire. Enfin, dans l'état porteur (ou « carrier state ») une partie de bactéries porteuses de prophages est immunisée à l'attaque phagique et coexiste avec une sous-population de cellules sensibles permettant aux phages de se multiplier (Pourcel et al., 2017).



III.2.2 Les phages dans les écosystèmes alimentaires

III.2.2.1 Les phages : le yin et le yang de l'agroalimentaire

Les phages en agroalimentaire sont connus depuis longtemps. En particulier, les phages des bactéries lactiques utilisées comme levains, laitiers en particulier, sont bien décrits. Par exemple, les phages ciblant les espèces *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus* sont bien étudiés, et une littérature abondante existe à leur sujet (pour revues consulter, entre autres, Garneau & Moineau, 2011; Lavelle et al., 2018; Mahony et al., 2016, 2017). Ces phages sont à l'origine de problèmes de fermentation puisqu'ils détruisent tout ou partie des levains de fabrication. Ceci engendre donc des défauts sensoriels des produits finis et jusqu'à l'arrêt complet des fabrications, pouvant entraîner des pertes économiques sévères. Une fois installés, il est difficile de se débarrasser des phages. Les rotations de ferments sont donc un des moyens mis en œuvre pour éviter l'implantation de phages ciblant les ferments. Plus largement, la mise en place d'un système d'évaluation préventive des points critiques de contamination par les phages en industrie (Phage Analysis and Critical Control Points [PACCP]), sur le modèle de l'HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), pourrait être préconisée (Samson and Moineau, 2013).

A l'opposé, de nombreux phages sont quant à eux étudiés pour leur rôle d'agents antimicrobiens pour contrôler le développement de bactéries d'altération ou pathogènes (Cristobal-Cueto et al., 2021; Mahony et al., 2011), avec une littérature riche existant à ce sujet, dont seulement des exemples de travaux existants seront cités ici, sans en faire un bilan exhaustif. Ces phages sont testés à tous les stades de la production alimentaire : du champ (biopréservation) jusqu'au produit fini (biocontrôle). Par exemple, des études sont menées pour appliquer des traitements à base de phages sur des cultures pour lutter contre la bactérie phytopathogène *Xylella fastidiosa* responsable de la destruction de nombreux arbres et plantes, suite à l'obstruction des vaisseaux de xylème par formation de biofilms, notamment pour les cultures d'oliviers et d'agrumes (Clavijo-Coppens et al., 2021). En élevage, les phages sont également utilisés dans des traitements modèles pour réduire le portage sain de pathogènes chez les animaux, comme *Salmonella* chez le porc (Wall et al., 2010), *Campylobacter* chez le poulet (Loc Carrillo et al., 2005), ou encore *Staphylococcus aureus* MRSA chez le porc (Tuomala et al., 2021) (pour revue complète, consulter par exemple Ferriol-González and Domingo-Calap, 2021). Les phages peuvent aussi être utilisés pour limiter les infections des animaux d'élevage comme, par exemple, pour traiter des infections à *Vibrio harveyi* dans les élevages de crevettes (Stalin and Srinivasan, 2017) ou encore réduire les infections chez le poulet (Mosimann et al., 2021). L'application de phages sur les matières premières ou les aliments finis permet également de réduire le risque microbiologique en limitant ou éliminant les bactéries pathogènes ou d'altération. Par exemple, des phages ont été testés contre *Listeria monocytogenes* et *E. coli* producteurs de shigatoxine (STEC) dans du lait cru (Rodríguez-Rubio et al., 2015; Tomat et al., 2013), contre *Salmonella* dans du fromage (Modi et al., 2001), contre *Vibrio parahaemolyticus* dans des huîtres (Zhang et al., 2018), ou encore contre *E. coli* O157 dans de la viande hachée de bœuf (Shebs-Maurine et al., 2020). De nombreuses revues récentes font état des avancées en matière d'utilisation des phages comme agents de biocontrôle sur des produits alimentaires vairés et pour de nombreux pathogènes (par exemple, se référer aux revues suivantes : Gambino and Brøndsted, 2021; Mahony et al., 2011; O'Sullivan et al., 2019; Xu, 2021).

Les phages comme agents de biocontrôle présentent l'avantage d'avoir une action ciblée contre certaines souches d'une espèce bactérienne, d'être relativement faciles à isoler, propager et peu coûteux à produire. Certaines limites sont néanmoins identifiées avec la possible apparition de résistances bactériennes par exemple. La réglementation européenne actuelle ne permet pas, pour l'instant, l'utilisation des phages en agroalimentaire. Néanmoins, des produits à base de phages sont déjà commercialisés dans certains pays hors UE (Monk et al., 2010). C'est le cas notamment de produits comme le ListShield™ (société Intralytix) et le Listex™ P100 (société Microcos) bénéficiant du statut GRAS (Generally Recognized As Safe), ciblant le pathogène *L. monocytogenes* dans les denrées



alimentaires comme le fromage et la viande. Sur le même principe, le produit EcoShield (société Intralytix) autorisé aux États-Unis et au Canada, est destiné à lutter contre la présence de *E. coli* O157:H7 dans les aliments. Le produit PhageGuard STM (société Microeos), est aussi utilisé en prévention de contaminations des surfaces à *Salmonella* dans les ateliers de production des viandes hachées et de poulet. Enfin, le produit CUSTUS[®]YRS (société ACD Pharma) est commercialisé en Norvège pour contrôler le pathogène du saumon, *Yersinia ruckeri*, très problématique en salmoniculture. En Europe, la situation évolue avec notamment, depuis 2019, une ordonnance de la Cour de justice européenne qui permet aux entreprises alimentaires de continuer à utiliser, en l'absence d'un cadre juridique européen, des phages pour éviter la bactérie *L. monocytogenes* dans les aliments prêts-à-manger. Cette décision suit une évaluation de l'EFSA concernant le ListexTM P100 recommandant de poursuivre les tests d'efficacité de ce produit et d'évaluer la persistance des phages après applications, sans émettre de contre-indications majeures sur l'utilisation de ce produit sur des aliments pour la consommation humaine (EFSA, 2016).

Tous ces travaux démontrent l'importance des phages et leur potentiel en agroalimentaire. Ces études sont toutefois uniquement basées sur l'isolement, la caractérisation et l'utilisation d'un ou plusieurs phages en cocktails. Elles ne s'intéressent pas à l'impact global des phages sur les communautés microbiennes, seulement sur la bactérie cible. Il apparaît ainsi primordial de s'interroger sur les communautés de phages dans leur ensemble afin de connaître leur place dans les écosystèmes alimentaires.

III.2.2.2 Les communautés de phages des aliments

Les phages sont connus pour influencer les équilibres microbiens des écosystèmes auxquels ils sont associés, et plusieurs modèles sont décrits pour expliquer leur effet de modulation des populations microbiennes (De Paepe et al., 2014). Parmi ces modèles d'écologie, celui de « kill the winner » fait état de la course à l'armement entre les phages et leurs hôtes bactériens au sein d'un écosystème (Figure 5). Dans une communauté complexe, des populations bactériennes vont naturellement être dominantes (« winners ») par rapport à d'autres, en raison de leur meilleure adaptation aux conditions de milieu. L'apparition d'une population dominante est généralement suivie de l'apparition d'une population de phages prédateurs qui vient réduire cette population dominante, contribuant ainsi au maintien de l'équilibre des populations bactériennes dans l'écosystème. Les bactéries vont évoluer en développant des résistances aux phages. En parallèle, les phages vont eux même évoluer et acquérir des mutations contrecarrant cette résistance bactérienne, et ainsi de suite. Ce phénomène est également appelé le « paradoxe de la reine rouge » (Marston et al., 2012; Middelboe et al., 2009; Van Valen, 1977).

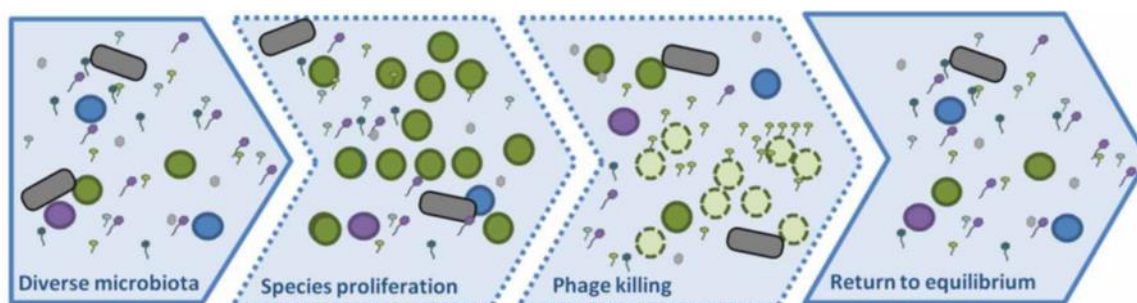


Figure 5 : Modèle « kill the winner » de l'impact écologique des phages dans un écosystème (De Paepe et al., 2014).

La diversité et le rôle des communautés de phages (phageomes) sont étudiés depuis une vingtaine d'années, et en particulier dans le microbiote intestinal humain, en lien avec la santé (Dalmaso et al., 2014b). A ce propos, il a été montré que le phageome chez une personne atteinte de maladie inflammatoire chronique de l'intestin était très différent d'une personne en bonne santé, et que selon

le type de maladie chronique intestinale, le phageome variait (Norman et al., 2015). Ceci laisse à penser que les phages sont impliqués directement ou indirectement dans l'équilibre du microbiote intestinal et plusieurs équipes de recherche travaillent sur ce thème. Il existe en revanche peu de données concernant le phageome des aliments (Ledormand et al., 2021; Mahony and van Sinderen, 2022; Paillet and Dugat-Bony, 2021). A ce jour, le phageome d'aliments fermentés asiatiques (du kimchi, du chou fermenté et des crevettes fermentées) a été décrit dans deux études basées sur des approches de métagénomique (Jung et al., 2018; Park et al., 2011). Les phageomes de ces produits étaient dominés par des phages de l'ancien ordre des *Caudovirales*. De plus, l'analyse du phageome de kimchis coréens ou chinois permettait de mieux différencier l'origine géographique de ces aliments fermentés qu'une analyse métagénétique bactérienne (Jung et al., 2018). Dans une autre étude, il a été montré que les phages influençaient les dynamiques bactériennes au cours de la fermentation du kimchi, et indirectement, la production de métabolites et donc probablement la qualité du produit fini (Jung et al., 2022). Dans une étude de la diversité du phageome de la croûte de l'Epoisses, la majorité des séquences de phages retrouvées ciblaient *Lactococcus lactis*, et les genres *Glutamicibacter* et *Pseudoalteromonas* (Dugat-Bony et al., 2020).

En dehors de ces quatre études, et avant les travaux de thèse de Pierre Ledormand, il n'existait pas d'autres données sur la place des communautés de phages dans les écosystèmes alimentaires, et en particulier leur influence sur les dynamiques microbiennes. Ces travaux seront exposés dans la partie III-5.

Mes travaux de recherche s'articulent donc autour de ces thématiques : potentiel des phages comme agents de biocontrôle et rôle du phageome des aliments.

III.3 – Utilisation des phages contre les salmonelles dans la filière des fromages AOP au lait cru de Normandie.

III.3.1 Contexte : Maîtrise des salmonelles dans la filière fromagère AOP au lait cru de Normandie (projet CESam)

Dans le cadre du projet CESam (financement Région Normandie-FEDER, responsable scientifique : Nathalie Desmasures) ayant pour objectifs de détecter et mettre en interaction de façon innovante des micro-organismes au sein de communautés de complexité variable pour potentialiser leur effet barrière vis-à-vis de *Salmonella*, j'ai piloté la partie dédiée à la recherche et à la caractérisation de phages anti-salmonelles.

Le genre *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Deux espèces sont actuellement décrites : *Salmonella bongori* et *S. enterica* (Tindall, 2005). Cette dernière est composée de six sous-espèces, dont l'une d'elles, *S. enterica* subsp. *enterica* compte environ 2000 sérovars parmi les 2600 recensés pour le genre *Salmonella*. Les salmonelles sont la deuxième cause de zoonoses chez l'homme après *Campylobacter*. Les cinq serovars majoritairement responsables d'infections humaines étaient en 2021 : *S. Enteritidis* (54,6 %), *S. Typhimurium* (11,4 %), *S. Typhimurium* monophasic (1,4,[5],12:i:-) (8,8 %), *S. Infantis* (2,0 %) et *S. Derby* (0,93 %) (EFSA and ECDC, 2022). Le dernier rapport de l'EFSA recense, pour l'année 2021, 60050 cas de salmonellose dans l'Union européenne, avec une tendance stable depuis les cinq dernières années, même si les chiffres de 2020 sont plus bas en raison de la sortie du Royaume-Uni de l'UE et de la crise du COVID19 (EFSA and ECDC, 2022). Au total, 773 cas d'aliments contaminés par *Salmonella*, dont 143 confirmés, ont été rapportés en 2021 dans 22 pays membres, causant 6755 cas de personnes malades dont 1123 hospitalisations et 1 décès. *Salmonella* a représenté, pour l'année 2021, 19,3 % de toutes les infections alimentaires recensées. Les aliments responsables de salmonellose étaient les œufs et ovoproduits, suivis des produits mixtes (« mixed foods »), des produits végétaux et jus, et des produits à base de viande de porc et de boulangerie (EFSA and ECDC, 2022).



En Normandie, l'incidence de sérovars tels que Dublin et Mbandaka est en forte augmentation chez les bovins depuis plusieurs années. Si à l'échelle européenne le risque lié à *Salmonella* dans le lait et les produits laitiers reste faible, à l'échelle régionale la mise à l'écart du lait pour prévenir le risque sanitaire lié aux salmonelles en zone AOP est d'environ 12 % chaque année en Normandie (données Organismes de Défense et de Gestion (ODG) laitiers normands). Ceci a de fortes répercussions économiques sur toute la filière des fromages AOP au lait cru de Normandie (Camembert de Normandie, Pont L'Évêque, Neufchâtel et Livarot) qui représente 1670 emplois directs et 2,4 emplois générés pour 100 000 litres de lait en AOP (contre 1 emploi / 100 000 litres pour la ferme « France » - source CNAOL).

Les phages anti-*salmonelle* et leurs modèles d'application aussi bien en élevage qu'en cours de fabrications alimentaires et sur produits finis sont bien décrits dans la littérature scientifique, et sont recensés par exemple dans la revue de LeLievre et al., 2019. Les objectifs de ce volet du projet CESam étaient donc de constituer une collection de phages issus d'environnements laitiers normands, d'étudier leur diversité et d'explorer leurs potentialités dans des modèles de laboratoire. Ces travaux sont en cours de publication et seulement une partie d'entre eux sera présentée pour illustrer les grandes tendances et résultats obtenus dans ce volet du projet CESam.

III.3.2 Isolement et caractérisation de phages anti-*Salmonella*

Entre 2017 et 2018, 117 échantillons ont été prélevés dans 24 fermes laitières de la filière fromagère AOP au lait cru de Normandie, 16 avec des historiques de présence de *Salmonella* et 8 sans historique de contamination. Ces échantillons comprenaient du lait cru de tank, de la paille provenant des zones de litière pour vaches, du foin, des aliments pour bovins, de l'eau d'abreuvoirs, de la bouse de vache et du fumier, de l'eau provenant de flaques d'eau autour de la ferme. La recherche de phages s'est faite par enrichissement des échantillons contre des souches hôtes potentielles, principalement des sérovars Mbandaka, Dublin et Montevideo, avant des spots tests sur géloses contenant la souche hôte potentielle.

Un total de 99 phages a été isolé et leur morphologie a été observée en microscopie électronique en transmission (MET, CMAbio³, Université de Caen Normandie). Les phages étaient tous des podophages (Figure 6) avec une tête icosaédrique caractéristique allant de 60 à 80 nm selon le phage, et une queue courte non contractile.

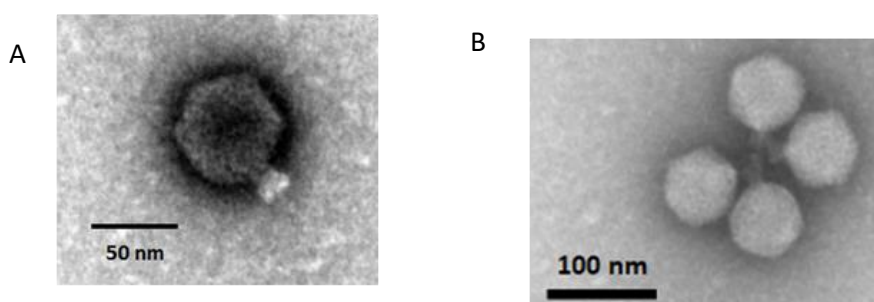


Figure 6 : Exemples de phages isolés dans cette étude observés par microscopie électronique en transmission (coloration négative à l'acétate d'uranyle, CMAbio³, Université de Caen Normandie). A : phage UCMA 21035 et B : phage UCMA 20985.

Le spectre d'hôte de ces phages a été testé contre 9 souches de *Salmonella* de la collection UCMA et des profils de restrictions (digestion par *EcoRI*, *PstI*, *BamHI* et *HaeIII*) ont été effectués afin de caractériser ces phages et identifier les éventuels doublons. Les 99 phages ont ainsi pu être classés en 28 profils de lyse (LP) sur la base de leur spectre d'hôte (1 à 7 souches sensibles sur les 9 testées). Un représentant de chaque profil a ainsi été retenu (Tableau 1). Le profil LP1 représentait 38% des phages

isolés et a été retrouvé dans 18 des 24 exploitations agricoles, dans tous les types d'échantillons. A l'opposé quelques phages comme les profils LP2 ou LP6 étaient très spécifiques d'une exploitation et d'un seul type d'échantillons. Les phages ont été retrouvés aussi bien dans des exploitations avec un historique de contamination à salmonelle que dans d'autres fermes sans historique connu de présence de salmonelles (Tableau 1).

Tableau 1 : Répartition des phages selon des fermes et le type d'échantillon

Profil	Nombre d'isolats de phages	Identifiant de la ferme En gras, les fermes avec un historique de contamination par <i>Salmonella</i>	Type d'échantillon
LP1	38	4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23	F, FM, M, O, Si, St, W
LP2	1	13	W
LP3	2	8, 11	F, M
LP4	5	4, 24	F, FM, Si, O
LP5	2	4, 8	F, St
LP6	1	20	FM
LP7	1	10	FM
LP8	8	5, 7, 8, 14, 20, 21	F, FM, M, O, W
LP9	1	9	F
LP10	3	1, 2	F, W
LP11	1	3	FM
LP12	6	4, 11, 12, 13, 14, 19	F, M, O
LP13	1	23	O
LP14	4	4, 14, 16, 17	FM, M, W
LP15	1	7	W
LP16	1	2	Si
LP17	4	5, 7, 8, 18	F, FM, O, Si
LP18	1	6	Si
LP19	2	9, 21	F, FM
LP20	1	2	FM
LP21	1	3	M
LP22	1	11	F
LP23	1	11	FM
LP24	2	15	M, W
LP25	1	5	W
LP26	1	9	F
LP27	7	4, 11, 12, 13, 14, 21	F, M, O
LP28	1	10	F

F: aliment pour bovin, W: eau d'abreuvoir, FM: bouse et lisier, St: paille, M: lait cru, Si: ensilage et foin, O: autre.



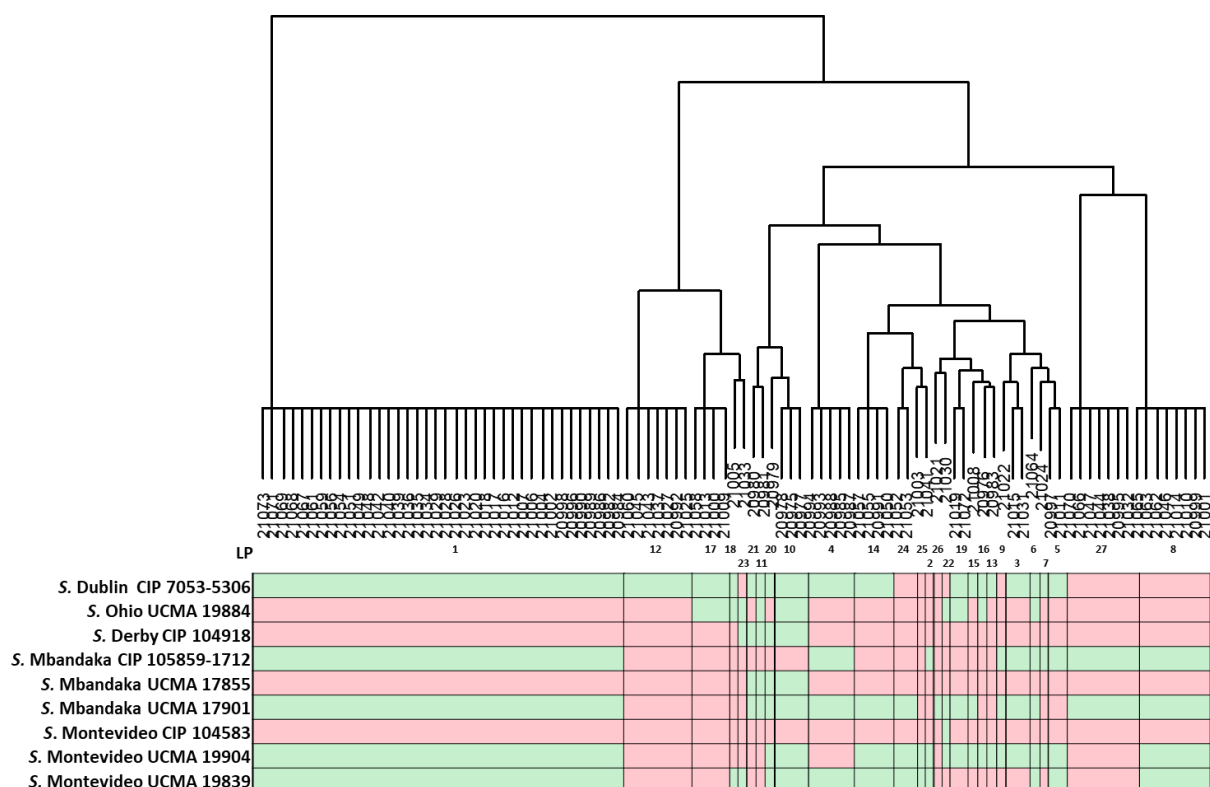


Figure 7 : Clustering des profils de lyse des phages de cette étude en fonction de leur spectre d'hôte.

Certains phages ne ciblaient qu'une seule des souches testées, comme, par exemple, les phages ayant les profils LP2, LP12 et LP26 (Figure 7). Le profil majoritaire LP1 ciblait des souches de sérovars différents : Dublin, Mbandaka et Montevideo. Cette partie du travail a montré une diversité de phages dans l'environnement d'exploitations laitières de la filière fromagère AOP au lait cru de Normandie. Des études des phages de *Salmonella* en exploitations laitières aux Etats-Unis et en Thaïlande (Switt et al., 2013; Wongsuntornpoj et al., 2014) ont également montré une grande diversité de phages dans l'environnement, ciblant une large gamme de sérovars comme constaté dans les exploitations normandes.

III.3.3 Evaluation des propriétés anti-*Salmonella* des phages en modèles *in vitro*

III.3.3.1 Mise au point d'un cocktail de phages et test de son potentiel anti-salmonelle en milieu LB

A partir de 28 phages sélectionnés (un par profil lytique), une analyse du ratio optimal phages/bactérie a permis la détermination de la MOI minimum, fixée à 10^3 , et des cocktails ont été élaborés, de façon à composer des cocktails de phages de complexité croissante (données non montrées). Un cocktail composé de huit phages s'est montré particulièrement intéressant et a été retenu pour la suite des travaux (Tableau 2).



Tableau 2 : Bactériophages utilisés dans l'élaboration du cocktail de phages

Phage	Souche hôte	Origine du phage
UCMA 20985	S. Mbandaka CIP105859-1712	Bouillon d'enrichissement
UCMA 20991	S. Montevideo UCMA 19887	Eau d'abreuvoir
UCMA 21001	S. Montevideo UCMA 17813	Eau d'abreuvoir
UCMA 21008	S. Mbandaka UCMA 17800	Ensilage
UCMA 21018	S. Mbandaka CIP105859-1712	Concentré (Aliment pour bovin)
UCMA 21022	S. Mbandaka UCMA 17800	Aliment pour génisses
UCMA 21041	S. Montevideo UCMA 19887	Eau d'abreuvoir
UCMA 21064	S. Mbandaka CIP105859-1712	Fèces

Les génomes de ces huit phages sont en cours de séquençage. Leur comparaison finira de caractériser les phages. Ce travail est réalisé en collaboration avec l'unité Maïage (Inrae).

Le potentiel anti-*Salmonella* du cocktail de phages a été testé, en milieu LB, contre 17 souches de salmonelles issues des échantillons collectés dans des fermes avec un historique de contamination des laits par des salmonelles ainsi que sur des souches de salmonelle de référence et d'autres souches de la collection du laboratoire. Le suivi a été effectué en microplaques (4 puits par souche) et lecture de densité optique (DO600nm) au lecteur de plaques Spark Tecan, à 37°C pendant 12h, avec lecture de DO toutes les 30 min. L'efficacité du cocktail variait selon le sérovar et selon la souche. Des exemples de ces suivis pour des souches de S. Mbandaka, S. Montevideo et S. Dublin, sérovars d'intérêt pour le projet CESam, sont donnés en Figure 8.



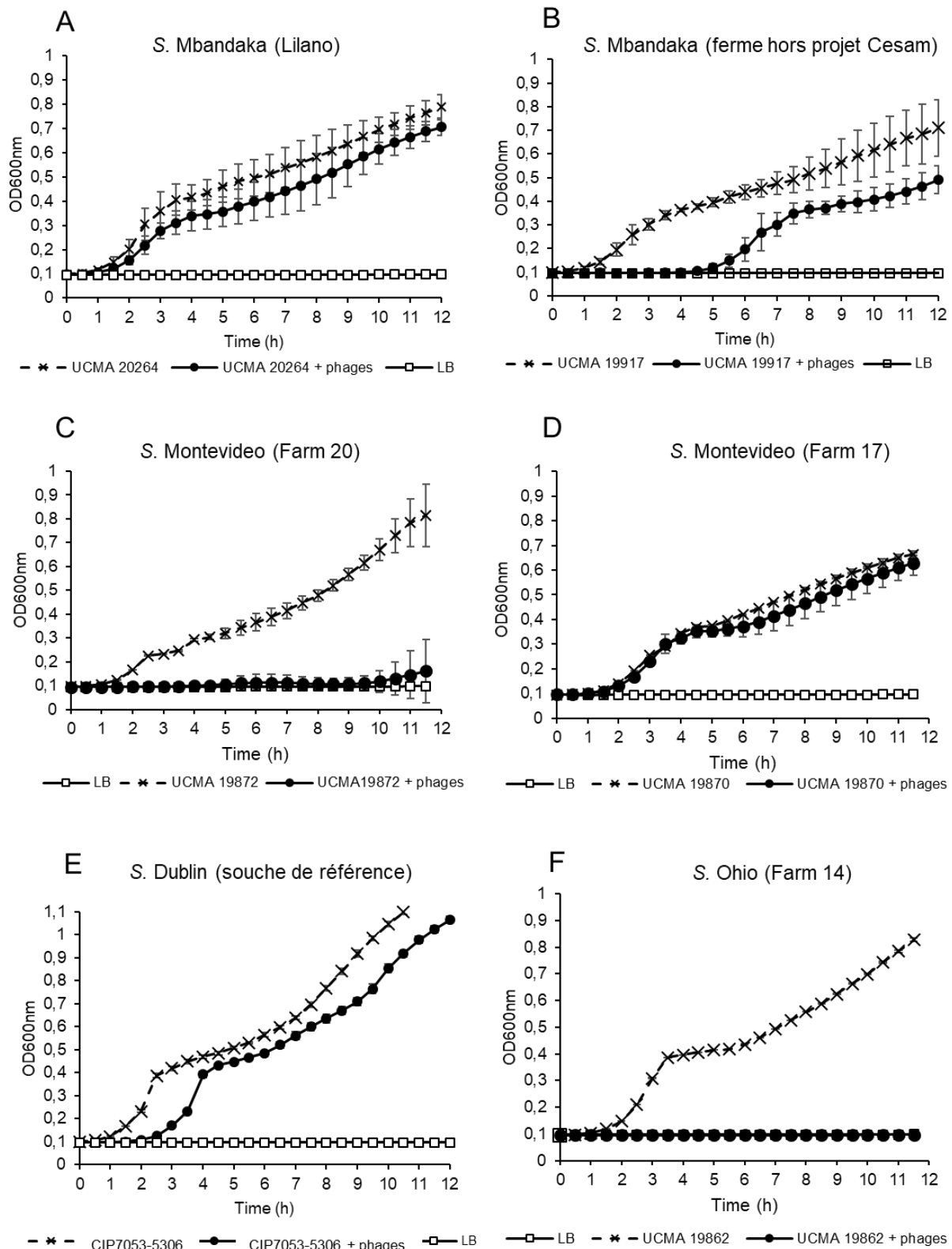


Figure 8 : Exemples de suivis de l'efficacité du cocktail de phages sur des souches de terrain et des souches de référence en milieu LB, à 37°C. Farm : ferme ; LB : milieu de culture témoin.

Selon la souche et son sérovar, l'efficacité du cocktail variait. En effet, le cocktail ne fonctionnait pas ou que peu contre les souches *S. Mbandaka* UCMA 20264 et UCMA 19971 (Figure 8 A et B). La souche *S. Montevideo* UCMA 19872 était inhibée complètement par le cocktail (Figure 8 C) alors que la souche



S. Montevideo UCMA 19870 ne montrait pas de sensibilité au cocktail (Figure 8 D). La croissance de la souche *S. Dublin* CIP7053-5306 étaient retardée mais pas inhibée par le cocktail (Figure 8 E). La croissance de la souche *S. Ohio* UCMA 19862 était inhibée (Figure 8 F). Les mêmes tendances ont été observées pour d'autres souches des mêmes sérovars et pour d'autres sérovars comme *S. Anatum*, *S. Panama*, *S. Hadar*, et *S. Typhimurim*. Au final, sur les 17 souches testées, neuf n'étaient pas inhibées, deux inhibées partiellement soit à cause d'un allongement de la phase de latence soit d'un ralentissement de la croissance en phase exponentielle. Sur les six souches inhibées par le cocktail, cinq étaient des *S. Montevideo* et une *S. Ohio*.

Ces essais en milieu LB ont montré la grande aptitude des salmonelles à résister aux phages, ce qui pourrait expliquer en partie leur persistance dans les environnements laitiers, et à la ferme notamment. Cette aptitude de résistance pourrait être due à l'acquisition par transfert horizontal chez certaines *Salmonella* d'un opéron *opvAB* permettant d'altérer la longueur l'antigène O du LPS (Cota et al., 2015). Cet antigène étant un site de fixation de phages, son changement de conformation via l'opéron *opvAB* entrainerait ainsi une résistance des salmonelles aux phages.

III.3.3.1 Test du cocktail de phages en milieu lait

Test de résistance des phages

Ce travail sur les phages s'effectuant dans le cadre du projet CESam pour la filière Camembert de Normandie (au lait cru), l'étape suivante a été de tester le cocktail en matrice laitière pour évaluer son efficacité, sur les souches ayant montré une sensibilité aux phages en milieu LB. Avant d'évaluer le potentiel anti-*Salmonella* du cocktail en modèle lait, les phages ont été caractérisés pour leur résistance à différentes gammes de pH et de températures, et à différentes concentrations en sel pour estimer leur résistance à certaines conditions physico-chimiques possiblement rencontrées dans le process fromager, et à d'autres plus extrêmes. Tous les phages avaient le même comportement, ainsi seuls les résultats pour le phages UCMA 21064 seront présentés ci-après à titre d'exemple.

Le nombre de phages capables d'infecter leur souche hôte après 24h d'incubation des phages à un pH compris entre 1 et 11 est présenté en Figure 9. La résistance au pH s'étendait dans une gamme allant de 3 à 9, avec un maintien du nombre de phages infectieux identiques aux titres phagiques de départ pour ces pH (Figure 9). Au-delà de cet intervalle de pH, le titre phagique chutait et aucun phage infectieux n'était dénombré. Les valeurs de pH du lait de vache (6,4 – 6,8) et de la majorité des fromages (4,6 – 7,0) (Trmčić et al., 2017) montrent que la gamme de résistance au pH de ce cocktail pourrait laisser envisager leur application en cours de process fromager, et en particulier en fabrication de Camembert.

Le nombre de phages capables d'infecter leur hôte après 8h et 24h d'incubation en LB à 4°C, 15°C, 30°C, 37°C, 50°C et 70°C a été mesuré. Jusqu'à 50°C, le nombre de phages infectieux était stable (Figure 10). Le nombre de phages infectieux chutait après 8 h à 70°C, avec une perte d'environ 3 log UFP/ml, pour être indétectable après 24h à 70°C (Figure 10). Les phages résistaient également à la salinité pour des concentrations en NaCl de 0,12M, 0,25M, 0,5M et 1M, le titre phagique ayant été mesuré après 24h d'incubation à ces différentes concentrations de NaCl, en milieu LB à 37°C. Aucune chute du titre phagique n'était constatée (résultats non montrés). Ces données montrent le potentiel de ces phages à rester infectieux dans des conditions rencontrées en cours de process d'un fromage à pâte molle comme le Camembert.



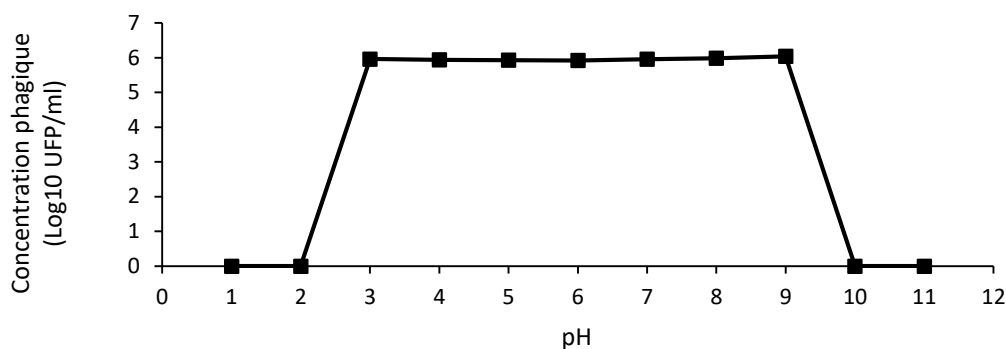


Figure 9 : Concentration en particules phagiques pour le phage UCMA 21064 après 24 heures d'incubation à différents pH. Le nombre initial de phages était de 6 log UFC/ml.

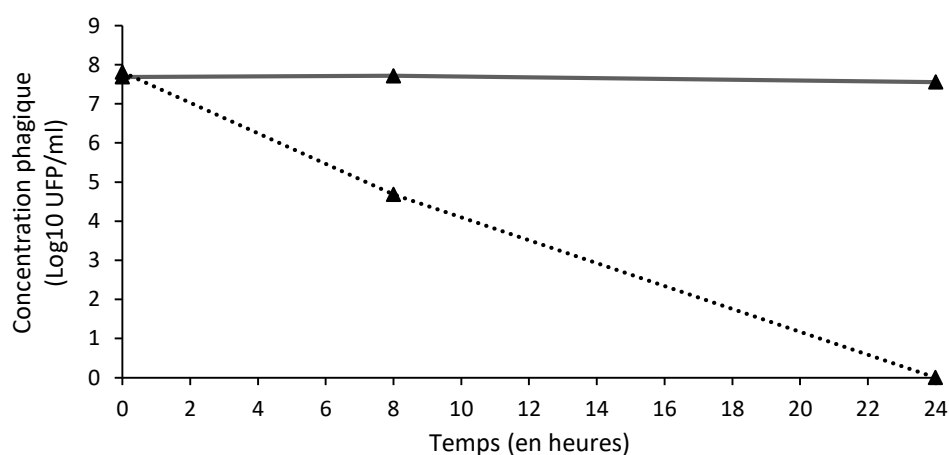


Figure 10 : Evolution de la concentration en particules phagiques sur 24 h du phage UCMA 21064 aux températures de 4°C, 15°C, 30°C, 37°C et 50°C (courbe en trait plein), et 70°C (courbe en pointillés)

Test du cocktail en lait entier

Le cocktail a ensuite été évalué pour son efficacité vis-à-vis des *Salmonella*, en lait entier UHT à 30°C pendant 24h d'incubation, avec un dénombrement des salmonelles réalisé à T0, à 6h et à 24h (Figure 11). L'effet inhibiteur du cocktail observé sur certaines souches en milieu LB était perdu en lait entier UHT comme par exemple pour la souche S. Ohio UCMA 19862 inhibée en LB (Figure 8 F) mais plus en lait (Figure 11 A). Pour le sérovar S. Montevideo, le cocktail perdait son efficacité en lait pour la souche UCMA 17813 (Figure 11 B). Il restait efficace pour les souches S. Montevideo UCMA 19867 et UCMA 19887 (Figure 11 C et D) avec une perte de 4 à 5 log ufc/ml au bout de 24h.



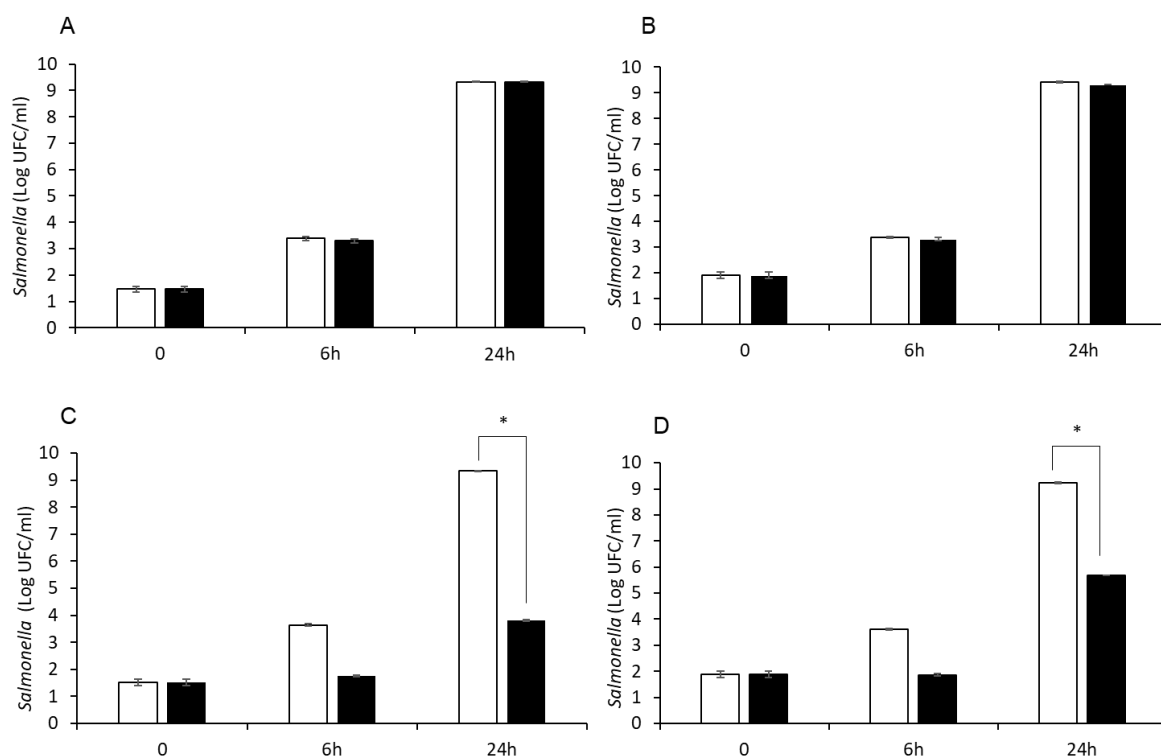


Figure 11 : Effet du cocktail de phages sur les souches *S. Ohio* UCMA 19862 (A), *S. Montevideo* UCMA 17813 (B), *S. Montevideo* UCMA 19867 (C) et *S. Montevideo* UCMA 19887 (D) dans du lait entier UHT. Les barres blanches indiquent la croissance de la souche seule, et les barres noires la croissance de la souche en présence du cocktail de phages. * : p -value < 0,05.

Ces résultats montrent l'effet de la matrice alimentaire sur l'efficacité des phages déjà décrits dans des travaux concernant l'efficacité de phages contre *Staphylococcus aureus* dans du lait cru ou chauffé (O'Flaherty et al., 2005). La structure des globules gras du lait cru empêchait l'infection phagique en protégeant les récepteurs cellulaires ce qui n'était plus le cas avec du lait chauffé. Un phénomène similaire peut sans doute expliquer les résultats obtenus pour les phages de salmonelle en milieu lait dans le projet CESam. L'efficacité des phages était toujours aussi dépendante de la souche de salmonelle utilisée. Il resterait à trouver des techniques pour suivre l'effet des phages dans des conditions de contamination par *Salmonella* plus proches des niveaux rencontrés habituellement. En effet, lorsqu'il y a contamination dans le lait cru, le nombre de *Salmonella* est généralement extrêmement faible avec des valeurs de 1 à quelques UFC/ml voire encore moins, donc difficilement détectables par dénombrements classiques. Une approche de PCR quantitative, adaptée de Riyaz-UI-Hassan et al., 2013, a été testée au cours du projet, sans permettre de descendre sous un seuil de détection de 100 UFC/ml, encore trop élevé. D'autres développements en ce sens mériteraient donc d'être explorés.

III.3.3 Conclusion

Ce travail sur les phages de salmonelle au cours du projet CESam a permis d'explorer la diversité des phages de ce pathogène dans la filière laitière au lait cru de Normandie et de la caractériser. L'efficacité des phages testés était diminuée en modèle lait selon la souche considérée. Malgré tout, ce travail montre l'intérêt de ces alternatives pour limiter le risque de salmonelle dans des filières fromagères au lait cru sensibles aux problèmes de contaminations par les pathogènes. Si la réglementation concernant les phages s'assouplissait, il serait sans doute intéressant de développer ces approches également à la ferme, pour tenter de réduire ou de contrôler le portage sain de certains bovins, ou



encore comme traitement des ambiances (aire de paillage, salle de traite, etc.) pour lutter contre la persistance de *Salmonella* dans les élevages laitiers.

En outre, il serait aussi intéressant de tester des approches couplant phages et bactéries inhibitrices de salmonelles en modèles fromagers. C'est d'ailleurs ce qui était prévu en fin de projet CESam mais qui n'a jamais pu être mené à son terme, en raison de la crise COVID-19 et de l'arrêt des manipulations à cette période.

III.4 – Rôle du phageome dans la modulation du microbiote intestinal

III.4.1 Introduction : les communautés de phages de l'intestin humain

L'intestin humain est un grand réservoir de phages dont la diversité et la stabilité dépendent de l'âge et de l'état de santé des personnes (Dalmasso et al., 2014b). Il est estimé que l'intestin humain pourrait contenir au moins autant de phages sinon plus que de bactéries, constituant probablement l'habitat le plus dense en phages dans la nature (Lepage et al., 2013; Mills et al., 2013). Le rôle du phageome dans la structure et la stabilité du microbiote intestinal est de plus en plus étudié, et en particulier dans le cas de troubles inflammatoires et maladies chroniques de l'intestin (Norman et al., 2015). Lors du traitement de ces maladies le recours aux antibiotiques est souvent nécessaire, engendrant des perturbations, ou dysbioses, plus ou moins importantes du microbiote intestinal. Des études ont montré que des phages d'origine intestinale appliqués seuls, en modèles murins ou chez des patients, montraient une aptitude à moduler le microbiote intestinal et ses fonctions (Ott et al., 2017; Rasmussen et al., 2020).

Dans ce contexte, le but de l'étude était d'évaluer si le transfert du phageome autochtone (après élimination de tout autre microorganisme) pouvait moduler les bactériomes et les phageomes de souris après dysbiose suite à un traitement antibiotique. Ces travaux ont été réalisés à l'APC Microbiome Institute (University College Cork, Irlande) pendant mon post-doctorat et ont fait l'objet d'une publication scientifique dont sont extraites les figures et la synthèse des résultats présentées dans cette partie (Draper et al., 2020).

III.4.2 Résultats marquants

III.4.2.1 Impact de la transplantation du phageome autochtone (FVT) sur le bactériome murin après traitement antibiotique

Etude 1 : Administration d'une seule FVT

Après une période d'acclimatation appropriée, 16 souris BALB/c (âgées de 7-8 semaines) ont reçu un traitement antibiotique (pénicilline 1000 U/ml et streptomycine 3 g/L) dans leur eau de boisson pendant 4 jours, suivi d'un jour sans antibiotiques. Des fèces ont été collectées pendant tout le temps avant et pendant le traitement. Puis les souris ont été séparées en deux groupes (n = 8) : un groupe FVT et un groupe Témoin. Chaque souris du groupe FVT a alors reçu par gavage 0,2 ml de solution de phageome préalablement obtenue lors de la collecte des fèces avant traitement antibiotique. Le groupe Témoin (« Control » sur les figures) a reçu une solution de phageome traité thermiquement et à la DNase pour détruire les phages. Les fèces des deux groupes ont été collectées 10h, 24h, 34h et 11 jours après administration des solutions. La composition bactérienne (bactériome) a été étudiée par métabarcoding 16S. Les phageomes ont été étudiés par métagénomique.

Par Analyse en Composantes Principales (PCoA), les bactériomes des souris Témoin et FVT formaient des groupes distincts et se rapprochaient progressivement de l'état initial pré-traitement au cours du temps (Figure 12 A). Onze jour après gavage, une différence significative existait entre les groupes FVT



et Témoin (PERMANOVA, Adonis, p-value = 0,004) (Figure 12 B), montrant une influence du gavage avec les phageomes autochtones.

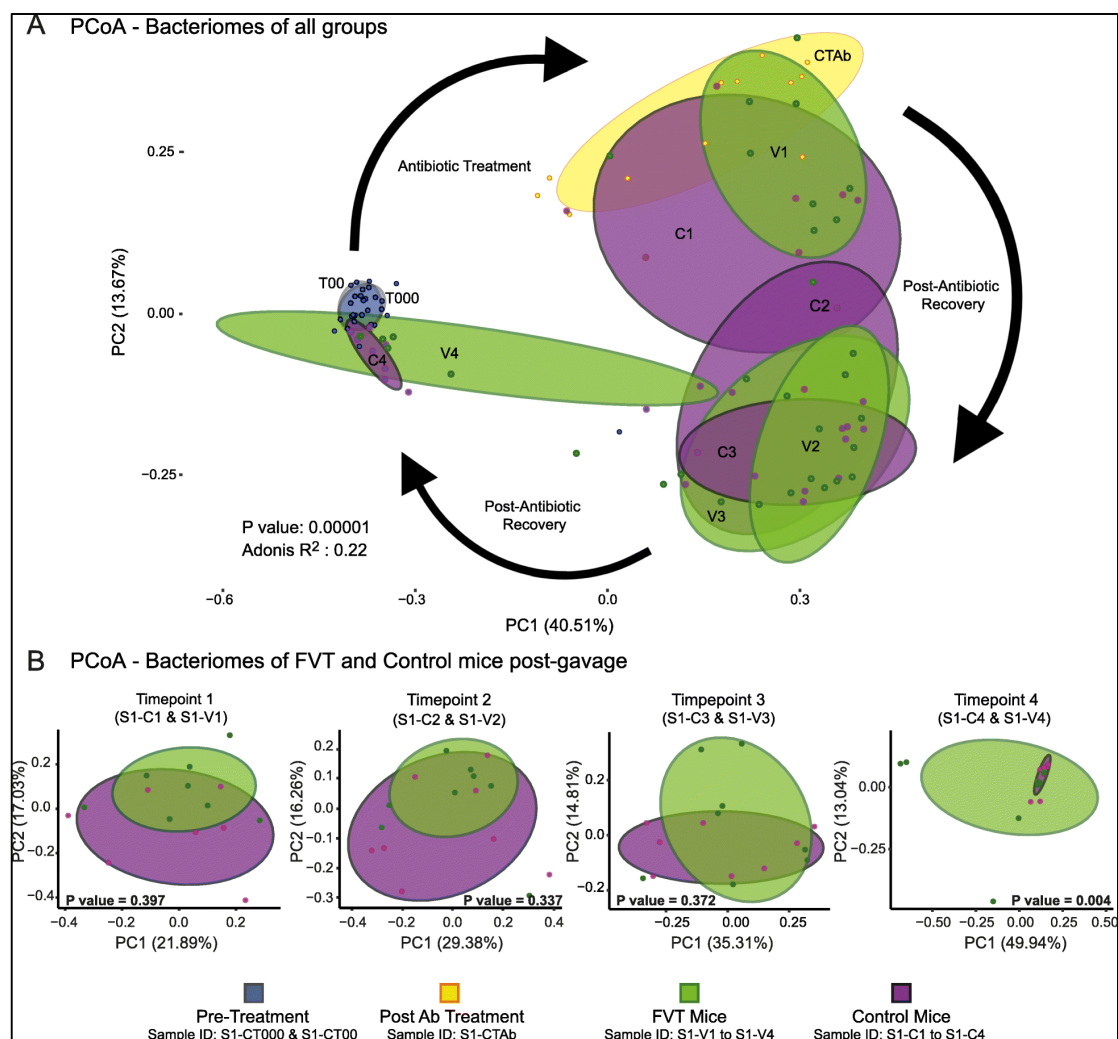


Figure 12 : Représentation PCoA des distances unweighted UniFrac pour tous les points et tous les groupes de l'étude 1. Les ellipses représentent des intervalles de confiance de 70% (A). Puis, un test PERMANOVA UniFrac a été réalisé avec la fonction Adonis de R pour déterminer les différences statistiques entre les groupes FVT et Control (modèle de formule = temps du traitement antibiotique + statut phage/control). Les graphes PCoA et p-values d'intérêt sont présentés (B). (Draper et al., 2020)

L'abondance de 12 OTU (Operational Taxonomic Unit) était statistiquement différente entre le groupe Témoin et le groupe FVT. Six de ces 12 OTU appartenaient à la famille des *Lachnospiraceae*, une aux *Ruminococcaceae*, une aux *Porphyromonadaceae*, et une aux *Deferribacteraceae*. Les trois dernières étaient non identifiées au niveau de la famille mais appartenaient à l'ordre des *Clostridiales*. Dix de ces OTU étaient plus abondantes dans le groupe Témoin que dans le groupe FVT et dans les souris avant dysbiose. Ceci implique donc que la transplantation de phageome autochtone contribuait à restaurer le bacteriome murin vers un état proche de celui avant traitement antibiotique.

Etude 2 : Administration de deux FVT

Afin de confirmer et d'affiner les résultats de l'étude 1, une deuxième expérimentation a été menée dans les mêmes conditions que l'étude 1 à la différence qu'un second gavage a été administré 4 jours



après le premier (*i.e.* à 12 jours). Des échantillons de contenus caecaux ont également été collectés post-mortem.

Dans l'étude 2, les groupements distincts entre Témoin et FVT étaient bien visibles par représentation PCoA (Figure 13 A). Comme pour l'étude 1, la tendance des bactériomes des deux groupes était de revenir à un état proche de l'état avant dysbiose au cours du temps. Les bactériomes des groupes Témoin et FVT étaient significativement distincts à partir du second gavage (p -value = 0,002) et jusqu'à la fin de l'expérimentation (p -value = 0,001) (Figure 13 B). Cette différence significative a également été confirmée dans les échantillons de contenus caecaux. Ces résultats montrent l'influence de l'administration des phageomes autochtones sur la composition du bactériome. Comme pour l'étude 1, des OTU avaient une abondance significativement différente entre les groupes Témoin et FVT. Cette deuxième étude a permis de mettre en évidence que l'administration des phageomes autochtones menait à des changements subtils mais significatifs du microbiote, et qui affectaient essentiellement les OTU les moins abondantes.

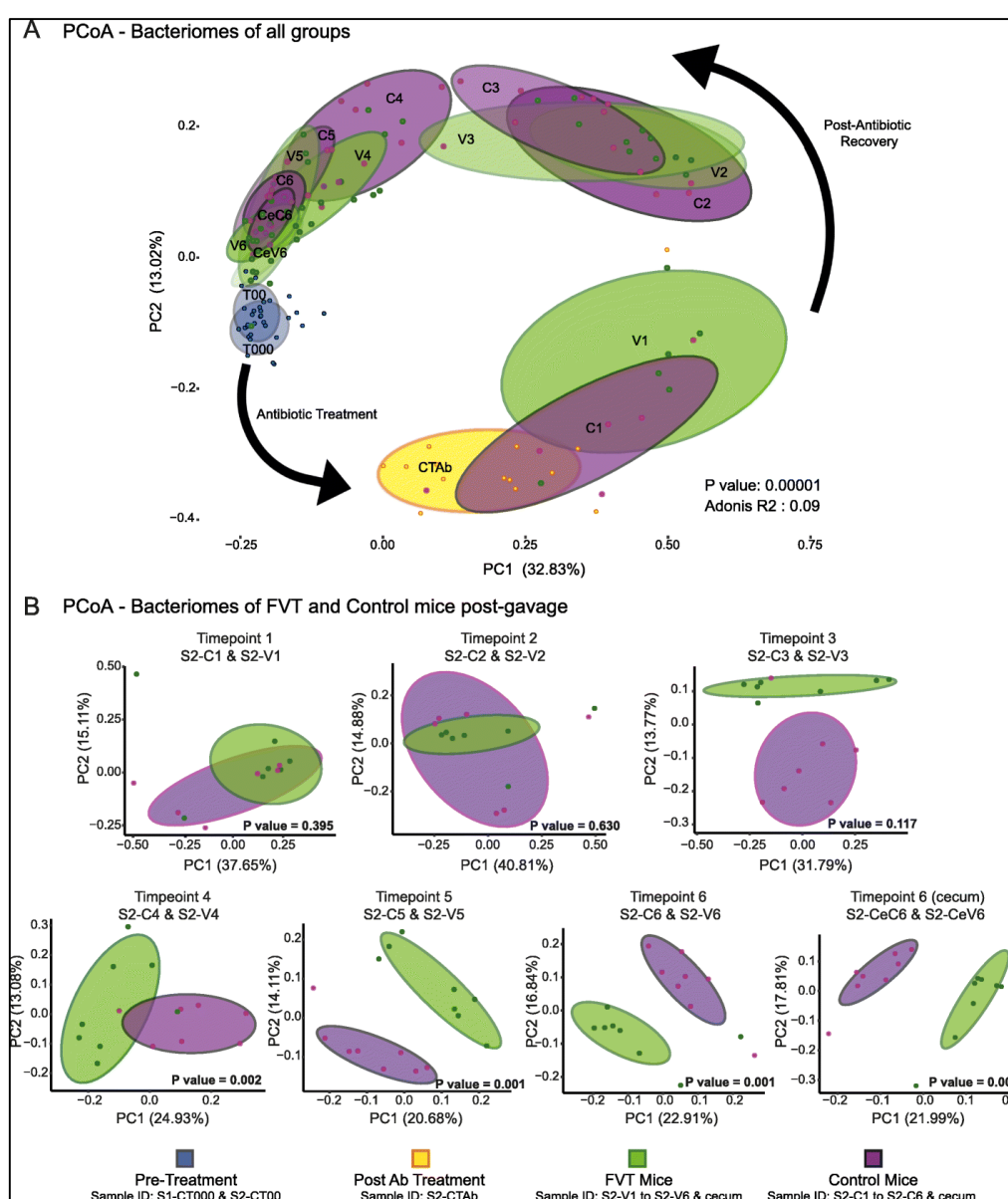


Figure 13 : Représentation PCoA des distances unweighted UniFrac pour tous les points et tous les groupes de l'étude 2. Les ellipses représentent des intervalles de confiance de 70% (A). Puis, un test PERMANOVA UniFrac a été réalisé avec la fonction Adonis de R pour déterminer les différences statistiques entre les groupes FVT et Control (modèle de formule = temps du traitement antibiotique + statut phage/control). Les graphes PCoA et p-values d'intérêt sont présentés (B). (Draper et al., 2020)



III.4.2.2 Evolution des phageomes suite aux FVT

Comme les quantités d'ADN phagiques récoltées dans les fèces de souris individuellement étaient insuffisantes pour réaliser un séquençage de métagénomique, les échantillons ont été réunis pour chaque temps (*i.e.* 8 souris pour chaque groupe à chaque temps), et une amplification a été réalisée pour les échantillons de l'étude 2. Une image de chaque « métavirome » de chaque groupe a ainsi pu être obtenue dans chaque étude, permettant de dégager des tendances sans pouvoir tirer de conclusions statistiques en raison des biais liés aux besoins techniques de séquençage.

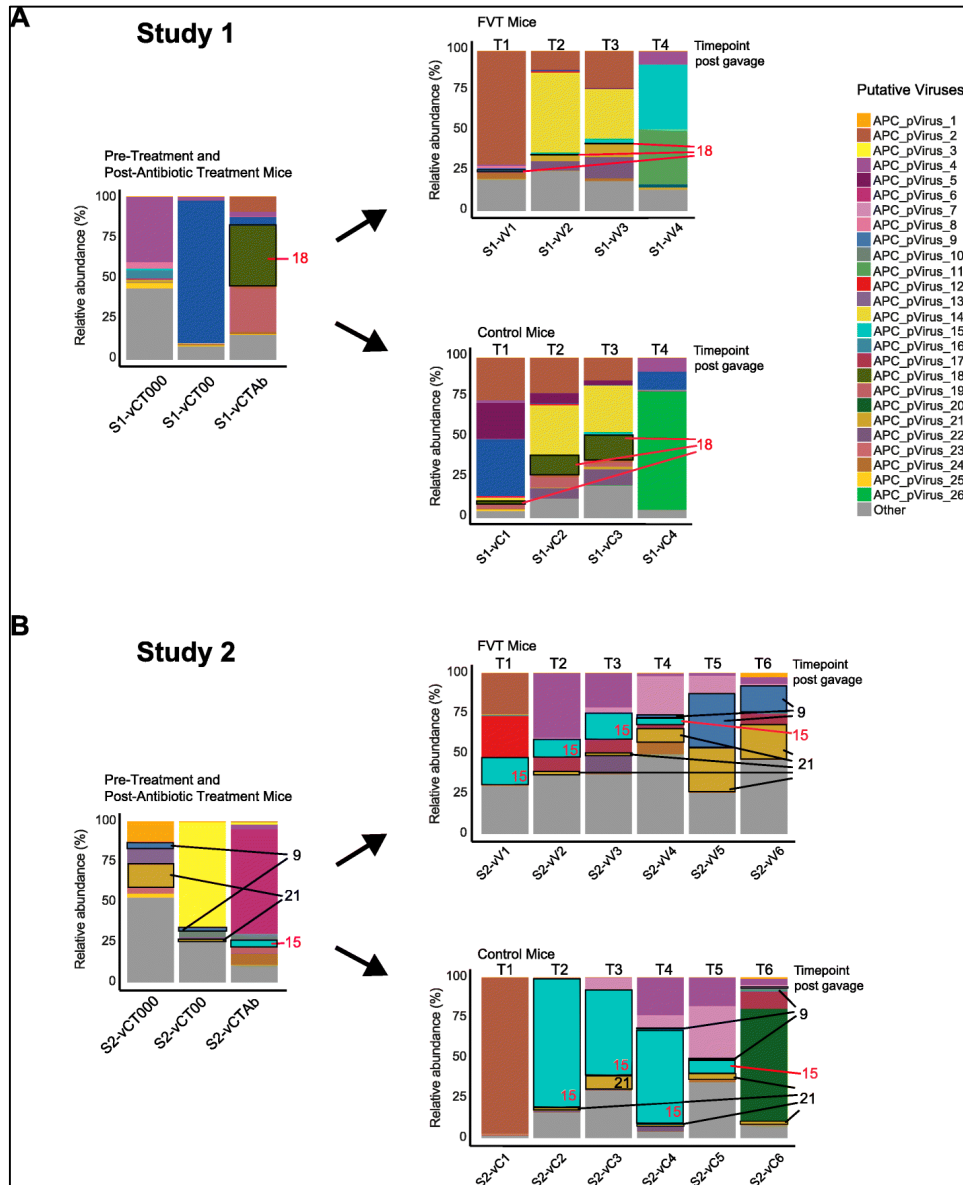


Figure 14: Analyse métagénomique de l'ADN isolé des virus extraits des échantillons de fèces de souris de l'étude 1 (A) et de l'étude 2 (B). Les résultats reflètent les viromes des groupes de souris, pour lesquels les échantillons de fèces ont été combinés, et représentent la somme virale du groupe pré-traitement ($n = 16$), traitement antibiotique ($n = 16$), Control ($n = 8$) et FVT ($n = 8$) à chaque temps. Les contigs ont été assemblés en virus potentiels et les abondances relatives sont représentées sur les graphes. Certains contigs d'intérêt ont été surlignés : ceux marqués avec des textes en noir sont abondants dans les souris avant traitement antibiotique et en plus grande abondance encore dans les souris FVT comparé au groupe Control. Ceux marqués avec des textes en rouge sont plus abondants après traitement antibiotique et dans le groupe Control que dans le groupe FVT (Draper et al., 2020).



Dans les deux études, les viromes étaient différents entre le groupe Témoin et le groupe FVT après gavage (Figure 14). Dans l'étude 2, le groupe FVT montrait une abondance importante des phages introduits lors du gavage, comme les phages APC-pVirus9 et APC-pVirus21, plus abondants dans le groupe FVT que dans le groupe Témoin (Figure 14 B). Dans les deux études, les contigs viraux très abondants après le traitement antibiotique, comme par exemple APC-pVirus18 et APC-pVirus15, restaient abondants dans le groupe Témoin alors qu'ils diminuaient dans le groupe FVT (Figure 14 A et B). Dans les deux études, le phageome du groupe FVT comptait plus de phages que celui du groupe Témoin au dernier temps de l'expérimentation.

III.4.3 Conclusion

Ce travail montre que les phages contribuent à structurer et moduler le microbiote intestinal, et en particulier lors de la perturbation de celui-ci. L'administration du phageome autochtone à des souris a permis un retour du microbiote à un état plus proche de celui avant dysbiose (suite à un traitement antibiotique). Ceci souligne donc l'importance de ces virus en écologie microbienne en lien avec la santé humaine, et ouvre les portes à de futures perspectives pour de potentielles applications pour des traitements complémentaires aux traitements de routine utilisés actuellement dans des cas de maladies de l'intestin comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la maladie de Crohn, etc.

III.5 – Interactions phages-bactéries dans les matrices d'intérêt cidricole

III.5.1 Introduction : le cidre une matrice particulière pour l'étude des phages

Les bactériophages jouent un rôle important dans la construction, l'équilibre et les fluctuations des populations microbiennes des différents écosystèmes auxquels ils sont associés (Mills et al., 2013). Les communautés bactériennes des écosystèmes alimentaires sont bien étudiées, cependant il existe un manque flagrant de données à propos de la diversité, de l'impact et de l'influence des communautés de phages sur les communautés microbiennes auxquelles elles sont associées au sein des produits alimentaires, et plus particulièrement dans les boissons fermentées comme le cidre (Ledormand et al., 2021). Le cidre est une boisson alcoolisée obtenue à partir de la fermentation de pommes (Figure 15). Brièvement, les pommes sont lavées et pressées après récolte pour séparer la partie liquide, dite « moût de pomme », de la partie solide « marc de pomme ». La fermentation du moût de pomme est assurée d'abord par les levures qui transforment les sucres en éthanol et en CO₂. Comme pour le vin, une deuxième étape de fermentation peut avoir lieu avec la fermentation malolactique (FML), réalisée par les bactéries lactiques, les quatre genres rencontrés dans le cidre étant *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactobacillus sensu lato* (Cousin et al., 2017). La FML peut être désirée ou non par les producteurs en fonction du produit voulu mais son impact dans le cidre reste encore mal connu comparé au vin (Sánchez et al., 2014). Généralement, la mise en bouteille s'effectue lorsque la densité est comprise entre 1009 et 1029 selon le type de cidre souhaité (Cousin et al., 2017) (Figure 15).



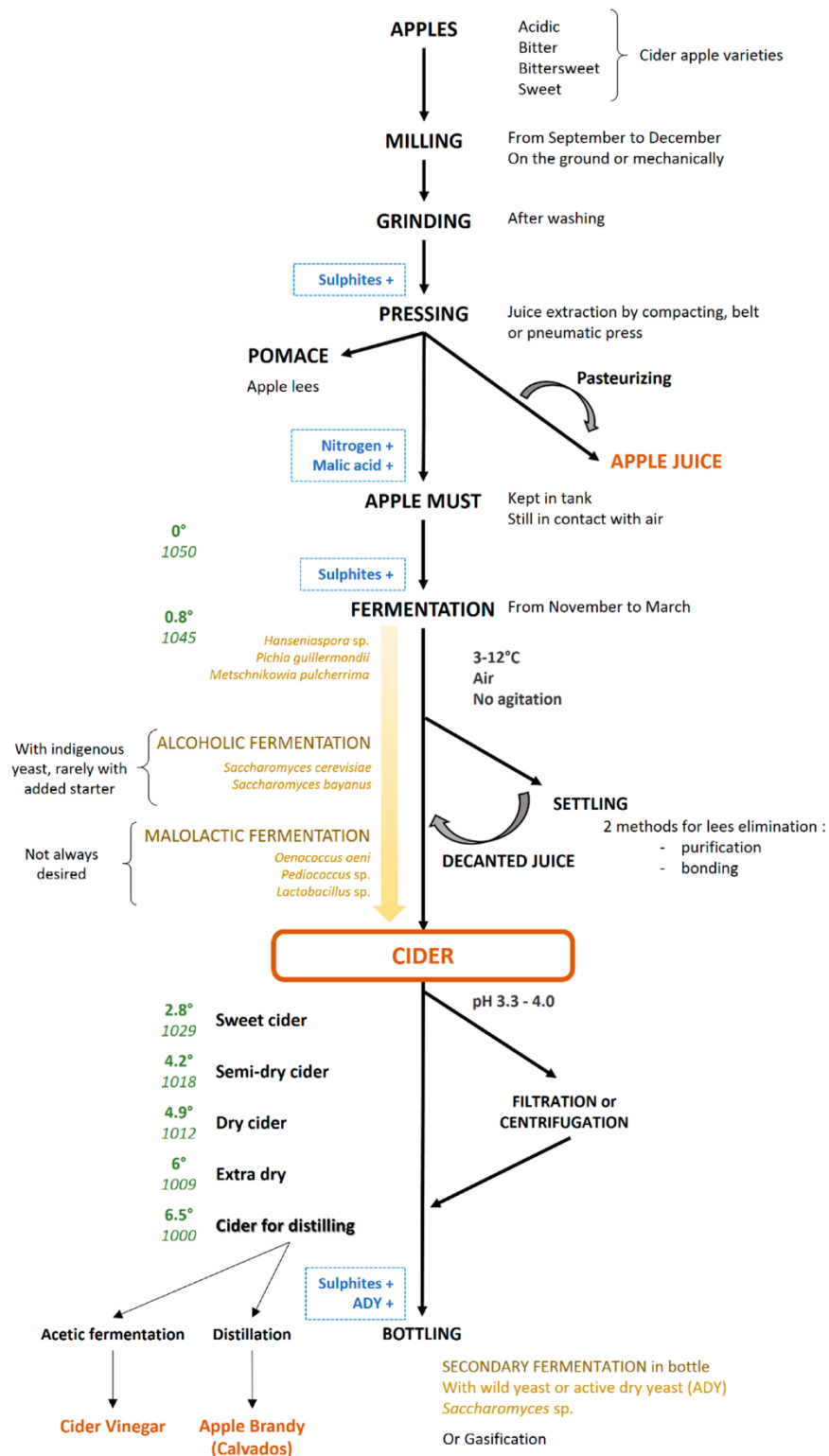


Figure 15 : Procédé de fabrication du cidre. Légende : Degré alcoolique et densité. Principales levures et bactéries impliquées dans la fermentation (Cousin et al., 2017).

Le cidre est une matrice alimentaire aux conditions particulières pour la croissance des microorganismes par sa composition physicochimique, en particulier la présence d'éthanol et des valeurs de pH autour de 3-4 (Ye et al., 2014). De nombreux acides organiques sont trouvés dans le



cidre avec majoritairement l'acide malique (représentant 90 % des acides et souvent estimé à hauteur de 5 g/L dans le moût), mais aussi l'acide lactique, l'acide quinique, l'acide citrique et l'acide succinique. La présence de polyphénols, tels que les flavonols, les anthocyanidines et les acides hydroxycinnamiques, généralement provenant de la peau des pommes (Guo et al., 2019), ont également leur importance dans la composition du cidre. Leur concentration peut atteindre 200 mg/L dans certains jus (Rosend et al., 2020; Wicklund et al., 2020). La composition aromatique des cidres dépend majoritairement des variétés de pommes utilisées et du métabolisme microbien mis en jeu (Rosend et al., 2019). Les composés aromatiques les plus retrouvés dans le cidre sont les esters, les alcools et les aldéhydes et sont formés pendant la fermentation alcoolique et la FML.

Les résultats présentés ci-dessous sont ceux obtenus dans le cadre de projet de thèse de Pierre Ledormand, dont je fus la co-encadrante (octobre 2019-décembre 2022). Ce projet avait trois objectifs : (i) étudier la diversité du phageome et des prophages du cidre, en comparant deux cuves chez deux producteurs, au cours de la fermentation de cidre de consommation ; (ii) explorer le potentiel des phages en tant que moteurs de la diversité microbienne dans un modèle de communauté synthétique inspirée du cidre, après un phénomène de perturbation des équilibres microbiens ; (iii) décrypter la réponse transcriptomique et protéomique d'une souche bactérienne du cidre à une infection par son phage lytique, au sein d'une communauté bactérienne synthétique. Le transcriptome et le protéome de la souche ont pu être étudiés par des approches de RNA-Seq et de protéomique globale.

III.5.2 Résultats marquants

III.5.2.1 Exploration du phageome du cidre

Les phages du cidre n'ayant pas encore été explorés, la première partie de ce projet s'est portée sur l'étude des phageomes (communautés de phages lytiques) et des prophages du cidre. Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique (Ledormand et al., 2022b), dont sont extraits la synthèse des résultats et les tableaux et figures présentés dans cette partie.

La première étape du travail a été de mettre au point une méthodologie pour récupérer les phages lytiques d'échantillons de cidre afin d'en extraire l'ADN et réaliser une étude métagénomique. Deux cuves de cidre en fermentation, l'une chez un producteur artisanal (P) et l'autre chez un producteur industriel (B), ont été prélevées à quatre temps de la fermentation (Tableau 3).



Tableau 3 : Echantillons de cidre collectés pour l'étude des phageomes et des prophages (Ledormand et al., 2022b). B : producteur industriel ; P : producteur artisanal

Sample ID	Producer ID (French Department)	Fermentation Time (Days)	Tank ID—Tank Volume (hL)	Sugar Concentration kg/m ³	pH
C1B1	B (Calvados)	0	C1—120	1060	4.02
C1B2	B (Calvados)	7	C1—120	1056	4.05
C1B3	B (Calvados)	14	C1—120	1048	4.03
C1B4	B (Calvados)	27	C1—120	1036	4.01
C2P1	P (Manche)	0	C2—10	1056	3.32
C2P2	P (Manche)	12	C2—10	1049	3.35
C2P3	P (Manche)	25	C2—10	1040	3.52
C2P4	P (Manche)	36	C2—10	1036	3.58

Différentes méthodes ont été testées pour concentrer les phages et extraire l'ADN (Tableau 4). Le phage UCMA 21115, issu du cidre (description du phage en partie III-5.2.3), a servi de contrôle pour la mise au point de la méthode.

Tableau 4 : Conditions testées pour la concentration du phageome du cidre (Ledormand et al., 2022b)

	Tested conditions to collect viral particles from cider								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII Tangential Flow Filtration	IX Flocculation with FeCl ₃
Tested volumes of cider (mL)	50			20, 50, 1000				400	
Sample spiked with phage UCMA 21115 (PFU/mL)	Yes (10 ⁴ -10 ⁹)							Yes (10 ⁵)	Yes (10 ⁴ -10 ⁸)
pH adjusted to 5.5			Yes				Yes		
Precipitation with 10% PEG-8000 and 0.5 M NaCl		Yes	Yes		Yes	Yes	Yes		
Centrifugation step	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes		
DNA extraction from	Pellet	Supernatant	Pellet	Pellet	Supernatant	Pellet	Pellet	Retentate	Flocculate



Les méthodes testées étaient basées sur les protocoles utilisés pour d'autres types d'échantillons comme les fèces (Shkoporov et al., 2018) et le fromage (Dugat-Bony et al., 2020). Avec ces méthodes, il est apparu difficile d'extraire l'ADN phagique lorsque la concentration en phages était inférieure à 10^7 UFP/mL, dans un cidre ajusté à pH 5,5. Des adaptations des protocoles d'extraction, par exemple avec l'utilisation de molécules comme le polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) pour contrecarrer l'effet des polyphénols (Kasajima et al., 2013) présents en grande quantité dans le cidre, ont été entreprises pour tenter d'améliorer l'extraction d'ADN des particules phagiques, mais sans succès. De plus, des techniques permettant de concentrer les particules virales dans les eaux, comme la filtration tangentielle (Cai et al., 2015) ou la floculation au FeCl_3 (John et al., 2011) ont été également utilisées sur de plus gros volumes de cidre afin de concentrer et maximiser les chances d'extraction du phageome des échantillons de cidre, sans plus de réussite. Il est donc apparu que le cidre était probablement un réservoir assez pauvre en phages lytiques, et donc que le phageome du cidre serait difficile à explorer plus en détail à ce stade. Ceci a également été corroboré par le fait qu'une recherche de phages lytiques à partir des mêmes échantillons, contre 160 souches hôtes potentielles d'origine cidricole, n'a pas non plus permis d'isoler d'autres phages que le phage UCMA 21115 dont l'hôte était la souche *Liquorilactobacillus mali* UCMA 16447. Néanmoins, il est possible de penser que des phages lytiques sont quand même présents dans le cidre car il serait étonnant qu'une telle matrice riche en bactéries ne contienne pas un phageome lytique associé. Sur la base de ces constats, un besoin d'amélioration des méthodes d'isolement des phages lytiques depuis cette matrice particulière semble nécessaire et sera présenté dans la partie IV-Projet de recherche.

En parallèle de l'exploration du phageome lytique, la dynamique des prophages au sein des génomes bactériens au cours du procédé de fermentation des deux producteurs a été étudiée. Une étude métagénomique a été réalisée sur les différents échantillons de cidre des deux producteurs. Un total de 1174 prophages putatifs a été identifié en utilisant VIBRANT dans les deux cuves des deux producteurs, avec une abondance plus importante chez le producteur industriel que chez le producteur artisanal. Une heatmap a pu ainsi être réalisée (sur la base des « reads per length of the contig (in kb) per million (RPKM) » et les contigs avec des valeurs de RPKM au-dessus de 5 ont été conservés) pour visualiser les dynamiques des prophages chez le producteur industriel (Figure 16). Aucune représentation de ce type n'a pu être établie pour l'autre producteur à cause de l'abondance trop faible des prophages dans les échantillons (RPKM max = 11.4 et 1593 valeur sous un seuil de RPKM de 5.0, presque tous égaux à 0).



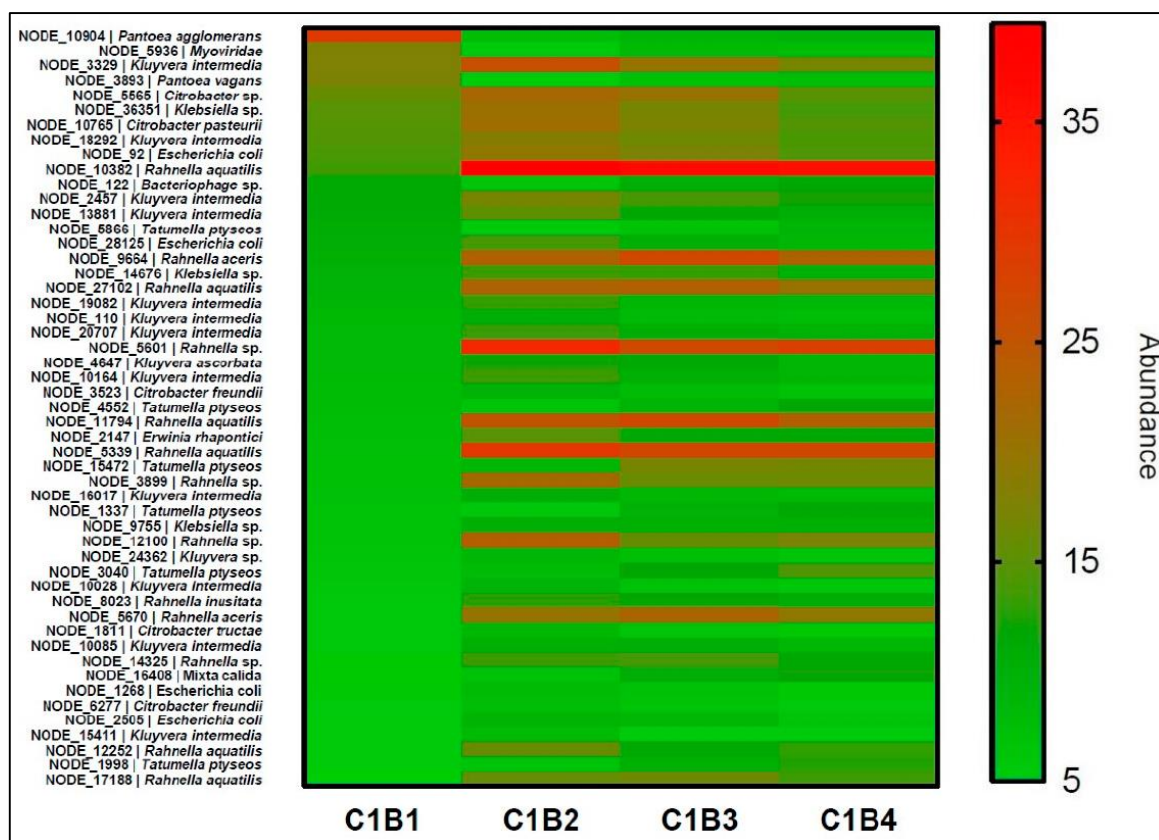


Figure 16 : Heatmap montrant les dynamiques des prophages les plus abondants retrouvés pendant le premier mois de fermentation chez le producteur B. C1 indique l'identifiant du tank, et B1, B2, B3, B4 sont les points d'échantillonnage pendant le processus fermentaire, comme indiqué dans le Tableau 3. NODE indique le prophage identifié et l'identification bactérienne mentionnée correspond l'espèce hôte la plus probable prédite après une analyse BLAST (E-value < 10⁻¹⁶; % of identity >85%). Les valeurs de RPKM au-dessus de 5,0 ont été retenues pour la construction de la heatmap. Couleur verte à rouge : abondance de la plus faible à la plus forte. (Ledormand et al., 2022b)

D'une manière générale, l'abondance des prophages (identifiés par l'appellation « NODE ») dans la cuve du producteur industriel augmentait au fil du temps pour certains hôtes bactériens alors que d'autres prophages fluctuaient ou diminuaient (Figure 16). Par exemple, le contig NODE_10382, affilié à *Rahnella aquatilis*, augmentait au cours du temps. Le contig NODE_10904, affilié à *Pantoea agglomerans*, diminuait après le premier point de prélèvement, et le contig NODE_3329, associé à *Kluyvera intermedia*, variait au cours du temps. Comme attendu, ces dynamiques de prophages suivaient celles de leurs hôtes prédits. Par exemple, le genre *Rahnella* augmentait au cours du temps (abondance totale de 4%, 14%, 12% et 11% dans C1B1, C1B2, C1B3 et C1B4, respectivement), le genre *Pantoea* diminuait (abondance totale de 15%, 4%, 5% et 5% dans C1B1, C1B2, C1B3 et C1B4, respectivement), et le genre *Kluyvera* variait au cours du temps (abondance totale de 7%, 11%, 10% et 8% dans C1B1, C1B2, C1B3 et C1B4, respectivement) (résultats non montrés).

L'augmentation de la fréquence des prophages au cours du temps pourrait ainsi être un indicateur d'installation et de prépondérance de la lysogénie dans le cidre. Inversement, la diminution des prophages pourrait indiquer la baisse de la lysogénie. En effet, ces observations peuvent être des marqueurs d'entrée en cycle lytique des prophages, impliquant donc leur faible présence dans leurs hôtes (Chevallereau et al., 2022; Howard-Varona et al., 2017; Kim and Bae, 2018).

Ces travaux ouvrent des perspectives concernant les corrélations existant entre la présence de prophages, de phages lytiques, et les dynamiques bactériennes associées dans une matrice telle que le cidre ou d'autres matrices alimentaires fermentées. Une piste serait notamment de faire ces suivis de phageomes et de prophages sur des processus fermentaires plus longs, comme par exemple ceux

du cidre destiné à la distillation pour la production de Calvados ou encore destinée à la production de vinaigre de cidre, plutôt que sur des processus de fermentation courts du cidre pour la consommation en bouteille (Trček et al., 2016).

III.5.2.2 Influence des phages sur la structure et le métabolisme d'une communauté microbienne modèle

De nombreux travaux se basent sur des communautés modèles afin d'étudier les relations entre microorganismes. Les modèles de communautés modèles prenant en compte le rôle des phages sont très peu utilisés et concernent essentiellement le microbiote intestinal. Par exemple, comme décrit précédemment, une partie des travaux de recherche auxquels j'ai pris part a montré que les communautés de phages autochtones permettaient un retour rapide à l'équilibre du microbiote de souris suite à une dysbiose dans un système modèle (Draper et al., 2020), travaux présentés en partie III-4. Toujours dans un microbiote modèle chez la souris, il a également été mis en évidence que les phages influencent les dynamiques des populations microbiennes ainsi que leur métabolisme (Hsu et al., 2019).

Ainsi, afin d'évaluer l'impact des phages sur une communauté microbienne alimentaire modèle, une perturbation des équilibres microbiens a été créée. Les dynamiques microbiennes et le métabolisme de la communauté ont été suivis. Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique (Ledormand et al., 2022c), dont sont extraites les figures et la synthèse des résultats présentées dans cette partie.

La communauté modèle était constituée de la souche de levure *Saccharomyces uvarum* UCMA 10446, de la souche *Oenococcus oeni* UCMA 19297, du couple *L. mali* UCMA 16447 – phage UCMA 21115, et du couple *Leuconostoc mesenteroides* CIM 3004 – phage PLE01, en milieu MRS. Les niveaux cellulaires des quatre souches ont été standardisés pour constituer la communauté modèle afin que chaque souche atteigne 10^4 - 10^5 UFC/mL au bout de 24 h à 25°C. Une perturbation était alors créée par application d'un choc thermique (50°C, 10 min). Les phages étaient ajoutés dans la communauté perturbée 24 h après le choc thermique dans le but d'observer leur effet sur la communauté microbienne en état de déséquilibre. Ainsi, trois conditions ont été suivies : une condition témoin sans perturbation et sans phages (C), une condition avec perturbation et sans ajout de phages (D) et une condition avec perturbation et ajout de phages (P). Les populations microbiennes ont ainsi été suivies pendant sept jours au moyen de dénombrements et par analyse de leur métabolisme par HPLC et GC-MS. Les expérimentations ont été répétées trois fois. Les dynamiques des populations ont été étudiées au moyen d'une analyse statistique des résultats de dénombrements et de composition avec R (v 4.1.2) et Prism (tests de Kruskal-Wallis et de Dunn [test non paramétrique de comparaisons multiples] avec une p-value ajustée par la méthode de Benjamini-Hochberg). Des valeurs de p-value $\leq 0,05$ étaient considérées comme significatives. Des analyses en composantes principales (ACP) ont également été réalisées avec R, pour chaque temps, et en ne retenant que les variables avec une contribution supérieure à 3 et une valeur de \cos^2 supérieure à 0,5 (pour les dimensions 1 et 2).

Les dénombrements de la condition P étaient significativement plus proches de la condition C ($p < 0,05$), que de la condition D (Figure 17 A). A 168 h (fin du suivi de la communauté), les populations microbiennes des conditions C et P étaient à des niveaux semblables en terme de dénombrements, avec 10^7 - 10^8 UFC/mL pour *O. oeni* UCMA 19297 et *L. mali* UCMA 16447, et 10^3 - 10^5 UFC/mL pour *Ln. mesenteroides* CIM 3004 et *S. uvarum* UCMA 10446. La condition D était différente. En effet, à partir de 72 h, *L. mali* UCMA 16447 et *Ln. mesenteroides* CIM 3004 étaient dominantes (10^7 - 10^8 UFC/mL) tandis que *O. oeni* UCMA 19297 et *S. uvarum* UCMA 10446 étaient retrouvées à de plus faibles concentrations (10^5 - 10^6 UFC/mL). Les populations de phages étaient similaires à 168 h, puisque le phage UCMA 21115 était présent à une concentration 10^9 UFP/mL tandis que le phage PLE01 était à 10^8 UFP/mL (Figure 17 A). A 25°C, il a donc été montré que les phages semblaient participer à un retour



à l'équilibre des populations microbiennes de la communauté modèle suite à une perturbation avant l'ajout des phages, pour tendre vers un état semblable à celui retrouvé dans la condition témoin n'ayant pas subi de perturbation.

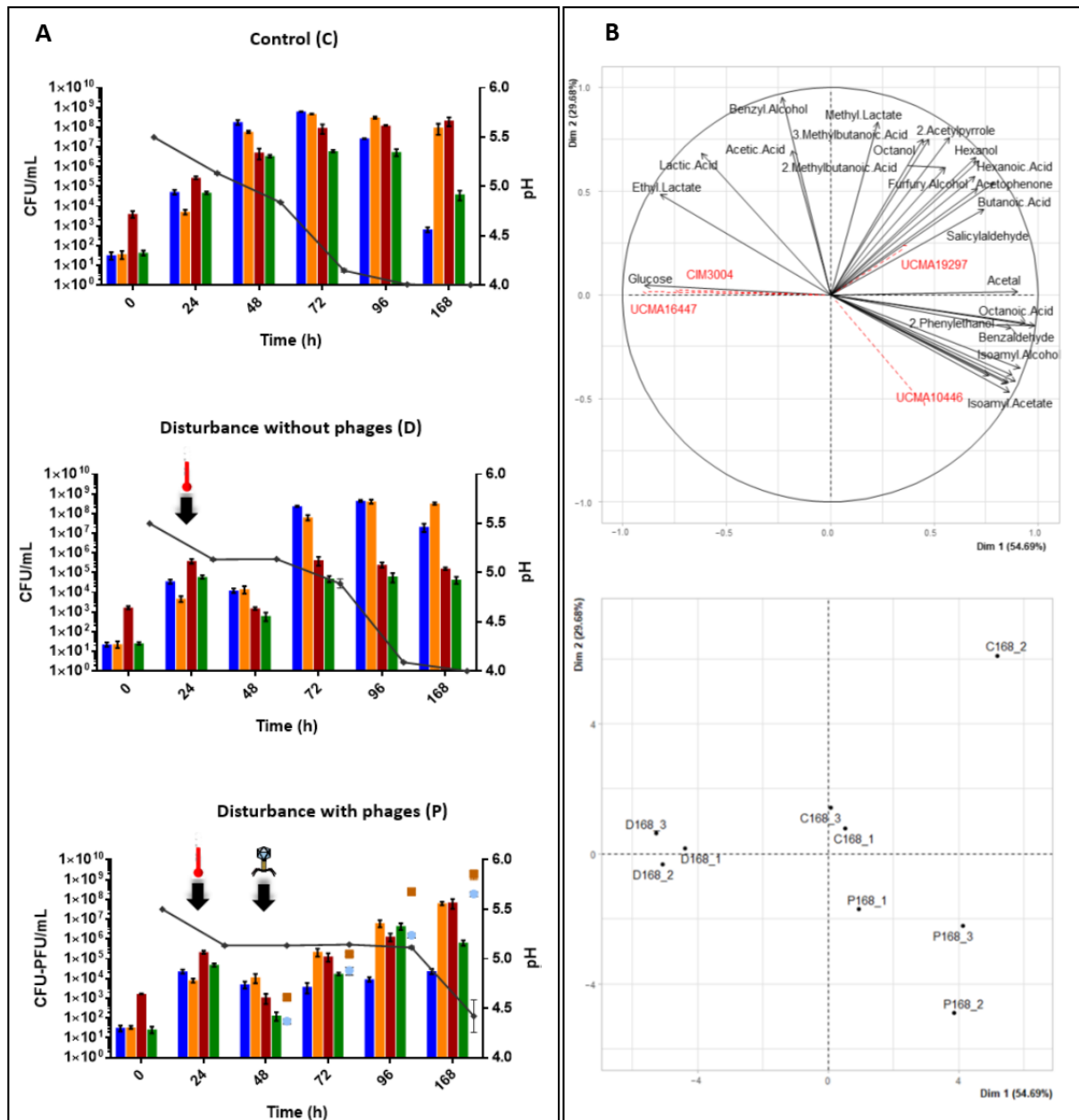


Figure 17 : Suivi de la communauté modèle à 25°C. A : Dynamiques des populations microbiennes et courbe de pH (courbe noire) dans les trois conditions expérimentales (témoin, perturbation sans phage et perturbation avec phages). *Ln. mesenteroides* CIM 3004 est représenté en bleu, *L. mali* UCMA 16447 en orange, *O. oeni* UCMA 19297 en rouge et *S. uvarum* UCMA 10446 en vert. Le phage UCMA 2115 (carrés oranges) a été ajouté à une MOI de 0,1 et le phage PLE001 (cercles bleus) à une MOI de 0,01. Les flèches noires indiquent le choc thermique et l'ajout de phage. Les valeurs présentées sont des moyennes et écarts-types issus de trois répliques biologiques. **B : Analyse en Composantes Principales des composés étudiés** (flèches noires) avec des variables illustratives (flèches rouges) représentant les quatre souches de la communauté microbienne modèle et **Distribution des échantillons** dans la condition C (témoin), la condition D (perturbation sans ajout de phages) et la condition P (perturbation et ajout de phages) à 168h. Les échantillons sont nommés de la manière suivante : Condition (C : témoin, D : perturbation sans ajout de phages, P : perturbation et ajout de phages) Temps (168 h)_Réplica biologique (1, 2, 3) (Par exemple, C168_1 signifie Témoin à 168h, réplique biologique 1) (Ledormand et al., 2022c).

La consommation des sucres, la production d'éthanol, et la production de composés organiques volatils ont été suivies au cours du temps, avec 32 composés retenus pour l'ACP (Figure 17 B). Les signatures métaboliques des conditions C et P étaient proches avec une plus grande richesse en composés volatils comme les esters éthyliques (octanoate d'éthyle, hexanoate d'éthyle et 2-phényl-



éthanol) que dans la condition D, elle-même caractérisée par des niveaux plus élevés en lactate d'éthyle, par exemple. Ces résultats confirment par la même occasion ceux obtenus par l'observation des niveaux cellulaires des souches de la communauté modèle dans chaque condition.

Le même dispositif expérimental a été mis en œuvre à 15°C (Figure 18 A).

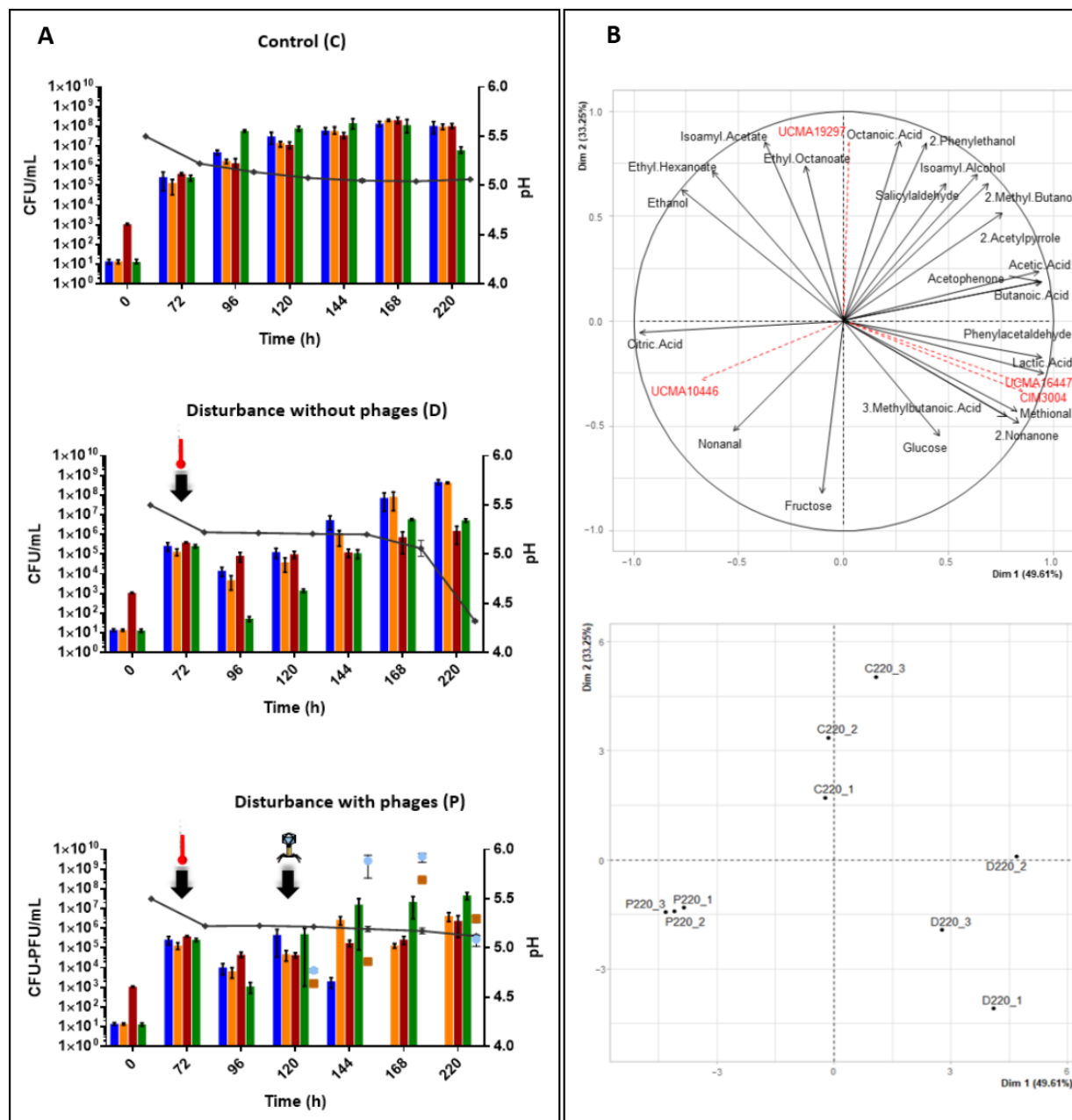


Figure 18 : Suivi de la communauté modèle à 15°C. A : Dynamiques des populations microbiennes et courbe de pH (courbe noire) de la communauté modèle dans les trois conditions expérimentales (témoin, perturbation sans phage et perturbation avec phages). *Ln. mesenteroides* CIM 3004 est représenté en bleu, *L. mali* UCMA 16447 en orange, *O. oeni* UCMA 19297 en rouge et *S. uvarum* UCMA 10446 en vert. Le phage UCMA 21115 (carrés oranges) a été ajouté à une MOI de 0,1 et le phage PLE001 (cercles bleus) à une MOI de 0,01. Les flèches noires indiquent le choc thermique et l'ajout de phage. Les valeurs présentées sont des moyennes et écarts-types issus de trois répliques biologiques. **B : Analyse en Composantes Principales des composés étudiés** (flèches noires) avec des variables illustratives (flèches rouges) représentant les quatre souches de la communauté microbienne modèle et **Distribution des échantillons** dans la condition C (témoin), la condition D (perturbation sans ajout de phages) et la condition P (perturbation et ajout de phages) à 220h. Les échantillons sont nommés de la manière suivante : Condition (C : témoin, D : perturbation sans ajout de phages, P : perturbation et ajout de phages) Temps (220h)_Réplique biologique (1, 2, 3) (Par exemple, C220_1 signifie Témoin à 220h, réplique biologique 1) (Ledormand et al., 2022c).



A 15°C, les fluctuations des niveaux cellulaires de la condition P étaient significativement plus éloignées de celles des conditions C et D ($p < 0,05$) (Figure 18 A). En effet, après l'ajout des phages, et particulièrement après 144 h, la population de *Ln. mesenteroides* CIM 3004 était indétectable (inférieure au seuil de détection de 10^1 UFC/mL) alors que les autres souches microbiennes atteignaient environ 10^7 UFC/mL. Les conditions C et D étaient similaires puisque toutes les souches ont été retrouvées à des concentrations comprises entre 10^7 et 10^8 UFC/mL. Les populations de phages étaient similaires à 220 h, puisque le phage UCMA 21115 était présent à une concentration de 10^6 UFP/mL tandis que le phage PLE01 était à 10^5 UFP/mL. Contrairement à l'expérimentation à 25°C, il a ainsi été observé que les phages amplifiaient le phénomène de perturbation de la communauté microbienne, à cette température basse.

A 15°C, la signature métabolique de chaque condition reflétait également les tendances observées pour les dénombrements microbiens (Figure 18 B). En effet, la signature métabolique de la condition P était différente de celle des conditions C et D. Par exemple, des composés comme le phényl-acétaldéhyde, le lactate, le citrate, et l'acétate étaient retrouvés en plus grande quantité dans les conditions C et D que dans la condition P. Cependant, les différences entre les trois conditions étaient moins bien marquées que pour l'expérience réalisée à 25°C.

Ces travaux ont donc permis de mettre en évidence le rôle important joué par les phages au sein des communautés microbiennes d'origine alimentaire, tant au niveau des dynamiques de populations, que sur le métabolisme qui en découle. Cette étude a également montré que les phages, au-delà de l'impact sur leur hôte, influencent également le comportement des autres populations du modèle. Il a été montré que les phages pouvaient avoir une action différente en fonction des paramètres de l'écosystème dans lequel ils se trouvent, comme illustré dans ce cas avec une température différente. Enfin, ce travail souligne également la nécessité de tenir compte des phages dans les procédés de fermentation, dont l'impact peut être non négligeable dans des écosystèmes encore plus complexes, et selon les paramètres physico-chimiques des différentes étapes des procédés de fermentation. L'influence des phages sur les dynamiques et les métabolismes microbiens pourrait ainsi se répercuter sur la qualité organoleptique du produit fini, par exemple, à travers la différence de composition en composés organiques volatils, qui eux-mêmes influencent grandement le profil aromatique des produits auxquels ils sont associés.

III.5.2.3 Réponse de la souche *L. mali* UCMA 16447 à l'infection par le phage UCMA 21115

La réponse d'une souche bactérienne infectée par un phage est peu décrite dans la littérature. Quelques études portent sur des pathogènes (Chatterjee et al., 2020; Chevallereau et al., 2016; Lavigne et al., 2013; Leskinen et al., 2016; Zhao et al., 2016) mais, en ce qui concerne les bactéries d'intérêt alimentaire, seule la réponse transcriptomique et protéomique de *Lactococcus lactis* a été étudiée (Ainsworth et al., 2013; Fallico et al., 2011; Lemay et al., 2020, 2019).

De plus, actuellement, les approches pour étudier les interactions phages-bactéries sont essentiellement basées sur des modèles ne tenant compte que du couple phage-hôte seul, négligeant ainsi la place des communautés microbiennes constituant les écosystèmes. L'originalité de cette étude se trouvait dans le fait que cette interaction phage-bactérie se passait au contact d'une communauté bactérienne, pour créer des conditions susceptibles de favoriser les interactions entre les souches, afin de mimer ce qui peut se produire dans une boisson fermentée telle que le cidre.

D'ailleurs, pour le cidre, aucune donnée n'est disponible sur le comportement des souches bactériennes lors de l'infection par des phages. Ainsi, le but de cette partie du travail était de caractériser la réponse de la souche *L. mali* UCMA 16447 lors de l'infection par son phage UCMA 21115, par une approche combinant la métatranscriptomique (RNASeq) et la métaprotéomique



(spectrométrie de masse nLC-MS). Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique (Ledormand et al., 2022a), dont sont extraites la synthèse des résultats et les figures présentées dans cette partie. Malgré la faible occurrence des phages lytiques constatée dans le cidre (Ledormand et al., 2022b), le siphophage UCMA 21115 ciblant la souche *L. mali* UCMA 16447 a pu être isolé et caractérisé (Figure 19).

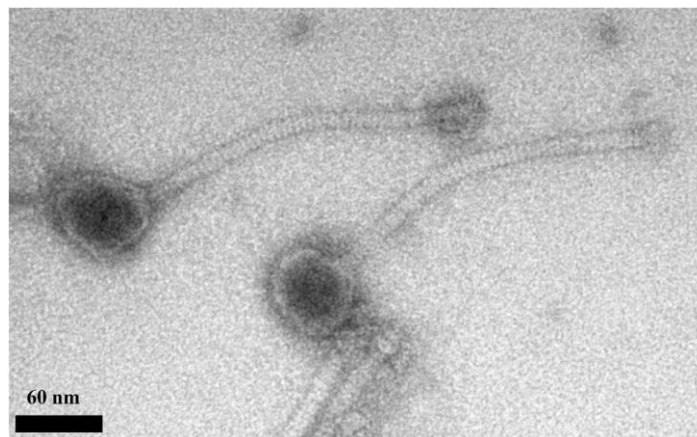


Figure 19 : Morphologie du phage UCMA 21115 obtenue par microscopie électronique en transmission (Ledormand et al., 2022a).

Le phage UCMA 21115 appartient à la classe des *Caudoviricetes* et possède une morphologie classique avec une tête d'un diamètre de 60 ± 3 nm ($n = 3$) et une queue non contractile d'une longueur de 223 ± 5 nm ($n = 3$). Son génome est de 27915 pb avec un contenu G+C de 36,3%, et compte 42 ORF.

Le couple phage UCMA 21115-*L. mali* UCMA 16447 a été utilisé dans un modèle d'infection afin d'analyser la réponse de la souche lors de l'infection phagique. Le couple phage-bactérie était placé au sein d'une communauté bactérienne modèle lors de l'infection. L'expérimentation s'est déroulée de la manière suivante. Une communauté modèle a été constituée. Pour cela, quatre souches, *i.e.* *L. mali* UCMA 19420, *Secundilactobacillus collinoides* UCMA 16566, *S. collinoides* UCMA 20009, et *Lactobacillaceae* sp. nov. UCMA 15818 (espèce non publiée), ont été cultivées 16 h en bouillon MRS à 30°C, puis ont servi à inoculer 1 L de MRS à 1% (*i.e.* 10 ml de chaque souche). La communauté modèle a ensuite été incubée à 30°C jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,2. En parallèle, 5 ml de pré-culture de la souche *L. mali* UCMA 16447 ont servi à inoculer 500 ml de bouillon MRS, avant incubation à 30°C jusqu'à une DO_{600nm} de 0,2. A ce stade, la culture de *L. mali* UCMA 16447 a été divisée en deux fractions : l'une recevant le phage UCMA 21115 et l'autre non. Les deux fractions ont été immédiatement placées dans des boudins de dialyse (MWCO 12000–14,000, ROTH) et immergées dans la communauté modèle. Les boudins de dialyse permettaient de contenir le couple phage-bactérie tout en permettant les échanges potentiels de molécules entre *L. mali* UCMA 16447 et les quatre souches de la communauté modèle (Saraoui et al., 2013). L'incubation du dispositif a été poursuivie à 30°C. Des échantillons des boudins de dialyse ont été prélevés à 0, 15 et 60 min après le début de l'infection pour extraire l'ARN et les protéines de la souche *L. mali* UCMA 16447 en vue d'une analyse par RNASeq et par protéomique respectivement. A T0 et T60, des échantillons de la communauté modèle ont aussi été prélevés pour une analyse protéomique. L'expérience a été répétée trois fois. Les résultats de transcriptomique ont été analysés avec SARTools DESeq2 v.1.7.3 (Varet et al., 2016) avec les paramètres par défaut. Les transcrits de gènes avec une p-value ajustée (adjusted p-value) $p < 0,05$ et un $|\text{fold change Log2}| \geq 1$ (considéré comme une augmentation ou une diminution d'expression d'au moins 2 fois) étaient considérés comme différentiellement exprimés entre deux conditions.

Ce dispositif expérimental n'a pas permis d'identifier de protéines différemment exprimées dans le communauté modèle en présence de la souche *L. mali* UCMA 16447 infectée ou non. Ceci est probablement dû au temps court (60 min) ne permettant pas de voir de différence significative d'expression de protéines à l'échelle de la communauté. Une approche métatranscriptomique sur cette communauté pourrait apporter plus d'informations sur les possibles changements d'expression dans ce dispositif expérimental pour de futurs travaux (Monnet et al., 2016).

Pendant l'infection phagique, 122 et 215 gènes de *L. mali* UCMA 16447 étaient différemment exprimés à T15 et T60 respectivement, par rapport à la condition sans phages. Les mêmes tendances étaient observées au niveau des protéines, avec 28 protéines différemment exprimées à T60. D'une manière générale les gènes codant pour des fonctions cellulaires telles que le métabolisme des carbohydrates, la translation et la transduction du signal étaient sous-exprimés, alors que des gènes impliqués dans le métabolisme des nucléotides et du contrôle de l'intégrité de l'ADN étaient surexprimés pendant l'infection (Figure 20).

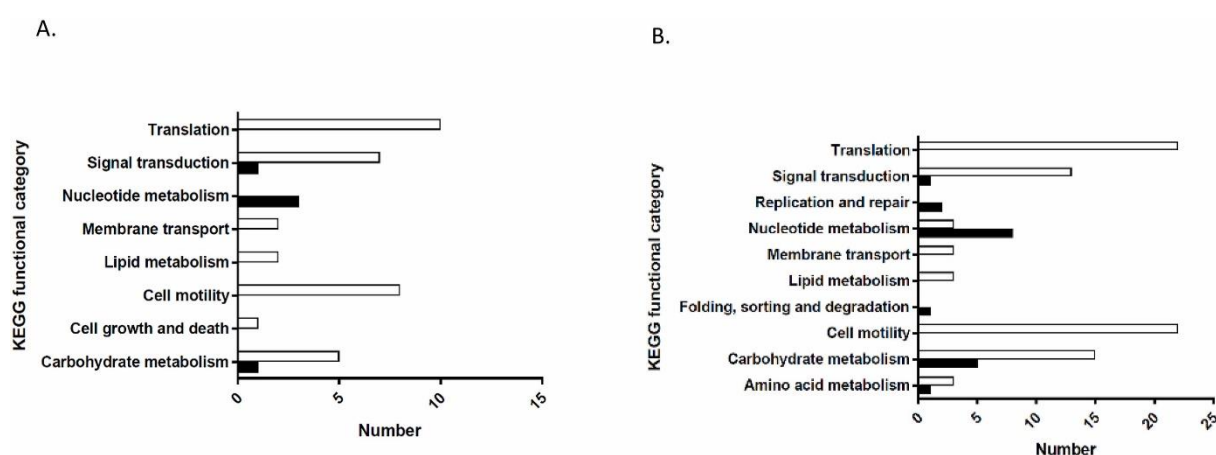


Figure 20 : Principales fonctions de *L. mali* UCMA 16447 impactées pendant l'infection par le phage UCMA 21115 à deux temps de l'infection par RNA-Seq. Les graphes montrent les gènes différemment exprimés après 15 min d'infection (A) et après 60 min d'infection (B). Les barres noires indiquent les gènes induits et les barres blanches les gènes réprimés en comparaison avec la condition non infectée au même temps. (Ledormand et al., 2022a)

Les gènes de la glycolyse étaient également affectés par l'infection phagique avec la répression des gènes codant pour la phosphofructokinase (*pfk* ; fold change Log2 = -1,24), pour la glyceraldehyde 3-phosphate déhydrogénase (*gpdh* ; fold change Log2 = -1,21), pour la phosphoglycérate kinase (*pgk* ; fold change Log2 = -1,40), pour la phosphoglycérate mutase (*pgm* ; fold change Log2 = -1,02) et pour la triose phosphate isomérase (*tpi* ; fold change Log2 = -1,27) (Figure 21).

Inversement, le gène codant pour la D-lactate déhydrogénase (*ldh* ; fold change Log2 = 1,33) était fortement induit pendant l'infection phagique (Figure 21), suggérant un impact de l'infection sur le métabolisme du lactose. La surexpression du gène codant pour la fructose-1,6-biphosphatase-3 (*fbp* ; fold change Log2 = 1,99), qui a une activité antagoniste de la PFK, renforce l'hypothèse d'une inhibition de la glycolyse (Figure 21).

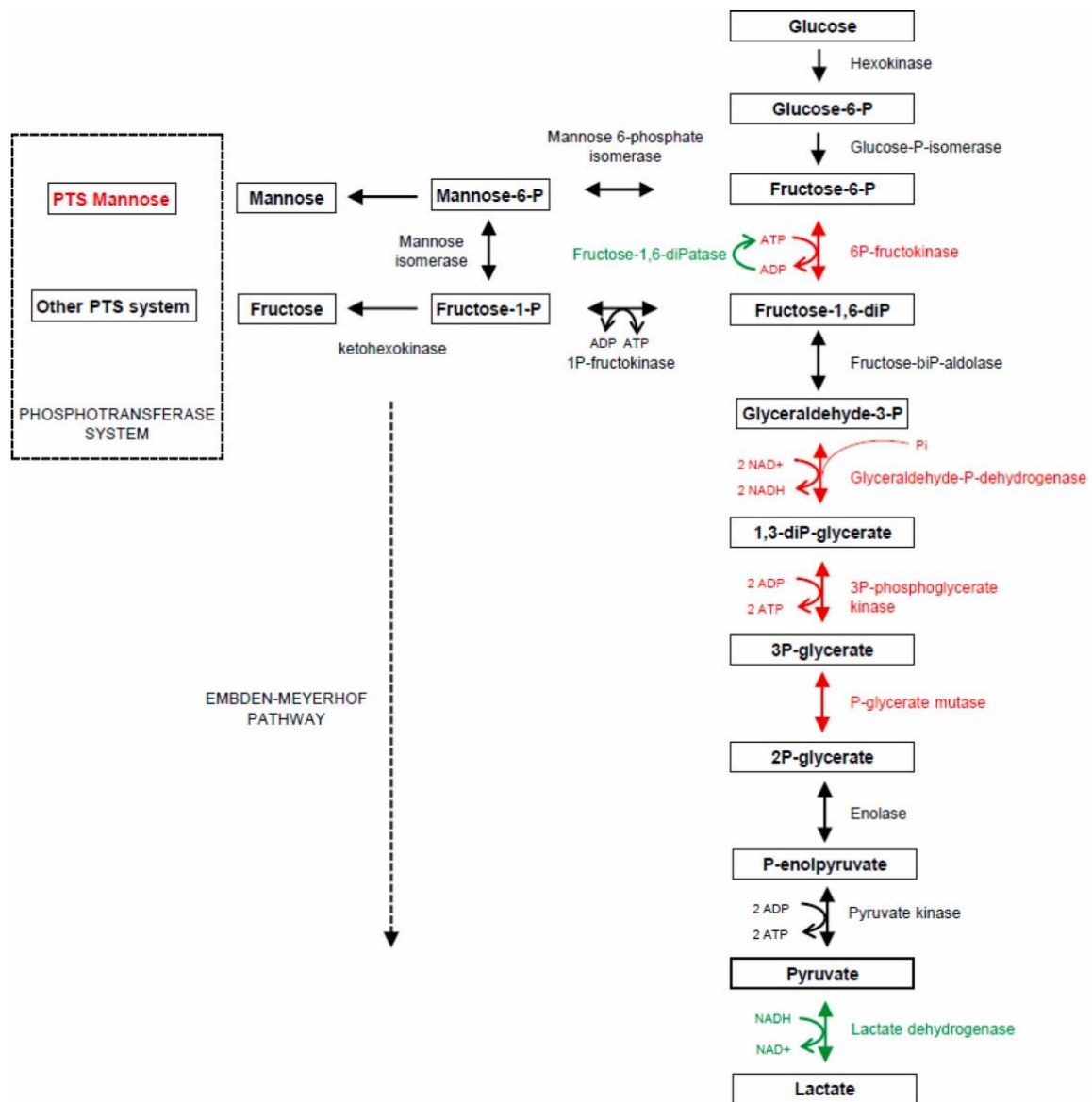


Figure 21 : Voie d'Embden-Meyerhof chez la souche *L. mali* UCMA 16447 pendant l'infection par le phage UCMA 21115 (Ledormand et al., 2022a)

Ce travail a aussi mis en évidence que l'infection phagique entraînait la répression des gènes impliqués dans la motilité de *L. mali* UCMA 16447. Après 60 min d'infection, 26 gènes codant pour des protéines du flagelle étaient réprimés comme des constituants du corps basal (par exemple, *fliE* : fold change Log2 = -1,12 ; *fliR* : fold change Log2 = -1,29), du crochet (par exemple, *flgB* : fold change Log2 = -1,78 ; *flgD* : fold change Log2 = -1,69), et du filament (par exemple, *fliS* : fold change Log2 = -2,94). De plus, onze gènes impliqués dans le chimiotactisme étaient également réprimés, dont notamment un gène codant une protéine MCP (methyl-accepting chemotaxis protein) pour la régulation du système flagellaire (fold change Log2 = -2,73).

Au niveau protéique, l'impact de l'infection sur la répression du système flagellaire était confirmé avec une forte répression de la flagelline. Plusieurs hypothèses ont été émises mais seraient encore à vérifier. Une hypothèse serait que des mécanismes cellulaires pourraient être mis en œuvre chez *L. mali* UCMA 16447 lors de l'infection pour réduire la production de flagelles, connus pour être des récepteurs de phages chez de nombreuses espèces bactériennes (Baldvinsson et al., 2014; Choi Younho et al., 2013; Evans et al., 2010), et ainsi potentiellement contrer l'infection. Lors de l'infection phagique chez *Agrobacterium* sp., il a été constaté que la motilité cellulaire était nécessaire pour



permettre le transfert du phage vers un récepteur de la membrane cellulaire (Gonzalez et al., 2018). Une hypothèse basée sur ce résultat pourrait être que chez *L. mali* UCMA 16447, la répression du système flagellaire serait alors possiblement un moyen de prévenir ou, du moins, de ralentir l'infection. Une autre possibilité serait que la répression du système flagellaire provoquée par l'infection phagique permettrait une économie d'énergie à l'avantage du phage comme cela a été montré pour un phage infectant la bactérie motile *Bacillus thuringiensis* (Wu et al., 2014).

III.5.3 Conclusions

Les écosystèmes alimentaires restent, pour grande partie, une « boîte noire » dans laquelle les interactions microbiennes, et en particulier le rôle des phages, sont difficiles à étudier. Des verrous techniques sont encore à lever notamment en ce qui concerne l'isolement de phages lytiques libres de ces matrices fermentées.

Ce travail de thèse a néanmoins permis d'apporter de nouvelles connaissances sur les communautés de phages dans notre boisson fermentée modèle, le cidre. Ces travaux ont soulevé la question du rôle écologique joué par les phages dans cette boisson, et peut-être plus largement dans les boissons fermentées, au vu de leur faible occurrence dans le cidre. En outre, ces travaux de recherche ont souligné le rôle important des phages sur les dynamiques microbiennes et le métabolisme de communautés microbiennes modèles. Cette thèse a également mis en évidence d'importantes perturbations cellulaires provoquées par une infection phagique chez une souche de l'espèce *L. mali*.





PROJET DE RECHERCHE





IV- Projet de recherche

IV. 1 Objectifs scientifiques

La poursuite de mes travaux de recherche se fera dans la thématique « Rôle des communautés de phages dans les matrices d'intérêt alimentaire », domaine qui reste encore à explorer largement. A ce jour, la diversité et le rôle des communautés de phages au sein des écosystèmes alimentaires sont peu connus. Il apparaît intéressant de s'interroger sur la place des phageomes en tant que moteurs des dynamiques microbiennes, et au-delà sur leur impact sur la qualité des produits fermentés. Les phages sont des acteurs à part entière des processus de fabrication des aliments, et à ce titre, ils méritent d'être plus largement étudiés, et pris en compte.

Deux projets ont déjà été identifiés pour le développement de cette thématique à court et moyen terme, et sont présentés dans cette partie. Le projet SURPHAGES va débuter fin 2023, pour une durée de 42 mois, et s'intéressera à l'implication des phages dans les défauts d'affinage des fromages par une approche ciblée via le développement d'outils moléculaires notamment, et par une approche plus globale de métaviromique. SURPHAGES a déjà obtenu un financement de la part du CNIEL (interprofession laitière) et une demande de financement complémentaire PNDAR (FranceAgrimer) a été faite lors de l'appel à projets en février 2023.

L'autre projet envisagé à moyenne échéance sera dans la continuité des travaux de thèse de Pierre Ledormand afin de poursuivre l'exploration de la place des phages dans les matrices de type produits végétaux fermentés, et en particulier des boissons fermentées, et de leurs interactions avec les communautés microbiennes associées. Il est prévu de réaliser ce travail dans le cadre d'une nouvelle thèse par la demande d'un financement RIN Doctorant Région Normandie ou d'une bourse ministérielle via le concours de l'Ecole doctorale NBISE par exemple.

IV. 2 Projet SURPHAGES : Rôle des phages des bactéries non acidifiantes dans l'affinage des fromages

IV.2.1 Contexte, objectifs et stratégie du projet

La réflexion autour du rôle écologique des communautés de phages dans les aliments fermentés a débouché sur le montage d'un projet de recherche avec une collaboration de l'équipe MALIM, de l'institut technique Actalia (porteur du projet), de l'INRAe SayFood et du CNIEL (interprofession laitière), dans le cadre d'un co-financement CNIEL- PNDAR FranceAgriMer.

La surface des fromages héberge une communauté microbienne très riche, composée de nombreuses espèces fongiques et bactériennes (Irlinger et al., 2014; Wolfe et al., 2014). La présence de phages dans l'industrie laitière est connue et de nombreux travaux ont porté notamment sur les phages infectant des bactéries lactiques de ferments comme *Lc. lactis* et *Strep. thermophilus* (Lavelle et al., 2018; Mahony et al., 2017; Murphy et al., 2013). La diversité des communautés de phages au sein des écosystèmes fromagers est en revanche moins bien décrite. Certains travaux se sont intéressés aux phages présents dans des lactosérums (Muhammed et al., 2017). Des travaux plus récents utilisant également une approche de métagénomique virale ont permis de révéler la présence, en surface d'un fromage de type pâte molle à croûte lavée, d'une communauté phagique également très dense et très diversifiée (>100 contigs viraux différents détectés) (Dugat-Bony et al., 2020). La comparaison des séquences obtenues avec des bases de données de génomes de phages isolés a permis de prédire les hôtes potentiels d'un certain nombre d'entre eux, parmi lesquels on retrouve la plupart des bactéries dominantes détectées en surface de ce fromage, dont certaines espèces sont connues pour être ensemencées volontairement en tant que ferments d'affinage. Plusieurs contigs n'avaient en revanche pas suffisamment d'identité avec les génomes de phages connus et leurs hôtes restaient donc inconnus à ce stade.



Si les phages capables d'infecter les ferments lactiques acidifiants ont fait l'objet de nombreuses recherches, seulement quelques publications scientifiques font état de l'isolement et de la caractérisation de phages infectant des bactéries d'affinage, notamment *Propionibacterium freudeunreichii* (Cheng et al., 2018; Gautier et al., 1995) et *Brevibacterium aurantiacum* (de Melo et al., 2020). Une étude récente s'est intéressée à cinq phages virulents, infectant des souches de bactéries d'affinage telles que *Glutamicibacter arilaitensis*, *Psychrobacter aquimaris*, *B. aurantiacum* et *Leuconostoc falkenbergense* (Paillet et al., 2022). L'analyse de leurs génomes a montré que la grande majorité d'entre eux sont nouveaux (faible homologie de séquence avec d'autres phages connus), soulignant encore le manque d'informations actuellement disponibles sur ce type de phages.

Dans ce contexte, le projet SURPHAGES cherche à étudier la diversité des phages des bactéries d'affinage non acidifiantes et de connaître leur impact sur le produit fini. Ainsi, il est prévu de constituer une collection de phages capables d'infecter des ferments non acidifiants pour lesquels peu de représentants sont actuellement disponibles. Les phages isolés feront l'objet d'une caractérisation approfondie : évaluation du spectre d'hôtes et des conditions d'infectiosité, caractérisation morphologique et séquençage du génome. Parallèlement aux étapes d'isolement, les échantillons collectés feront l'objet d'une analyse non ciblée, par une approche de métagénomique virale, avec pour objectif d'estimer la diversité virale dans les différents produits étudiés et d'ajuster les isollements en conséquence. Enfin, la caractérisation des phages des bactéries non acidifiantes permettra de développer des outils rendant possible leur recherche, et le cas échéant, leur quantification dans des échantillons de produits laitiers et d'environnements laitiers.



IV.2.2 Déroulement du projet

Le projet SURPHAGES s'articulera autour de cinq actions (Figure 22). J'assurerai la co-coordination de trois des cinq actions du projet. Il est également prévu que j'encadre un(e) ingénieur(e) d'études pour une durée de 34 mois.

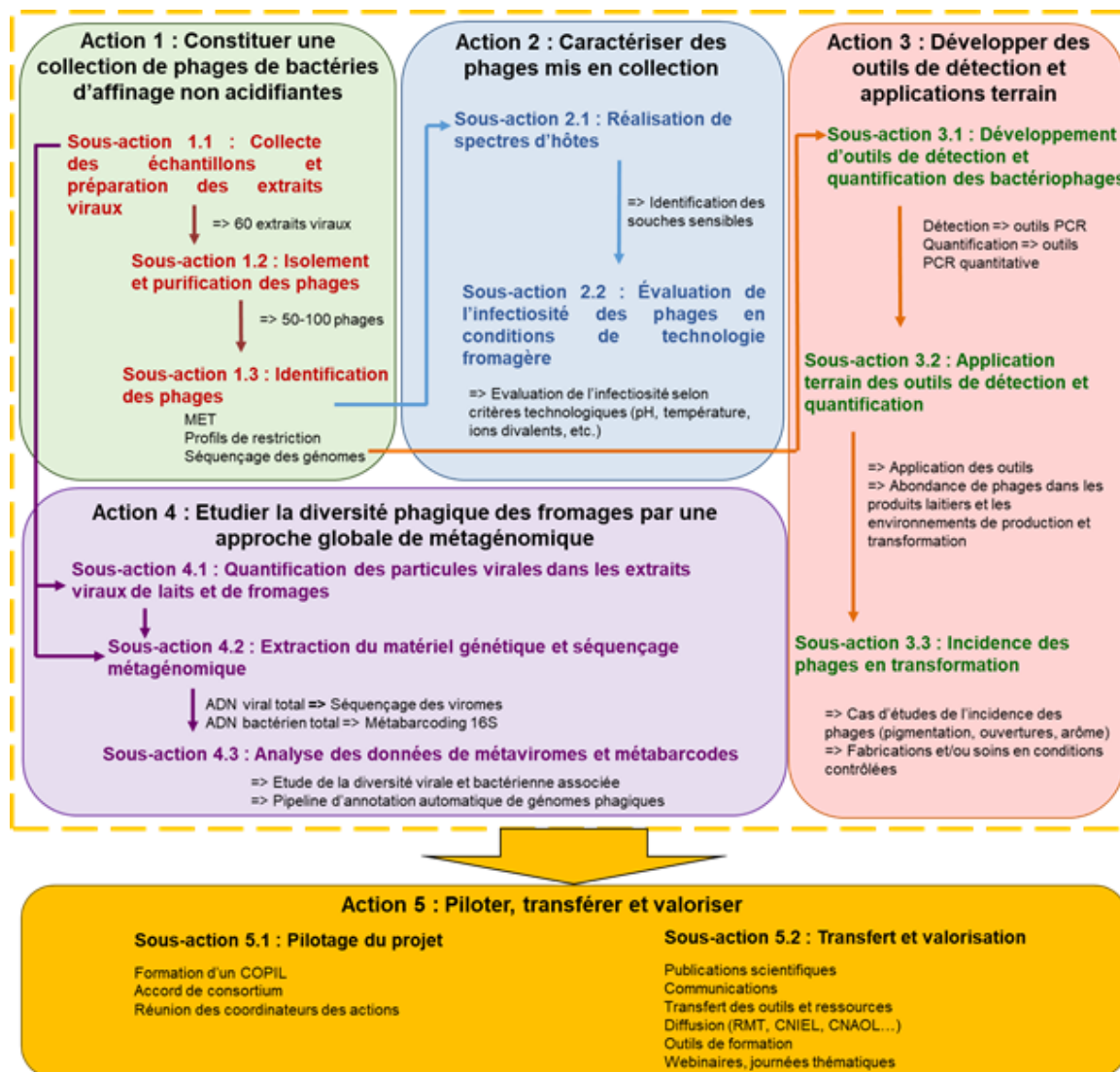


Figure 22 : Organisation et contenu des volets (WP) du projet SURPHAGES.

Les actions 1 et 2 auront pour but la constitution d'une banque de 50 à 100 phages de bactéries d'affinage non acidifiantes et leur caractérisation (séquençage de génomes, MET, spectre d'hôtes, etc.). Brièvement, les espèces bactériennes ciblées seront *Brevibacterium aurantiacum* (linens), *Lactocaseibacillus* (anciennement *Lactobacillus*) *casei/paracasei*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Hafnia alvei*, *Staphylococcus xylosus/equorum*, *Corynebacterium casei*, *Glutamicibacter* (anciennement *Arthrobacter*) *arilaitensis*. L'isolement des phages et la préparation des extraits viraux se fera à partir de 60 échantillons minimum incluant des fromages de technologies variées, avec ou sans défauts d'affinage, et des laits crus.

L'action 3 aura pour enjeu de mettre au point des outils pour (i) détecter et quantifier la présence de phages d'intérêts dans les produits et environnements laitiers, (ii) de faire la corrélation entre la présence de ces phages et leur impact sur les bactéries d'intérêt laitier, (iii) et, le cas échéant, de faire



la corrélation entre la présence de phages et l'impact sur les qualités organoleptiques des produits. Des cas d'études seront mis en œuvre afin d'étudier l'impact de phages d'intérêt sur l'apparition de certains défauts comme des défauts d'ouverture, de pigmentation ou encore d'arôme.

La diversité des viromes et des communautés associées sera évaluée dans l'action 4 à l'aide d'approches métagénomiques. Cela permettra d'évaluer la diversité des phages selon les technologies fromagères et de développer des outils d'analyse de ces données de métaviromes, notamment via la mise au point de pipelines d'annotation automatique des génomes de phages qui n'existent pas actuellement.

La valorisation et le transfert des résultats obtenus dans ce projet fera l'objet du volet transversal (action 5).

IV.2.3 Résultats et retombées attendus

Ce projet sur les phages des bactéries non acidifiantes permettra de renforcer les liens déjà existants entre les partenaires du projet (université de Caen Normandie, Actalia et Inrae SayFood) dans le cadre d'une collaboration sur une période étendue (42 mois). Ces liens consolideront l'expertise et contribueront à poursuivre le développement de la thématique des phages dans le domaine des aliments en France, à ce jour toujours peu étudiée.

Le projet SURPHAGES permettra également d'acquérir des connaissances scientifiques manquantes à l'heure actuelle sur la diversité de ces phages de bactéries d'affinage non acidifiantes par leur séquençage de génomes et les informations concernant leur morphologie. Les apports de connaissances concernant leur physiologie donneront probablement des clés pour améliorer encore la maîtrise des procédés de fabrication en ce qui concerne la qualité organoleptique des fromages. En effet, le projet permettra d'apporter des connaissances, des recommandations, et des outils aux professionnels impliqués dans le projet (CNIEL) pour une meilleure maîtrise des phages de bactéries d'affinages non acidifiantes.

L'analyse des métaviromes permettra d'avoir une vision globale de la composition en phages des échantillons étudiés, indépendamment du choix de certaines bactéries hôtes. Elle représentera en cela une base de connaissances complémentaires à la constitution d'une collection pour de futures investigations. Ce projet apportera également des informations sur la prévalence de ces phages dans des produits et des environnements laitiers. De possibles réservoirs de ces phages pourront ainsi être identifiés. L'enrichissement des bases de données génomiques internationales avec de nouveaux génomes et métagénomes de phages constitue également un élément essentiel d'apport de connaissances sur les phages auquel le projet SURPHAGES contribuera à étoffer.

Les différents outils développés dans le cadre de ce projet permettront l'investigation de cas d'études individuels ultérieurs et l'accélération de futurs projets (validation/adaptation des protocoles d'isolement des phages et de tests de résistance, détection et quantification dans des produits laitiers et des environnements laitiers, mise au point d'un pipeline d'annotation automatique des génomes viraux, validation des protocoles d'extraction, ...).

La valorisation et le transfert des connaissances acquises dans ce projet permettront de mettre en avant la recherche sur la thématique.

IV.3 Interactions phages-bactéries dans les matrices végétales fermentées (Projet VégéPhage)

Pour la poursuite des travaux initiés lors de la thèse de Pierre Ledormand (projet Phageome), il apparaît intéressant de se questionner sur le fait que les phages lytiques semblent peu abondants dans le cidre, et peut être dans d'autres matrices végétales fermentées. Qu'est-ce que ce type d'écosystème a de particulier par rapport à d'autres habitats hostiles dans lesquels les phages sont trouvés ?



Pourquoi les phages lytiques, ont, a priori, plus de mal à s'adapter à ce type de matrice malgré l'abondance des bactéries composant cet écosystème ?

Il est donc intéressant de poursuivre ces travaux, pour creuser les axes suivants élargis à d'autres matrices alimentaires : (i) améliorer les connaissances sur la composition des communautés de phages des aliments fermentés ; (ii) comprendre les mécanismes impliqués dans les relations phages-hôtes au sein de communautés alimentaires. Ainsi, il est envisagé de diviser le projet en trois phases ou work packages (WP) :

WP1 : Diversité des phages de produits alimentaires fermentés d'origine végétale

La première partie du travail sera de suivre l'évolution des phageomes (lytiques et prophages) au cours de processus de fabrication de produits végétaux tels que le cidre à distiller, le vinaigre de cidre, ou encore des produits à base d'autres végétaux fermentés. Une collaboration avec des producteurs locaux, déjà partenaires du laboratoire MALIM, sera établie pour la collecte d'échantillons.

Tâche 1.1 : Développement méthodologique pour l'isolement de phages et l'extraction de leur ADN

Une première partie du volet WP1 visera à poursuivre la mise au point de la méthodologie d'isolement des phages et de l'extraction de leur ADN dans ce type de matrices végétales fermentées, entreprise dans le projet Phageome. En effet, il a été observé que l'ajustement du pH d'échantillons de cidre à une valeur de 5,5 permettait de mieux extraire l'ADN phagique dans des échantillons artificiellement ensemencés en phages (Ledormand et al., 2022b). Lors de ce travail, l'ADN phagique a été extrait directement après ajustement du pH. Ainsi, un développement méthodologique intéressant à tester serait d'ajuster le pH des échantillons à 5,5 et d'attendre au minimum une nuit avant de réaliser l'extraction d'ADN ou de chercher à isoler des phages lytiques potentiellement présents dans les échantillons. Le pH pouvant probablement influencer le potentiel infectieux des phages, ces conditions d'extraction pourraient favoriser une meilleure extraction et/ou isolement de phages lytiques dans des matrices fermentées vraisemblablement peu riches naturellement en phages lytiques. De même, mener en parallèle la collecte d'isolats bactériens issus des mêmes échantillons pourrait améliorer la recherche et l'isolement de phages lytiques.

Tâche 1.2 : étude des phageomes et des phages « signatures » de processus de fermentation

Ensuite, les phageomes lytiques et/ou les prophages seront étudiés par approche de séquençage à haut débit (shotgun) à différentes étapes de la fabrication. Une collaboration avec l'unité Maiage (INRAE) est envisagée pour le traitement des données de séquençage, comme cela a déjà été fait lors du projet Phageome, ainsi qu'une formation (ou perfectionnement) du doctorant et/ou de ses encadrants à l'analyse des données de shotgun sont prévues.

En parallèle, une banque de phages issus de ces matrices végétales fermentées sera constituée. Lors du projet Phageome et lors de travaux antérieurs au laboratoire, il est apparu que la population bactérienne en début de la fermentation du cidre est composée de genres bactériens tels que *Zymomonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Gluconobacter*, puis leur succèdent des genres appartenant aux bactéries lactiques (*Lactobacillus sensu lato*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*) (Ledormand et al., 2022b; Misery et al., 2021). Ainsi, il est prévu de se servir de souches bactériennes appartenant à ces différents genres pour maximiser les chances d'isoler la plus grande diversité de phages possible. Les phages lytiques isolés seront caractérisés (temps de latence, burst size, structure du virion en MET) et leurs génomes séquencés.

Les données de phageomes et les génomes de phages seront ensuite comparés afin d'identifier finement les éventuels réservoirs de phages pendant la fabrication, et possiblement d'identifier des phages marqueurs de la diversité microbienne, ou des phages signatures d'un atelier par exemple. Des techniques de détection par PCR pourront également être utilisées afin d'identifier les réservoirs de phages d'intérêt comme décrit dans le cas de phages de fromage (Paillet et al. 2022). Brièvement, à



partir des extraits viraux préparés sur différents échantillons servant à l'étude des phageomes, réservoirs potentiels de phages, la présence de phages sera recherchée par méthode en double couche sur les souches indicatrices. La présence des phages d'intérêt sera alors effectuée, après remise en suspension des plaques, par PCR à l'aide d'amorces spécifiques designées au préalable.

Cette partie du travail permettra de poursuivre l'apport de connaissances sur la boîte noire que constitue le phageome des écosystèmes alimentaires et en particulier des produits végétaux fermentés.

WP2 : Exploration et étude du rôle des prophages dans des souches issues de matrices végétales fermentées

Tâche 2.1 : Constitution d'une banque de souches issues de matrices fermentées et séquençage de leurs génomes

En parallèle du WP1, des souches issues des échantillons de boissons fermentées utilisés pour l'étude des phageomes seront collectées. Ces souches appartiendront, entre autres, aux genres *Zymomonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus sensu lato*, *Oenococcus*, *Leuconostoc* et/ou *Pediococcus*. Leurs génomes seront séquencés en vue d'être explorés pour la recherche de prophages.

Tâche 2.2 : Etude des prophages des souches séquencées

Les prophages identifiés dans les génomes des souches seront comparés au moyen de RAST qui permet d'obtenir une annotation automatique des génomes de phages (McNair et al., 2018). Les prophages ainsi identifiés pourront également être comparés à ceux des bases de données comme réalisés dans l'étude de (Claisse et al., 2021). Ils seront également comparés aux données de métagénomique des phageomes obtenues dans le WP1

Lorsque des prophages entiers seront trouvés, leur induction sera testée notamment avec de la mitomycine C à 0,1 et 1 µg/ml.

Cette partie du travail permettra d'avoir une meilleure vision de la présence de prophages dans des souches issues de matrices végétales fermentées comme le cidre par exemple, et de possiblement en établir une phylogénie. Cela complétera les données de métagénomique obtenues lors du WP1 avec une approche culturale. Les données obtenues dans ce volet de la thèse apporteront des éléments de connaissance concernant le rôle des phages dans la fitness des bactéries dans les aliments fermentés comme cela a pu être étudié chez *O. oeni* dans le vin (Claisse et al., 2021).

WP3 : Potentiel des phages comme moteurs des communautés microbiennes des aliments fermentés

La troisième partie du travail de thèse s'attachera aux interactions phages-bactéries au sein de communautés modèles mimant un processus technologique.

Tâche 3.1 : Mise en place d'une communauté microbienne modèle

Ce travail s'appuiera sur le modèle de communauté microbienne développé dans le cadre de Phageome (Ledormand et al., 2022c). Les phages et leurs hôtes isolés du WP1 pourront servir à complexifier la communauté modèle existante afin de suivre son comportement en présence ou en l'absence de phages dans des fabrications pilotes. Le but sera de se rapprocher de conditions mimant un contexte de fabrication pour une observation *in situ* des relations phages-bactéries.



Tâche 3.2 : Suivi de la communauté pour comprendre l'influence des phages

L'étude de la réponse des bactéries de la communauté modèle se fera par une approche méthodologique alliant de la métatranscriptomique (RNASeq) (Ledormand et al., 2022a) et de la métabolomique (GC-MS et/ou UHPLC-MS/MS, HPLC) pour le suivi de la consommation et/ou de la production de carbohydrate, d'acides organiques, de composés d'arôme, etc. Des mesures de paramètres comme le pH, le potentiel Redox, le dosage de l'azote non protéique, et des dénombrements microbiens seront également effectués pour obtenir une image complète des dynamiques de la communauté modèle.

En complément, une approche ciblée de qPCR pourrait permettre de suivre de manière plus fine l'expression de certains gènes d'intérêt dans la communauté afin de décortiquer les mécanismes impliqués dans les relations phages-bactéries.

IV.4 Perspectives de recherche à plus long terme

A plus longue échéance, je souhaiterais développer également mes travaux de recherche dans le cadre de collaborations avec d'autres équipes françaises et internationales, en répondant à des appels à projets nationaux de type ANR, européens de type PRIMA par exemple, ou internationaux.

En effet, il me paraît intéressant de poursuivre ces questionnements autour des phages des écosystèmes alimentaires en s'intéressant à d'autres matrices ou écosystèmes alimentaires et d'aller solliciter des expertises notamment en bioinformatique, en modélisation des interactions microbiennes, ou pour l'étude de la structure des phages et des mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'infection par exemple.

Cela doit permettre d'approfondir les connaissances sur la diversité de ces entités biologiques probablement largement sous-estimée comme l'ont démontré par exemple Borrel et al. (2012). De même, les liens entre communautés bactériennes et phageomes sont encore à explorer, et surtout leur impact sur la qualité des produits alimentaires. Dans un contexte où nourrir la planète, et donc assurer la sécurité alimentaire pour tous, est devenu une préoccupation majeure (objectif stratégique 2 : « zéro » faim, du programme des Nations d'ici 2030), la problématique des phages est essentielle pour assurer la production d'aliments de qualité durable.

Enfin, un autre axe que je voudrais pouvoir continuer à explorer est celui concernant les phages comme agents antimicrobiens amorcé dans le projet CESam. Cette thématique représente également un enjeu majeur actuel pour répondre à la menace de la résistance bactérienne aux antibiotiques grandissante. Trouver des alternatives est essentiel même si la réglementation européenne actuelle n'est pas encore favorable à l'utilisation systématique des phages. Ces dernières années, un assouplissement de la réglementation a été constaté laissant présager que l'usage des phages va de plus en plus se développer, comme c'est déjà le cas aux Etats-Unis par exemple, ou des pays d'Europe de l'Est. Sur ces aspects, il reste également à fournir des éléments sur la persistance de l'ajout massif de phages dans un écosystème sur l'ensemble des communautés. Il faudrait vérifier si la phagothérapie peut générer les déséquilibres éventuels, avec quelles conséquences sur la résilience des écosystèmes. Il n'existe pas de données sur la persistance dans les environnements de phages ajoutés volontairement. Des modèles de co-évolution accélérée phages-communautés microbiennes sont sans doute à mettre en place pour répondre à ces questions.



V- Intégration dans le paysage local, moyens financiers et humains, et collaborations stratégiques

L'environnement de recherche et le réseau dans lequel mon projet de recherche s'inscrit sont décrits sur la Figure 23.

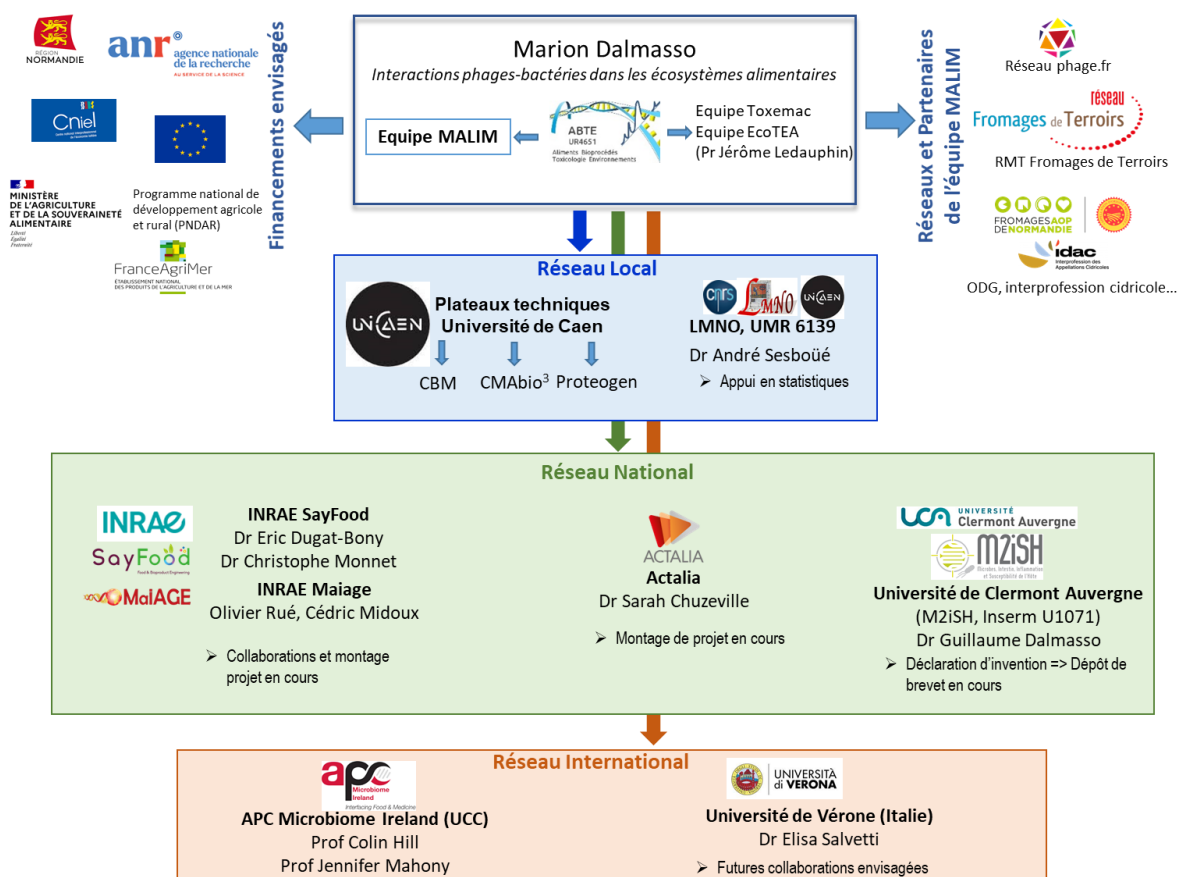


Figure 23 : Organigramme fonctionnel pour la réalisation de mon projet de recherche

Les axes stratégiques de recherche de l'équipe Matrices ALimentaires et Microbiotes (MALIM, UR4651 ABTE) visent à comprendre comment se structure le microbiote des aliments et quelles sont les interactions au sein des matrices d'intérêt alimentaire. La thématique « Interactions phages-bactéries dans les écosystèmes alimentaires » et le projet que je souhaite développer sont donc pleinement intégrés aux objectifs du laboratoire. Ce projet de recherche permet de renforcer les axes stratégiques du laboratoire en apportant une expertise dans un domaine émergent en France, celui des phages en alimentaire, et permettant de consolider les partenariats existants et d'en développer de nouveaux, offrant ainsi d'autres opportunités de collaborations et de financements pour le laboratoire. Dans ce contexte, mon projet de recherche est favorisé par ma place au sein de l'équipe MALIM, dans l'UR ABTE et les collaborations possibles avec les autres équipes de l'UR ABTE. Ceci a déjà eu lieu lors de la thèse de Pierre Ledormand, avec le Prof Jérôme Ledauphin (équipe EcoTEA) pour les analyse de GC-MS. D'autres collaborations sont envisagées et notamment pour l'utilisation de la UHPLC-MS/MS (Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS) disponible dans l'UR ABTE. Mes recherches bénéficient déjà de l'appui technique de plusieurs plateformes de l'Université de Caen Normandie (CBM, CMABio3, Proteogen). Il faut noter aussi que l'équipe MALIM bénéficie d'un soutien privilégié

pour les analyses statistiques grâce à sa collaboration avec le Dr André Sesboüé (LMNO, UMR6139 CNRS, Unicaen).

Mon projet peut également s'appuyer sur le réseau collaboratif solide de l'équipe MALIM avec les acteurs des filières cidricoles et fromagères de Normandie, et avec les réseaux professionnels, scientifiques et technologiques tels que le RMT Fromages de Terroirs et le réseau Bactériophages France auxquels MALIM participe. Depuis mon arrivée dans l'équipe MALIM, j'ai pu poursuivre ma formation aux analyses bioinformatiques sur Galaxy (métagénomique 16S avec FROGS, analyse RNASeq avec DESeq2) et aussi développer des collaborations dans ce domaine avec l'unité Inrae MaiAGE.

La réussite d'un projet dépend en partie des moyens humains et financiers qui y sont consacrés. J'ai donc développé une collaboration avec le Dr Eric Dugat-Bony (Inrae Sayfood) et le Dr Sarah Chuzeville (ACTALIA) pour construire mon projet de recherche, et en particulier au travers du projet SURPHAGES. Ceci doit me permettre de renforcer l'équipe MALIM par le recrutement d'un(e) ingénieur(e) d'études pendant 34 mois sur ce projet. Le financement du projet sera réalisé par un co-financement CNIEL et PNDAR Connaissance (FranceAgrimer).

Les autres moyens envisagés sont le recrutement d'un(e) doctorant(e) sur le projet VégéPhage via la demande d'une bourse RIN doctorant Région Normandie et/ou une bourse ministérielle par le concours de l'école doctorale nBISE, ou d'autres financements selon les opportunités. Mon projet de recherche s'insère d'ailleurs dans la stratégie de spécialisation intelligente du Programme Opérationnel régional FEDER-FSE/IEJ Normandie 2021-2027 (RI S3) de la Région Normandie, et en particulier dans le domaine de spécialisation « Préserver et transformer durablement les ressources agricoles, marines, sylvicoles et les systèmes de production / Qualité des systèmes de production ». En effet, à travers le déploiement de programme de financement de projets de recherche notamment, la région Normandie vise à favoriser l'émergence de projets de recherche et les collaborations « public-privé » dans les domaines stratégiques au regard des enjeux sociétaux actuels, dont dépend la durabilité des systèmes alimentaires et la garantie de la sécurité alimentaire.

Des dépôts de dossiers de financement par l'ANR seront aussi à considérer. Mon projet pourrait s'intégrer au domaine « Sciences de l'environnement », et plus particulièrement aux axes A.3 : Biologie des animaux, des organismes photosynthétiques et des microorganismes et/ou A.4 : Alimentation et systèmes alimentaires de ce dispositif national.

En collaboration avec le Dr Guillaume Dalmasso (M2iSH Inserm, Université de Clermont Auvergne), une déclaration d'invention concernant des phages a été réalisée en février 2022. Les opportunités de dépôt de brevet seront étudiées selon les résultats des expérimentations en cours.

D'autres perspectives de collaborations internationales sont en outre possibles grâce, notamment, à mes liens avec l'APC Microbiome Institute (University College Cork) depuis mes années de post-doctorat en Irlande, et avec le Dr Elisa Salvetti (Université de Vérone). Par exemple, il serait intéressant de développer un projet concernant les prophages dans les génomes bactériens au vu de l'expertise en génomique microbienne du Dr Elisa Salvetti, ou encore de collaborer sur des approches concernant les phages comme agents antimicrobiens avec l'équipe du Prof Colin Hill (UCC), expert dans ce domaine.



VI- Conclusion

Ma thématique de recherche s'intègre parfaitement dans les axes stratégiques développés au sein de l'équipe MALIM. Les différentes plateformes de l'Université de Caen Normandie, les compétences du laboratoire, ainsi que les collaborations mises en place avec d'autres équipes sont des atouts certains pour la bonne conduite de mes projets.

L'ensemble de mon projet de recherche apportera des éléments scientifiques pour une meilleure compréhension des relations existant entre phages et bactéries au sein des écosystèmes alimentaires. Mes recherches contribueront à lever une partie du voile sur la contribution des phages à la production d'aliments sûrs et durables, étant des acteurs à part entière des microbiotes alimentaires.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES





VII- Références bibliographiques

- Abdelsattar, A.S., Dawooud, A., Rezk, N., Makky, S., Safwat, A., Richards, P.J., El-Shibiny, A., 2021. How to train your phage: the recent efforts in phage training. *Biologics* 1, 70–88. <https://doi.org/10.3390/biologics1020005>
- Ackermann, H.-W., 2011. The first phage electron micrographs. *null* 1, 225–227. <https://doi.org/10.4161/bact.1.4.17280>
- Ackermann, H.-W., Prangishvili, D., 2012. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch Virol* 157, 1843–1849. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1383-y>
- Ainsworth, S., Zomer, A., Mahony, J., van Sinderen, D., 2013. Lytic infection of *Lactococcus lactis* by bacteriophages Tuc2009 and c2 triggers alternative transcriptional host responses. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4786. <https://doi.org/10.1128/AEM.01197-13>
- Baldvinsson, S.B., Sørensen, M.C.H., Vegge, C.S., Clokie, M.R.J., Brøndsted, L., 2014. *Campylobacter jejuni* motility is required for infection of the flagellotropic bacteriophage F341. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 7096–7106. <https://doi.org/10.1128/AEM.02057-14>
- Borrel, G., Colombet, J., Robin, A., Lehours, A.-C., Prangishvili, D., Sime-Ngando, T., 2012. Unexpected and novel putative viruses in the sediments of a deep-dark permanently anoxic freshwater habitat. *ISME J* 6, 2119–2127. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.49>
- Cai, L., Yang, Y., Jiao, N., Zhang, R., 2015. Evaluation of Tangential Flow Filtration for the Concentration and Separation of Bacteria and Viruses in Contrasting Marine Environments. *PLOS ONE* 10, e0136741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136741>
- Chatterjee, A., Willett, J.L.E., Nguyen, U.T., Monogue, B., Palmer, K.L., Dunny, G.M., Duerkop, B.A., 2020. Parallel genomics uncover novel enterococcal-bacteriophage interactions. *mBio* 11. <https://doi.org/10.1128/mBio.03120-19>
- Cheng, L., Marinelli, L.J., Grosset, N., Fitz-Gibbon, S.T., Bowman, C.A., Dang, B.Q., Russell, D.A., Jacobs-Sera, D., Shi, B., Pellegrini, M., Miller, J.F., Gautier, M., Hatfull, G.F., Modlin, R.L., 2018. Complete genomic sequences of *Propionibacterium freudenreichii* phages from Swiss cheese reveal greater diversity than *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* phages. *BMC Microbiology* 18, 19. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1159-y>
- Chevallereau, A., Blasdel, B.G., De Smet, J., Monot, M., Zimmermann, M., Kogadeeva, M., Sauer, U., Jorth, P., Whiteley, M., Debarbieux, L., Lavigne, R., 2016. Next-generation “-omics” approaches reveal a massive alteration of host RNA metabolism during bacteriophage infection of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Genetics* 12, e1006134. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006134>
- Chevallereau, A., Pons, B.J., van Houte, S., Westra, E.R., 2022. Interactions between bacterial and phage communities in natural environments. *Nature Reviews Microbiology* 20, 49–62. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00602-y>
- Choi Younho, Shin Hakdong, Lee Ju-Hoon, Ryu Sangryeol, 2013. Identification and characterization of a novel flagellum-dependent *Salmonella*-infecting bacteriophage, iEPS5. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 4829–4837. <https://doi.org/10.1128/AEM.00706-13>
- Claïsse, O., Chaïb, A., Jaomanjaka, F., Philippe, C., Barchi, Y., Lucas, P.M., Le Marrec, C., 2021. Distribution of prophages in the *Oenococcus oeni* species. *Microorganisms* 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040856>
- Clavijo-Coppens, F., Ginot, N., Cesbron, S., Briand, M., Jacques, M.-A., Ansaldi, M., 2021. Novel virulent bacteriophages infecting Mediterranean isolates of the plant pest *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas albilineans*. *Viruses* 13. <https://doi.org/10.3390/v13050725>
- Cota, I., Sánchez-Romero, M.A., Hernández, S.B., Pucciarelli, M.G., García-del Portillo, F., Casadesús, J., 2015. Epigenetic control of *Salmonella enterica* O-antigen chain length: a tradeoff between virulence and bacteriophage resistance. *PLOS Genetics* 11, e1005667. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005667>
- Cousin, F.J., Le Guellec, R., Schlusshuber, M., Dalmasso, M., Laplace, J.-M., Cretenet, M., 2017. Microorganisms in fermented apple beverages: current knowledge and future directions. *Microorganisms* 5. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030039>
- Cristobal-Cueto, P., García-Quintanilla, A., Esteban, J., García-Quintanilla, M., 2021. Phages in food industry biocontrol and bioremediation. *Antibiotics (Basel)* 10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070786>
- Dalmasso, M., Aubert, J., Briard-Bion, V., Chuat, V., Deutsch, S.-M., Even, S., Falentin, H., Jan, G., Jardin, J., Maillard, M.-B., Parayre, S., Piot, M., Tanskanen, J., Thierry, A., 2012a. A temporal-omic study of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1 adaptation strategies in conditions mimicking cheese ripening in the cold. *PLoS One* 7, e29083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029083>



- Dalmasso, M., Aubert, J., Even, S., Falentin, H., Maillard, M.-B., Parayre, S., Loux, V., Tanskanen, J., Thierry, A., 2012b. Accumulation of intracellular glycogen and trehalose by *Propionibacterium freudenreichii* under conditions mimicking cheese ripening in the cold. *Appl Environ Microbiol* 78, 6357–6364. <https://doi.org/10.1128/AEM.00561-12>
- Dalmasso, M., Bolocan, A.S., Hernandez, M., Kapetanakou, A.E., Kuchta, T., Manios, S.G., Melero, B., Minarovicova, J., Muhterem, M., Nicolau, A.I., Rovira, J., Skandamis, P.N., Stessl, B., Wagner, M., Jordan, K., Rodriguez-Lazaro, D., 2014a. Comparison of polymerase chain reaction methods and plating for analysis of enriched cultures of *Listeria monocytogenes* when using the ISO11290-1 method. *J Microbiol Methods* 98, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.12.018>
- Dalmasso, M., de Haas, E., Neve, H., Strain, R., Cousin, F.J., Stockdale, S.R., Ross, R.P., Hill, C., 2015. Isolation of a novel phage with activity against *Streptococcus mutans* biofilms. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138651>
- Dalmasso, M., Hennequin, D., Duc, C., Demarigny, Y., 2009. Influence of backslopping on the acidifications curves of “Tomme” type cheeses made during 10 successive days. *Journal of Food Engineering* 92, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.019>
- Dalmasso, M., Hill, C., Ross, R.P., 2014b. Exploiting gut bacteriophages for human health. *Trends Microbiol* 22, 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.010>
- Dalmasso, M., Jordan, K., 2014. Absence of growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated Cheddar cheese. *J Dairy Res* 81, 46–53. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000678>
- Dalmasso, M., Jordan, K., 2013. Process environment sampling can help to reduce the occurrence of “*Listeria monocytogenes*” in food processing facilities. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 52, 93–100.
- Dalmasso, M., Nicolas, P., Falentin, H., Valence, F., Tanskanen, J., Jatila, H., Salusjarvi, T., Thierry, A., 2011. Multilocus sequence typing of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int J Food Microbiol* 145, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.037>
- Dalmasso, M., Prestoz, S., Rigobello, V., Demarigny, Y., 2008a. Behavior of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* in a four *Lactococcus* strain starter during successive milk cultures. *Food Science and Technology International* 14, 469–477. <https://doi.org/10.1177/1082013208100533>
- Dalmasso, M., Prestoz, S., Rigobello, V., Demarigny, Y., 2008b. Evolution of the raw cow milk microflora, especially lactococci, enterococci, leuconostocs and lactobacilli over a successive 12 day milking regime. *International Journal of Dairy Science* 3, 117–130. <https://doi.org/10.3923/ijds.2008.117.130>
- Dalmasso, M., Strain, R., Neve, H., Franz, C.M.A.P., Cousin, F.J., Ross, R.P., Hill, C., 2016. Three new *Escherichia coli* phages from the human gut show promising potential for phage therapy. *PLoS One* 11, e0156773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156773>
- de Melo, A.G., Rousseau, G.M., Tremblay, D.M., Labrie, S.J., Moineau, S., 2020. DNA tandem repeats contribute to the genetic diversity of *Brevibacterium aurantiacum* phages. *Environmental Microbiology* 22, 3413–3428. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15113>
- De Paepe, M., Leclerc, M., Tinsley, C.R., Petit, M.-A., 2014. Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Front Cell Infect Microbiol* 4, 39–39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00039>
- Demarigny, Y., Dalmasso, M., Tonleu, A., Rigobello, V., Beuvier, E., Ly-Chatain, M.H., Bouton, Y., 2011. Influence of the backslopping practice on the microbial diversity of the *Lactococcus* population in a model cheesemaking. *Food and Nutrition Sciences* 2, 618–627. <https://doi.org/10.4236/fns.2011.26087>
- Desiere, F., Lucchini, S., Canchaya, C., Ventura, M., Brüssow, H., 2002. Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 73–91.
- Draper, L.A., Ryan, F.J., Dalmasso, M., Casey, P.G., McCann, A., Velayudhan, V., Ross, R.P., Hill, C., 2020. Autochthonous faecal viral transfer (FVT) impacts the murine microbiome after antibiotic perturbation. *BMC Biology* 18, 173. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00906-0>
- Duckworth, D.H., 1976. “Who discovered bacteriophage?”. *Bacteriol Rev* 40, 793–802. <https://doi.org/10.1128/br.40.4.793-802.1976>
- Dugat-Bony, E., Lossouarn, J., De Paepe, M., Sarthou, A.-S., Fedala, Y., Petit, M.-A., Chaillou, S., 2020. Viral metagenomic analysis of the cheese surface: A comparative study of rapid procedures for extracting viral particles. *Food Microbiology* 85, 103278. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103278>
- EFSA, 2016. Evaluation of the safety and efficacy of ListexTMP100 for reduction of pathogens on different ready-to-eat (RTE) food products.
- EFSA, ECDC, 2022. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report, EFSA Journal.
- Evans, T.J., Trauner, A., Komitopoulou, E., Salmond, G.P.C., 2010. Exploitation of a new flagellatropic phage of *Erwinia* for positive selection of bacterial mutants attenuated in plant virulence: towards phage therapy. *Journal of Applied Microbiology* 108, 676–685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04462.x>



- Evseev, P.V., Lukianova, A.A., Shneider, M.M., Korzhenkov, A.A., Bugaeva, E.N., Kabanova, A.P., Miroshnikov, K.K., Kulikov, E.E., Toshchakov, S.V., Ignatov, A.N., Miroshnikov, K.A., 2020. Origin and evolution of *Studiervirinae* bacteriophages infecting *Pectobacterium*: Horizontal transfer assists adaptation to new niches. *Microorganisms* 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111707>
- Fallico, V., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., McAuliffe, O., 2011. Genetic response to bacteriophage infection in *Lactococcus lactis* reveals a four-strand approach involving induction of membrane stress proteins, D-alanylation of the cell wall, maintenance of proton motive force, and energy conservation. *J Virol* 85, 12032–12042. <https://doi.org/10.1128/JVI.00275-11>
- Ferriol-González, C., Domingo-Calap, P., 2021. Phage therapy in livestock and companion animals. *Antibiotics (Basel)* 10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050559>
- Gambino, M., Brøndsted, L., 2021. Looking into the future of phage-based control of zoonotic pathogens in food and animal production. *Current Opinion in Biotechnology* 68, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.10.003>
- Garneau, J.E., Moineau, S., 2011. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microb Cell Fact* 10 Suppl 1, S20. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S20>
- Gautier, M., Rouault, A., Sommer, P., Briandet, R., 1995. Occurrence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in swiss cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2572–2576. <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2572-2576.1995>
- Gonzalez, F., Helm, R.F., Broadway, K.M., Scharf, B.E., 2018. More than rotating flagella: lipopolysaccharide as a secondary receptor for flagellotropic phage 7-7-1. *Journal of Bacteriology* 200, e00363-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00363-18>
- Guo, J., Yue, T., Yuan, Y., 2019. Impact of polyphenols on the headspace concentration of aroma compounds in apple cider. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99, 1635–1642. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9345>
- Howard-Varona, C., Hargreaves, K.R., Abedon, S.T., Sullivan, M.B., 2017. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *The ISME Journal* 11, 1511–1520. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.16>
- Hsu, B.B., Gibson, T.E., Yeliseyev, V., Liu, Q., Lyon, L., Bry, L., Silver, P.A., Gerber, G.K., 2019. Dynamic modulation of the gut microbiota and metabolome by bacteriophages in a mouse model. *Cell Host & Microbe* 25, 803-814.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.05.001>
- Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S., Dugat-Bony, E., 2014. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiology Letters* 362, 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu015>
- John, S.G., Mendez, C.B., Deng, L., Poulos, B., Kauffman, A.K.M., Kern, S., Brum, J., Polz, M.F., Boyle, E.A., Sullivan, M.B., 2011. A simple and efficient method for concentration of ocean viruses by chemical flocculation. *Environmental Microbiology Reports* 3, 195–202. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00208.x>
- Jung, M.-J., Kim, J., Lee, S.H., Whon, T.W., Sung, H., Bae, J.-W., Choi, Y.-E., Roh, S.W., 2022. Role of combined lactic acid bacteria in bacterial, viral, and metabolite dynamics during fermentation of vegetable food, kimchi. *Food Research International* 157, 111261. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111261>
- Jung, M.-J., Kim, M.-S., Yun, J.-H., Lee, J.-Y., Kim, P.S., Lee, H.-W., Ha, J.-H., Roh, S.W., Bae, J.-W., 2018. Viral community predicts the geographical origin of fermented vegetable foods more precisely than bacterial community. *Food Microbiology* 76, 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.010>
- Kasajima, I., Sasaki, K., Tanaka, Y., Terakawa, T., Ohtsubo, N., 2013. Large-scale extraction of pure DNA from mature leaves of *Cyclamen persicum* Mill. and other recalcitrant plants with alkaline polyvinylpyrrolidone (PVPP). *Scientia Horticulturae* 164, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.011>
- Kim, M.-S., Bae, J.-W., 2018. Lysogeny is prevalent and widely distributed in the murine gut microbiota. *ISME J* 12, 1127–1141. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0061-9>
- Lavelle, K., Murphy, J., Fitzgerald, B., Lugli, G.A., Zomer, A., Neve, H., Ventura, M., Franz, C.M., Cambillau, C., van Sinderen, D., Mahony, J., 2018. A decade of *Streptococcus thermophilus* phage evolution in an Irish dairy plant. *Appl Environ Microbiol* 84. <https://doi.org/10.1128/AEM.02855-17>
- Lavigne, R., Lecoutere, E., Wagemans, J., Cenens, W., Aertsen, A., Schoofs, L., Landuyt, B., Paeshuyse, J., Scheer, M., Schobert, M., Ceyssens, P.-J., 2013. A multifaceted study of *Pseudomonas aeruginosa* shutdown by virulent podovirus LUZ19. *mBio* 4, e00061-00013. <https://doi.org/10.1128/mBio.00061-13>
- Ledormand, P., Desmasures, N., Bernay, B., Goux, D., Rué, O., Midoux, C., Monnet, C., Dalmasso, M., 2022a. Molecular approaches to uncover phage-lactic acid bacteria interactions in a model community simulating fermented beverages. *Food Microbiology* 107, 104069. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104069>



- Ledormand, P., Desmaures, N., Dalmasso, M., 2021. Phage community involvement in fermented beverages: an open door to technological advances? *Food Microbiol* 61, 2911–2920. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1790497>
- Ledormand, P., Desmaures, N., Midoux, C., Rué, O., Dalmasso, M., 2022b. Investigation of the phageome and prophages in French cider, a fermented beverage. *Microorganisms* 10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061203>
- Ledormand, P., Desmaures, N., Schlusshuber, M., Sesboué, A., Ledauphin, J., Dalmasso, M., 2022c. Phages shape microbial dynamics and metabolism of a model community mimicking cider, a fermented beverage. *Viruses* 14. <https://doi.org/10.3390/v14102283>
- LeLievre, V., Besnard, A., Schlusshuber, M., Desmaures, N., Dalmasso, M., 2019. Phages for biocontrol in foods: What opportunities for *Salmonella* sp. control along the dairy food chain? *Food Microbiol* 78, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.009>
- Lemay, M.-L., Maaß, S., Otto, A., Hamel, J., Plante, P.-L., Rousseau, G.M., Tremblay, D.M., Shi, R., Corbeil, J., Gagné, S.M., Becher, D., Moineau, S., 2020. A lactococcal phage protein promotes viral propagation and alters the host proteomic response during infection. *Viruses* 12. <https://doi.org/10.3390/v12080797>
- Lemay, M.-L., Otto, A., Maaß, S., Plate, K., Becher, D., Moineau, S., 2019. Investigating *Lactococcus lactis* MG1363 response to phage p2 infection at the proteome level. *Molecular & Cellular Proteomics* 18, 704–714. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001135>
- Lepage, P., Leclerc, M.C., Joossens, M., Mondot, S., Blottière, H.M., Raes, J., Ehrlich, D., Doré, J., 2013. A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut* 62, 146–158. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301805>
- Leskinen, K., Blasdel, B.G., Lavigne, R., Skurnik, M., 2016. RNA-sequencing reveals the progression of phage-host interactions between ϕ R1-37 and *Yersinia enterocolitica*. *Viruses* 8. <https://doi.org/10.3390/v8040111>
- Loc Carrillo, C., Atterbury, R.J., el-Shibiny, A., Connerton, P.L., Dillon, E., Scott, A., Connerton, I.F., 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 71, 6554–6563. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6554-6563.2005>
- Maghsoodi, A., Chatterjee, A., Andricioaei, I., Perkins, N.C., 2019. How the phage T4 injection machinery works including energetics, forces, and dynamic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 25097–25105. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909298116>
- Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R.P., van Sinderen, D., 2011. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.008>
- Mahony, J., McDonnell, B., Casey, E., van Sinderen, D., 2016. Phage-host interactions of cheese-making lactic acid bacteria. *Annu Rev Food Sci Technol* 7, 267–285. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033322>
- Mahony, J., Moscarelli, A., Kelleher, P., Lugli, G.A., Ventura, M., Settanni, L., van Sinderen, D., 2017. Phage biodiversity in artisanal cheese wheys reflects the complexity of the fermentation process. *Viruses* 9. <https://doi.org/10.3390/v9030045>
- Mahony, J., van Sinderen, D., 2022. Virome studies of food production systems: time for ‘farm to fork’ analyses. *Current Opinion in Biotechnology* 73, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.06.014>
- Marston, M.F., Pierciey, F.J., Shepard, A., Gearin, G., Qi, J., Yandava, C., Schuster, S.C., Henn, M.R., Martiny, J.B.H., 2012. Rapid diversification of coevolving marine *Synechococcus* and a virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 4544–4549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120310109>
- McNair, K., Aziz, R.K., Pusch, G.D., Overbeek, R., Dutilh, B.E., Edwards, R., 2018. Phage genome annotation using the RAST pipeline. *Methods Mol Biol* 1681, 231–238. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9_17
- Middelboe, M., Holmfeldt, K., Riemann, L., Nybroe, O., Haaber, J., 2009. Bacteriophages drive strain diversification in a marine *Flavobacterium*: implications for phage resistance and physiological properties. *Environmental Microbiology* 11, 1971–1982. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01920.x>
- Miller, R.V., Ripp, S.A., 2002. Chapter 8 - Pseudolysogeny: a bacteriophage strategy for increasing longevity *in situ*, in: Syvanen, M., Kado, C.I. (Eds.), *Horizontal Gene Transfer* (Second Edition). Academic Press, London, pp. 81–91. <https://doi.org/10.1016/B978-012680126-2/50011-6>
- Mills, S., Shanahan, F., Stanton, C., Hill, C., Coffey, A., Ross, R.P., 2013. Movers and shakers: influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota. *Gut Microbes* 4, 4–16. <https://doi.org/10.4161/gmic.22371>
- Misery, B., Legendre, P., Rue, O., Bouchart, V., Guichard, H., Laplace, J.M., Cretenet, M., 2021. Diversity and dynamics of bacterial and fungal communities in cider for distillation. *International Journal of Food Microbiology* 339, 108987. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108987>



- Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A., Griffiths, M.W., 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella* Enteritidis during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J. Food Prot.* 64, 927–933.
- Monk, A. b., Rees, C. d., Barrow, P., Hagens, S., Harper, D. r., 2010. Bacteriophage applications: where are we now? *Letters in Applied Microbiology* 51, 363–369. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02916.x>
- Monnet, C., Dugat-Bony, E., Swennen, D., Beckerich, J.-M., Irlinger, F., Fraud, S., Bonnarme, P., 2016. Investigation of the activity of the microorganisms in a Reblochon-style cheese by metatranscriptomic analysis. *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00536>
- Mosimann, S., Desiree, K., Ebner, P., 2021. Efficacy of phage therapy in poultry: a systematic review and meta-analysis. *Poultry Science* 100, 101472. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101472>
- Muhammed, M.K., Kot, W., Neve, H., Mahony, J., Castro-Mejía, J.L., Krych, L., Hansen, L.H., Nielsen, D.S., Sørensen, S.J., Heller, K.J., Sinderen, D. van, Vogensen, F.K., 2017. Metagenomic Analysis of Dairy Bacteriophages: Extraction Method and Pilot Study on Whey Samples Derived from Using Undefined and Defined Mesophilic Starter Cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 83, e00888-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00888-17>
- Muhterem-Uyar, M., Dalmaso, M., Bolocan, A.S., Hernandez, M., Kapetanidou, A.E., Kuchta, T., Manios, S.G., Melero, B., Minarovičová, J., Nicolau, A.I., Rovira, J., Skandamis, P.N., Jordan, K., Rodríguez-Lázaro, D., Stessl, B., Wagner, M., 2015. Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control* 51, 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.042>
- Murphy, J., Royer, B., Mahony, J., Hoyle, L., Heller, K., Neve, H., Bonestroo, M., Nauta, A., van Sinderen, D., 2013. Biodiversity of lactococcal bacteriophages isolated from 3 Gouda-type cheese-producing plants. *Journal of Dairy Science* 96, 4945–4957. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6748>
- Norman, J.M., Handley, S.A., Baldridge, M.T., Droit, L., Liu, C.Y., Keller, B.C., Kambal, A., Monaco, C.L., Zhao, G., Fleshner, P., Stappenbeck, T.S., McGovern, D.P., Keshavarzian, A., Mutlu, E.A., Sauk, J., Gevers, D., Xavier, R.J., Wang, D., Parkes, M., Virgin, H.W., 2015. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 160, 447–460. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002>
- O’Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W.J., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., 2005. Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 274–279. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01762.x>
- O’Sullivan, L., Bolton, D., McAuliffe, O., Coffey, A., 2019. Bacteriophages in food applications: From foe to friend. *Annual Review of Food Science and Technology* 10, 151–172. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121747>
- Ott, S.J., Waetzig, G.H., Rehman, A., Moltzau-Anderson, J., Bharti, R., Grasis, J.A., Cassidy, L., Tholey, A., Fickenscher, H., Seegert, D., Rosenstiel, P., Schreiber, S., 2017. Efficacy of sterile fecal filtrate transfer for treating patients with *Clostridium difficile* infection. *Gastroenterology* 152, 799-811.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.010>
- Paillet, T., Dugat-Bony, E., 2021. Bacteriophage ecology of fermented foods: anything new under the sun? *Current Opinion in Food Science* 40, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.03.007>
- Paillet, T., Lossouarn, J., Figueroa, C., Midoux, C., Rué, O., Petit, M.-A., Dugat-Bony, E., 2022. Virulent phages isolated from a smear-ripened cheese are also detected in reservoirs of the cheese factory. *Viruses* 14. <https://doi.org/10.3390/v14081620>
- Park, E.-J., Kim, K.-H., Abell, G.C.J., Kim, M.-S., Roh, S.W., Bae, J.-W., 2011. Metagenomic Analysis of the Viral Communities in Fermented Foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1284. <https://doi.org/10.1128/AEM.01859-10>
- Poimenidou, S.V., Dalmaso, M., Papadimitriou, K., Fox, E.M., Skandamis, P.N., Jordan, K., 2018. Virulence gene sequencing highlights similarities and differences in sequences in *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains of clinical and food origin from 3 different geographic locations. *Front Microbiol* 9, 1103. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01103>
- Pourcel, C., Midoux, C., Vergnaud, G., Latino, L., 2017. A carrier state is established in *Pseudomonas aeruginosa* by phage LeviOr01, a newly isolated ssRNA levivirus. *J Gen Virol* 98, 2181–2189. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000883>
- Publications service, 2007. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D’Herelle, presented by Mr. Roux. *Research in Microbiology* 158, 553–554. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.07.005>
- Rasmussen, T.S., Mentzel, C.M.J., Kot, W., Castro-Mejía, J.L., Zuffa, S., Swann, J.R., Hansen, L.H., Vogensen, F.K., Hansen, A.K., Nielsen, D.S., 2020. Faecal virome transplantation decreases symptoms of type 2 diabetes and obesity in a murine model. *Gut* 69, 2122–2130. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320005>



- Riyaz-Ul-Hassan, S., Verma, V., Qazi, G.N., 2013. Real-time PCR-based rapid and culture-independent detection of *Salmonella* in dairy milk – addressing some core issues. *Letters in Applied Microbiology* 56, 275–282. <https://doi.org/10.1111/lam.12046>
- Rodríguez-Rubio, L., García, P., Rodríguez, A., Billington, C., Hudson, J.A., Martínez, B., 2015. Listeriaphages and coagulin C23 act synergistically to kill *Listeria monocytogenes* in milk under refrigeration conditions. *International Journal of Food Microbiology* 205, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.007>
- Rosend, J., Kaleda, A., Kuldjärv, R., Arju, G., Nisamedtinov, I., 2020. The effect of apple juice concentration on cider fermentation and properties of the final product. *Foods* 9. <https://doi.org/10.3390/foods9101401>
- Rosend, J., Kuldjärv, R., Rosenvald, S., Paalme, T., 2019. The effects of apple variety, ripening stage, and yeast strain on the volatile composition of apple cider. *Heliyon* 5, e01953. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01953>
- Samson, J.E., Moineau, S., 2013. Bacteriophages in food fermentations: new frontiers in a continuous arms race. *Annu Rev Food Sci Technol* 4, 347–368. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182541>
- Sánchez, A., de Revel, G., Antalick, G., Herrero, M., García, L.A., Díaz, M., 2014. Influence of controlled inoculation of malolactic fermentation on the sensory properties of industrial cider. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 41, 853–867. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1402-y>
- Saraoui, T., Parayre, S., Guernec, G., Loux, V., Montfort, J., Cam, A.L., Boudry, G., Jan, G., Falentin, H., 2013. A unique *in vivo* experimental approach reveals metabolic adaptation of the probiotic *Propionibacterium freudenreichii* to the colon environment. *BMC Genomics* 14, 911. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-911>
- Scholz, C.F.P., Kilian, M., 2016. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,.
- Shebs-Maurine, E.L., Torres, E.S., Yeh-Parker, Y., de Mello, A.S., 2020. Application of MS bacteriophages on contaminated trimmings reduces *Escherichia coli* O157 and non-O157 in ground beef. *Meat Science* 170, 108243. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108243>
- Shkoporov, A.N., Ryan, F.J., Draper, L.A., Forde, A., Stockdale, S.R., Daly, K.M., McDonnell, S.A., Nolan, J.A., Sutton, T.D., Dalmasso, M., McCann, A., Ross, R.P., Hill, C., 2018. Reproducible protocols for metagenomic analysis of human faecal phageomes. *Microbiome* 6, 68. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0446-z>
- Stalin, N., Srinivasan, P., 2017. Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Veterinary Microbiology* 207, 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.006>
- Switt, A.I.M., den Bakker, H.C., Vongkamjan, K., Hoelzer, K., Warnick, L.D., Cummings, K.J., Wiedmann, M., 2013. *Salmonella* bacteriophage diversity reflects host diversity on dairy farms. *Food Microbiol.* 36, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.014>
- Tindall, B.J., 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Sys Evol Microbiol* 55, 521–524. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63580-0>
- Tiwari, U., Cummins, E., Valero, A., Walsh, D., Dalmasso, M., Jordan, K., Duffy, G., 2015. Farm to fork quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* contamination in raw and pasteurized milk cheese in Ireland. *Risk Anal* 35, 1140–1153. <https://doi.org/10.1111/risa.12332>
- Tomat, D., Mercanti, D., Balagué, C., Quiberoni, A., 2013. Phage biocontrol of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during milk fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 57, 3–10. <https://doi.org/10.1111/lam.12074>
- Trček, J., Mahnič, A., Rupnik, M., 2016. Diversity of the microbiota involved in wine and organic apple cider submerged vinegar production as revealed by DHPLC analysis and next-generation sequencing. *International Journal of Food Microbiology* 223, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.007>
- Trmčić, A., Ralyea, R., Meunier-Goddik, L., Donnelly, C., Glass, K., D'Amico, D., Meredith, E., Kehler, M., Tranchina, N., McCue, C., Wiedmann, M., 2017. Consensus categorization of cheese based on water activity and pH—A rational approach to systemizing cheese diversity. *Journal of Dairy Science* 100, 841–847. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11621>
- Tuomala, H., Verkola, M., Meller, A., Van der Auwera, J., Patpatia, S., Järvinen, A., Skurnik, M., Heikinheimo, A., Kiljunen, S., 2021. Phage treatment trial to eradicate LA-MRSA from healthy carrier pigs. *Viruses* 13. <https://doi.org/10.3390/v13101888>
- Van Valen, L., 1977. The Red Queen. *The American Naturalist* 111, 809–810. <https://doi.org/10.1086/283213>



- Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.-Y., Dillies, M.-A., 2016. SARTools: a DESeq2- and EdgeR-based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq data. PLOS ONE 11, e0157022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157022>
- Wall, S.K., Zhang, J., Rostagno, M.H., Ebner, P.D., 2010. Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight swine. Appl. Environ. Microbiol. 76, 48–53.
- Wicklund, T., Skottheim, E.R., Remberg, S.F., 2020. Various factors affect product properties in apple cider production. International Journal of Food Studies 9, SI84–SI96.
- Wolfe, B.E., Button, J.E., Santarelli, M., Dutton, R.J., 2014. Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. Cell 158, 422–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>
- Wongsuntornpoj, S., Moreno Switt, A.I., Bergholz, P., Wiedmann, M., Chaturongakul, S., 2014. *Salmonella* phages isolated from dairy farms in Thailand show wider host range than a comparable set of phages isolated from U.S. dairy farms. Vet. Microbiol. 172, 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.023>
- Wu, D., Yuan, Y., Liu, P., Wu, Y., Gao, M., 2014. Cellular responses in *Bacillus thuringiensis* CS33 during bacteriophage BtCS33 infection. Journal of Proteomics 101, 192–204. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.016>
- Xu, Y., 2021. Phage and phage lysins: New era of bio-preservatives and food safety agents. Journal of Food Science 86, 3349–3373. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15843>
- Ye, M., Yue, T., Yuan, Y., 2014. Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider. Journal of the Science of Food and Agriculture 94, 2951–2957. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6639>
- Zhang, H., Yang, Z., Zhou, Y., Bao, H., Wang, R., Li, T., Pang, M., Sun, L., Zhou, X., 2018. Application of a phage in decontaminating *Vibrio parahaemolyticus* in oysters. International Journal of Food Microbiology 275, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.027>
- Zhao, X., Chen, C., Shen, W., Huang, G., Le, S., Lu, S., Li, M., Zhao, Y., Wang, J., Rao, X., Li, G., Shen, M., Guo, K., Yang, Y., Tan, Y., Hu, F., 2016. Global transcriptomic analysis of interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and bacteriophage PaP3. Sci Rep 6, 19237. <https://doi.org/10.1038/srep19237>

