

Les bactériophages : des alliés dans le
combat contre l'antibiorésistance
*Bacteriophages: allies in the fight against
antibiotic resistance*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°581, agriculture, alimentation, biologie,
environnement et santé (ABIES)

Spécialité de doctorat: Microbiologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute,
78350, Jouy-en-Josas, France.

Référent : AgroParisTech

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 23/09/2021, par**

Maud BILLAUD

Composition du Jury

Claire LE HENAFF

Professeure, INP Bordeaux

Présidente

Cécile BREYTON

Directrice de recherche, CNRS – Université Grenoble Alpes

Rapporteur & Examinatrice

Mart KRUPOVIC

Directeur de recherche, Institut Pasteur

Rapporteur & Examinateur

Clara TORRES-BARCELO

Chargée de recherche, INRAE Centre Provence-Alpes-Côtes d'Azur

Examinatrice

Direction de la thèse

Marie-Agnès PETIT

Directrice de recherche, INRAE Centre IDF Jouy-en-Josas-Antony

Directrice de thèse

Gaëlle DEMARRE

Chercheuse, Pherecydes Pharma

Co-encadrante & Examinatrice

Remerciements

Je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue tout au long de cette thèse, que ce soit directement en m'aidant à faire des expériences ou à écrire ce manuscrit, ou indirectement en m'encourageant dans les moments difficiles.

Tout d'abord, je remercie particulièrement ma directrice de thèse, Marie-Agnès Petit, pour son encadrement pendant ces trois années, ses encouragements et son implication.

Je remercie Patrick Champion-Arnaud, Gaëlle Demarre, mes co-encadrants de thèse de Pherecydes Pharma, ainsi que Cindy Fèvre, Directrice R&D à Pherecydes Pharma pour avoir suivi mes travaux durant ces 3 années.

Je souhaite exprimer ma gratitude aux personnes qui ont accepté d'évaluer mon travail. Je leur suis reconnaissante de leurs commentaires constructifs et précieux qui m'ont permis d'améliorer ce manuscrit. Je remercie donc les rapporteurs, Cécile Breyton et Mart Krupovic, ainsi que Claire Le Hénaff et Clara Torres-Barcelo qui seront les examinateurs.

Merci à Isabelle Vallet et Laurent Debarbieux, membres de mon comité de thèse pour leur regard critique, leurs commentaires et suggestions pertinentes.

Un grand merci aux personnes qui m'ont aidée pour effectuer les expérimentations et analyser les résultats de mes travaux :

- Emma Ollivier, qui a été ma stagiaire durant 3 mois, et qui a travaillé sur l'étude de l'infection des phages dans différents milieux, me permettant de gagner un temps précieux dans mes expériences,
- Julien Lossouarn, pour m'avoir expliqué et fourni différents protocoles dont j'avais besoin et soutenue moralement dans le laboratoire, en particulier durant les expériences de fluctuation dont nous nous souviendrons l'un et l'autre longtemps,
- Elisabeth Moncault, qui a reproduit les expériences d'infection en Sputum Media dont j'avais besoin pour mon article sur *Pseudomonas aeruginosa* et dont la bonne humeur est contagieuse,
- Christine Longin, pour sa patience et le partage de ses yeux aiguisés pour obtenir de belles photos de microscopie électronique.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu avoir des discussions constructives qui m'ont aidée à orienter ce projet, essentiellement à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRAE) dans l'Unité MICALIS dont l'équipe Phages fait partie, ainsi qu'à Pherecydes Pharma, l'entreprise dans laquelle je travaille et qui finance cette thèse.

Je remercie les personnes de l'équipe Phages, qui m'ont toutes aidée à divers moments : Marie-Agnès Petit, François Lecointe, Mariane De Paepe, Julien Lossouarn, Olivier Son et Elisabeth Moncault.

Je remercie Alice Eon-Bertho, assistante ingénieure dans l'équipe Phages durant les deux dernières années de ma thèse, ma voisine de paillasse durant de longues heures dans le laboratoire de niveau 2, sans elle le temps serait passé beaucoup moins vite.

Je remercie Pauline Misson et Romain Sausset, en thèse en même temps que moi, avec qui nous nous sommes serré les coudes, principalement en échangeant de bons moments et des gâteaux.

Je remercie de nouveau François Lecointe, mon voisin de bureau, pour m'avoir supportée durant ces trois années, et avoir été d'un soutien sans faille, surtout au sujet des références bibliographiques.

Mes remerciements vont enfin aux personnes qui m'ont soutenue dans ce travail d'endurance. En particulier, mes parents Stéphanie et Daniel Billaud, qui m'ont encouragée et aidée quand ils le pouvaient tout au long de cette thèse, ainsi que Julie LeNaour et Caroline Stoll, pour leur écoute, leurs conseils et leur patience. Grâce à vous quatre, j'ai parfois pu résoudre des problèmes tout simplement en en parlant, et en les reformulant. Aussi, je tiens à remercier Noëlla Baraquin, surnommée Tatie, pour son enthousiasme sur mon sujet de thèse, ses poèmes et son talent pour trouver et découper toutes coupures de journaux parlant de phagothérapie.

Table des matières

Introduction bibliographique.....	5
1. Les bactériophages	6
1.1. Définition	6
1.2. Phages virulents et phages tempérés : les différents modes de vie des phages	6
1.3. Classification des phages	12
1.4. Les phages de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2. L'antibiorésistance : une problématique globale	20
2.1. L'histoire des antibiotiques, et de l'apparition de l'antibiorésistance	20
2.2. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques	21
2.3. Les bactéries pathogènes du groupe ESKAPE	22
2.4. Les enjeux d'une telle crise.....	24
2.5. Quelles sont les solutions ? Il y a-t-il des solutions ?	25
3. La Phagothérapie.....	26
3.1. Histoire.....	26
3.2. Les phages et les GMP : quels critères pour garantir la qualité et la sûreté du produit ?	28
3.3. La Phagothérapie : les défis pour une utilisation à grande échelle	34
Résultats	43
1. Caractérisation de viromes de porcs : Analyses des phages et prophages.	48
1.1. Etudes des phages et des prophages trouvés dans 14 viromes de porcs.	48
1.2. Manuscrit de l'article n°1	54
2. Etudes des Phages de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94
2.1. Etudes de quatre phages virulents infectant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94
2.2. Manuscrit de l'article n°2.....	98
3. Resensibilisation d'un mutant <i>wzy</i> aux podovirus : par quel mécanisme ?.....	124
3.1. Le mutant <i>wzy</i> est resensibilisé au phage PP1792, et partiellement à PP1797. ...	124
3.2. L'adsorption de PP1792 est améliorée sur un mutant <i>wzy</i> , mais seulement en milieu minimum.....	127
3.3. Les gènes <i>flbB</i> et <i>rocS1</i> sont impliqués dans la résistance aux podoviridae en milieu riche.	129
Discussion	142
Références bibliographiques	149
Annexe	162
1. Rapport construction souche	162

Introduction bibliographique

1. Les bactériophages

1.1. Définition

Les bactériophages, aussi appelés phages, sont des virus infectant exclusivement les bactéries. Ils ont été découverts indépendamment par deux chercheurs au début du XXème siècle à seulement deux ans d'intervalle : Alan Twort et Félix d'Hérelle (D'Herelle, 2007; Twort, 1915). Ils ont d'abord été découverts par Twort en 1915 qui a pu en isoler sur des bactéries du genre *Micrococcus*. Il ne précise alors pas la nature de l'agent antibactérien isolé. C'est D'Hérelle qui, après avoir isolé des phages sur la bactérie *Shigella dysenteria*, les nommera « mangeurs de bactéries » en Grec : « bactériophages ». L'hypothèse que l'agent isolé était de nature virale sera confirmée bien plus tard, par Ruska qui observera un phage au microscope électronique pour la première fois en 1940 (Ackermann, 2011).

1.2. Phages virulents et phages tempérés : les différents modes de vie des phages

Les phages peuvent être séparés en deux grandes catégories en fonction de leur mode de vie, c'est-à-dire leur comportement dans la bactérie : les phages virulents et les phages tempérés.

1.2.1. Les phages virulents

Les phages virulents se propagent uniquement par cycles lytiques, en tuant la bactérie. Au cours de ce cycle lytique, ils se fixent sur la bactérie cible via un récepteur spécifique, injectent leur matériel génétique à l'intérieur de la bactérie puis, à l'aide des ressources de cette dernière, ils se multiplient. La membrane et la paroi bactérienne sont ensuite lysées, provoquant la mort de la bactérie hôte et la libération de dizaines voire de centaines d'autres bactériophages identiques à l'original. Ces phages, une fois libérés, vont à leur tour infecter de nouvelles bactéries et se multiplier ainsi en chaîne. Ces phages virulents sont ceux utilisés en phagothérapie.

1.2.2. Les phages tempérés

Les phages tempérés alternent entre cycles lytiques et lysogéniques. Une fois qu'ils ont injecté leur matériel génétique dans la bactérie, ils vont soit initier un cycle lytique, soit s'associer de manière stable à la bactérie (cycle lysogénique) sous forme plasmidique (épisode) ou en intégrant le génome bactérien. Sous cette forme ils sont appelés prophages, et peuvent rester ainsi longtemps avant de déclencher un nouveau cycle lytique.

L'intégration au génome de la bactérie peut se faire de différentes manières : soit de manière aléatoire par transposition, soit par recombinaison site spécifique. Dans ce dernier cas, le phage s'intègre au niveau d'un site spécifique sur le génome bactérien à l'aide de son intégrase. Lorsque le phage est à l'état de prophage ou d'épisome il est en « dormance », et il se réplique avec le chromosome bactérien. Le phage peut sortir de cet état de dormance soit spontanément, soit en fonction de signaux précis de la bactérie : généralement au moment de l'activation du système SOS de cette dernière. Cette étape s'appelle l'induction : le phage va généralement s'exciser du génome de la bactérie s'il s'y était intégré, et commencer un cycle lytique (Choi et al., 2010; Fang et al., 2017; Li et al., 2019; Zeng et al., 2016).

Ce type de bactériophages n'est pas utilisé en phagothérapie car, intégrés au génome de la bactérie, ils expriment parfois quelques gènes qui confèrent un changement de phénotype bactérien (phénomène longtemps appelé « conversion lysogénique »). Ces gènes, appelés collectivement morons ou gènes cargo, sont parfois des gènes de virulence codant par exemple pour la botuline, la Shiga toxine, etc. ou bien des gènes qui permettent une meilleure absorption du fer, une meilleure résistance aux radicaux oxydants, ou enfin une résistance à l'infection par d'autres phages (Bondy-Denomy et al., 2016; Fang et al., 2017; Lossouarn et al., 2019).

Plusieurs études ont montré que plusieurs prophages (complets ou défectifs) pouvaient être retrouvés dans le génome d'une même bactérie – phénomène appelé polylysogénie. Concernant les prophages défectifs, il est proposé que les bactéries « domestiquent » ainsi des prophages car leurs morons confèrent à la bactérie un facteur de virulence ou une résistance à l'attaque phagique, lui donnant un rôle important dans l'évolution adaptative des bactéries et des maladies infectieuses (Burns et al., 2015; Em et al., 2004; Lossouarn et al., 2019).

1.2.3. Les infections chroniques

En plus des deux styles de vie principaux décrits ci-dessus, certains phages sont bourgeonnants, c'est-à-dire que leur cycle lytique est remplacé par un cycle dit chronique, spécifique des phages filamenteux maintenant regroupés dans l'ordre des Tubulavirales (cf. 1.3.2).

Lors d'une infection chronique, les phages, sous forme épisomique, produisent des virions en continu qui sont sécrétés au fur et à mesure de la bactérie sans la lyser : le virion est assemblé au niveau de la membrane interne de la cellule hôte, où il est recouvert de son « manteau » protéique au fur et à mesure qu'il est sécrété (Figure 1). Ainsi, il n'y a pas de

disruption de la membrane bactérienne par des holines, ni dégradation du peptidoglycane par des endolysines, évitant la lyse de la bactérie hôte. Il est cependant possible d'observer des « plages » ou régions turbides, car le phage ralentit la croissance de la bactérie en se répliquant. Certains mutants de phages filamenteux font des plages claires cependant, il est alors supposé qu'une trop grande efficacité des cycles chroniques finit par lyser l'hôte.

Certains de ces phages filamenteux peuvent aussi entrer en cycle lysogénique et s'intégrer au génome bactérien sous forme de prophage. Pour ces phages, l'intégration dans le génome de l'hôte se fait à l'aide d'une intégrase phagique ou d'une recombinaise site-spécifique bactérienne comme XerC-XerD, et l'excision est favorisée par des facteurs de directionnalité (« phage-encoded recombination directionality factor », RMN en anglais) ou une excisionase (Li et al., 2019, p. 4; Nash, 1977) codés par le phage. Les phages filamenteux ont de petits génomes (6-10 kb) et souvent ne codent pas leur propre recombinaise : ils utilisent celle de leur hôte (Huber and Waldor, 2002). Pour les phages filamenteux Pf infectant *Pseudomonas aeruginosa*, il a été récemment prouvé que Pf4 et Pf5, qui ont des génomes plus longs que la moyenne chez les phages filamenteux (12kb et 10 kb), encodent leur propre excisionase, xisF4 et xisF5, qui permettent l'excision mais aussi la répllication du prophage (Li et al., 2019). Il a été aussi montré que Pf4 code pour un répresseur, *Pf4r*, ressemblant au répresseur C du phage P2 (42% de similarité) (Webb et al., 2004) qui confère l'immunité à Pf4 et empêche ainsi une surinfection par Pf4 (Li et al., 2019). Cette immunité à la surinfection peut cependant être contournée : une forme de Pf4 superinfectieux a déjà été décrit plusieurs fois dans la littérature. Cette forme est retrouvée au bout de 7 jours dans les cultures en biofilm. C'est une forme mutée en amont et dans le répresseur *Pf4r*, et en amont de l'excisionase. Sous cette forme, Pf4 est alors capable d'infecter la souche lysogène, et de la lyser, ce qui n'est normalement pas le cas en cycle chronique : des plages de lyses claires sont alors observables (Hui et al., 2014; Li et al., 2019; McElroy et al., 2014; Scott A. Rice et al., 2009; Webb et al., 2004).

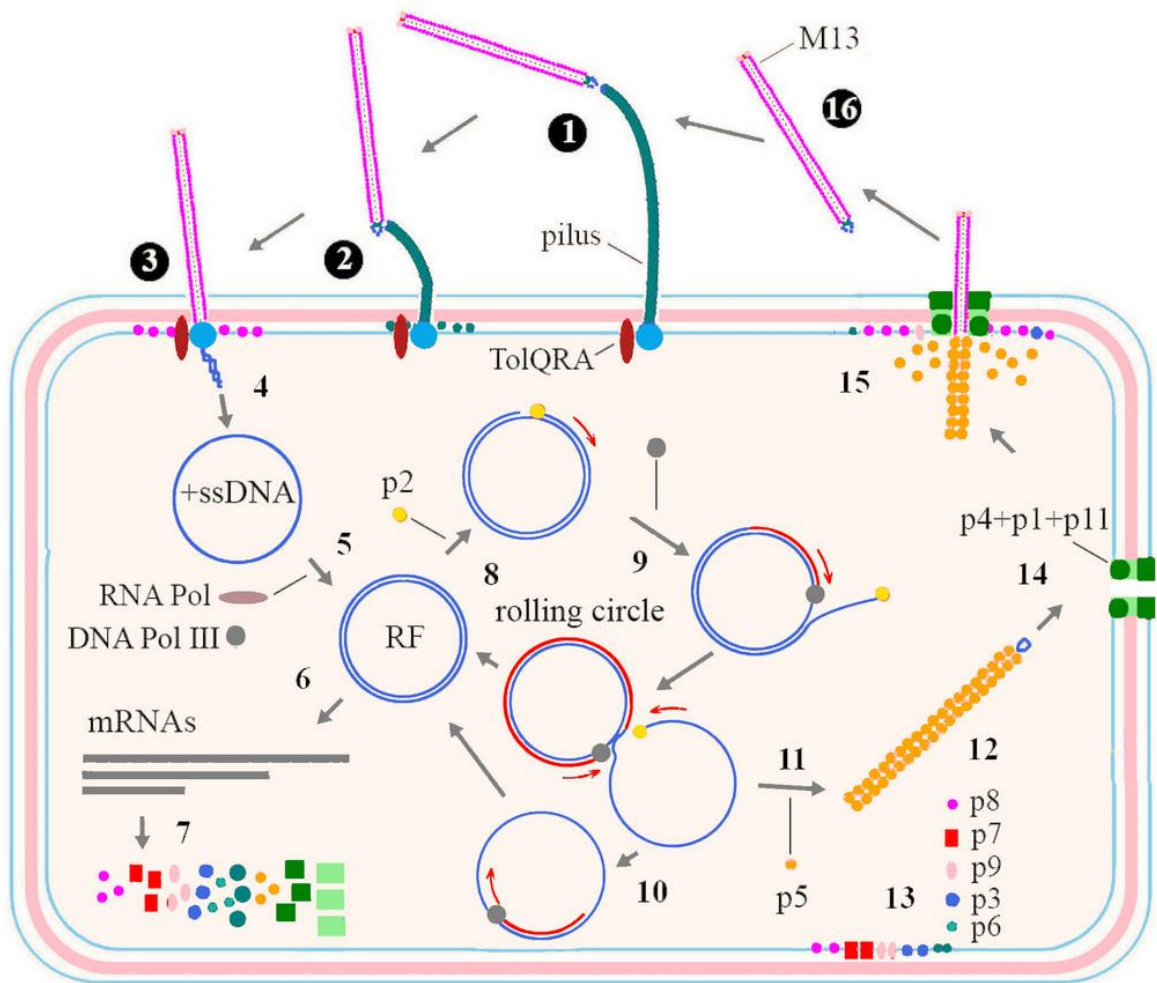


Figure 1: Cycle de réplication de phage M13 de la famille des Inoviridae. (Knezevic and Adriaenssens, 2021). M13 se fixe au pilus sexuel F d'*Escherichia coli* puis se fixe aux protéines TolQRA de la membrane interne (étapes 1 à 3). A l'étape 4, le manteau du phage est dégradé au fur et à mesure que l'ADN entre dans la cellule. L'ADN injecté est simple brin et circulaire, il est converti en double brin par les protéines de l'hôte (étape 5), puis se réplique par « rolling circle » grâce à une incision simple brin site-spécifique réalisée par la protéine p2 de M13 (étape 8), qui permet la synthèse du brin + (étape 9), et le déplacement d'un simple brin +, recircularisé à la fin d'un tour par p2 (étape 10). Ce simple brin circulaire est ensuite recouvert de la SSB phagique p5, (étape 11) et sécrété hors de la cellule par les protéines du pore de sécrétion phagique, composé de p1 (protéine typique des phages filamenteux), p4 et p11 (étape 15) où il est recouvert des protéines du manteau (p3, 6, 7, 8 et 9) au fur et à mesure que p5 est déplacé et qu'il sort. Il n'y a ainsi pas de lyse de la bactérie.

1.2.4. La pseudolysogénie

Le phénomène de pseudolysogénie peut être observé chez les phages virulents, comme chez les phages tempérés. C'est un état où le phage reste sous forme plasmidique dans la bactérie, sans former de virions. Cet état est le plus souvent observé lorsque les conditions de l'environnement sont défavorables pour la bactérie, surtout si le milieu est pauvre en nutriments

en particulier le carbone et l'azote (Ripp and Miller, 1997). C'est un état connu depuis une cinquantaine d'année (Baess et al., 1971), mais encore très peu compris.

L'avantage théorique conféré par la pseudolysogénie est discuté. Si on se place du point de vue du phage, il est supposé que cet état est un moyen pour celui-ci de perdurer dans une population bactérienne qui subit des conditions environnementales défavorables, en attendant que les conditions s'améliorent. En effet, ce n'est pas dans l'intérêt du phage d'éliminer toutes les bactéries qu'il peut infecter : il ne pourrait alors plus perdurer non plus dans l'environnement. Dans cette logique, il semble donc normal que certains phages attendent des conditions favorables dans lesquelles la population bactérienne peut de nouveau se multiplier, permettant au phage d'avoir suffisamment d'hôtes à infecter. De plus, on peut aussi supposer que, dans des conditions environnementales difficiles, le phage a plus de chance de perdurer « à l'abri » dans une cellule hôte qu'à l'extérieur sous sa forme de virion (Ripp and Miller, 1997).

Si on se place du point de vue de la bactérie, si c'est elle qui déclenche la pseudolysogénie chez le phage, cela peut être un mécanisme de défense de cette dernière. On peut alors supposer que la pseudolysogénie lui permet d'avoir le temps de se multiplier et donc d'augmenter ses chances de muter vers la résistance au phage l'infectant. Les mutants résistants aux phages seront alors sélectionnés par les phages en cycle lytique et permettront de limiter encore l'impact de l'infection sur la population bactérienne (Latino et al., 2016).

En résumé, la pseudolysogénie permet qu'il y ait toujours une population bactérienne dénuée de phages : le phage a donc toujours un réservoir de proies, et la bactérie a toujours une chance de se multiplier et d'évoluer vers la résistance.

1.2.5. *L'état porteur*

Le dernier état découvert à ce jour est appelé « carrier state » en anglais, ou encore « état porteur » et concerne uniquement les phages tempérés. Comme pour la pseudolysogénie, l'état porteur est un état où le phage ne s'intègre pas au génome de la bactérie, ni ne se synchronise avec son cycle de répllication (forme épisomique), mais confère une immunité transitoire à la surinfection par d'autres phages. Le génome du phage reste donc sous forme épisomique, il ne se réplique pas - et se transmet à uniquement une cellule fille lors de la division de la cellule mère. La seule différence avec la pseudolysogénie est qu'ici une fraction des phages s'intègre

au génome bactérien sur une partie de la population bactérienne, et l'état porteur est un état stable au cours du temps (Brathwaite et al., 2015; Siringan et al., 2014).

L'immunité transitoire observée dans cet état est liée à l'expression de certains gènes du phage qui confèrent l'immunité à la surinfection, tels que *cII*, *sieA* ou *gtrABC* pour le phage P22 infectant *Salmonella typhimurium*. Les protéines ainsi produites se retrouvent dans les cellules filles au cours des divisions, et leur confèrent la résistance aux phages, jusqu'à ce que la concentration soit trop basse pour empêcher l'infection par des phages présents dans le milieu (Cenens et al., 2015, 2013a, 2013b).

Bien que l'état porteur soit différent de la pseudolysogénie, les hypothèses pour expliquer son intérêt sont les mêmes : pour le phage, ce mécanisme permet de générer une sous-population bactérienne sensible aux phages en permanence, et il peut ainsi toujours réinfecter, se multiplier et évoluer. Pour la bactérie, cela lui laisse du temps pour se multiplier, évoluer vers la résistance et ainsi échapper au phage.

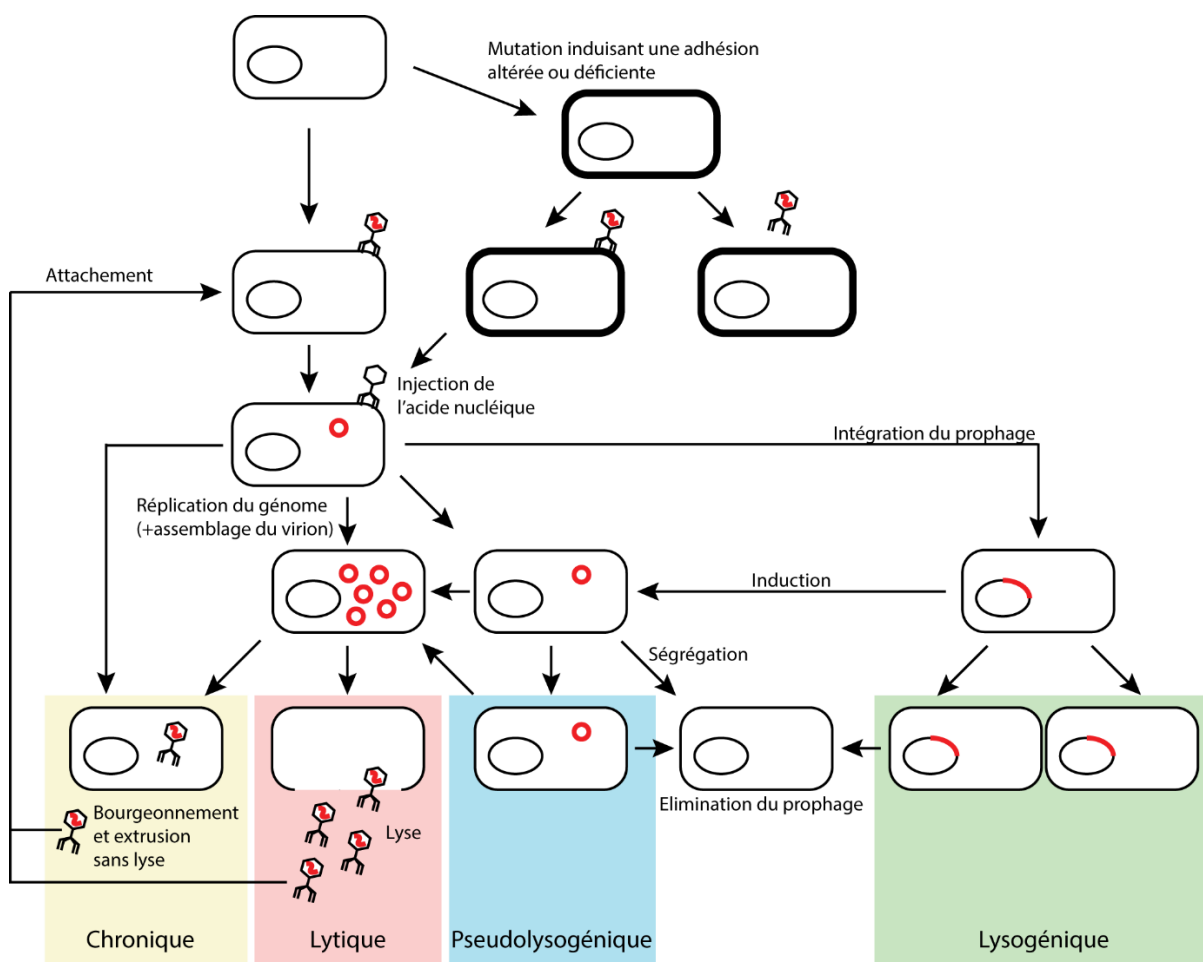


Figure 2 : Les étapes des cycles lytique, lysogénique, chronique ou pseudolysogénique. Schéma repris de Weinbauer et al. 2014, et adapté par Jeffrey Cornuault, (Cornuault, 2018; Weinbauer, 2004)

1.3. Classification des phages

Pour la majorité des micro-organismes, la classification taxonomique se fait en comparant la séquence nucléotidique de gènes conservés, comme celui codant pour l'ARNr 16S. Dans le cas des phages, il n'est pas possible d'utiliser cette méthodologie.

En effet, pour les phages, il n'existe pas de gène commun à tous les phages qui permettrait d'obtenir une phylogénie globale. De plus, les phages mutent et évoluent à une fréquence supérieure à celles des bactéries, et de nombreux transferts horizontaux surviennent entre phages (Drake, 1991; Hutinet et al., 2018; Paepe et al., 2014; Sanjuán et al., 2010).

Initialement, l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) classait les phages selon leur morphologie et le type d'acide nucléique présent dans la capsid : ARN, ADN, simple ou double brin (cf. Figure 3). Les particules virales infectieuses, ou virions, sont composés d'une

coque protéique contenant le matériel génétique, et observable en microscopie électronique. La forme de cette coque peut être allongée (ordre des *Tubulavirales*, phages filamenteux, le filament est d'une longueur proportionnelle à celle du génome et fait 2 µm dans le cas de M13) ou icosaédrique (phages ayant une capsid ou « tête », cette tête mesurant entre 30 et 160 nm de diamètre, pour les phages phiX174 et G, respectivement). Les phages ayant une tête connectée à une queue sont regroupés au sein de l'ordre des *Caudovirales*. Leur queue permet aux phages caudés de trouver leur récepteur bactérien et d'injecter leur ADN. Il existe trois types de queue, les longues et contractiles (longueur variable mais en général supérieure à une centaine de nanomètres) qui sont associées aux familles Herelleviridae, Chuseviridae, Ackermannviridae, et Myoviridae, les longues et non-contractiles (une centaine de nanomètres), associées aux Drexlerviridae, Demereciviridae and Siphoviridae, et les petites (une dizaine de nanomètres), associées aux Autographiviridae, Zobellviridae, Schitoviridae, Guelinviridae, Rountreeviridae, Salasmaviridae et Podoviridae.

Ici, je me concentrerai sur la description des ordres *Caudovirales* et *Tubulavirales*.

1.3.1. Les *Caudovirales*

La majorité des phages décrits à ce jour sont des phages à queue et à ADN double brin, faisant partie de l'ordre des *Caudovirales*. L'autre caractéristique de ces phages est que ses membres partagent tous le même repliement dans l'espace de leur « major capsid protein fold » (MCP), comme celle du phage HK97 qui infecte *E. coli* (Duda and Teschke, 2019). En 2009, cet ordre était composé de 3 familles, les Myoviridae, les Podoviridae et les Siphoviridae, 2 sous-familles, 28 genres et 79 espèces. Dix ans plus tard, la classification purement morphologique est progressivement abandonnée au profit d'une classification moléculaire. Cet ordre est actuellement composé de 14 familles, 73 sous-familles, 927 genres et 2814 espèces (Adriaenssens et al., 2020).

Cependant, grâce aux avancées sur les protocoles d'isolement, d'extraction et de séquençage des phages, ainsi qu'au développement des études métagénomiques, il est possible que de nombreux autres ordres de phages soient définis et que le rang taxonomique des phages caudés soit remonté au niveau de la classe des Caudovirecetes (Brum et al., 2013; Kauffman et al., 2018; Roux et al., 2019).

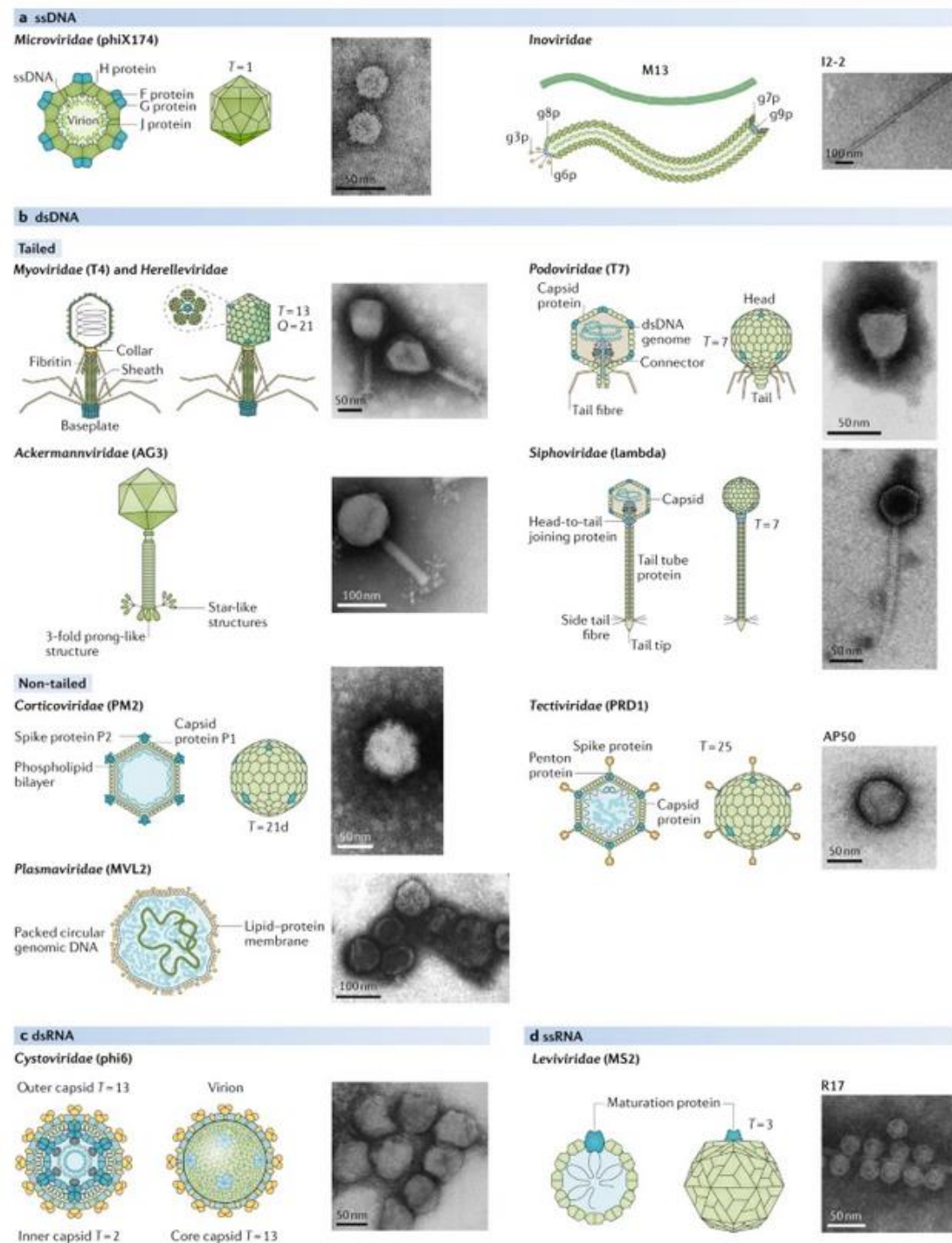


Figure 3 : Classification des phages, telle qu'elle existait fin 2019, reproduit de Dion et al., 2020. Les phages à ADN simple brin (panneau a) se répartissent en deux familles, les *Inoviridae* (1.3.2., page 15), et les *Microviridae*, constitués d'une petite capside (30 nm de diamètre) sans queue. Les phages à ADN double brin (panneau b) comprennent les Caudovirales, qui se répartissaient alors en quatre familles (1.3.1., page 13), auxquelles s'ajoutent les familles de phages non caudés (« non-tailed »), *Tectiviridae* et *Corticoviridae* (cette dernière ayant une membrane interne en plus de la capside), ainsi que les *Plasmaviridae* n'ayant pas de capside, mais une membrane lipidique. Enfin, il existe une famille de phages à ARN double brin, les *Cystoviridae* (panneau c), et une famille de phages à ARN simple brin, les *Leviviridae*.

1.3.2. Les Tubulavirales

Les *Tubulavirales*, du latin *tubula*, *tubulae*, qui signifie pipe – tube, sont des phages avec une morphologie et un mode de vie bien particulier. Ce sont des phages à ADN simple brin, qui ont un cycle « chronique » que je décris plus haut (Chapitre 1.2.3). Leur autre particularité est qu'ils ressemblent à des filaments souples ou à des cordes rigides (Adriaenssens et al., 2020).

Initialement, ces phages, aussi appelés phages filamenteux, se retrouvaient dans une famille, les *Inoviridae*. À la suite de la découverte de nouvelles espèces, et de leur diversité plus importante qu'initialement perçue (Roux et al., 2019), il a été nécessaire de créer un ordre plutôt qu'une famille, qui se sépare en trois familles : les *Inoviridae*, les *Plectroviridae* et les *Paulinoviridae*. Les *Inoviridae* réunissent les phages ayant la morphologie de long filaments fins et souples (longueur, 600–2500 nm, largeur 6–10 nm) infectant principalement les bactéries Gram –, alors que les *Plectroviridae* sont plus courts et plus larges (longueur 70–280 nm, largeur 10–16 nm) et ressemblent à des cordes rigides et plus courtes. De plus, ils infectent exclusivement les bactéries sans paroi. Enfin, les *Paulinoviridae*, la famille la plus récemment découverte, ont généralement la même morphologie que les *Inoviridae*, et infectent les bactéries à Gram + telles que *Propionibacterium freudenreichii* (Adriaenssens et al., 2020; Chopin et al., 2002; Knezevic et al., 2021; Roux et al., 2019).

Comme vu précédemment, les phages filamenteux ont un mode de fonctionnement par bourgeonnement, ils ne lysent pas leur hôte. On peut supposer que ces phages tendent vers une dynamique de coopération avec leur hôte. Si c'est le cas, quels sont les avantages pour la bactérie hôte ? Les phages filamenteux se retrouvent aussi bien dans des souches cliniques que des souches marines ou terrestres, et confèrent souvent des avantages à leur hôte (Hay and Lithgow, 2019). Par exemple, des phages de type f327, infectant les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* présentes dans la glace de l'Arctique, améliorent la motilité et la chimiotaxie de l'hôte, tout en ralentissant sa croissance, régulant ainsi la population bactérienne durant les périodes où l'environnement est riche en nutriments (Yu et al., 2015).

Les phages filamenteux sont des vecteurs connus de virulence : le phage CTX ϕ qui infecte *Vibrio* code pour la toxine du choléra, qui provoque des diarrhées chez l'humain et permet ainsi la dissémination du pathogène. Ce phage est aussi beaucoup retrouvé chez les espèces marines de *Vibrio*, avec au total 45% des espèces de *Vibrio* séquencées, cliniques et

marine, qui sont lysogénisées par ce phage (Castillo et al., 2018; Hay and Lithgow, 2019; Sakib et al., 2018; Weynberg et al., 2015).

Aussi, les phages dit « Pf1-like », Pf1, Pf4, Pf5, Pf6 et Pf7 qui infectent différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa*, sont très répandus parmi les souches de cette espèce (plus de la moitié des souches séquencées), et sont étudiés pour leur rôle dans la virulence de leur bactérie hôte (Knezevic et al., 2015). Ils ont un rôle reconnu dans la formation, le maintien et la dispersion du biofilm. Le biofilm est un état où une population bactérienne vit attachée à une surface dans une matrice extracellulaire produite par ces bactéries. Cette matrice extracellulaire très visqueuse protège les bactéries dans des environnements hostiles : elles peuvent ainsi résister au système immunitaire de l'hôte qu'elles infectent, et sont beaucoup plus tolérantes aux antibiotiques et aux désinfectants, puisque ces derniers ne peuvent pas passer la barrière physique qu'est la matrice. La capacité à produire un biofilm chez une bactérie est considéré comme un facteur de virulence (Lewis, 2008; Marrie et al., 1982). Lorsqu'une bactérie lysogénisée par un phage Pf-like entre en état de biofilm, les virions sécrétés vont s'ordonner et former des cristaux liquides. Ces cristaux améliorent les propriétés des biofilms, et confèrent une meilleure adhérence, ainsi qu'une meilleure tolérance aux antibiotiques et à la dessiccation (Secor et al., 2015b, 2015a).

Ces phages Pf jouent aussi un rôle dans les infections chez l'homme et la souris. Dans le modèle souris, une infection pulmonaire par *P. aeruginosa* contenant Pf4 a été étudiée (Scott A. Rice et al., 2009; Secor et al., 2017) : dans ce modèle, les bactéries lysogènes avaient une meilleure adhésion à la mucine présente dans les poumons, échappaient à la phagocytose et la réponse immunitaire inflammatoire de l'hôte était diminuée. Les souris infectées par des bactéries contenant un phage Pf sont plus à même de développer une infection chronique. Dans le modèle humain, sur des plaies, les infections causées par une souche contenant au moins un phage Pf augmentait la morbidité et la mortalité chez le patient, qui avait plus de chance de développer une infection chronique qu'avec une souche dépourvue de Pf (Sweere et al., 2019). Dans cette étude, ils ont ensuite montré (en modèle souris et humain), que la phagocytose était inhibée en présence de phages Pf, que les phages Pf empêchent le bon fonctionnement du système immunitaire en produisant de l'ARN viral au sein des leucocytes, provoquant une réponse immunitaire pour une infection virale et empêchant ainsi l'élimination de l'infection bactérienne (Sweere et al., 2019). Enfin, ces phages ont aussi un rôle dans les infections pulmonaires chroniques, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose : dans les deux cohortes de patients étudiés, les patients atteints d'infection par *P. aeruginosa* avec un

phage Pf avaient plus de chance de voir leur infection évoluer vers une infection chronique et résistante aux antibiotiques (Burgener et al., 2019; Secor et al., 2017).

1.4. Les phages de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa faisant partie des espèces ESKAPE (voir Partie 2 de l'introduction), de nombreux phages ont déjà été isolés et caractérisés sur cette espèce. Nous en ferons une brève présentation, pour mieux situer ceux qui ont été plus particulièrement étudiés lors de ma thèse.

*1.4.1. La classification des phages infectant *Pseudomonas aeruginosa**

P. aeruginosa est une espèce bactérienne que l'on retrouve dans de nombreux environnements, avec un génome de base (« core genome » en anglais) représentant environ 10% du génome total (Freschi et al., 2019). Les 90% restant étant principalement des gènes permettant à cette espèce de s'adapter à son environnement.

La plupart des phages décrits infectant le genre *Pseudomonas* font partie des Caudovirales (97%), et seulement une petite fraction (3%) fait partie d'un autre ordre (Ceyssens and Lavigne, 2010), et parmi ceux-ci la majorité ont pour hôte l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Ces phages ont des tailles de génomes très diverses, pouvant aller de 3,5 kb à 316 kb (De Smet et al., 2017). L'étude des génomes de ces phages, au nombre de 155 en 2018 – dont 132 infectant *Pseudomonas aeruginosa* - (Tang et al., 2018), a révélé une grande diversité génétique, comme chez leurs hôtes : lorsqu'on compare des séquences de phages de genres différents, peu voire pas de similarités sont observées, à quelques exceptions près (Kwan et al., 2006). Parmi les 155 phages séquencés en 2018, 93 sont des phages virulents, 34 sont tempérés et 28 ont un style de vie indéterminé (Tang et al., 2018). Les phages caudés infectant *Pseudomonas* sont divisés en 11 genres : les LUZ24-like, D3112-like, PB1-like, PAK_P1-like, KPP10-like, phiKZ-like, YuA-like, P2-like, T7-like, phiKMV-like et N4-like.

1.4.2. Les récepteurs

Lorsqu'un nouveau phage est découvert, l'une des premières caractéristiques regardées est son récepteur. C'est grâce à ce récepteur que le phage va pouvoir s'accrocher à la surface de la bactérie avant d'injecter son matériel génétique dans cette dernière.

En conclusion, les phages sont des organismes très divers, capables d'infecter tout type de bactéries et ayant développés de nombreux modes de vie pour survivre et évoluer. Ils peuvent être d'un réel intérêt pour une utilisation clinique, car on peut supposer qu'il sera toujours possible de trouver un phage capable d'infecter la souche pathogène d'un patient. A contrario, les antibiotiques ne sont pas capables d'évoluer et ne représente pas une source intarissable de traitements, comme nous allons en discuter dans la partie suivante.

2. L'antibiorésistance : une problématique globale

2.1. L'histoire des antibiotiques et de l'apparition de l'antibiorésistance

2.1.1. Historique

La découverte des antibiotiques a révolutionné le monde de la santé après la Seconde Guerre mondiale. C'est l'une des avancées scientifiques les plus importantes du 20^{ème} siècle : avant, les infections bactériennes étaient la première cause de morbidité et de mortalité chez les humains. Leur utilisation a aussi permis d'autres avancées scientifiques majeures, en rendant les opérations chirurgicales ou la chimiothérapie beaucoup moins risqués. (O'Neil, 2014).

En 1929, Alexander Flemming découvre la pénicilline, et une dizaine d'année plus tard, en 1940, une équipe de chercheurs à Oxford, dirigée par Howard Florey et Ernest Chain, a été capable de purifier la pénicilline en quantité suffisante pour une utilisation clinique. Cela mena à la production et la distribution en masse de pénicilline à partir de 1945. Cette même année, Flemming mit en garde sur l'apparition de potentielles souches mutantes de *Staphylococcus aureus* résistantes à la pénicilline en cas de mauvais usage de cette dernière. Et, en effet, à peine quelques années plus tard, plus de la moitié des souches de cette espèce bactérienne étaient devenues résistantes à la pénicilline (Alanis, 2005; Aminov, 2010; Chain et al., 2005).

2.1.2. Antibiorésistance : phénomène naturel, ou provoqué par les hommes ?

La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel, qui était présent bien avant l'utilisation des antibiotiques par l'homme (D'Costa et al., 2011; Finley et al., 2013). En revanche, la surconsommation d'antibiotiques ainsi que leur mauvaise utilisation à des fins cliniques et industrielles a fortement accéléré l'émergence de mutants résistants (<https://amr-review.org/background.html>).

Les antibiotiques, bien que connus principalement pour leur utilisation en santé humaine, sont aussi beaucoup utilisés en agriculture et aquaculture, comme facteur de croissance pour le bétail, ou encore pour traiter les infections bactériennes chez le bétail, les poissons d'élevage et les céréales pour la consommation humaine. L'utilisation extensive des antibiotiques dans le domaine agricole ainsi qu'en santé humaine a eu pour effet d'augmenter les concentrations en antibiotiques dans les eaux usées et les nappes phréatiques. A cela s'ajoute les déchets de l'industrie pharmaceutique, et un mauvais traitement de ces derniers, qui augmentent encore les concentrations en antibiotiques ainsi que leur persistance dans

l'environnement. Les microorganismes présents dans ces environnements ont alors une forte pression de sélection qui s'exerce sur eux, provoquant l'émergence accélérée de mutants résistants aux antibiotiques (Finley et al., 2013; Gordillo Altamirano and Barr, 2019).

2.2. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

2.2.1. Les mécanismes biologiques de résistances aux antibiotiques

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour résister aux antibiotiques. Ces derniers peuvent être classés en deux catégories : ceux qui agissent sur la cible intracellulaire ou le récepteur de l'antibiotique, et ceux qui agissent directement sur l'antibiotique.

Pour les mécanismes qui agissent sur la cible ou le récepteur de l'antibiotique, ils sont capables soit de le modifier par mutation spontanée, ou grâce à une enzyme qui va, par exemple, méthyliser le récepteur, empêchant ainsi l'antibiotique de s'y fixer. Les mécanismes qui agissent directement sur l'antibiotique vont, quant-à-eux, le transformer par acétylation par exemple, ou le dégrader au moyen d'enzymes, comme les β -lactamases, qui dégradent les β -lactames. L'antibiotique est ainsi rendu inactif. Enfin, la bactérie peut aussi rejeter l'antibiotique dans l'environnement en produisant des pompes à efflux qui vont excréter l'antibiotique hors de la cellule. Ce système est efficace pour les antibiotiques comme la tétracycline, qui ont une action interne (Alanis, 2005; Doi and Arakawa, 2007; Jacoby and Munoz-Price, 2009).

Les bactéries présentent parfois une résistance ou une tolérance phénotypique aux antibiotiques : en biofilm par exemple ou en entrant en persistance. Le biofilm, comme expliqué dans la partie 1.3.2. est considéré comme un facteur de virulence, car il permet à la population bactérienne d'être plus tolérante aux antibiotiques et de mieux survivre en habitat hostile, tel que le corps humain. La persistance, quant-à-elle, consiste en un état de dormance de la bactérie : elle échappe à l'antibiotique ou du moins le tolère car elle interrompt les fonctions essentielles à sa croissance, en attendant que les conditions environnementales redeviennent moins hostiles (Bigger, 1944; Brauner et al., 2016).

2.2.2. Le transfert des gènes de résistances

La résistance aux antibiotiques peut être transmise horizontalement ou verticalement. L'une des manières d'acquérir la résistance aux antibiotiques pour les bactéries est par l'apparition d'une ou de plusieurs mutations spontanées qui sont ensuite sélectionnées dans l'environnement par la pression de sélection exercée par la présence d'antibiotiques. Les bactéries résistantes

vont alors être capables de se multiplier malgré la présence d'antibiotiques. Dans ce cas, la résistance est transmise verticalement.

L'autre méthode d'acquisition de gènes de résistance pour les bactéries est par transfert horizontal : la bactérie sensible accepte des gènes de résistance d'autres bactéries. Ce mécanisme peut se faire par (i) transformation : la bactérie récupère de l'ADN présent dans l'environnement (provenant d'autres bactéries mortes à proximité par exemple) et l'intègre à son génome. (ii) Par conjugaison, qui est la méthode la plus commune, où un plasmide -ou un élément conjugatif intégratif (ICE)- contenant le gène de résistance est transféré d'une bactérie à une autre par conjugaison.

Enfin (iii), il y a le mécanisme de transduction où le matériel génétique est transféré via un vecteur viral. Il existe trois types principaux de transduction : la transduction généralisée, où le bactériophage, virulent ou tempéré, va encapsider un fragment du génome bactérien de la même taille que le sien durant son cycle infectieux, puis transférer ce fragment d'ADN lors de l'infection de la bactérie suivante. Plus récemment, il a été découvert que certains prophages pouvaient aussi encapsider des fragments d'ADN bactérien en aval de leur génome sans s'exciser : dans ce cas, l'empackage de l'ADN s'initie *in situ* au niveau du prophage intégré, ça s'appelle la transduction latéralisée (Chen et al., 2018). Il existe aussi la transduction spécialisée, où le phage tempéré sous la forme de prophage, en s'excisant de manière imprécise, récupère un fragment du génome de la bactérie situé au niveau de ses sites d'intégration au moment de son excision du génome bactérien (Kleiner et al., 2020).

Lors de la transduction, les bactériophages peuvent donc encapsider un gène de résistance aux antibiotiques, une toxine ou un autre gène de virulence, et le véhiculer à d'autres bactéries lors d'une prochaine infection (Chen and Novick, 2009; Kleiner et al., 2020).

2.3. Les bactéries pathogènes du groupe ESKAPE

Après la découverte de la pénicilline et le début de son utilisation comme antibiotique dans les années 40, de nouvelles molécules sont découvertes régulièrement, palliant l'apparition de résistances aux antibiotiques, qui n'est alors pas considérée comme un problème. Dans les années 90, le nombre de nouvelles molécules antibactériennes commence à s'épuiser : en plus d'avoir une fonction antibactérienne avérée, ces molécules doivent être prouvées comme sûres pour l'utilisation chez l'homme. C'est la fin de la période considérée comme l'âge d'or des antibiotiques. Le rapport bénéfices/coûts pour les entreprises pharmaceutiques dans le but de

trouver et développer de nouvelles molécules devient alors insuffisant, décourageant les entreprises à continuer les recherches pour en trouver de nouvelles (Cars et al., 2008; European Centre for Disease Prevention and Control and European Medicines Agency, 2009; Gordillo Altamirano and Barr, 2019).

L'utilisation excessive des antibiotiques dans l'agriculture ainsi qu'en santé humaine et vétérinaire, comme vu précédemment, a amené à l'apparition de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (MDR pour Multi-Drug Resistant en anglais), largement résistante (XDR pour extensively drug-resistant en anglais) voire pan-résistantes aux antibiotiques (PDR pour Pan-Drug Resistant en anglais). Une souche est considérée comme MDR si elle est résistante à au moins un agent dans 3 catégories d'antimicrobiens ou plus, XDR si elle est sensible à uniquement 1 ou 2 catégories d'antimicrobiens, et elle sera considéré PDR si elle est résistante à toutes les catégories d'antimicrobiens (Magiorakos et al., 2012).

Certaines espèces, particulièrement problématiques ont attiré l'attention des chercheurs, médecins et agents de santé publique : elles sont au nombre de six, et à elles seules, représentent la majorité des infections MDR nosocomiales et font partie des plus sévères. Ce groupe est constitué de six espèces pathogènes : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et le genre *Enterobacter*. Ce groupe est identifié par l'acronyme ESKAPE (initiales des six espèces) rappelant la capacité de ces membres à « échapper » aux traitements antibiotiques via différents systèmes de résistance. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, ou World Health Organization, WHO en anglais) a récemment publié un rapport listant 12 espèces pathogènes pour lesquelles la recherche de nouveaux antibiotiques est jugée prioritaire. Le rapport divise ces pathogènes en trois catégories : priorité critique, élevée ou moyenne. Parmi les pathogènes ESKAPE, 4 sont de priorité critique pour la recherche de nouveaux traitements antibiotiques : *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et le genre *Enterobacter*, les deux restants sont en priorité haute (De Oliveira et al., 2020; O'Neil, 2014; Rice, 2008)

Les patients les plus à risques sont les personnes immunodéprimées, en soins intensifs ou avec des facteurs de comorbidité. Cependant, à l'ère dans laquelle nous rentrons, post-antibiotique, même les infections communes ou les blessures mineures peuvent devenir mortelles (<https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241509763>)

2.4. Les enjeux d'une telle crise

La charge de l'antibiorésistance peut être mesurée via 3 facteurs : la morbidité, la mortalité et le coût financier. Même en utilisant ces facteurs, l'impact mesuré est sous-estimé car les méthodes de surveillance ne sont pas encore au point partout dans le monde (<https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241509763>)

2.4.1. Les enjeux sanitaires : morbidité et mortalité

Pour les patients atteints d'une infection nosocomiale, si celle-ci est MDR ou PDR, cela signifie de plus mauvais pronostics comparés aux patients atteints d'une infection avec une souche sensible aux antibiotiques. Ils auront notamment des taux de mortalité plus élevés (parfois jusqu'à 2 fois plus de risque), des durées de séjours hospitaliers allongées, plus de risques de complication ou de séquelles permanentes (morbidité) et plus de chance d'être en échec thérapeutique (Cosgrove, 2006; Gordillo Altamirano and Barr, 2019; O'Neil, 2014).

En 2012, 158 000 infections à bactéries multi-résistantes sont survenues en France, entraînant environ 12 500 décès soit un taux de mortalité à 7,9% (Colomb-Cotin et al., 2016). En comparaison, de mars 2020 à juin 2021, 5 744 589 cas de covid-19 ont été confirmés en France, entraînant 110 563 décès ("Coronavirus: chiffres clés et évolution," 2021) soit un taux de mortalité de 1,9%.

De plus, d'après une étude conjointe de l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) et l'European Medicines Agency (EMA) datant de 2009 et menée à partir des données récoltées de 2002 à 2007 par l'European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), 25 000 décès en Europe ont pour origine les infections à bactéries multi-résistantes (European Centre for Disease Prevention and Control and European Medicines Agency, 2009). Beaucoup de ces bactéries résistantes posent des problèmes dans les hôpitaux : *Acinetobacter baumannii* (résistante à l'imipénème), qui représentait seulement 2 à 3 % des infections nosocomiales en France en 2008 est passé à 11,1 % en 2011 soit une multiplication d'un facteur 4 en seulement 3 ans (<https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/resistance-antibiotiques>). En 2013 aux Etats Unis, environ 2 millions d'infections et 23 000 morts par ans ont été associés à des bactéries résistantes aux antibiotiques (Laxminarayan et al., 2013).

2.4.2. Antibiorésistance : le coût financier pour les patients et les systèmes de santé

Comme nous l'avons mentionné, la durée des séjours à l'hôpital et des traitements est plus longue pour les patients atteints de bactéries résistantes aux antibiotiques. De plus, certains antibiotiques comme les carbapénèmes, utilisés en dernier recours, sont plus coûteux que les antibiotiques classiques. Par conséquent, les complications liées à ces bactéries entraînent des coûts estimés à 1,5 milliards d'euros chaque année en Europe (European Centre for Disease Prevention and Control and European Medicines Agency, 2009). Aux Etats-Unis, le US Office of Technology Assessment a estimé les coûts d'hôpitaux liés aux infections par cinq groupes majeurs de bactéries nosocomiales résistantes aux antibiotiques à 1.3 milliard de dollars US en 1992. Une autre étude plus récente effectuée par Spellberg et al., (2007) a estimé le coût sociétal des infections par le pathogène MDR *P.aeruginosa* à 2.7 milliard de dollars US chaque année, à elle seule.

Une revue prédit que d'ici 2050, 10 millions de mort par an seront causés par les infections MDR, et que le coût à l'échelle mondiale s'élèvera à 82 trillions d'euros (100 trillions de dollars). L'antibiorésistance est donc reconnue comme un problème de santé à échelle mondiale pouvant affecter tous les individus, quel que soit leur âge, statut socioéconomique, ou pays de résidence (Gordillo Altamirano and Barr, 2019; O'Neil, 2014).

2.5. Il y a-t-il des solutions ? Quelles sont-elles ?

L'OMS, pour essayer de répondre au problème global qu'est l'antibiorésistance, a mis en place un plan d'action qui consiste en 5 points majeurs. Le premier consiste à éduquer les populations sur cette problématique afin de limiter l'automédication et l'utilisation des antibiotiques dans les cas où ils ne sont pas nécessaires (infection virale ou fongique), ainsi que leur utilisation en agriculture. Il faut aussi continuer la surveillance et les recherches pour renforcer nos connaissances sur le sujet, réduire la prolifération des infections, et optimiser l'utilisation des agents antimicrobiens. Et, surtout, encourager et développer la recherche de nouveaux antibiotiques ainsi que des traitements alternatifs et des nouveaux outils diagnostiques pour limiter au maximum l'expansion des multi-résistances aux antibiotiques tout en gardant les moyens de traiter les infections bactériennes (<https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/resistance-antibiotiques>; <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241509763>).

Il devient donc urgent de mettre en place de nouveaux traitements thérapeutiques pour épauler ou compléter les antibiotiques. Différentes possibilités sont explorées, par exemple :

- Les peptides antimicrobiens, qui ont une activité sur la membrane procaryote pouvant aller jusqu'à la dissolution de cette dernière (Hancock and Lehrer, 1998; Marr et al., 2006; Neshani et al., 2019),
- Les aminoglycosides et leurs dérivés, des antibiotiques contre les bactéries à Gram négatif, qui interagissent avec l'ARN 16S et conduisent à une mauvaise traduction lors de la synthèse protéique. Une nouvelle génération de ces antibiotiques est en cours de développement, appelé la plazomicin, qui serait efficace même sur les bactéries résistantes (I. Galani et al., 2012 a; I. Galani et al., 2012 b; Hancock and Lehrer, 1998; Shaeer et al., 2019).
- Les nanoparticules, qui sont de taille suffisamment petite pour passer à travers la membrane bactérienne. Les nanoparticules de ZnO et de CuO se révèlent particulièrement efficace contre *E. coli* et *S. aureus* (Azam et al., 2012; Gharpure et al., 2020),
- La SASP (Small Acid-soluble Spore Proteins), une protéine antibactérienne est en cours de développement chez Phico Therapeutics. Une fois le gène codant pour cette protéine injectée dans la cellule hôte, cette dernière va le traduire et ainsi produire la protéine SASP qui va s'accrocher à l'ADN bactérien, le rendant « inaccessible ». La bactérie ne peut alors plus se reproduire, ni métaboliser : le système immunitaire de l'hôte a ainsi le temps de l'éliminer (<https://www.phicotx.co.uk/>)
- Les endolysines de bactériophages dont la spécificité envers chaque espèce bactérienne représente une source importante de solutions thérapeutiques (Schmelcher et al., 2012),
- La phagothérapie, qui est l'utilisation des prédateurs naturels des bactéries, les bactériophages, des virus qui s'attaquent uniquement à celles-ci.

3. La Phagothérapie

3.1. Histoire

Après la découverte des phages en 1915, Félix d'Hérelle a très vite l'idée d'utiliser les phages comme agents antibactériens en médecine. Les phages sont alors étudiés et utilisés avec une visée thérapeutique : cette pratique est appelée la phagothérapie. La phagothérapie est utilisée durant une dizaine d'année en Occident, mais le manque de contrôles qualités et de caractérisation des produits contenant les phages (concentration en phages, absence de toxine

ou de bactéries, etc.) donne lieu à la remise en question de la sûreté et de l'efficacité de ce traitement (Regulski et al., 2018). En parallèle, la pénicilline est découverte et commence à être utilisée comme antibactérien. Les antibiotiques apparaissent alors comme un traitement plus sûr et plus efficace que la phagothérapie (voir résumé historique, Figure 4). Cette dernière cesse alors d'être utilisée en Occident : seuls les pays d'Europe de l'Est et anciennement de l'URSS, n'ayant pas accès aux antibiotiques à cause du rideau de fer, continuent le développement et l'utilisation de la phagothérapie. La phagothérapie est notamment étudiée à l'Institut Eliava en Géorgie, où d'Herelle a travaillé, et l'Unité de Phagothérapie (Phage Therapy Unit, PTU en anglais) de l'Institut d'Immunologie et de Thérapie Expérimentale Ludwik Hirszfeld en Pologne (Gordillo Altamirano and Barr, 2019; Pires et al., 2020).

Comme expliqué dans le chapitre précédent, ce sont les problèmes d'antibiorésistance liés à l'utilisation excessive d'antibiotiques qui ont poussé à la recherche d'alternatives, remettant la phagothérapie sur le devant de la scène. Cependant, le manque de preuves d'efficacité, tels que des résultats concluants d'essais cliniques randomisés, rend les agences de régulation réticentes à l'utilisation des phages comme traitement (Pires et al., 2020; Sybesma et al., 2018). Dans les pays de l'Est de l'Europe, où ces traitements sont appliqués depuis longtemps, un certain recul existe. Ainsi, en 2012, une revue résumant les résultats des traitements par phagothérapie de 153 patients effectués au Phage Therapy Unit en Pologne est publiée. Au total, 40% des cas cliniques étudiés ont vu une amélioration après avoir été traité avec des phages, dont 20% avec éradication de la souche pathogène ou le rétablissement du patient (Międzybrodzki et al., 2012).

Bien que les essais cliniques aient encore à démontrer l'efficacité des phages, la phagothérapie est de plus en plus connue par le grand public : les cas cliniques où des patients en danger de mort ou d'amputation utilisent en dernier recours la phagothérapie avec succès sont régulièrement relayés par les médias (Dedrick et al., 2019; Panosian Dunavan, 2020). Par conséquent, de plus en plus de patients sollicitent eux-mêmes les hôpitaux et organismes travaillant sur la phagothérapie. C'est ainsi que l'hôpital Queen Astrid à Bruxelles (Belgique) a vu une augmentation des demandes de traitements par phagothérapie depuis 2017. Il en va de même pour l'entreprise Pherecydes Pharma (France), qui traite certains patients en impasse thérapeutique pour les infections causées par *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

A la vue de l'intérêt grandissant du grand public et des médecins pour la phagothérapie, les défis principaux auxquels se confrontent la phagothérapie sont réglementaires : il est important

de s'assurer que les solutions de phages utilisés soient sûres, efficaces et reproductibles d'une production à l'autre pour que les agences de régulation donnent leur feu vert.

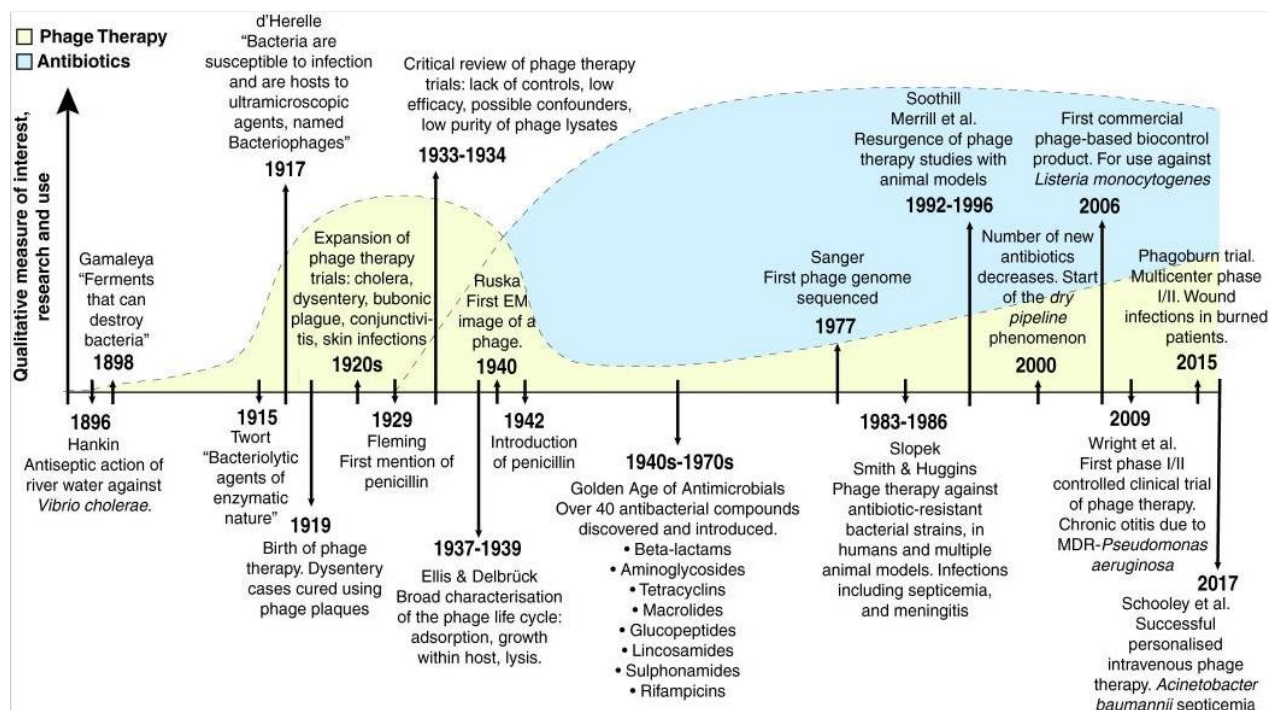


Figure 5 : Chronologie des événements majeurs de l'histoire des phages, de la phagothérapie et des antibiotiques. Les courbes représentées en arrière-plan sont des mesures qualitatives de l'intérêt général, de la recherche et de l'utilisation de la phagothérapie (en jaune) et des antibiotiques (en bleu). Tiré de Gordillo Altamirano and Barr, 2019.

3.2. Les phages et les GMP : quels critères pour garantir la qualité et la sûreté du produit ?

Les autorités de régulation des médicaments ont classé les phages comme « substance biologique ». En tant que tels, les phages entrent dans le cadre de la législation pharmaceutique et doivent obtenir une autorisation de commercialisation. Par conséquent, en plus de devoir prouver à la fois la sûreté et l'efficacité du produit, les procédés de production doivent répondre aux critères de Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) aussi appelé Good Manufacturing Practice (GMP) en anglais.

Les BPF sont des documents réglementaires qui décrivent les principes et les lignes directrices à suivre pour la fabrication des médicaments à usage humain et vétérinaire (<https://www.afmps.be/fr/>). En effet, tous les médicaments actuellement présents sur le marché ont précédemment obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM), délivrée par les autorités compétentes, comme l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des

produits de santé) en France, l'AFMPS (Agence fédérale des médicaments et des produits de santé) en Belgique ou la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis. L'objectif de ces directives est de s'assurer que le médicament est bien conforme aux exigences de qualité, de sécurité et d'efficacité requises pour la commercialisation. Des inspections sont régulièrement faites chez les fabricants de médicaments, afin de vérifier que les BPF sont respectées. Ces exigences sont maintenues et harmonisées au niveau de l'Union Européenne (UE) par l'Agence Européenne des Médicaments (European Medicines Agency, EMA en anglais) : elles concernent tous les médicaments, que ces derniers soient finis ou intermédiaires, expérimentaux ou commerciaux, à usage humain ou vétérinaire. Ils doivent tous être titulaires d'une autorisation de fabrication. Cela est aussi bien valable pour les médicaments destinés au marché européen que les médicaments destinés à l'exportation (<https://www.afmps.be/fr/>). Les Etats-Unis, ainsi que d'autres régions du monde, appliquent des directives très similaires aux BPF européennes.

Répondre aux critères qualité des BPF demande des ressources financières importantes, ce qui représente un véritable obstacle pour les hôpitaux et les centres de phagothérapie à but non-lucratifs.

La problématique principale pour la phagothérapie est qu'il n'y a pas de directives claires concernant la production et les contrôles qualités des phages dans les BPF. Cependant, au fur et à mesure que des études et des essais cliniques sont faits sur la phagothérapie, des critères apparaissent. En 2015, Pirnay et al., ont publié un article faisant état de ces critères jugés comme nécessaires lors de la production de phages à visées thérapeutiques. C'est sur cet article que je me suis appuyée pour énumérer les points suivants. Mais au préalable, nous décrirons succinctement les différents essais cliniques de phagothérapie, et leurs enseignements.

3.2.1. Essais cliniques : source d'apprentissage pour un traitement optimal

Actuellement, des essais cliniques sont en cours : seuls quelques-uns sont déjà achevés. En 2009, un essai clinique portant sur les otites chroniques causées par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes aux antibiotiques a été mené. Cet essai clinique de phase I/II randomisé a été effectué en double aveugle et approuvé par l'Agence britannique de réglementation des médicaments et des produits de santé (MHRA) et par le Central Office for Research Ethics Committees (COREC). Le traitement consistait en un cocktail de 6 phages, avec 10^5 PFU (plaque forming unit) de chacun des phages par dose. Il y avait 24 patients au total : 12 ont été traités avec le cocktail de phages et 12 ont été traités avec un placebo, en une

dose, directement sur le lieu de l'infection (l'intérieur de l'oreille) puis les patients ont été suivis régulièrement jusqu'à 42 jours après traitement. Pour tous les patients traités avec le cocktail de phages, une amélioration des indicateurs cliniques, comme l'inflammation, l'odeur, l'ulcération etc. a été observée. Seulement 3 des 12 patients ont cependant éradiqué l'infection, et aucun effet secondaire indésirable n'a été remarqué (Pires et al., 2020; Wright et al., 2009).

La même année, Rhoads et al. ont rapporté un essai clinique de phase I contrôlé, randomisé et en double aveugle, pour déterminer la sûreté de l'utilisation d'un cocktail de phages traitant les infections à *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. coli*. Plus précisément, ce cocktail visait à guérir les ulcères veineux de jambes (Venous Leg Ulcers, VLU, en anglais). Le traitement a été administré par voie topique : soit le cocktail de phages, soit une solution saline (placébo). Les 24 patients ont été traités durant 12 semaines, avec un suivi de 24 semaines après la fin du traitement. Aucun effet secondaire négatif n'a été rapporté, mais aucune différence significative du taux ni de la fréquence de guérison des ulcères n'a été observé non plus. Contrairement au premier essai clinique décrit ci-dessus, ici, l'efficacité des phages composant le cocktail n'avait pas été testé en amont sur les souches des patients traités avec celui-ci. Les auteurs reconnaissent qu'il faudrait, dans un essai clinique de phase II, tester l'efficacité du cocktail de phages sur un plus grand nombre de patients et d'abord vérifier que les bactéries infectant les patients sont bien sensibles aux phages composant le cocktail (Pires et al., 2020; Rhoads et al., 2009).

En 2013, l'essai clinique PhagoBurn phase I/II, randomisé, contrôlé et en double aveugle a été réalisé. Ce dernier a été effectué en suivant les BPF pour la production des phages et les Bonnes Pratiques Cliniques (BPC). Dans cet essai, 27 patients souffrant de brûlures infectées par *Pseudomonas aeruginosa* ont été traités soit avec un cocktail de 12 phages par voie topique durant 7 jours, soit avec le traitement classique (crème de Sulfadiazine d'argent 1 %, groupe contrôle). Les patients ont ensuite été suivis durant 14 jours après traitements. Une baisse de la charge bactérienne a été observée chez les patients traités avec le cocktail, cependant la baisse était moins forte que celle observée dans le groupe contrôle. Comme pour les deux essais cliniques décrits précédemment, aucun effet secondaire indésirable n'a été remarqué. Dans le cas de cet essai, il a été rapporté qu'après la production dans le cadre des BPF, le titre de la solution de phages utilisé pour le traitement avait chuté fortement – 1×10^2 PFU/mL au lieu de 1×10^6 PFU/mL : une dose 1000 fois plus faible qu'anticipé a donc été administrée aux patients. De plus, comme pour l'essai rapporté par Rhoads et al., l'efficacité des phages sur les souches infectant les patients n'avait pas été vérifiée. Enfin, il a aussi été

remarqué que dans le cas des traitements phagiques qui avaient échoué, les bactéries étaient résistantes aux phages lorsque ces derniers étaient à des concentrations basses (Jault et al., 2019).

Entre 2009 et 2011, un essai clinique de phase I/II randomisé, en double aveugle avec un contrôle par placebo a été mené par Nestlé. Cet essai visait à vérifier la sûreté et l'efficacité d'un cocktail de phages T4-like administré oralement à des enfants atteints de diarrhées aiguës à *E. coli* au Bangladesh. Ici, les phages ont bien été retrouvés dans l'intestin, mais aucun effet bénéfique n'a été remarqué. D'après les auteurs, cela peut être lié au spectre d'hôtes réduit du cocktail, ainsi qu'à une dose insuffisante de phages. En effet, les phages n'étaient pas protégés (par encapsidation par exemple, ou en basifiant l'intestin avant traitement), donc une dose plus basse qu'initialement administrée est arrivée jusqu'à l'intestin. Enfin, le rôle de *E. coli* dans les diarrhées aiguës chez les enfants au Bangladesh n'avait pas été démontré au moment de cet essai. Une corrélation a été rapportée entre la sévérité des diarrhées et l'abondance de *Streptococcus gallolyticus* et *Streptococcus salivarius* dans les selles, laissant à penser que ce n'est pas *E. coli*, mais *Streptococcus* qui aurait pu être à l'origine de ces diarrhées (Kieser et al., 2017; Sarker et al., 2016).

Enfin, Ooi et al., 2019 ont effectué un essai clinique de phase I afin de déterminer la sûreté, la tolérance et l'efficacité d'un cocktail de 3 phages contre les rhinosinusites chroniques récalcitrantes (« recalcitrant chronic rhinosinusites », CRS en anglais) causées par *S. aureus*. L'essai a été fait sur 9 patients, cette fois-ci différentes doses de traitements ont été testées, et l'efficacité des phages sur les souches pathogènes des patients a été vérifiée : 3×10^8 PFU pendant 7 jours, 3×10^8 PFU pendant 14 jours et 3×10^9 PFU pendant 14 jours. Aucun effet secondaire sérieux n'a été détecté pour toutes les doses et pour 2 des patients l'infection a été éradiquée. D'après les auteurs, un essai clinique randomisé est nécessaire pour déterminer la dose optimale et démontrer l'efficacité du cocktail de phages (Ooi et al., 2019).

Ces essais, bien qu'ils ne démontrent pas l'efficacité des phages comme traitement thérapeutique nous apprennent plusieurs choses : à ce jour, les traitements à base de phages testés sur l'homme ne causent pas d'effets secondaires notoires, et il est important de déterminer la posologie du traitement, c'est-à-dire la dose, la fréquence d'administration ainsi que le nombre de doses, la durée du traitement. Aussi, ces essais ont démontré qu'il était nécessaire de bien identifier la ou les espèces bactériennes responsables de l'infection et de vérifier l'efficacité du ou des phages testés sur ces souches avant traitement. Enfin, il est important de

vérifier la concentration en phage de la solution avant administration, pour être sûr qu'une dose suffisante est donnée au patient.

3.2.2. *Choix de la souche bactérienne pour la production des phages*

Au-delà de ces grands principes que l'on peut tirer des essais cliniques déjà réalisés, une entreprise engagée dans la production de phages thérapeutiques doit veiller à la sécurité du produit qu'elle fournit aux médecins. Cela concerne tout d'abord la souche bactérienne utilisée pour la production de phages : elle doit être dénuée de prophages et de gènes de résistances aux antibiotiques (Gordillo Altamirano and Barr, 2019; Pires et al., 2020; Pirnay et al., 2015). En effet, les prophages, s'ils s'excisent et s'induisent, peuvent être retrouvés dans le produit fini. Or, les génomes de ces phages contiennent parfois des gènes de facteurs de virulence, donc s'ils s'intègrent au génome des bactéries ciblées par la thérapie, ces prophages pourraient permettre de mieux résister au système immunitaire ou de la protéger d'une infection par un autre phage. Il est donc nécessaire de les éliminer ou de les désactiver afin d'être sûr de ne pas les transmettre à la souche infectant le patient.

Il en va de même pour les gènes de résistance aux antibiotiques : ces derniers peuvent se transmettre d'une souche à l'autre par transfert horizontal (cf. Chapitre 2) ce qui pourrait aggraver l'état de santé du patient.

Enfin, idéalement, la souche de production ne doit pas coder pour des toxines, qui risquerait de se retrouver dans le produit fini. Cependant, il est aussi possible de tester la quantité présente d'endotoxine présente dans le produit, et si la concentration est inférieure aux limites exigées par la Pharmacopée européenne, alors le produit peut être utilisé. Pour calculer cette limite, un calcul est à effectuer avec la formule suivante :

$$\frac{K}{M}$$

Où K est la dose seuil d'endotoxines ayant un effet pyrogène, par kilogramme de masse corporelle et M est la dose maximale recommandée pour le produit, en bolus, par kilogramme de masse corporelle. Le bolus constitue une dose unique (habituellement importante) de médicament ou d'une autre substance qui est préparée en vue d'être administrée (<https://www.cancer.be/lexique/b/bolus>). La valeur de K change selon les différentes voies d'administration et est spécifiée dans la monographie 5.1.10. de la Pharmacopée Européenne ("5.1.10 Guidelines for using the test for bacterial endotoxins," 2016). Il est important de garder

en tête que les GMP ont été mises en place avant tout pour protéger les patients recevant les traitements.

3.2.3. Les phages à visées thérapeutiques

Une fois établie l'innocuité de la souche productrice, les phages à visées thérapeutiques doivent être virulents et ne pas faire de cycle de lysogénie, pour les mêmes raisons que la souche de production ne doit pas contenir de prophages. Ces phages ne doivent pas non plus coder de toxines, qui pourraient ensuite être relâchées dans l'environnement au moment de la lyse de la bactérie, et impacter le patient. Il est aussi important de vérifier que les phages utilisés ne soient pas transducteurs : ils pourraient alors récupérer et transduire des fragments de génome bactérien codant pour des gènes de virulence (Gabashvili et al., 2020; Haaber et al., 2016).

De plus, il ne faut pas oublier que les phages, contrairement aux antibiotiques, sont des entités biologiques capables d'évoluer : c'est à la fois un avantage et un inconvénient (Gordillo Altamirano and Barr, 2019). En effet, les phages évoluent et il est possible de les « entraîner » pour récupérer des phages capables d'infecter des bactéries devenues résistantes. Mais cela veut aussi dire qu'ils peuvent évoluer durant la production, donnant des variants dont la capacité d'infection ou le spectre d'hôtes par exemple, peuvent être diminué. C'est pourquoi, il est important de caractériser au maximum les phages produits et la souche de production, ainsi que d'effectuer des productions en respectant les BPF : on peut ainsi anticiper au maximum cette évolution (Mutti and Corsini, 2019).

Pour résumer, les critères décrit ci-dessus concernant la souche de production et les phages utilisés pour la phagothérapie visent à : (i) limiter la présence de toxines dans le produit fini, (ii) empêcher la transmission de facteur de virulence à la souche infectant le patient et (iii) garantir l'efficacité du produit et sa reproductibilité de fabrication. L'objectif ici est de garantir au maximum que le traitement administré au patient améliorera son état de santé.

3.2.4. Formulation et conditions de stockage : garant d'une qualité durable

Que ce soient les stocks de bactéries et de phages pour la production, les solutions intermédiaires ou le produit fini, de bonnes conditions de stockage ainsi qu'une bonne formulation sont nécessaires pour garantir la qualité et la sûreté du produit dans le temps. Pour cela, des contrôles réguliers sont à mettre en place (Pirnay et al., 2015).

Concernant les stocks de bactéries et de phages pour la production, plusieurs méthodes de conservation sont possibles, telles que la congélation ou la lyophilisation par exemple. En

fonction de la méthode de conservation choisie, il peut être nécessaire de suivre plusieurs paramètres, tels que la température, afin de vérifier la stabilité des conditions de stockage.

Ici, nous parlerons principalement du produit fini, car c'est le plus critique. L'objectif principal est la formulation d'une solution garantissant l'activité du phage sans baisse significative de sa concentration durant la production et le stockage. L'autre critère important est la stérilité : il faut garantir la stérilité de la solution dans le temps. Pour garantir ces deux critères, il est nécessaire de contrôler régulièrement (i) l'activité du phage dans la solution en le titrant par exemple, (ii) la stérilité et (iii) mesurer le pH de la solution (Jault et al., 2019; Pirnay et al., 2015). En effet, si le pH est trop élevé ou trop bas, le phage peut devenir inactif. Il n'est alors plus capable d'infecter les bactéries et le traitement perd son efficacité (Ceyssens et al., 2008; Knezevic et al., 2011).

La problématique principale ici, est que la formulation dans laquelle les phages sont stables diffère d'un phage à un autre. Il faudrait donc tester et modifier la composition de la solution pour chaque phage produit. L'une des solutions envisagées serait l'encapsulation des phages dans des matrices comme les liposomes, l'alginate, la cellulose ou d'autres polymères (Cortés et al., 2018; Malik et al., 2017; Pires et al., 2020). L'encapsulation des phages serait aussi une solution intéressante pour la protection du phage jusqu'à son arrivée sur le site d'infection : les phages peuvent être éliminés ou dégradés par le système immunitaire du patient, ou par le pH si la solution de phages est ingérée.

Comme lors de la production, il est aussi important de vérifier si les phages stockés mutent au bout d'un certain temps de stockage (Botka et al., 2019). Comme dit précédemment, les mutations spontanées des phages durant le stockage sur de longue période et/ ou l'accumulation de mutation durant la production des phages peuvent entraîner des modifications de leur « fitness » et leur spectre d'activité.

3.3. La Phagothérapie : les défis pour une utilisation à grande échelle

3.3.1. Efficacité des phages contre les biofilms

L'un des avantages de la phagothérapie par rapport à l'antibiothérapie, est que certains phages sont capables de dégrader les biofilms bactériens : ces phages codent pour des dépolymérase, des enzymes dégradant les polysaccharides capsulaires et certains exopolysaccharides qui composent le biofilm. Cela permet au phage d'atteindre son récepteur à la surface de la bactérie. Ces dépolymérase sont spécifiques et ne dégradent que certains

types de polysaccharides. Un mélange de phages codant pour différentes dépolymérase serait donc une bonne solution pour éliminer au maximum le biofilm, qui parfois empêche l'accès des antibiotiques et des phages à la bactérie (Schmerer et al., 2014).

3.3.2. *Evolution des bactéries : apparition de mutants résistants aux phages*

Comme lors de l'utilisation d'antibiotiques, l'émergence de mutants résistants aux phages peut être observée après leur utilisation sur le lieu de l'infection, ce qui peut fortement impacter l'efficacité du traitement. Selon Oechslin, 2018, l'apparition des mutants est fréquente et presque inévitable.

3.3.2.1. Mécanismes de résistances bactériens à l'infection par les phages

Dans la nature, les phages exercent déjà une forte pression de sélection sur les bactéries : ils sont présents partout où se trouvent leurs hôtes et leur nombre y est parfois supérieur, notamment dans les sols et les sédiments (Cobián Güemes et al., 2016). Les bactéries essaient d'échapper à l'infection par les phages en utilisant des mécanismes divers, et les phages évoluent pour contrer ou échapper à ces mécanismes : c'est ce qui est appelé la « course à l'armement » (« arms race en anglais ») entre les phages et les bactéries (Bernheim and Sorek, 2020; Labrie et al., 2010).

Parmi les principaux mécanismes de résistance aux phages que possèdent les bactéries, on peut classer les mécanismes de résistance aux phages selon l'étape du cycle lytique sur laquelle s'exerce le blocage : l'adsorption est la première étape d'infection du phage, celle où le phage se fixe de manière spécifique et irréversible à la surface de la bactérie en reconnaissant un récepteur présent à la surface de cette dernière. Pour empêcher cette étape, la bactérie peut, par mutation, perdre ou modifier le récepteur bactérien sur lequel le phage se fixe, ou produire une matrice extracellulaire ou des inhibiteurs compétitifs qui vont « cacher » le récepteur et empêcher le phage de l'atteindre (Labrie et al., 2010).

Durant leur cycle infectieux, certains phages sont capables d'empêcher l'infection par d'autres phages. Ce système, appelé Sie pour Superinfection Exclusion, peut agir soit en modifiant le récepteur du phage infectant, soit en empêchant l'injection de son génome ou en inhibant sa réplication. Le système Sie ne marche en général que sur des phages de la même espèce ou famille que celui qui infecte la bactérie. Il est présent chez les phages infectant des bactéries Gram + et Gram -, et aussi bien chez les phages virulents que chez les prophages, qui

protègent ainsi leur hôte de l'infection par un autre phage (Chung et al., 2014a, 2014b; Labrie et al., 2010).

Une fois que le phage a injecté son génome dans la bactérie, il existe encore de nombreux mécanismes pour contrecarrer les prochaines étapes de l'infection. Ces mécanismes peuvent être séparés en deux groupes : les mécanismes généralistes et les mécanismes ciblés. Parmi les mécanismes généralistes, on trouve ceux de restriction modification (appelés R-M), qui peuvent couper et dégrader l'ADN étranger. Ces systèmes consistent principalement en la méthylation de l'ADN endogène, permettant à l'hôte de reconnaître tout ADN non-méthylé comme étant étranger via des endonucléases de restriction bactériennes qui vont ensuite le dégrader (Bernheim and Sorek, 2020; Bertani and Weigle, 1953). Les systèmes R-M sont très répandus, et plusieurs peuvent être présent par bactérie (Oliveira et al., 2014). D'autres systèmes de restriction et modification de l'ADN existent, comme les systèmes BREX (Bacteriophage Exclusion), ou DISARM (Defense Island system associated with R-M) (Goldfarb et al., 2015; Ofir et al., 2018).

Une autre manière qu'a la bactérie pour dégrader l'ADN du phage est le système CRISPR-Cas (Clustered regularly interspaces short palindromic repeats), qui est actuellement très étudié. Il est considéré comme le système immunitaire adaptatif des prokaryotes. Ici, les acides nucléiques viraux sont reconnus puis dégradés par l'hôte. Ce mécanisme s'effectue en deux étapes : premièrement, un phage infecte une population bactérienne, dont une partie échappe car le phage n'arrive pas à compléter son cycle lytique. Les bactéries survivantes vont alors récupérer un fragment d'ADN de ce phage, appelé spacer, et l'intégrer à leur génome entre deux Direct Repeat (DR). Ces séquences sont ensuite transcrites et deviennent des ARN CRISPR qui guident la machinerie CRISPR-Cas via la similarité de séquence. La bactérie ayant acquis le spacer sera alors capable de reconnaître l'ADN de ce dernier si celui-ci l'infecte de nouveau et de le dégrader. Ce système fonctionne donc comme une mémoire de l'hôte, il est ainsi possible de connaître l'historique des infections que l'hôte a subies par le passé (Barrangou et al., 2007; Bernheim and Sorek, 2020; Cornuault, 2018; Stern et al., 2012).

Comme dit précédemment, il existe aussi des mécanismes de défense spécifiques : les systèmes Abi, pour Abortive infection, en font partie. Une fois la cellule infectée, le système Abi va permettre à cette dernière de se tuer ou d'arrêter son métabolisme avant que le phage ait eu le temps de se multiplier et de compléter son cycle. Ce système a pour objectif d'éviter la propagation du phage au sein de la communauté bactérienne, permettant ainsi la survie de la

communauté bactérienne, au détriment de la cellule en elle-même. C'est un système qui est considéré comme « altruiste » (Lossouarn et al., 2019).

Encore aujourd'hui, de nouveaux mécanismes de défenses bactériens sont régulièrement découverts, tel que le cGAS, qui est un système de type Abi (Bernheim and Sorek, 2020; Cohen et al., 2019). Il est fort probable que d'autres seront découverts dans le futur.

Les bactéries ont donc de nombreux mécanismes pour éviter l'infection par les phages. Ces données encouragent à vérifier la sensibilité de chaque souche de patient avant de leur administrer une solution de phages, afin d'être sûr de l'efficacité de ces derniers.

3.3.2.2. Phagothérapie : l'émergence de mutants résistants aux phages

Dans le contexte de la phagothérapie, une application de phages est décidée parce que la ou les souches du patient sont sensibles à ces derniers, si bien que normalement, aucun des mécanismes décrits précédemment n'entre en jeu. Exception faite du mécanisme de défense CRISPR, qui peut conférer une résistance « acquise » : en effet, une souche de patient pourrait s'avérer sensible au départ au phage choisi, mais acquérir par la suite (à faible fréquence) un ou plusieurs spacers, lui conférant une résistance. Cependant, si différents phages sont appliqués, la probabilité d'acquisition de double résistance devient faible. L'émergence de mutants résistants aux phages peut aussi survenir par acquisition de mutations dans le récepteur phagique (Alseth et al., 2019).

Les récepteurs bactériens sont des éléments présents à la surface des bactéries, tels que les lipopolysaccharides (LPS), exopolysaccharides (EPS), les protéines membranaires, les capsules, flagelles et pili. L'apparition de bactéries résistantes a aussi été observée *in vivo*, mais la fréquence et les mutations semblent différentes (Alseth et al., 2019). Par exemple, en 2017, Oechslin et al., ont testé l'efficacité d'un cocktail de phage pour traiter une endocardite causée par *Pseudomonas aeruginosa*. Dans cette étude, des mutants résistants ont émergé *in vitro* mais pas *in vivo*. Les auteurs supposent que cela est dû au fitness diminué des mutants résistants aux phages : les éléments de surface servant de récepteurs aux phages cités au début de ce paragraphe sont des facteurs de virulence de la bactérie : par exemple, les EPS permettent aux bactéries de s'accrocher aux surfaces et entre-elles, ils aident aussi à la formation du biofilm. En les perdant, la bactérie perd en virulence et est plus facilement éliminée par le système immunitaire de l'hôte. Plusieurs autres études ont observé cette baisse de virulence après la

mutation du récepteur du phage (Alseth et al., 2019; Filippov et al., 2011; León and Bastías, 2015).

3.3.3. *Quelles solutions pour prévenir l'apparition de ces mutants résistants ?*

3.3.3.1. L'utilisation de cocktail de phages

Les mutants résistants aux phages émergent lorsque la charge bactérienne décroît grâce au traitement. On s'attend donc à ce qu'ils soient principalement éliminés par le système immunitaire *in vivo*, mais il est important de limiter leur émergence pour que le traitement soit efficace, y compris chez les patients immunodéprimés ou immunodéficients (Kortright et al., 2019a; Rohde et al., 2018). La solution la plus envisagée est le cocktail de phages composé de phages ayant des récepteurs bactériens différents. La bactérie aura alors besoin de muter différents récepteurs simultanément pour devenir complètement résistante, ce qui limite fortement la fréquence d'apparition de ces mutants (Yang et al., 2020).

Il y a deux types de cocktails de phages, les cocktails qui ont une composition fixe (« prêt-à-porter ») pouvant être utilisés facilement à grande échelle, et les cocktails qui sont préparés spécifiquement pour un patient (« sur-mesure ») en fonction de la sensibilité de la souche pathogène (Figure 5, Pirnay et al., 2011). La législation actuelle déterminée par les BPF appelle au contrôle qualitatif et quantitatif prédéterminé des tous les constituants du produit thérapeutique. Cette définition convient mieux à l'utilisation de cocktails de phages « prêt-à-porter » » mais pas à l'utilisation « sur-mesure » puisque la composition en phages serait variable en fonction du patient traité.

Dans le cas des cocktails « prêt-à-porter », l'intérêt est d'avoir une solution de phages à « large spectre » utilisable si une crise sanitaire, semblable à celle de l'épidémie d'infections à *E. coli* qui a eu lieu en 2011 en Allemagne, émerge. Cependant, les souches bactériennes évoluent vite et ces cocktails auront besoin d'être mis à jour régulièrement afin de pallier l'émergence de résistance aux phages et l'apparition de nouvelles souches pathogènes (Pirnay et al., 2015). Comme souligné précédemment, ces cocktails suivraient les directives BPF qui sont coûteuses en argent et en temps pour une utilisation uniquement de courte durée en raison de l'émergence de mutants résistants. Cependant, si une ou des entreprises arrivaient à faire commercialiser leurs solutions de phages « prêt-à-porter » dans les conditions BPF, les autorités de régulation telles que la FDA ou l'EMA pourraient modifier leurs règles comme elles l'ont fait avec les vaccins contre la grippe, qui nécessitent aussi une procédure de mise à jour rapide (Pirnay et al., 2011).

L'autre solution concerne les cocktails « sur-mesure » : dans ce cas, les patients atteints d'une infection bactérienne seront traités uniquement avec des phages efficaces contre leur souche. Ce traitement permet d'avoir une meilleure chance de réussite et moins d'émergence de mutants résistants aux phages à grande échelle. De plus, si un mutant résistant émerge après le traitement, il est toujours possible d'isoler un autre phage efficace ou « d'entraîner » un ou plusieurs phages pour infecter et éliminer ce nouveau mutant. Le problème de cette approche « sur-mesure » est qu'elle ne peut pas suivre les exigences BPF puisque certains traitements ne seront administrés qu'à un ou deux patients.

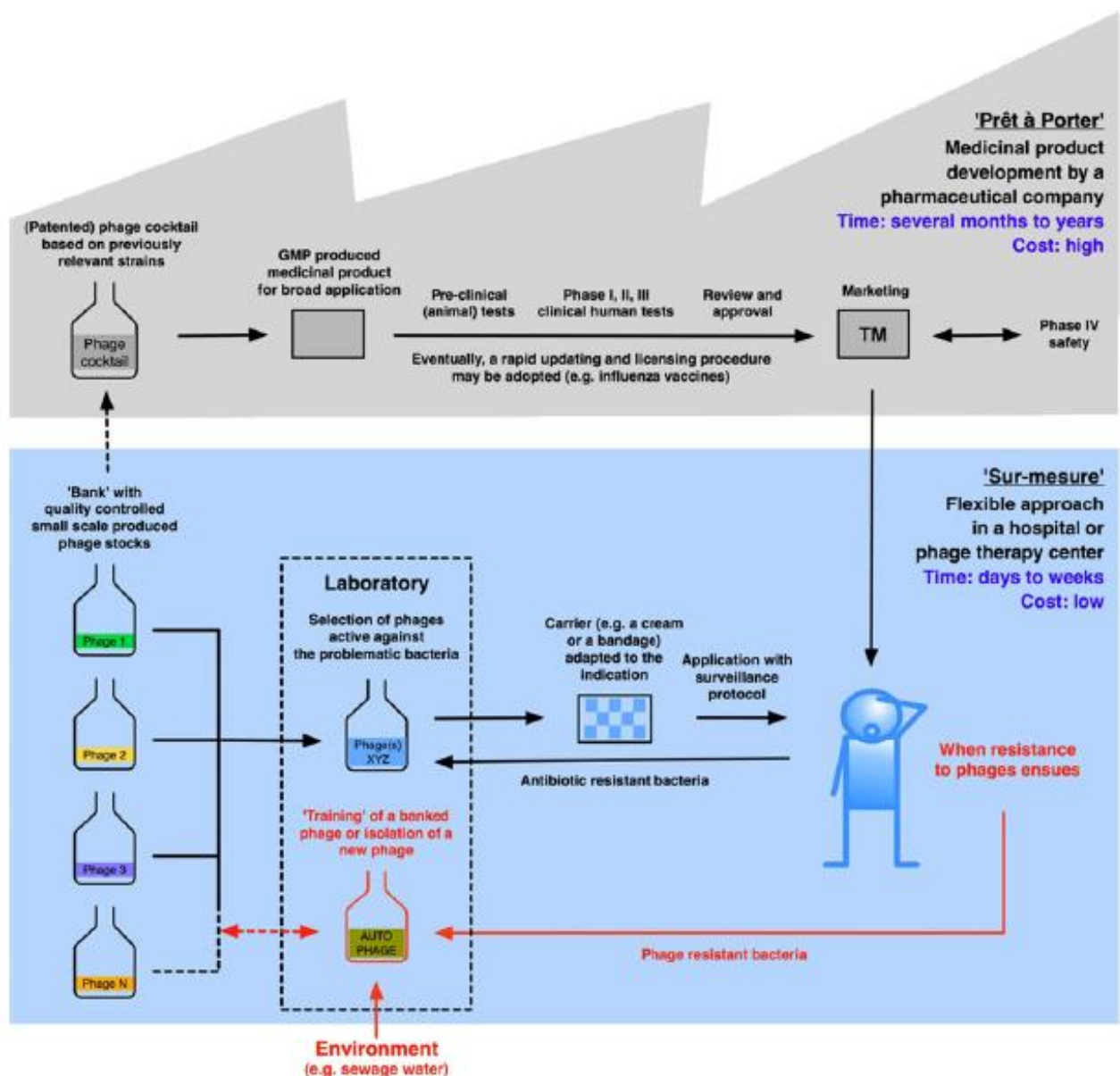


Figure 6 : Deux méthodes de cocktails pour la phagothérapie : prêt-à-porter ou sur-mesure ?

Les deux approches devraient être possibles et complémentaires. Tiré de Pirnay et al., 2011.

3.3.3.2. L'utilisation séquentielle de phages

Une autre possibilité est d'utiliser un premier phage sur la souche sensible à celui-ci, puis d'administrer un phage capable d'infecter les mutants résistants dans un second temps, en utilisant un phage avec un autre récepteur bactérien par exemple. Cette utilisation aurait comme principal avantage de permettre de maintenir à bas niveau la charge bactérienne et sur une plus longue période, en permettant ainsi au système immunitaire du patient d'éliminer l'infection (Hall et al., 2012).

3.3.3.3. Les traitements combinés phages-antibiotiques

Enfin, il est possible de combiner le traitement par les phages avec un traitement antibiotique ou un autre traitement antibactérien, afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique (Torres-Barceló et al., 2018, 2014). Quelques phages ont pour récepteur des pompes à efflux, responsables de résistance à certains antibiotiques (Chan et al., 2016). Les mutants résistants aux phages seraient alors sensibles aux antibiotiques, et les mutants résistants aux antibiotiques seraient sensibles aux phages, limitant fortement l'apparition de mutants résistants aux deux, et augmentant ainsi les chances de succès du traitement.

Pour résumer, de nombreuses solutions sont envisageables afin de pallier l'émergence de mutants résistants aux phages thérapeutiques. Cependant, certains défis restent à relever, et les premiers essais cliniques ainsi que nos connaissances sur l'antibiorésistance ont servi d'avertissement pour ne pas reproduire les erreurs passées.

3.3.4. *Quels défis reste-t-il à surmonter ?*

3.3.4.1. Le coût

Comme déjà mentionné, le coût pour la mise en place des directives GMP et l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché d'un médicament est conséquent : en moyenne, une entreprise doit payer 296 000 euros de frais pour une demande de commercialisation d'un produit, puis environ 106 300 euros par an pour garder cette autorisation (EMA, <https://www.ema.europa.eu>). En plus de ces frais, la mise en place des directives GMP puis leur maintien peut coûter beaucoup d'argent en main d'œuvre et en matériels.

De plus, les phages étant des entités naturellement présentes dans la nature, composées de matériel génétique et de protéines, une entreprise ne peut pas protéger leur utilisation avec un brevet. Le seul cas possible serait avec des phages génétiquement modifiés, ce qui est problématique au vu de la réglementation actuelle sur l'utilisation d'éléments génétiquement modifiés en santé humaine (Pirnay et al., 2011).

3.3.4.2. Traitement « sur-mesure » : la rapidité de diagnostic pour un traitement efficace

L'un des avantages des phages par rapport aux antibiotiques est leur spécificité : les phages ont rarement un spectre d'hôtes plus large que l'espèce bactérienne, ce qui permet de cibler les traitements sans impacter la flore microbienne du patient. L'inconvénient de cette spécificité, c'est qu'il est nécessaire d'identifier la souche pathogène et de vérifier sa sensibilité aux phages pour pouvoir traiter le patient. Pour cela, un « phagogramme » est effectué, sur le même principe qu'un antibiogramme. Cependant, cette technique prend du temps : environ 48h. Cette durée peut être trop longue dans le cas où le patient est en état critique et qu'un diagnostic rapide est nécessaire. Des méthodes plus rapides d'identification des phages efficaces contre la souche testée sont donc à développer. Quelques pistes sont en cours d'études, et expliqués dans Pires et al., 2020.

3.3.4.3. La taille et diversité des banques de phages

Quelle que soit la méthode utilisée parmi celles citées ci-dessus, elles nécessitent toutes des banques de phages importantes et diversifiées. En effet, l'autre problème rencontré lié à la spécificité des phages est le manque de phages capables d'infecter certaines souches, comme *Clostridioides difficile* : il est nécessaire d'agrandir et de diversifier les banques de phages virulents utilisables en phagothérapie (Gordillo Altamirano and Barr, 2019; Pires et al., 2020).

3.3.4.4. Phagothérapie : est-ce que la résistance aux phages peut devenir un problème global, comme l'antibiorésistance ?

Certaines entreprises, plutôt que de développer la phagothérapie, ont décidé de développer l'utilisation des phages pour le traitement des animaux, des cultures agricoles ou comme conservateurs dans les aliments. Par exemple, l'entreprise PhageGuard a mis en place des cocktails de phage contre *Listeria*, *Salmonella* et *E. coli* approuvés par la FDA pour la nourriture (fromages, poissons et fruits de mer, viande et volaille, fruits et légumes, nourriture pour animaux) ainsi que la désinfection de surface dans l'industrie agroalimentaire (<https://phageguard.com/>). Cependant, on ne sait pas quel effet aura une utilisation globale des phages sur les communautés microbiennes. Est-ce que cela pourrait engendrer les mêmes problèmes que ceux rencontrés lors de l'utilisation massive d'antibiotiques ? Cette question est à prendre en compte, lors de l'élaboration de stratégies thérapeutiques à base de phages (Pirnay et al., 2011).

Les phages ont un spectre d'hôtes plus restreint que la plupart des antibiotiques. Ce que l'on souhaite éviter avec l'utilisation globale de phages est la résistance des bactéries pathogènes humaines MDR aux phages. Il faut donc définir quelles espèces bactériennes il est important de traiter en agriculture. Par exemple, traiter les souches pathogènes qui infectent uniquement les poulets, telle que *Enterococcus cecorum*, mais pas les hommes, serait acceptable dans une logique « une seule santé », tandis que, traiter en élevage des souches pathogènes de l'animal et de l'homme comme *E. coli*, serait problématique. Cela conduirait à l'émergence de souches pathogènes pour l'homme résistantes à la fois aux antibiotiques et aux phages.

Toutefois, l'un des avantages des phages – qui est aussi un inconvénient pour la mise en place des BPF – est leur capacité à évoluer pour être toujours capable d'infecter les bactéries, même les mutants résistants qui pourraient apparaître (Pires et al., 2020).

Comme j'ai pu le montrer au cours de cette introduction, l'antibiorésistance est un problème de santé majeur et global. L'un des vecteurs de diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques (Antibiotic Resistance Gene, ARGs) sont les éléments génétiques mobiles, en particulier les plasmides conjugatifs et les ICEs. Lors de ma thèse, l'une des problématiques a été de déterminer si les phages aussi – en dehors des phages transducteurs – contiennent et véhiculent des ARGs. Aussi, comme précisé dans l'introduction, il reste encore de nombreux critères à définir permettre l'utilisation de la phagothérapie. Cependant, certains d'entre eux ont déjà été déterminés, notamment l'utilisation d'une souche bactérienne de production dénuée de prophages actifs et de toxines, et la caractérisation des récepteurs des phages afin d'anticiper l'émergence de mutants résistants aux phages. Dans ce but, et en lien avec l'entreprise Pherecydes Pharma, j'ai d'abord travaillé à la construction d'une souche bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa* servant à la production de phages thérapeutiques, donc curée de ses prophages actifs et sans toxine. J'ai ensuite caractérisé les récepteurs des 4 phages anti-*Pseudomonas* à visée thérapeutique sélectionnés par Pherecydes Pharma et mesuré la fréquence d'apparition de mutants résistants à ces phages.

Résultats

Présentation de la thématique de thèse

Cette thèse est une thèse CIFRE, financée par Pherecydes Pharma, et co-encadrée par deux chercheurs, l'un dans cette entreprise, l'autre dans une équipe de recherche de l'INRAE. Pherecydes Pharma est une entreprise qui depuis 2007 développe la phagothérapie comme traitement contre les bactéries résistantes aux antibiotiques. Elle travaille notamment sur 3 espèces bactériennes considérées comme prioritaires par l'OMS, appartenant au groupe ESKAPE mentionné dans l'Introduction, pour la recherche de nouveaux traitements thérapeutiques : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Afin de répondre aux normes pharmaceutiques en vigueur et de produire des phages en respectant les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), Pherecydes Pharma a décidé de financer une thèse CIFRE portant sur *Pseudomonas aeruginosa* et ses phages anti-*Pseudomonas*.

Sous la direction de Marie-Agnès Petit, directrice de l'équipe Phages à l'INRAE et de ma thèse, j'ai d'abord construit une souche de *Pseudomonas aeruginosa* curée de ses prophages et sans toxines. J'ai donc recherché si la souche bactérienne sélectionnée par Pherecydes Pharma – appelée LMG12228 – contenait des prophages afin de les déléter du génome de la bactérie et de les caractériser. LMG12228 contenait deux prophages : Pf4 et Pf6, tous les deux des phages filamenteux (Tubulavirales, Chapitre 1.3.2. de l'introduction) vecteurs de virulence chez la bactérie. L'une des particularités de ces phages (surtout Pf4), comme mentionné dans l'introduction, est qu'ils deviennent parfois superinfectieux, et produisent alors tellement de virions qu'ils finissent par lyser la bactérie. C'est d'ailleurs ce que nous avons pu constater lors de ma thèse dans des cultures bactériennes de LMG12228 et parfois dans certaines productions de nos phages virulents qui étaient contaminées par les Pf (cf. photos ci-dessous).

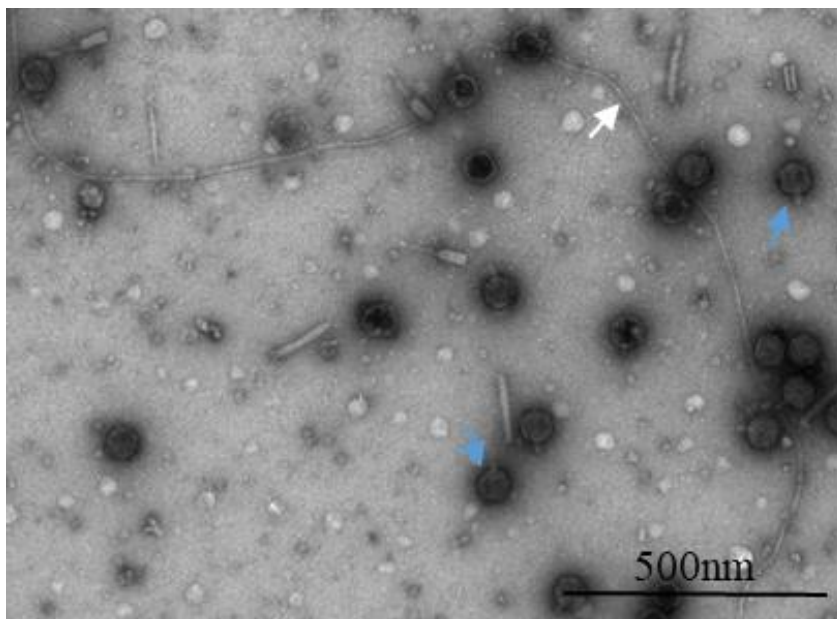


Photo 1 : Photo d'une production du podovirus PP1792 en Microscopie Electronique à Transmission (MET)

Flèche blanche : long filament pouvant être un pilus ou un phage filamenteux Pf4

Flèches bleues : le podovirus PP1792

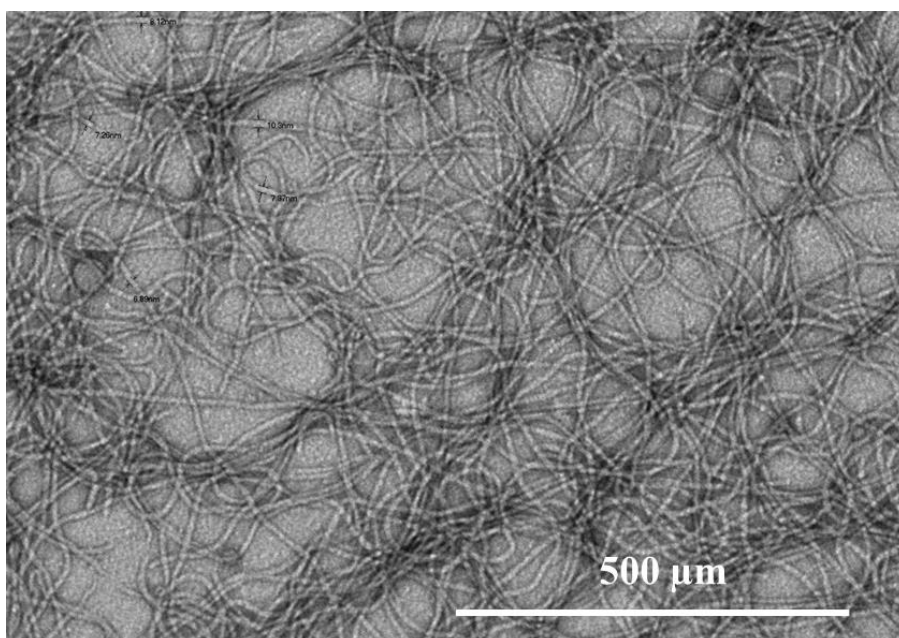


Photo 2 : Surnageant d'une culture de LMG12228 où une lyse spontanée a été observée. Les filaments observés sont des phages filamenteux Pf superinfectieux.

LMG12228 contenait aussi un gène codant pour une exotoxine : *toxA*. Il a donc fallu curer la souche de ces deux prophages et déléter le gène *toxA*, la souche ainsi construite a été nommée LMG3Δ. Les détails des constructions sont disponibles dans le rapport présent en Annexe 1. Cette construction fait l'objet d'une demande de brevet en cours chez Pherecydes Pharma. Lors de ces constructions, je me suis beaucoup intéressée aux phages filamenteux et à leur importance dans la virulence de leur hôte.

En parallèle, un travail avait été initié dans l'équipe INRAE sur des viromes d'échantillons fécaux de porcs prélevés dans des élevages utilisant des quantités variées d'antibiotiques : l'objectif premier était de détecter si les phages de ces viromes codaient pour

des ARGs, au même titre que les plasmides ou les ICEs. Des travaux préliminaires avaient indiqué une abondance particulière de phages filamenteux dans ces viromes. J'ai donc travaillé sur l'assemblage des reads des viromes de porcs, la détection en particulier des phages filamenteux, ainsi que sur la prédiction de l'hôte bactérien infecté par les phages filamenteux trouvés, ainsi qu'une autre famille de phages prévalents. Ce sont les résultats de ces analyses ainsi que de l'analyse du contenu en ARGs des viromes de porcs qui sont présentés sous la forme d'un article dans le chapitre 1.

Une fois la souche LMG3Δ construite (Annexe 1), je suis passée à l'étude des 4 phages anti-*Pseudomonas* sélectionnés par Pherecydes Pharma en amont de ma thèse. L'objectif ici était dans un premier temps de se rapprocher au maximum des conditions *in vivo* d'infection des phages afin d'étudier leur comportement et, dans un second temps, de déterminer leur récepteur en étudiant les mutations observées sur les bactéries mutantes résistantes qui émergent après infection. Dans le chapitre 2, sous forme d'article, l'impact des conditions de cultures sur les capacités d'infection des phages est étudié, ainsi que la fréquence d'apparition de mutants résistants. Différentes mutations sont alors observées, dont certaines – avec des expériences supplémentaires – nous permettent de déterminer les récepteurs des 4 phages.

Enfin, dans le chapitre 3, ce sont les mutations ne menant pas à la découverte des récepteurs qui sont étudiées. En effet, il a été remarqué que la perte de la chaîne O des LPS permettait aux 2 podovirus anti-*Pseudomonas* de mieux infecter la souche LMG3Δ. L'objectif ici était de déterminer le mécanisme à l'origine de cette amélioration de l'infection des podovirus. Nous avons d'abord pensé à un effet shielding : la chaîne O des LPS cacherait le récepteur des podovirus, le rendant difficile d'accès à ces derniers. Cette explication s'avère cependant simpliste, et d'autres mécanismes semblent entrer en jeu qui seront explorés dans ce dernier chapitre.

1. Caractérisation de viromes de porcs : Analyses des phages et prophages.

1.1. Etudes des phages et des prophages trouvés dans 14 viromes de porcs.

La diffusion de gènes de résistance aux antibiotiques est devenue un problème de santé majeure. L'un des vecteurs de diffusion sont les éléments génétiques mobiles, principalement les plasmides conjugatifs et les éléments conjugatifs intégratifs (ICEs). Cependant, les bactériophages, une autre catégorie d'éléments génétiques mobiles, contiennent rarement des ARGs (Enault et al., 2017) alors que, sous leur forme prophage, ils pourraient représenter une manière efficace de disséminer des ARGs. Les méthodes d'extraction d'ADN, de séquençage et d'assemblages se sont améliorées ces dernières années, permettant une étude plus poussée et plus fiable des fractions virales (viromes). Une étude a d'ailleurs été faite sur les ARGs dans les viromes des eaux usées, où les phages étaient peu nombreux comparés aux autres éléments génétiques mobiles (Maestre-Carballa et al., 2019; Petrovich et al., 2020). Malgré cela, plusieurs autres études rapportent la présence importante de phages contenant des ARGs dans les viromes de feces de porcs (Calero-Cáceres et al., 2019; Lekunberri et al., 2017; Wang et al., 2018).

Dans l'étude faites ici, des feces de porcs provenant de différentes fermes ont été récupérés, puis les viromes et les microbiotes totaux ont été séquencés pour chaque échantillon.

Les résultats détaillés de cette étude sont décrits dans l'article « **Analysis of viromes and microbiomes from pig fecal samples reveals that phages and prophages rarely carry antibiotic resistance genes** » qui a été soumis au journal ISME Communication. Les références données dans le résumé de l'article correspondront aux figures situées dans l'article. Ici, je présente un résumé de cet article. Dans cette étude, j'ai testé divers paramètres d'assemblage, puis effectué les assemblages des contigs viraux. J'ai enfin étudié les phages filamenteux identifiés.

1.1.1. Recherche des bactériophages et des prophages dans les feces de porcs : analyses des viromes et des microbiotes totaux.

Les fractions virales de 14 échantillons fécaux de porc ont été purifiées sur gradient, l'ADN (double et simple brin) extrait et amplifié par « multiple displacement amplification » (MDA) puis séquencé, comme expliqué dans le « Matériels et Méthodes » de l'article. Les reads ont été assemblés en contigs, et ceux avec une taille supérieure à 2kb ont été retenus et agrégés

s'ils se recouvraient à plus de 80% tout en partageant au moins 95% d'identité nucléotidique (niveau de l'espèce). Ceci a permis d'obtenir 7755 contigs non redondants. Les reads viraux ont ensuite été alignés sur ces 7755 contigs, et l'abondance relative de ces contigs a été calculée pour générer les matrices d'abondance « VP » (Virome de porc).

Pour les microbiotes totaux, l'ADN a été extrait, en utilisant un protocole adapté à la lyse bactérienne (et donc différent de celui utilisé pour les viromes, voir « Matériels et Méthodes »). Notamment, aucune étape d'amplification MDA n'a été réalisée, si bien que l'ADN simple brin n'a pas été séquencé. En revanche, le séquençage à haut débit a été réalisé à la même profondeur que les viromes et les assemblages ont été effectués de manière similaire. Une fois les contigs ainsi assemblés, ceux d'une taille supérieure à 2 kb ont été agrégés à 95% d'identité puis regroupés comme précédemment, ce qui a permis d'obtenir 220 000 contigs.

Parmi ces contigs des microbiotes totaux, une recherche des contigs viraux a été effectuée en combinant 3 critères : (i) résultat positif après analyse par l'outil VIBRANT, (ii) homologie avec un des contigs viraux VP par alignement BLASTn, (iii) affiliation virale par Kaiju (cf. Matériels et Méthodes). Sur les 220 000 contigs, 16 940 (7.7%) ont été déterminés comme d'origine virale.

Parmi ces contigs, il peut y avoir des prophages non-induits voire défectifs. Nous avons défini comme prophages non-induits ou défectifs les phages qui n'étaient pas reconnus par les reads de la fraction virale et donc ne formaient pas de particules virales (ou virions). Sur les 16 940 contigs viraux provenant des microbiotes totaux, 77% appartenaient à cette catégorie. Les 23% restants avaient une quantité significative de reads des viromes qui s'alignaient sur eux et ont été classés comme « phages actifs ».

1.1.2. Les viromes contiennent très peu de gènes de résistance aux antibiotiques

Les ARGs ont ensuite été recherchés au travers des contigs issus des viromes de porcs et des microbiotes totaux en utilisant les logiciels Resfam (Gibson et al., 2015) (Gibson et al., 2015), et Resfinder (Bortolaia et al., 2020). Pour les contigs des viromes de porcs, les résultats sont représentés dans le Tableau 1 : 8 contigs ont été identifiés comme contenant un ARG par Resfam, et 3 seulement par Resfinder (critères plus stricts). Sur les 8 contigs, aucun ne provenait d'un génome de phages : 2 étaient des plasmides, et les autres étaient des fragments d'ADN bactérien donc des contaminants. A la vue de ces résultats, aucun phage contenant des ARGs

n'a été trouvé dans les viromes de porcs. Le ratio maximal d'ARGs par rapport au nombre total d'ORF était inférieur à 9.8×10^{-6} , ou inférieur à 0.012 par Mb de contigs assemblés.

Pour les contigs des microbiotes totaux (bactériens ou viraux), 1764 ARGs ont été identifiés avec Resfam et 279 avec Resfinder. Cette différence est liée au fait que Resfam inclut les gènes de transporteurs ABC parmi les gènes ARGs, dont probablement des faux positifs. Nous avons donc seulement gardé le résultat obtenu par Resfinder, ce qui donne environ $1.8 (+/-0.5) \times 10^{-4}$ ARG sur le total des gènes, et 0.18 (+/- 0.05) ARG par Mb. Nous avons ensuite étudié les 168 contigs contenant les 279 ARGs, ainsi que leur abondance dans les 14 microbiotes de porcs. Les ARGs étaient globalement plus abondants chez les porcelets que chez les adultes, et les ARGs étaient principalement des gènes de résistance à la tétracycline. Enfin, nous avons voulu déterminer si certains des contigs contenant des ARGs étaient viraux. Sur les 16 940 contigs viraux des microbiotes totaux, 3 (0.02%) avaient au moins un gène de résistance aux antibiotiques. Les 3 contigs en question provenaient de la catégorie « prophages inactifs » (Figure 5A - page 75) : un était un hybride ICE/prophage, le deuxième une insertion de séquence (IS) juste après la région du prophage, et dans le dernier, l'insertion de l'ARG semble avoir provoqué l'interruption d'un gène (Figure 5B, page 75). En conclusion, notre recherche de phages contenant des ARGs dans les viromes et les microbiotes de porcs n'en retrouve aucun dans les viromes et quelques-uns dans les prophages inactifs.

1.1.3. *Les viromes de porcs sont riches en inovirus et en phages de la famille Oengus.*

Après l'étude des ARGs, nous avons voulu explorer les caractéristiques des viromes de porcs, tels que les familles de phages les plus abondantes. Parmi le contenu viral, deux clades principaux ont émergé : 344 contigs dont 272 circulaires étaient des inoviruses et 94 contigs étaient des phages proches génétiquement du phage tempéré Oengus qui infecte *Faecalibacterium prausnitzii*. Comme expliqué dans l'introduction, les inoviruses sont des phages filamenteux qui ont un cycle infectieux chronique durant lequel des virions sont sécrétés sans tuer la bactérie hôte. Ils ont un rôle dans la pathogénicité de leur hôte (voir Introduction). Les inovirus codent pour une protéine de la morphogénèse qui leur est caractéristique : la protéine I, dont le gène se nomme gpI. Dans la matrice d'abondance Figure 1 (page 65), les contigs d'inovirus ont été classés selon leur type de gpI. La moitié des contigs (181 des 344, soit 52%) possèdent un gène gpI du même type que le phage B5 qui infecte *Propionibacterium*

freudenreichii et qui est aussi le seul phage filamenteux infectant une bactérie Gram + reporté à ce jour (Chopin et al., 2002).

Nous avons alors tenté de déterminer les hôtes de ces inovirus en ne gardant que les génomes circulaires, car complets. J'ai alors recherché des spacers de CRISPR dans les 272 génomes circulaires d'inovirus, et obtenu 4 prédictions : deux phages infecteraient *Roseburia*, un *Ruminococcus* et un *Lachnoclostridium*. J'ai ensuite utilisé l'outil WISH (Galiez et al., 2017) et BLASTn pour compléter cette recherche. J'ai pu ainsi ajouter 67 prédictions aux 4 précédentes : la plupart des hôtes prédits faisaient partie du genre *Clostridium* (Figure 2A, page 69). Nous en avons conclu que des inovirus nouveaux et infectant des Firmicutes sont présents dans les échantillons fécaux de porcs.

Le second clade a été trouvé en faisant une analyse vCONTACT2 (Bin Jang et al., 2019) des 2991 contigs de *Caudovirales* issus des viromes avec 2214 génomes de phages de référence. Parmi les 7 clusters les plus riches (Suppl. Tableau 4, page 84), il y en avait un particulièrement large de 98 phages, dont 4 étaient des génomes de référence et 94 provenaient des contigs des viromes. Une analyse ViPTree (Nishimura et al., 2017) a ensuite été effectuée sur les 17 génomes les plus longs de ce cluster (45-62 kb) en comparaison avec des génomes de phages déjà référencés. La longueur des branches de l'arbre obtenu laisse supposer que le cluster formé par vCONTACT2 inclut plus qu'un seul genre viral (Figure 3B, page 71). De plus, sur les 4 phages de référence présents dans ce cluster, le phage Oengus qui infecte *Faecalibacterium prausnitzii* est plus proche des contigs VP que les 3 autres phages infectant *Actinobacteria*. C'est pour cela que ce cluster a été nommé « Oengus-like ». Des analyses complémentaires ont ensuite montré que peu de phages de ce cluster (3 sur les 38 ayant une taille supérieure à 40kb) ont une intégrase, contrairement à Oengus, suggérant qu'en majorité, ces phages issus du microbiote du porc soient virulents. Nous avons finalement voulu déterminer les hôtes des phages de ce cluster : les hôtes prédits font principalement partie de la famille des *Clostridiceae* (Figure 3C, page 71).

En conclusion, dans cette étude nous avons démontré que les ARGs sont rarement codés par des phages : la probabilité de trouver un ARG dans un génome de phage est environ 1000 fois plus basse que celle d'en trouver dans un génome de bactérie. Nous avons aussi découvert que les viromes de porcs sont riches en phages filamenteux et que la majorité d'entre eux semblent infecter des souches Gram +. La faible quantité d'ARGs trouvés dans les génomes de phages est un résultat encourageant pour le combat contre l'antibiorésistance. En effet, il

suggère que les phages ne sont pas des vecteurs de diffusion des ARGs. Concernant la phagothérapie, on ne s'attend donc pas à ce que les phages choisis pour traiter soient porteurs d'ARG (et c'est facile à vérifier) cependant, il demeure important de tester leur capacité à effectuer de la transduction généralisée. En effet, certains phages sont dits « transducteurs » parce qu'ils encapsident parfois de l'ADN bactérien et le transmettent aux bactéries qu'ils infectent.

1.2. Manuscrit de l'article n°1

Analysis of viromes and microbiomes from pig fecal samples reveals that phages and prophages rarely carry antibiotic resistance genes

Maud Billaud^{1,2}, Quentin Lamy-Besnier¹, Julien Lossouarn¹, Elisabeth Moncaut¹, Moira B. Dion^{4,5}, Sylvain Moineau^{4,5,6}, Fatoumata Traoré³, Emmanuelle Le Chatelier³, Catherine Denis⁷, Jordi Estelle⁷, Caroline Achard⁸, Olivier Zemb⁸, Marie-Agnès Petit^{1*}

1 Université Paris- Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350 Jouy-en-Josas, France.

2 Pherecydes Pharma 22 Bd Benoni Goullin, 44200 Nantes, France.

3 Université Paris-Saclay, INRAE, MGP, 78352 Jouy en Josas, France.

4 Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique, Faculté des sciences et de génie, Université Laval, Quebec City, Quebec, G1V 0A6, Canada.

5 Groupe de recherche en écologie buccale, Faculté de médecine dentaire, Université Laval, Quebec City, Quebec, G1V 0A6, Canada.

6 Felix D'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses, Université Laval, Quebec City, Quebec, G1V 0A6, Canada.

7 Université Paris-Saclay, INRAE, Génétique Animale et Biologie Intégrative, 78352 Jouy-en-Josas, France.

8 INRAE, Unité Génétique Physiologie et Systèmes d'Élevage, Toulouse, France

* Marie-agnes.petit@inrae.fr

Authors declare they have no competing interests.

Abstract

Understanding the transmission of antibiotic resistance genes (ARGs) is critical for human health. For this, it is necessary to identify which type of mobile genetic elements is able to spread them from animal reservoirs into human pathogens. Previous research suggests that in pig feces, ARGs may be encoded by bacteriophages. However, convincing proof for phage-encoded ARGs in pig viromes is still lacking, because of bacterial DNA contaminating issues. We collected 14 pig fecal samples and performed deep sequencing on both highly purified viral fractions and total microbiota, in order to investigate phage and prophage-encoded ARGs. We show that ARGs are absent from the genomes of active, virion-forming phages (below 0.02% of viral contigs from viromes), but present in three prophages, representing 0.02% of the viral contigs identified in the microbial dataset. However, the corresponding phages were not detected in the viromes, and their genetic maps suggest they might be defective. We conclude that among pig fecal samples, phages and prophages rarely carry ARG. Furthermore, our dataset allows for the first time a comprehensive view of the interplay between prophages and viral particles, and uncovers two large clades, inoviruses and Oengus-like phages.

Introduction

The spread of antibiotic resistance genes (ARGs) is a major health concern, and powerful sequencing techniques are now making it possible to examine the contribution of mobile genetic elements to their spread. The main mobile vectors currently recognized as responsible for spreading ARGs are conjugative plasmids and integrative conjugative elements (ICEs, also known as conjugative transposons)¹. In both cases, ARG spread occurs through conjugation, a process that involves the formation of a conjugative pilus, the contact between a donor and a recipient bacterium, and the transfer of the genetic element. ARG are frequently found in pig fecal samples², and their associated mobile genetic elements start to be well documented. For instance, analyses were conducted on a set of metagenomics contigs that were cloned on bacterial artificial chromosomes. Eleven of them were conferring resistance to tetracycline to *Escherichia coli*, and nine of the *tet* genes were present on mobile genetic elements (plasmids or ICEs)³.

Interestingly, bacteriophages, another category of mobile genetic elements, apparently rarely encode ARGs⁴. Phages can usually be divided into two large groups based on their lifestyle. Virulent phages inject their genetic material into bacteria, replicate and lyse their host cells, thereby releasing several new virions at the end of this lytic cycle. Temperate phages are able to alternate between the lytic cycle and a dormant stage where they maintain their genetic material within the bacterial genome as prophages (following an integration step or as plasmids). While dormant, prophages may still express a few of their genes, including some are beneficial to their host, such as *bor*, which is involved in resistance to serum complement killing⁵, and the iron transporter *sitABCD* genes⁶. In theory, a temperate phage and its expression profile in a prophage state would offer an efficient process for the dissemination of ARGs. So, why have they so rarely been detected?

Initially, their absence was noted on the basis of single phage biology methods, such as phage culturing and sequencing, and therefore the investigations lacked breadth. On the other hand, qPCR studies have reported the presence of ARGs in virus-enriched environmental samples from natural waters⁷, wastewater plants⁸, or human/animal fecal samples^{9,10}. However, virome preparations are often highly contaminated by bacterial DNA^{11,12}, making it difficult to discern whether the ARG originates from viral or bacterial DNA using qPCR alone. A distinct process through which phages can mobilize ARG is generalized transduction. During this process, instead of packaging their own genome in their capsid, some phage particles will

package bacterial DNA (sometimes at high frequencies¹³). This process is far from universal in phages, and the fraction of phages capable of performing such task is unknown.

Shotgun metagenomics studies of enriched viral fractions (viromes) and improved programs for assembling short reads into quality contigs can now help determine whether ARGs are found in phage genomes. ARGs were recently investigated in the virome from wastewater samples, and they were found to be scarce compared to other genetic elements^{14,15}. However, several reports have raised a concern with pig fecal samples, which appeared to be rich in phage encoded ARG^{9,16,17}.

Another approach for investigating the ARG content of phages is to study prophage regions of completely assembled bacterial genomes. Recent reports on pathogenic bacterial species such as *Acinetobacter baumannii* or *Streptococcus suis* found prophage regions with ARGs¹⁸⁻²⁰. In these *in silico* studies, the difficulty lies in the ability to discern whether such prophages are defective or still functional and able to, for instance, complete lytic cycles, form viral particles, and therefore spread ARG in bacterial populations.

Here, with respect to the ARG content in pig fecal viromes, we elected to extract and analyse new samples, because the presence of bacterial DNA contamination was either clearly mentioned in previous reports¹⁷, or it was poorly documented, by the absence of detection of a DNA band after PCR with 16S universal primers. Moreover, we sequenced in parallel the purified virome and the total microbiota of the same samples to have access to the prophage content and be able to test whether they were active (i.e. present also in the virome fraction). Our study presents the results of these analyses performed using 14 pig fecal samples collected from farms with varying degrees of antibiotic usage and reports the presence and absence of ARG among microbiota and viral particles, respectively.

Materials and Methods

Sampling

Fourteen farms in Brittany (France) were selected during year 2015, for pig feces sampling based on their various veterinary practices and more precisely, on their antibiotic treatment protocols. The antibiotic treatments for the fourteen animals used in our study are shown Suppl. Table 1. Since piglets are more heavily treated with antibiotics, five of the 14 samples were collected from piglets rather than adults.

Virome DNA sample preparation and sequencing

Viral particles were enriched from fecal samples following the route 5 protocol described in Castro-Mejia et al.²¹ but with minor modifications. Two grams of frozen fecal sample were resuspended into 50 mL of PBS adjusted to 0.2 M NaCl, homogenized and agitated overnight at 4°C on a rolling device. After a prefiltration step on glass-fiber filters, samples were centrifuged at 5000 g 30 minutes at 4°C, and bacterial pellets were discarded. This centrifugation step was repeated until supernatants were clear (up to 3 times). Five grams of polyethylene glycol 8000 was then dissolved into the phage supernatants, and phages were left to precipitate overnight at 4°C. The precipitate was then centrifuged for 10 minutes at 15,000 g, after careful removal of PEG, and resuspended into 1 mL of SM buffer (50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM Mg-SO₄). A iodixanol-SM step gradient was then formed in a 12-mL ultracentrifugation tube (Beckman, ultraclear tubes), by applying 6 mL of a solution at 20% iodixanol-SM, and then adding slowly with a Pasteur pipette, below this volume, 4.5 mL of a 45% iodixanol-SM solution. Finally, the phage sample (1.5 mL) was placed on top of the tube. The sample was ultracentrifuged for 5 h at 40 000 g, at 10°C. Most of the 14 gradients contained two visible bands (see Suppl. Fig. 1). The lower band was the viral band, which was collected from the bottom of the tube and dialyzed against SM buffer (4 h) in two successive 1-L volumes (final volumes 3-5 ml after dialysis). Samples (0.9 mL) were then treated with DNaseI (2.5 U, 1h30 with Turbo DnaseI, Ambion) to remove residual free DNA.

To check for bacterial DNA contamination of the virome preparations prior to DNA extraction, qPCR was performed with universal 16S primers and compared to an *E. coli* total DNA standard. Total nanoparticle concentrations were also estimated with a Videodrop apparatus (Myriade), an apparatus that detects nanoparticles using light interferometry²². Most samples had less than 10 ng/mL of bacterial DNA for every 10¹⁰ nanoparticles and were not further treated prior to gradient loading. Filtration (0.2 µm pore size, polyethersulfone filters)

was performed on four samples (VP4, VP5, VP15 and VP17) that were considered too heavily contaminated with bacteria. For viral DNA extraction, 1 mL of viral sample was added to a 1-mL solution of 50% phenol/50% chloroform-iso-amyl alcohol (24:1), manually mixed for 1 min, and centrifuged for 20 min at 12 000 g. The soluble phase was recovered and treated a second time with phenol-chloroform. The soluble phase was then added to an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1), emulsified and centrifuged for 5 min at 12 000 g. DNA from the soluble phase was finally precipitated by adding sodium acetate (0.3 M), 1 µg of glycogen as the DNA carrier, and 0.6 volume of isopropanol. The DNA pellet was collected by centrifugation, washed with 70% ethanol, dried, and resuspended in 11 µL of 10 mM Tris pH 8. DNA was quantified using Qubit. Due to the insufficient total amount of DNA obtained (20 to 250 ng out of the 600 ng required), a multiple displacement amplification step (MDA, with kit Genomiphi2) was performed on 1 µL of each sample (90 min at 37°C), after microdialysis (0.02 µM VWPS filters, Millipore) to remove potential inhibitors. This step allowed for the inclusion of ssDNA viruses in the analysis. However, RNA viruses (which are the less abundant among known bacterial viruses) were excluded. Libraries were prepared using the Truseq kit and sequencing was performed on an Illumina Hiseq platform (2 x 150 nt, pair end), with an average depth of 50 million total reads per sample.

Virome read cleaning, assembly and contig treatments to constitute the VP reference dataset

Reads from each sample were trimmed using Trimmomatic²³ (ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:100), and dereplicated with the fastx-unique tool from the free version of the Usearch9 suite (R. Edgar, <http://drive5.com/usearch>). Reads were then paired again using the fastq_pair program (Edwards Lab), and unique reads (~30% of total) were kept as well. Assemblies were run separately on each sample using SPAdes (Bankevich et al., 2012) (version 3.13, parameters: --only-assembler -k 21,33,55,77,99,127) to include both paired and unique reads. The meta option in SPAdes, which does not permit inclusion of unique reads, was disregarded in order to keep as many reads as possible for assemblies, and improve contig lengths. A clustering step of viral contigs from all samples was performed at 95% nt identity using CDhit (psi-cd-hit.pl -c 0.95 -G 0 -g 1 -aS 0.9 -prog blastn) and only contigs that were equal to or above 2 kb were retained for further analysis. The final viral dataset contained 7755 virome-de-porc (VP) contigs (out of the original 8090 contigs prior to clustering).

To examine the assembly completeness of the VP contigs dataset, dereplicated reads were mapped back on the 7755 contigs using the Bowtie2²⁴ with default parameters (allows multiple

matches, with random affiliation). On average, 75% of total virome reads were mapped back on the VP collection. To generate abundance matrices, mapping result were treated with tools from the Samtool suite²⁵ (view, sort, index, idxstat), and the number of reads found on each contig was finally converted into reads per length of the contig (in kb) per million (RPKM). The VP matrix contained high RPKM values, ranging from 5 to 91 000.

Microbiota DNA sample preparation and sequencing

Total microbiota DNA extraction was performed according to protocol H of the international standards for human fecal samples (IHMS, <http://microbiome-standards.org/index.php?id=Sop&num=007>), starting from 0.2 g of frozen fecal sample. In short, purification steps involved guanidine thiocyanate/SDS sarkosyl treatment for 1h at 70°C, followed by bead beating to break open all bacteria, then repeated polyvinylpyrrolidone applications to remove polyphenols. DNA was then precipitated with isopropanol, washed and dried. This protocol should also break open the viral capsids, thanks to the initial guanidine thiocyanate protein denaturation step, although the question has never been specifically addressed, to our knowledge. However, the absence of any step to convert ssDNA into dsDNA prevented sequencing of ssDNA viruses. Libraries were prepared using the Truseq kit and sequencing was performed on an Illumina Hiseq platform (2x150 nt, pair end), with an average depth of 61 million total reads per sample.

Microbiota read cleaning, assembly and contig treatments to constitute the P reference dataset

The same steps applied for viromes were followed for total microbiota, with some simplifications. Briefly, reads of each sample were trimmed with Trimmomatic (same parameters as virome reads, except MINLEN=125), and then directly assembled with SPAdes (same options as for viromes). A clustering step of each individual microbial sample was performed at 95% nt identity with CDhit, and only contigs of a size equal to or above 2 kb were retained for further analysis. The microbial dataset comprised 220,000 pig (P) contigs (from 271,163 contigs prior clustering).

To examine the assembly completeness, reads were mapped back onto the P contig dataset using Bowtie2 on default parameters. On average, 69% of microbial reads were mapped back on the P contigs collection. To generate abundance matrices, mapping results were treated with tools from the Samtools suite, and the number of reads found on each contig was finally

converted into RPKM. The P contigs matrix contained RPKM values that were 10-times lower than the VP matrix, ranging from 0.71 to 6890.

To estimate the main phyla present in the microbiome samples, a taxonomic affiliation was determined using Kaiju²⁶ for the top 10 585 P contigs with a global abundance above 10 RPKM. To sum up contig abundances by phyla, those which might belong to the same microbial species were binned into clusters based on kmer composition and co-occurrence with VAMB²⁷. A single contig per VAMB cluster was conserved in the abundance matrix, which ended up containing 5862 contigs (~species). Moreover, in the context of ARG analyses, Kaiju-based taxonomic assignment of interesting contigs was complemented with a BLASTn against the nt database (retaining the best hit with E-value below 10^{-50} , when present).

Bacterial contamination level of the viral-enriched DNA

The amount of bacterial DNA contamination of the virome reads was estimated using two methods. First, reads were mapped onto the 16S SILVA collection²⁸ with Bowtie2. All samples had a ratio of 16S matching reads over total reads (prior dereplication) of 2×10^{-4} , which is a cut-off for viromes with satisfactory-level purity¹². The maximal 16S read ratio was 3×10^{-5} in sample VP2 (see Suppl. Table 2). Second, reads were submitted to the viromeQC program¹¹, which estimates a viral enrichment yield. This is done by comparing the frequency of reads matching with 16S, 23S and ribosomal protein encoding genes, to that expected for global microbial metagenomics samples. Enrichment was 100-fold, except for 3 samples (lowest value 7-fold, sample VP2, Suppl. Table 2). ViromeQC results matched well with the 16S method, and showed that the pig viromes were essentially viral in content.

Analysis and labeling of the bona fide viral contigs within the VP dataset

The analysis was conducted in two steps. From the VP dataset of 7755 contigs, the 2480 contigs with the highest RPKM (above 100) were first analyzed. Several programs and methods were applied to identify non viral contigs (bacteria and plasmids, see suppl. Figure 2). Virsorter²⁹ recognized 23% (568 contigs) of these contigs as viral (all categories were accepted, cat1 and cat2 were vastly dominant). The Inovirus detector³⁰ was then run on the remaining contigs and 143 inoviruses (putative or confirmed, most were circular). To add contigs corresponding to phages recently added into public databases, MegaBLAST was run against the nt database of NCBI (April 2020, E-val below 10^{-16}). As bacterial hits could also correspond to prophages, all BLASTn hits, as well as the remaining unclassified contigs were taken for a search centered on proteins, making use of PHROGs, a database of phage proteins (Terzian et al., submitted,

see <https://phrogs.lmge.uca.fr>). For this, an HMMER hmmscan³¹ was used for proteins from all remaining contigs against PHROG profiles was run, and all contigs with at least 5 orfs and 35% of them homologous to a PHROG family (E-value below 10^{-12}) were counted as phages. In total, this BLASTn + PHROGs step allowed for the recognition of 966 additional contigs from the following origins: 654 phage, 232 eukaryotic viral (collectively designated below as “viruses” for short, while “phages” is kept for bacterial viruses), 72 bacterial and 8 plasmid fragments. Next, the VIBRANT classifier³² was used on the remaining uncharacterized contigs, leading to additional 325 phages and 29 viruses. In the end, 1951 contigs were found to be of viral nature, 72 bacterial, 8 plasmidic, and only 449 contigs of the 2480 (18%) remained uncharacterized.

In a parallel study on infant gut viromes, various tools dedicated to the recognition of viral contigs were compared, and VIBRANT was among the best³³. The 1951 viral contigs detected in the top 2480 contigs with high abundance (as described above, see also Suppl. Fig. 2) were therefore verified using VIBRANT. A high degree of overlap was observed between manual analysis and automatic VIBRANT detection for all *Caudovirales* and *Petitvirales* genomes (92.5% and 99% were detected by VIBRANT, respectively). VIBRANT was also successful at detecting eukaryotic viruses, as 79% of them were detected. VIBRANT was less successful at detecting inoviruses (35% detected).

In a second step, we used VIBRANT and the Inovirus detector on the remaining 5275 low-abundance contigs and obtained an additional 3654 viral and 201 inovirus contigs. In total, 5806 contigs (75%) were recognized as viral (and 77.3% of those treated by VIBRANT, i. e. among contigs with ≥ 4 ORFs). Finally, 44% of these 5806 viral contigs were considered complete or high quality by CheckV³⁴.

Contig annotations and ARG search

VP and P contigs were annotated using Prokka³⁵ (version 1.13 with --addgenes and --namer options). Following annotation, three ARG searches were compared for the VP contigs: (i) hmmscan against ResFam profiles (³⁶ --cut_ga option), as in our previous report⁴; (ii) BLASTp against the MUSTARD database³⁷ ($\geq 95\%$ id and $\geq 90\%$ alignment cut-offs), built in part with ARG genes found in the human gut; (iii) BLASTn against the version 4.0 release of Resfinder³⁸, with parameters $\geq 90\%$ identity, $\geq 60\%$ coverage. For microbial P contigs, only the Resfam and Resfinder searches were performed. A deeper analysis was then conducted on the most prevalent contigs. BLASTn search against nt (as of November 2020) with contig

P4_NODE_19877 (2256 bp, contains a *tetR* gene), indicated that among the top 176 BLASTn hits ($\geq 99\%$ identity, 100% coverage), 41 were *Clostridiales*, and 11 *Bifidobacteriaceae* complete genomes. In the vicinity of the *tet* gene, genes annotated as *traG*, *mobC* and relaxase were found, suggesting the presence of an ICE.

Elements of VP contig classification

- single-stranded (ss) DNA viruses: A total of 2807 ssDNA viruses were recognized. *Petitvirales* were recognized either because they were specifically mentioned (“non-*Caudovirales* gene enrichment” score) in the Virsorter output, or by searching for terms ‘VP1’, ‘VP4’, and ‘Pilot’ in the annotated contigs of the VIBRANT output. The ssDNA eukaryotic viruses were mostly detected thanks to Megablast searches against the viral section of nt, and therefore directly affiliated. A ‘REP_TLCV’ (rep gene of tomato-leaf curl virus) annotation in VIBRANT files allowed to detect some additional eukaryotic viruses. *Tubulavirales* were detected thanks to Inovirus-detector³⁰. Most (272 of 344 total inoviruses) were circular, and these were analyzed into more details. A vCONTACT2 clustering of these 252 circular contigs revealed 50 clusters with a quality above 0.5, involving altogether 65% (179 phages) of all input genomes. Pairwise ANI (average nt identity) were also computed for all genomes sharing the same *gpi* gene, a gene typical of filamentous phages and needed for virion morphogenesis. Species membership was defined for pairs with ANI above 0.95, and genus boundary ANI > 0.75. A summary of the 272 circular genome properties is listed in Suppl. Table 3.

- double-stranded (ds) DNA viruses: All viral contigs not recognized as ssDNA viruses were placed abruptly into the *Caudovirales* category (2999 in total). These were clustered with vCONTACT2³⁹, together with the 2191 reference phages from Viral Refseq v88, and 23 additional intestinal phages such as LAK phages⁴⁰, phages infecting *Faecalibacterium prausnitzii*⁴¹ and *Roseburia intestinalis*⁴². For 1675 of the 2999 VP contigs, a cluster was formed (478 clusters altogether), but only 18 of them contained reference phage genomes. All clusters of a quality above 0.5 (as indicated in the ‘quality’ column of the clusters output file of vCONTACT2) were considered further, and the top 7 are listed in Suppl. Table 4. These vCONTACT2 clusters were used to coalesce the most abundant *Caudovirales* contigs.

- Huge phages. VP homologs to the 361 huge phage genomes⁴³ were searched for by two approaches: first, the whole VP dataset was compared with BLASTn (E-val < 10^{-5}) to the huge phages. Very few hits were found (30) and none with a query coverage above 14%. Then a more sensitive search was done with tBLASTx on a subset of large virome VP contigs and

microbiota P contigs. These included the 21 VP contigs of a size above 150 kb, a 381 kb P contig considered viral due to its homology to a VP contig by BLASTn, and 5 VAMB bins having both a Kaiju annotation as viral and a cumulated size above 180 kb. These contigs were compared to the 35 closed_circular_curated huge phages⁴³ and the 15 complete *Prevotella* megaphages⁴⁰ with cutoffs placed at 30% query cover, 65% (amino-acid) identity and E-value 10^{-3} .

Phage genome annotations were performed by running a BLASTp of ORFs predicted with Prokka against the NR database at NCBI (E-val $< 10^{-5}$), and if needed HHpred against PDB (P > 98%) using the online Tübingen Toolkit Webserver⁴⁴, and alignments maps were done with Easyfig⁴⁵.

Partitioning active phage versus inactive prophage contigs in the microbial P dataset, among contigs detected as viral with VIBRANT.

A schematic summarizing the classification of active phage and inactive prophage contigs is shown in Suppl. Figure 3. Among the 220 000 P contigs, the viral ones were searched with VIBRANT. This gave 16 612 positive contigs. To complement this collection, 328 contigs matching by BLASTn to a VP contig (> 95% nt identity) or affiliated by Kaiju as viral, were added (total 16 940 viral P contigs). We reasoned that this set of viral contigs represented two very different situations, either virulent or temperate phages replicating and forming virions (category “active phage”), or dormant prophages that do not manifest viral activity (ie no capacity to form a free virion, at least in the ecosystem studied, category “prophage”). We took advantage of the virome reads to partition this set into either “active phage” if the viral P contig was matched by virome reads, or “prophage” if not, as described below.

We were also interested in the overlap between VP contigs and these viral P contigs. In a first step, therefore, the virome VP contigs were placed together with microbiome viral P contigs and dereplicated (95% identity, 90% coverage), generating a set of 23 181 non redundant viral contigs. Among them, 6658 were found only in the VP set (54 Mb cumulative length). There were 660 contigs in the “overlap” category, where contigs are representing both viral P and VP segments, with in some cases many small P contigs matching a large VP contig, and also the reverse situation, indicating that viral assembly was incomplete in both cases, unsurprisingly (24 Mb). The last 15 873 contigs were found only in the P assembly (178 Mb).

In a second step, virome reads were mapped onto the complete collection of 23 181 non redundant viral contigs. We reasoned that the modest overlap of the VP contigs with P ones

(only 14% of VP have a match to P) could be the result of partial assembly, so that parts of the same phage may be assembled in each set. Therefore, it was expected that some of the P contigs having no overlap with any VP contig might still be corresponding to active phages. In this mapping, the VP contig with lowest cumulative abundance across the 14 samples had a RPKM value of 2.6. We then considered as “active viral contigs” all P contigs with global RPKM abundance above 2.6. This added 3049 P contigs as active viral contigs (39 Mb). In total, of the 16 940 starting viral P set, 4021 contigs (23.7%) belonged to the active phage category (corresponding to these 3049, together with 972 P contigs present or included into VP contigs of the “overlap” set), while the rest was considered inactive prophages.

Host predictions for interesting phage clades

For the 7755 VP contigs, host prediction was first attempted by searching for matching CRISPR spacers, using the recent spacer database from Dion et al.⁴⁶ and the default parameters (a maximum of two mismatches allowed). A host was predicted for 469 of these contigs (6% of total contigs). Next, a set of spacers was extracted from our P contigs (of all sizes, including those below 2 kb). For these spacers, CRISPR arrays were first identified using CRISPRDetect v2.2⁴⁷. Spacers were then extracted from the CRISPRDetect GFF output file along with the following metadata: contig ID, start and end positions on the contig, length, sequence, orientation and position inside the locus. Spacers were assigned a unique ID and a custom BLAST database was generated (n = 14 941 spacers). Next, BLASTn v2.9.0 was used to perform pairwise alignments between the P contig spacers and the selected viral contigs, applying the same filters as previously described⁴⁶. A total of 1075 (14%) VP contigs matched the in-house spacer collection. For 148 of the P contigs containing such matching spacers, a taxonomical affiliation could be proposed, based on the Kaiju indication followed by a BLASTn search (E-value < 10⁻¹⁶) against the Bacteria section of the nt database. As expected, affiliation was more successful using the in-house spacer collection, although in most cases, taxonomical affiliation of these in-house P contigs was unsuccessful (many very short contigs).

For the two clades of phages mostly focused in our study, 272 inoviruses and 94 Oengus-like phages, 15 and three hosts were predicted by this first method, respectively. Three additional tests were performed on this subset: (1) submission to the spacer collection at JGI (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/vr/main.cgi>) and applying the two-mismatch cutoff as above, (2) BLASTn search against NCBI nt (E-value < 10⁻⁴ and coverage > 10%), and (3) WiSH⁴⁸. WiSH computes conditional probabilities of all 9-mers in bacterial genomes of the database (2155 bacterial genomes meaningful for the ecosystem were taken) and compares them to that

of the query phage. The first output is the probability (expressed as log-likelihood) that the given phage will infect each of the bacteria in this collection. The closer the log-likelihood is to 0, the more likely the host is correct. A log-likelihood is also calculated for the phages that do not infect the bacteria of this same collection. By comparing these two log-likelihoods, a second statistic (a p-value) gives the confidence of the WiSH prediction. Four inoviruses and four phages of the Oengus cluster with known hosts were tested as controls. Only the five best log-likelihood with a p-value inferior or equal to 0.05 for each phage contig were considered as putative hosts. Next, a filter was applied on the log-likelihood values, which had to be below those obtained for the control phages. Finally, the bacteriophages with 4 to 5 predictions from the same taxonomic order were considered sure and kept.

Data availability

For the 14 virome and metagenome samples, raw sequencing data, as well as spades assembly outputs (contigs of a size above 2 kb, named as in the manuscript, before the clustering step at 95% identity) are accessible through the NCBI, Bioproject PRJNA741980. .

Results

Among most abundant virome contigs, only 18% correspond to unclassified contigs

Viral fractions of the 14 pig fecal samples were purified, separated on gradients, their ss- and ds-DNA extracted, amplified by multiple displacement amplification (MDA), and sequenced, as described in Materials and Methods. Reads were assembled into contigs, those of a size above 2 kb were retained, and clustered at the species level (>95% nt identity). Viral reads were mapped back onto the 7755 contigs obtained, and relative abundance of these contigs were computed to generate the so-called “VP” (for ‘virome-de-porc’) matrix.

The 2480 contigs with total RPKM values above 100 were then selected for in-depth viral sequence identification (see Materials and Methods and Suppl. Fig. 2A). Overall, 82% of all abundant contigs (2031) could be classified either as viral or, in a few cases, bacterial or plasmidic, therefore reducing unclassified contigs (the so-called “viral dark matter”) to only 18% of the sub-set of abundant VP contigs (Suppl. Fig. 2B). Among these classified contigs, 83% were phages, and 13% eukaryotic viruses (Suppl. Fig. 2C), and the remaining contigs were bacterial or plasmid DNA. Most phages belonged to the *Petitvirales* order (52% of phages), which is consistent with previous research⁴⁹, and the most common viruses were from the *Smacoviridae* family (31 % of viruses, Suppl. Fig. 2D).

An overview of the abundance matrix of these 2480 most abundant contigs, grouped by clades, is shown Fig. 1 (see full matrix in Suppl. Table 5).

	Adult pigs									Piglets					%
	17	9	13	15	3	5	16	11	6	4	8	2	7	12	
<i>Propionibacterium</i> B5 gpl	47 698	7 236	5 645	5 048	5 760	3 586	4 736	1 455	1 950	2 867	2 583	629			7
<i>Acholeplasma</i> MV-L1 gpl	7 732	255		852				344	756				299		
<i>Ralstonia</i> RSM1 gpl		968	283			826		708		9 574		138			
Other <i>Tubulavirales</i>	226	788	1 095	1 519	1 904	1 578		3 280	2 155		2 264				
<i>Gokushovirinae</i>	32 158	7 434	5 914	13 292	5 783	4 844	13 628	1 249	9 902	1 497	4 485		323	4 581	30
<i>Alphatrevirus</i>									1 137						
Other <i>Petitvirales</i>	15 140	21 885	15 620	54 182	12 192	91 843	56 344	17 350	38 736	39 194	22 729	4 223	8 399	66 471	
<i>Smacoviridae</i>	17 770			10 204		428	3 524	1 237	5 703	3 709	5 946		2 623	7 734	21
<i>Circoviridae</i>			819	5 736	807	4 464	775	11 510	2 610	2 418	2 623				
<i>Gemycircularvirus</i>				997							2 499		205		
<i>Genomoviridae</i>				2 337							792				
CRESS	525	3 749	4 091	1 000	13 726	36 216	2 129	5 162	12 577	1 413		16 019	397	16 056	
Other non-bacterial viruses	4 592	3 133	5 975	6 288	1 680	7 855	30 853	36 067	85 695	6 148	2 602	2 235	902	459	14
cluster734_21kb	103														
cluster62_125kb	137														
cluster484_62kb			154												
cluster448_24kb								311							
cluster_423_48kb								1 057							
cluster374_104kb										168					
cluster725_20kb											127				
cluster_r1t			317				307			113	204				
cluster535_29kb											274				
cluster23_37kb											321	111			
cluster737_65kb												158			
cluster444_37kb												210			
cluster_100_29kb							113			443		226			
cluster643_24kb												437			
cluster_Oengus		90		62	460			52				686		99	
cluster_T1															
cluster_440_30kb													473		
cluster361_37kb													530		
cluster657_26kb													10 627		
cluster119_75kb															
cluster394_40kb															
cluster_IME207														872	
cluster_CrAssphage01									1 023					1 087	
Other <i>Caudovirales</i>	15946	16708	11373	19869	3360	6918	22230	20309	8588	16261	18952	28474	25965	36019	1
<i>Bacteroidetes</i>			96									13 487		260	
<i>Firmicutes</i>		709	253	179				974			1 337	768	268		
<i>Proteobacteria</i>												1 654			
Plasmids		2 263	153		374	772		770	243					101	0
Unclassified contigs	39868	18 142	62 847	13 538	138 247	55948	42 011	29 526	21 235	30 790	12 308	27 463	25 563	5 898	27

Figure 1: Abundance matrix of the 2480 most abundant virome contigs, grouped into clades. Abundances are expressed as RPKM (grey scale on the right). The last column shows the percentage of total RPKM in each contig category: *Tubulavirales*, *Petitvirales*, non-bacterial viruses, *Caudovirales*, Bacteria, Plasmids, and Unclassified.

It should be noted that ssDNA viruses abundances cannot be compared to dsDNA ones (*Caudovirales*), due to their over-amplification during the MDA step ^{50,51}. Still, *Petitvirales* represented 30% of total abundance, followed by non-bacterial viruses (21%) and *Tubulavirales* (7%). *Tubulavirales* contigs (described in detail below) were grouped according to their type of morphogenesis protein, encoded by *gpI*. We noted a gradient of abundance in *Tubulavirales*, with adults containing most of them (samples are organized in the matrix following this gradient). Among *Caudovirales*, some of the contigs were grouped into higher order taxons (see below). In these cases, the contigs were labelled with the name of a similar

reference phage genome when available, and were otherwise assigned a vCONTACT2³⁹ cluster number (followed by the size of the circular or largest contig). Still, most signals came from unclustered contigs. We noted that piglets had significantly higher abundances of *Caudovirales* compared to adults ($P=0.0036$, Student t-test), and fewer ssDNA eukaryotic viruses (not significant, $P=0.07$). The remaining lower abundance contigs were also classified (see Materials and Methods) and 72% were found to be viral. We conclude that the majority of contigs from these highly purified viromes were indeed viral in nature, with a substantial proportion being ssDNA viruses.

The few antibiotic resistance genes found in viromes are not encoded by phages

ARG were then searched among the complete set of 8090 VP contigs of a size above 2 kb (before clustering, and regardless of their abundance) in viromes. Contigs that were not predicted to be viral were also included (Table 1, see Materials and Methods).

Table 1: The eight ARG-positive contigs assembled from viromes

NODE	ARG name	ResFam	ResFam (E-val)	Resfinder	CONTIG properties		
					phage VIBRANT	best BLASTn hit size, nt (@=circular)	RPKM in viromes
VP8_NODE183	ABC_efflux		2.9e-97	NO	no	<i>Parabacter. distasonis</i>	16 427
VP2_NODE298	MexH		2.2e-42	NO	no	Alistipes	13 316
	RND_efflux		0	NO			
VP7_NODE302	tet(40)		NO	YES	no	<i>Eubacterium maltosivorans</i>	7 945
	ANT9		1.3e-80	NO			
VP7_NODE1	ABC_efflux		7.9e-89	NO	no	Clostridiales	301 151
VP7_NODE2	ABC_efflux		5.1e-84	NO	no	-	230 004
VP7_NODE3	tet(W)		0	YES	no	-	226 564
VP8_NODE804	TEM		1.8e-205	YES	no	<i>E. coli</i> cloning vector pET11a	5 676 @
	tet_MFS_efflux		1.9e-80	NO			
VP12_NODE394	APH3'		3.2e-113	YES	yes	<i>C. difficile</i> plasmid pCd13	5 473 @

The search against ResFam profiles³⁶ revealed 8 VP contigs encoding 10 putative ARG, 5 of which were also retrieved with a BLASTp search against MUSTARD³⁷. The 5 missing ARG encoded ABC transporters, a category which is simply not included in MUSTARD. Finally, a more stringent search of confirmed ARG with Resfinder³⁸ reported only 3 of the 10 initially uncovered ones (Table 1). Interestingly, in one of the 8 ARG-positive contigs (VP7_NODE302), a *tet(40)* gene was found that was undetected with the two previous tools.

Detailed inspection of the 8 identified contigs revealed that none of them originated from phages, despite a positive VIBRANT³² prediction for one of them (contig VP12_NODE394, last line in Table 1). This phage candidate, however, turned out to be 99.8% identical to plasmid pCd13 of *Clostridioides difficile* (Genbank accession MH229772). In addition, this 5.4 kb contig was circular and contained a 1.5 kb deletion compared to pCd13. We therefore conclude that it is rather a plasmid than a phage. Of note, the second circular contig, VP8_NODE804, was 100% identical to synthetic plasmid pET11a with its *NdeI* restriction site mutated. We think this laboratory vector comes from the control DNA of the Genomiphi kit used to prepare DNA prior sequencing, suggesting that the sequencing depth was sufficient to detect even minor contaminants. Homologs for all remaining, non phage contigs were searched with BLASTn against NCBI nt database (May 2019) and most of them had a taxonomic association that is typical of intestinal bacterial species (Table 1).

We noted that the six ARG-positive contigs of chromosomal origin came from the viromes with less viral enrichment (Suppl. Table 2). Given the lower level of purity, it seems likely that these fragments came from remaining free bacterial DNA rather than viral particles. In contrast, the plasmid contig homologous to pCd13 from *Clostridioides difficile* came from a highly purified virome, making bacterial contamination unlikely. This plasmid may have been carried over by generalized transduction.

Taken altogether, the few ARG-positive contigs we found in highly purified pig viromes were not phage-encoded, even in samples originating from farms with heavy antibiotic use, such as sample 16. Compared to the 5806 contigs positively recognized as viral, this places the frequency of ARG-encoded viral contigs below 0.02%. The maximal ARG gene ratio over total viral orfs was below $1.2 \cdot 10^{-5}$, or below 0.015 per Mb of assembled viral contigs.

Pig viromes are rich in inoviruses and Oengus-like phages

Following the examination of ARGs, we explored the main characteristics of these virome assemblies. Among the rich viral content, two main clades emerged. First, 344 VP contigs (272 of them circular) were found to correspond to inoviruses — filamentous phages performing chronic bacterial infections, during which virions are secreted from the bacterial host without killing it⁵². Inoviruses encode a characteristic morphogenesis protein I (gene name *gpI*) which binds to the bacterial membrane and sets the secretion process into motion. Taxonomically, the best characterized family of inoviruses, *Inoviridae*, is now included into a *Tubulavirales* order and the richness of this order has recently been put to light³⁰. The role of

inoviruses in bacterial pathogenicity has been recognized in many species (for a recent review see⁵²), and even a direct effect on human immunity was reported recently⁵³. To our knowledge, the presence of functional inoviruses in intestinal microbiota has not yet been reported.

In the abundance matrix of Fig. 1, inovirus contigs were grouped according to their *gpI* type. Most of the contigs (181 of the 344, 52%) possessed the *gpI* type of *Propionibacterium* phage B5, the only known filamentous phage infecting a Gram-positive host⁵⁴. Adult pig viromes were particularly rich in this group, compared to piglets. The 272 complete circular genomes were taken for a deeper analysis (Fig. 2, details about all circular genomes are reported in Suppl. Table 3). Their clustering using vCONTACT2³⁹ indicated that they were very diverse, forming 50 clusters of a quality above 0.5, and leaving aside 93 singletons. None of the clusters included any of the 10 reference inoviruses available, not even phage B5. The 118 circular and clustered genomes with a B5 *gpI* are highlighted in yellow on the vCONTACT2 map (Fig. 2A).

Interestingly, the GC content in the pig inoviruses ranged from 19.6% to 52.5%, and therefore below the high GC content found in the *Actinobacteria* phylum, such as for *Propionibacterium freudenreichii* (67% GC), the host of the phage B5.

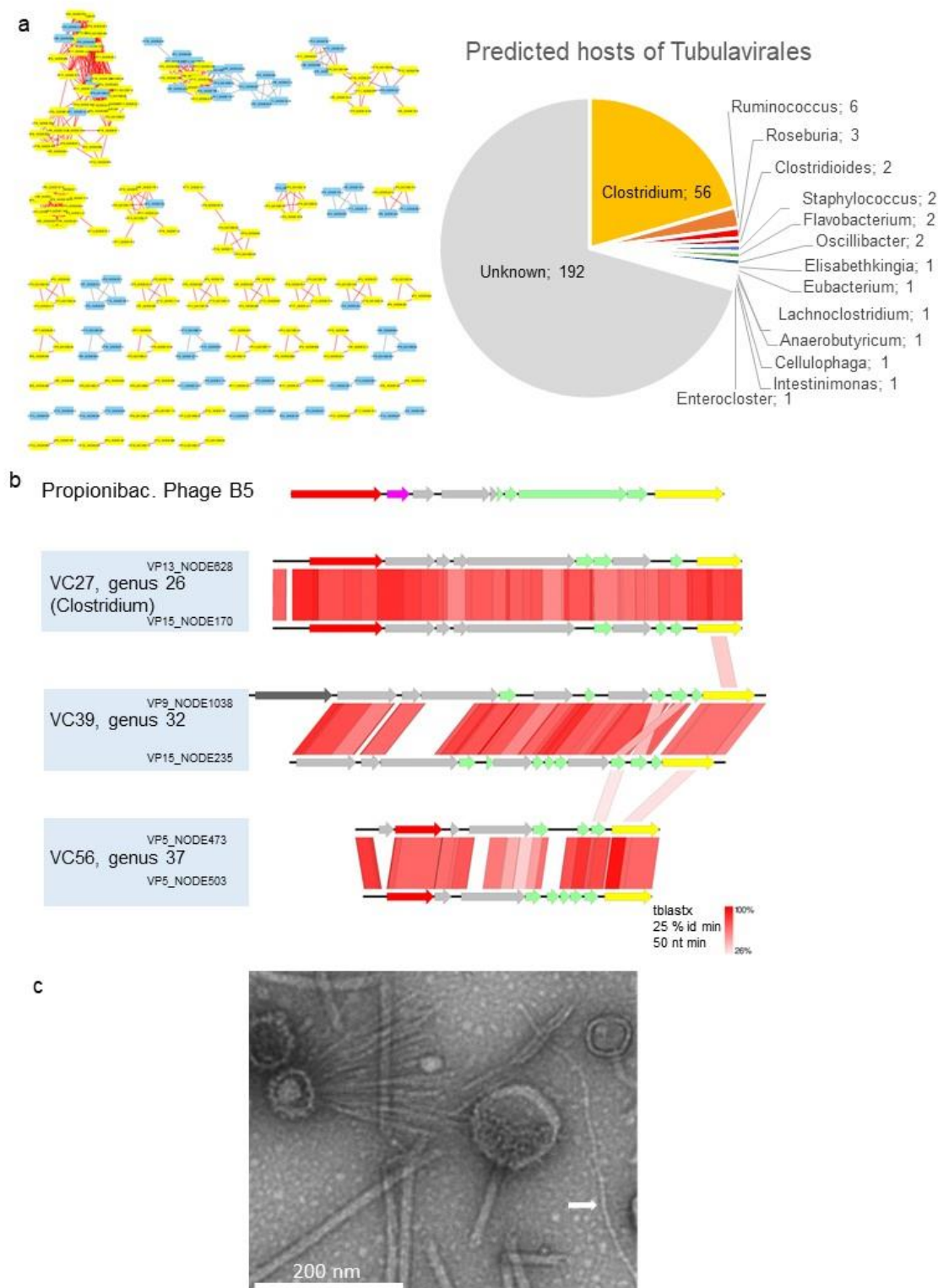


Figure 2: Properties of circular pig inoviruses. A, left: VContact2 map of all clustered complete genomes. Those encoding a phage B5-like *gpI* are in yellow; **A, right:** host predicted. **B.** Genome alignments (tBLASTx) and Easyfig map of 6 inoviruses encoding a B5-like *gpI* gene. Yellow: gene for morphogenesis protein I, red: replication initiation, green: structural genes (with transmembrane domains), pink: ssb (single-strand DNA binding) gene. Grey: unknown function. Dark grey: putative phosphoadenosine phosphosulfate reductase. **C** Transmission electron microscope image of virome VP17, the white arrow points to a thin filament that may correspond to an inovirus (length > 420 nm, width, 8 nm).

We tried to predict the bacterial hosts of these inoviruses with circular genomes. A search of nearly-identical CRISPR spacers led to the prediction of four possible Firmicute hosts: two *Roseburia*, a *Ruminococcus* and a *Lachnoclostridium*. A complementary search using WiSH⁴⁸ or BLASTn added 67 predictions, most often in the *Clostridium* genus (Fig. 2A, right). Consistent with these predictions, a filamentous phage infecting *Clostridium acetobutylicum* NCIB6444 was isolated (but its genome not sequenced) 30 years ago⁵⁵.

Pairwise tBLASTx genome comparisons between B5 and some of the VP genomes with a similar *gpI* revealed similar genetic organizations, although the B5-encoded *gpI* was too distantly related to those of pig genomes to appear in the results (Fig. 2B). Finally, we noticed that electron transmission microscopy images of the VP17 virome, which contained the most inoviruses, revealed some long filaments that are typical of inoviruses (Fig. 2C). We conclude that novel, Firmicute-infecting inoviruses are present in pig fecal samples.

The second notable characteristic of these pig viromes was identified by performing a vCONTACT2 clustering analysis³⁹ of the 2991 *Caudovirales* VP contigs, together with 2214 reference phage genomes (see Materials and Methods). Among the seven most populated clusters (listed in Suppl. Table 4), there was a particularly large one of 98 elements, 94 of which originated from pig virome contigs. Of note, four reference phage genomes were connected to them. Three of these four phages are virulent and infect *Actinobacteria*, including the *Rhodococcus* phages ReqiPoco6 and ReqiPepy6⁵⁶, and *Arthrobacter* phage Mudcat (accession NC_031224). The fourth is the temperate phage Oengus, which infects the *Firmicute* *Faecalibacterium prausnitzii*⁴¹.

The 17 largest genomes of this cluster (45-62 kb) were then compared to already classified phage genomes with ViPTree⁵⁷ (Fig. 3A). The ViPTree branch lengths are used as a guide among ICTV members, to help delimit family boundaries (branch lengths extending into the 0.01 - 0.05 region), and subfamily boundaries (between 0.1 and 0.5).

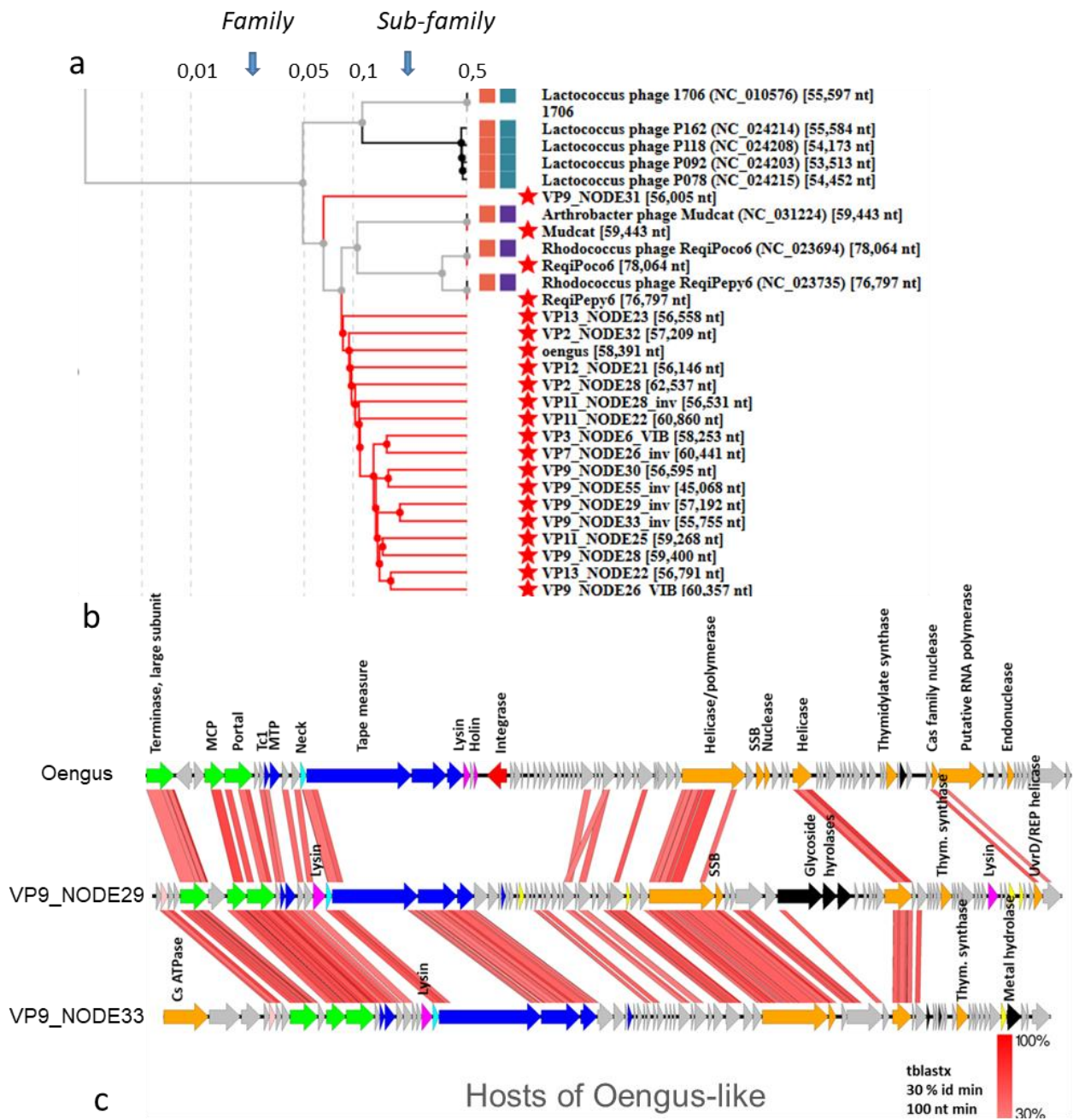


Figure 3. Characteristics of the Oengus cluster. **A.** Tree representation of the 17 largest Oengus-like contigs together with close reference phage neighbors in the global VipTree⁵⁷, which builds a distance based on shared genes, starting from nt sequences and tBLASTx comparisons. Red stars indicate all genomes that were added to the reference VipTree. **B.** Whole genome alignments (Easyfig map, with tBLASTx option) comparing two relatively close VP nodes (see A) and Oengus. MCP: major capsid protein, Tc1: Tail completion 1, SSB: single-strand binding protein **C.** Predictions of infecting hosts for the 94 contigs of the Oengus-like cluster.

According to such guidelines, the vCONTACT2 cluster members are related by deep branches, suggesting the clade includes more than one viral genus. ViPTree also shows that compared to *Actinobacteria* phages, phage Oengus is more closely related to all but one of these VP contigs. Therefore, we named this cluster ‘Oengus-like’. Surprisingly, among the 38 genomes that were larger than 40 kb, only three contained an integrase. This suggests that this clade contains a mix of temperate and virulent phages, with perhaps a small fraction of temperate phages and a majority of virulent phages, at least in the pig viromes. Using Oengus as a reference, whole genome alignment (tBLASTx) was performed for two complete genomes, and it showed that only a few genes were shared among phages of this cluster, confirming further that this cluster represents a taxon beyond the genus level (Fig. 3B). Finally, the search for predicted hosts was performed. The most frequently predicted hosts belonged to the *Clostridiaceae* family (Fig. 3C). In addition, for two of them, a few matching CRISPR spacers were found in strains of *Anaeromassilibacillus*, a genus that belongs to the same *Oscillospiraceae* family as *F. prausnitzii*, the host of phage Oengus. We recently proposed the family name Sisseviridae for this phage clade (extending up to Lactococcus phage 1706, Fig. 3A), which currently comprises 72 genera and 254 species³⁴.

Pig microbiota contains a high abundance of viruses in addition to six main bacterial phyla

We next investigated whether ARGs could be detected on prophages that are embedded in bacterial genomes. For this, we extracted, sequenced and assembled the DNA from the global fecal samples, following a distinct protocol for DNA extraction (see Materials and Methods, and Suppl. Fig. 3 for the overall analysis pipeline). After assembly and dereplication, a final binning step was performed to aggregate contigs from the same microbial species, using the VAMB tool²⁷. To estimate the main phyla present in the 14 pig fecal samples, a taxonomic affiliation with Kaiju was performed on the 220 000 contigs of a size above 2 kb.

In addition, we searched systematically for viral contigs among this microbial contig collection, using a combination of 3 criteria: (i) positive viral result according to VIBRANT³², (ii) homologous to a viral VP contig according to BLASTn results, (iii) viral affiliation by Kaiju

(see details in Materials and Methods). Of the 220 000 contigs, 16 940 (7.7 %) were deemed of viral origin (labelled viral-P contigs below). We reasoned however, that some of these contigs might correspond to uninduced prophages and some may even be defective prophages. We therefore used the collection of virome reads to determine which of the viral-P contigs were indeed functional (i.e., forming viral particles). Among these 16 940 viral-P contigs, 23.7% were covered by a significant amount of virome reads and classified as “active phages” (see Materials and Methods and Suppl. Fig. 3).

Figure 4 reports a synthetic representation of the main phyla detected, among OTU with abundance above 10 RPKM across the 14 samples (see details in Suppl. Table 6).

	N OTUs	Adults										Piglets						av
		P15	P3	P13	P5	P11	P9	P6	P16	P17	P12	P8	P7	P4	P2			
FIRMICUTES	2559	1 968	2 446	1 882	2 043	2 722	1 976	2 236	4 123	6 752	4 338	4 059	3 197	3 953	6 231	39%	15 000	
BACTEROIDETES	1304	1 707	2 215	1 117	1 333	1 609	1 888	1 514	2 803	1 514	1 848	1 980	683	1 927	1 601	21%		
ACTIVE PHAGES	547	956	1 219	1 641	658	547	1 955	2 044	5 287	3 209	198	956	12 551	917	695	16%		5 000
UNCLASSIFIED	429	630	399	1 197	960	729	583	987	837	2 282	378	580	4 248	780	491	9%		1 000
INACTIVE PROPHAGES	247	1 094	107	1 125	1 954	196	377	586	731	348	422	71	2 100	108	92	7%	200	
PROTEOBACTERIA	221	262	185	433	432	354	190	329	575	389	245	214	813	289	213	4%		
SPIROCHAETES	187	490	256	302	143	239	327	206	39	49	45	128	557	147	146	3%		
ACTINOBACTERIA	83	115	58	83	57	79	88	117	112	139	57	107	143	74	148	1%		
ARCHAEA	59	106	38	33	34	76	29	34	125	186	118	24	151	60	45	1%		
MOLLICUTES	15	7	10	7	8	13	18	177	4	20	6	7	57	7	11	0%		
SUMS		7 335	6 934	7 821	7 621	6 566	7 431	8 230	14 635	14 887	7 655	8 126	24 499	8 262	9 672	100%		

Figure 4. Main pig microbiota phyla. Abundances are expressed as RPKM (grey scale on the right). The average column does not include sample P7

In this matrix, active phages were binned and counted separately (798 contigs, binned into 547 “active phages”). The remaining viral contigs, for which no proof of activity was obtained, were either kept under their bacterial host taxonomy when available (329 contigs), or placed under “inactive prophages” otherwise.

In most samples (13/14), the three main phyla were *Firmicutes* (39%), *Bacteroidetes* (21%) and surprisingly, active phages (16%). The next bacterial core phyla with abundances above 1% were *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Actinobacteria* and *Archaea*. Aside from the active phage category, previous reports on pig microbiota described similar phyla distributions^{2,58,59}. The *Mollicute* class was added in the matrix to highlight sample P6, which contained a particularly high level of a single *Mycoplasma* OTU, suggesting pig 6 was sick.

The last sample (piglet P7) had a distinct profile, as virus reads represented 51% of the total. More precisely, a bin of two contigs (12.6 kb total) was responsible for 52% of all viral signal. Upon closer inspection, these contigs had a typical *Picovirinae/Raketienvirinae* organization (Suppl. Fig. 3), but its host could not be predicted. Interestingly, the P7 sample

also contained a very large 14 Mb OTU (401 contigs). A BLASTn search against the nt database of the NCBI indicated that its closest (77% identity) and most frequent (18% of contigs from this bin) parent was *Blastocystis hominis* (Eukaryote, Stramenopiles). We also noted that in this sample, richness and abundance in *Bacteroides* and *Prevotella* species was low. This suggests that there is intense predation on bacteria in the microbiota from sample P7.

A small fraction of ARGs are found in prophages in pig microbiota

An ARG search among the 271 163 P contigs (before dereplication) retrieved 1764 ARG with ResFam and 279 with Resfinder (see Suppl. Table 7 for overall counts, and Suppl. Table 8 for the details of each contig). The large increase in ARG with ResFam is due to the inclusion of ABC transporters, which probably include false positives. We therefore concentrated on ResFinder numbers. The Resfinder counts correspond globally to $1.8 (+/-0.5) 10^{-4}$ ARG gene per total genes, and $0.18 (+/- 0.05)$ ARG gene per Mb.

To further investigate the samples with the highest abundances of ARG-positive bacterial contigs and the category of antibiotic resistance that was prevalent, we focused on the abundance matrix of the 168 contigs that harbored the 279 ARG genes (Suppl. Table 8). Overall, a four-fold difference was observed between the most and least ARG-abundant microbiota samples (Suppl. Fig. 4). Piglets also had higher prevalence of ARGs compared to adults. Contigs encoding tetracycline resistance genes were by far the most abundant, followed by aminoglycoside and macrolide resistance genes (Suppl. Fig. 4), consistent with previous reports². Among the *tetR*-encoding contigs, three were particularly abundant, in all samples: the most abundant one encodes a *tet(W)* gene (in P4_NODE_19877) which apparently belongs to an integrative conjugative element (ICE, see Materials and Methods). The two next most abundant contigs (*tet (40)* genes in P12_NODE_17183, 2004 bp, and P8_NODE_13797, 2606 bp) were partially overlapping and matched a plasmid reported from a study on the tetracycline resistome of bio pig farms³. Clearly, and as concluded also by Kazimierczak et al., even though tetracycline which was used as a growth factor, is no longer used as such in Europe, the previously selected resistance genes still remain in pig microbiota. Some farms, however, and particularly farm 6, were markedly ARG-poor. What parameter of the farm settings could explain this good record is not known at present. We conclude that globally, the microbial ARG content of these pig fecal samples was similar to that previously reported in the literature^{2,60}.

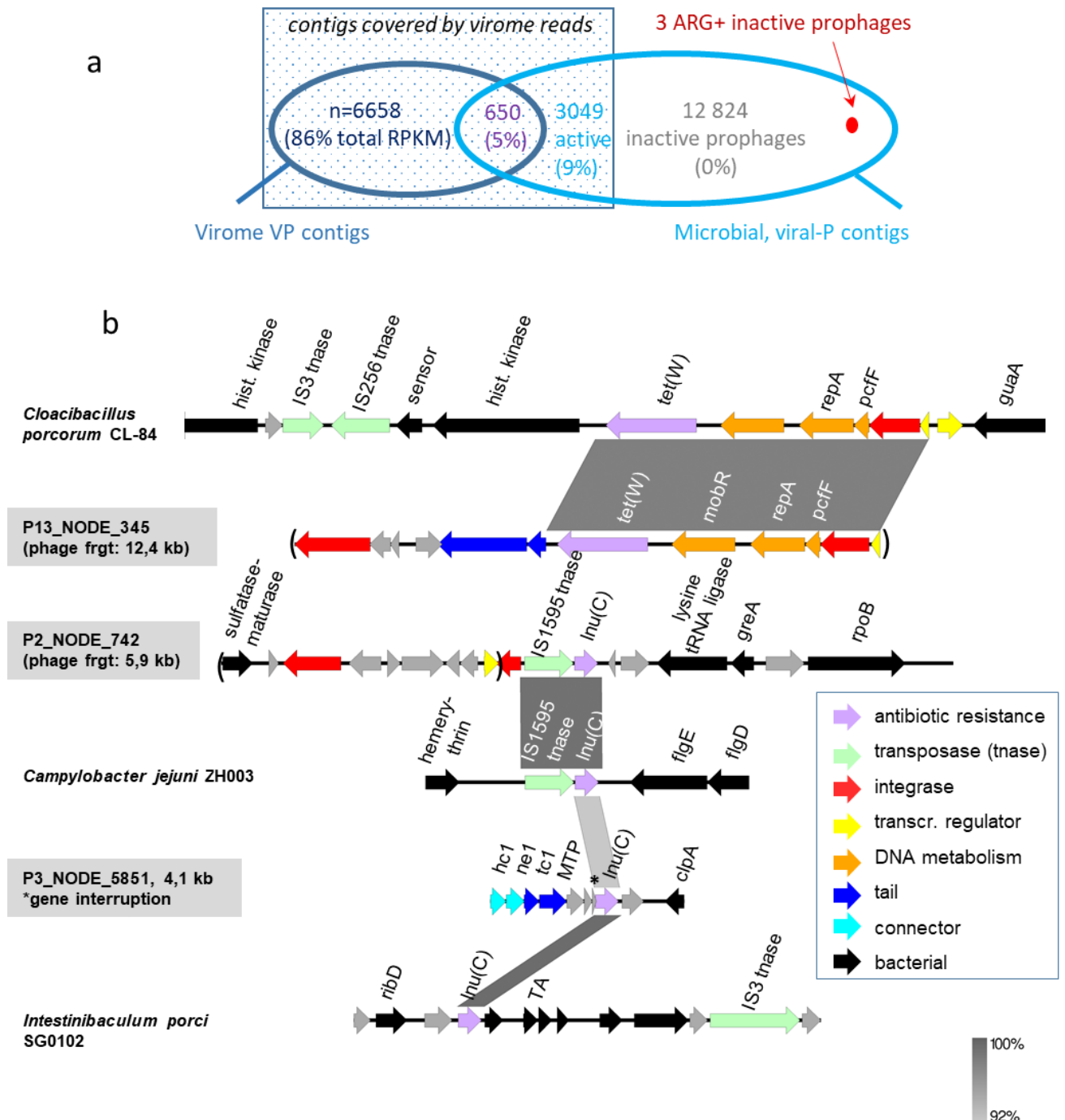


Figure 5: Overview of the ARG found in pig phages and prophages contigs. A. Overlap between viral contigs assembled from virome fractions (VP) and those recognized as viral within microbiota assemblies (viral-P). Among 23 181 dereplicated viral contigs (see Materials and Methods for details), 650 were present in both contig sets, while 6658 were present exclusively in viromes. No ARG was found in these two first subsets. Among the viral-P contigs, we distinguish those “covered” by viromes reads, and therefore considered active phages (square of dark blue shade, abundance in viromes indicated as % of RPKM among the 3 subsets of contigs covered by reads), from those that correspond to dormant prophages. The 3 ARG positive viral contigs (indicated in red) are among dormant prophages. **B.** Genetic maps of these three prophage regions. Easyfig⁴⁵ maps (BLASTn) of shared regions with other mobile elements are shown. Phage hallmark genes (tail and connector) are colored in blue. GNAT stands for GNAT family N-acetyltransferase, TA for toxin-antitoxin system, GGDEF for GGDEF domain-containing protein.

We next sought whether some of the ARG-positive contigs were viral. Three (of 16 940 viral-P contigs, 0.02%) were viral, and all three belonged to the inactive prophages subset (Fig. 5A). These three contigs represent 1.7% of all 168 ARG-positive contigs, while 30 at least were present on other mobile genetic elements (plasmids and ICE, as determined by a BLASTn search against nt, see Suppl. Table 8). A genetic analysis of the 3 ARG+ viral contigs revealed an ICE-prophage hybrid in one case, an IS just next to the prophage region in the second case, and a possible phage gene interruption by the ARG in the last case (star above the gene, Fig. 5B). All together, we conclude that our search for ARG-positive viral contigs across viromes and microbiomes retrieved none in the viromes, and 3 on inactive prophages.

Huge phages are detected among microbiota and virome contigs

As a last look at phage contigs present within the microbiota, we attempted to detect any so-called “huge phage” (size > 200 kb)⁴³. Indeed, such phage genomes were initially detected in whole microbiota samples, and several were found in pig fecal samples. No close homolog of the previously reported huge phages was found in our dataset, but four distant relatives of complete phage AOT2015-SM01_PERU_trim_clean_scaffold_10 (PERU for short, 201 kb) were found (see Materials and Methods for details). For the first of these, a long contig was present both in the microbiome and virome set. In the microbiome, this contig (P12_NODE_16) was 183 kb long, and its central section matched perfectly with the virome contig VP12_NODE3 (123 kb), confirming its viral nature. The three additional contigs (175-154 kb) came from three viromes VP2, VP9 and VP12. A *Clostridium* host was predicted for one of them (VP2_NODE1) because of a CRISPR spacer⁴⁶. The largest of these 4 contigs was manually annotated, and all 4 were aligned with PERU using tBLASTx and Easyfig (Suppl. Fig. 5). A fraction of the structural module (head genes) and the whole replication module genes were shared between these phages. Interestingly, P12_NODE_16 had long tail genes (absent from PERU and the 3 other contigs) and no detectable sheath encoding gene, suggesting that it is a siphovirus. A few ribosomal genes and eukaryote-like ribonucleoprotein genes (major vault-like protein-encoding genes) were also predicted.

In conclusion, in addition to the two prevalent phage clades found in pig viromes, pig microbiota analyses highlighted a group of four nearly complete phages that are distantly related to a huge phage. A small, highly abundant phage genome with an organization similar to *Picovirinae/Raketienvirinae* was also identified in a dysbiotic sample (P7).

Discussion

In-depth characterization of 14 pig fecal samples revealed that ARGs are present at 0.18 genes per Mb in the total microbiota of these samples (168 contigs, 279 ARGs). However, none of the ARG-containing contigs appears to belong to active phages, since ARGs were not detected in the viral contigs assembled from viromes reads (detection limit of 0.015 ARGs per Mb of viral contigs). Assuming an average genome size of 3 Mb for bacteria, and 30 kb for phages, these ARG numbers correspond to 0.5 ARG per bacterial genome, and below $3.6 \cdot 10^{-4}$ per phage genome. This suggests that ARG genes are at least 1000-fold less likely per viral genome, compared to bacterial genomes. We therefore conclude that even in pigs, and in samples originating from farms with heavy antibiotic usage (such as sample 16), the probability of detecting an ARG on a phage contig is at least 1000-fold lower compared to a bacterial genome.

An explanation for this contrast could be that ARG, whenever they enter prophage genomes (by transposition or recombination), tend to mutate the recipient phage, which loses then rapidly its fitness. However, temperate phage do encode other morons, which probably “landed” as abruptly as ARG in the first place in their genomes. So something specific to the ARG might be at play. For instance, as early as 1947, phage-antibiotic synergy (PAS) was investigated^{61,62} and sub-inhibitory concentrations of antibiotics were shown to be beneficial for phage growth. Recent reports confirmed this effect for virulent phages of *Staphylococcus aureus*^{63,64}, *Escherichia coli*^{65,66}, and other species^{67,68}, although some results suggest the opposite⁶⁹. If this behavior occurs in the gut, phages should not encode genes that diminish this beneficial effect. Importantly, it is unknown whether temperate phages also exhibit this PAS synergy. From the bacterial point of view, one could also argue that an ARG-containing prophage is so beneficial for the host that phage domestication rates speed up in order to retain the ARG.

Indeed, comparison of the 168 ARG-positive contigs to the pool of prophages present in microbiota revealed that three of them were prophages. Among these prophages, we introduced a distinction between those corresponding to functional and active phages, producing virions and therefore covered by virome reads, and inactive prophages. A large majority of these prophages were inactive (12 824, 77% of the total pool of prophage contigs), and the three ARG-positive prophage fragments belonged to these inactive prophages (Fig. 5A). This, together with the genetic map of these fragments (Fig. 5B), suggests they are being domesticated.

In fact, the subset of ‘active phage’ contigs in total microbiota samples entailed more than prophages. DNA from virulent phages, such as the dominant *Picovirinae/Raketienvirinae* of sample P7 (Suppl. Fig. 3) was also present. We can propose that the category of ‘active phages’ also includes the ‘virocell’ fraction, namely the fraction of phage particles replicating in bacteria at sampling time. A recent report suggests that in human microbiota, this fraction represents 25% of all viral contigs detected in total microbiota⁷⁰. Interestingly, in our pig samples, the proportion of ‘active phage’ contigs was similar (23%). This pool of active phages constituted an important fraction of the ecosystem, as it represented in average 16% of genome abundance (RPKM) in each sample (Fig. 4). If phage burst size is around 10 in the intestine (it is estimated at 16 for the Lambda phage in the murine intestine⁷¹), this proportion of 16% would correspond to a maximum of 1.6% of bacteria hosting an actively replicating phage. In one case (piglet P7 sample), the active phage fraction included 50% of total RPKM. This sample hosted as well a putative Stramenopile, and its bacterial richness was strongly decreased, suggesting dysbiosis.

The comparison between viral contigs found in the virome fraction and the total microbiota is somewhat puzzling, though. Only 1097 of the 7755 virome contigs (14%) have homologs in the total microbiota. Few studies have reported similar comparisons yet, but a similar limited overlap has been reported before by Gregory et al.⁷². Following the virocell reasoning, this might reflect the fraction of viral particles that replicate at time T. Another technical reason for the lack of overlap between microbial and virome viral contigs is certainly phage incomplete assemblies, which may produce different fragments of the same phage in the two subsets. Finally, we cannot exclude that the protocol used to extract total microbial DNA also extracted the DNA present in viral particles. As an important fraction is likely ssDNA, it was not sequenced in the microbiota samples (only 28 of the 2498 ssDNA phage contigs identified in viromes belonged to the overlapping set of 1097 VP contigs). Clearly, more investigations are needed to figure out what fraction of the viral world is captured upon microbiota sequencing, but our results suggest it might be representative, and help figure out phage-bacteria interactions in microbial ecosystems.

This pig sample analysis also revealed the significant progress of all tools designed to sort out viral genomes. We could identify 82% of the 2480 most abundant contigs of the 14 virome samples. Among them, two prominent phage clades were distinguished, inovirus infecting Gram-positive hosts (Fig. 2), and dsDNA phages similar to *Faecalibacterium* phage Oengus (Fig. 3). Even though viral samples had been purified on gradients, some bacterial and

plasmid DNA was still present. We could not determine convincingly whether such DNA corresponded to generalized transduction, or to remaining contamination. Among them, three contigs encoded ARG (according to the Resfinder results), two *tetR* genes on bacterial DNA, both coming from the dysbiotic VP7 piglet sample which was also one of the most contaminated samples, one *kanR* gene on a plasmid (Table 1).

Given the limited number of samples analyzed, few conclusions could be drawn concerning the differences between adult pigs and piglets, nor between animals treated with many/few antibiotics. We noted however that piglets had significantly higher abundances of *Caudovirales* compared to adult pigs, as well as fewer ssDNA eukaryotic viruses. The abundance of ARG genes found in microbiota did not correlate with the (recently applied) antibiotic treatments. The *tetR* genes were the most abundant overall, and most likely reflected the past practice, now forbidden in Europe, of antibiotic use for animal growth.

In conclusion, the consistent observations that ARGs are rarely encoded by phages is encouraging for the fight against antibiotic resistance, as well as for phage therapy. These results suggest that this type of mobile genetic element should not pose a threat, except in phages with high levels of generalized transduction. This is also good news in terms of safety for the use of phages to combat recalcitrant infections, as with the exception of those with high transduction levels, phages should not lead to ARG spread.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the Migale bio-informatics facility at INRAE for professional support, and Michi Waygood and Amanda Toperoff from Crayon-bleu for editing service. M.B.D. is recipient of graduate scholarships from the FRQNT and Sentinel North. S.M. holds a T1 Canada Research Chair in Bacteriophages. Q.L.B. and F.T. were recipient of a financial support from an INRAE MEM program.

Authors contributions

M.B, Q.L.B, J.L, M.D, S.M., E.L.C, J. E, O. Z., contributed to the generation and analysis of data and revised the manuscript, F.T., E.M., C.D., C.A. contributed to the generation of data, M.A.P analyzed data, supervised the work and wrote the manuscript.

References

1. Checcucci, A. *et al.* Exploring the Animal Waste Resistome: The Spread of Antimicrobial Resistance Genes Through the Use of Livestock Manure. *Front Microbiol* **11**, 1416 (2020).
2. Xiao, L. *et al.* A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nature Microbiology* **1**, 16161 (2016).
3. Kazimierczak, K.A., Scott, K.P., Kelly, D. & Aminov, R.I. Tetracycline resistome of the organic pig gut. *Appl Environ Microbiol* **75**, 1717-22 (2009).
4. Enault, F. *et al.* Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J* **11**, 237-247 (2017).
5. Barondess, J.J. & Beckwith, J. *bor* gene of phage lambda, involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. *J Bacteriol* **177**, 1247-53 (1995).
6. Mathieu, A. *et al.* Virulent coliphages in 1-year-old children fecal samples are fewer, but more infectious than temperate coliphages. *Nat Commun* **11**, 378 (2020).
7. Blanco-Picazo, P. *et al.* Antibiotic Resistance Genes in Phage Particles from Antarctic and Mediterranean Seawater Ecosystems. *Microorganisms* **8**(2020).
8. Zhang, A. *et al.* beta-lactam resistance genes in bacteriophage and bacterial DNA from wastewater, river water, and irrigation water in Washington State. *Water Res* **161**, 335-340 (2019).
9. Wang, M. *et al.* Estimating the contribution of bacteriophage to the dissemination of antibiotic resistance genes in pig feces. *Environ Pollut* **238**, 291-298 (2018).
10. Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J. & Muniesa, M. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 4908-11 (2011).
11. Zolfo, M. *et al.* Detecting contamination in viromes using ViromeQC. *Nat Biotechnol* **37**, 1408-1412 (2019).
12. Roux, S., Krupovic, M., Debroas, D., Forterre, P. & Enault, F. Assessment of viral community functional potential from viral metagenomes may be hampered by contamination with cellular sequences. *Open Biol* **3**, 130160 (2013).
13. Haaber, J. *et al.* Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. *Nat Commun* **7**, 13333 (2016).
14. Petrovich, M.L. *et al.* Microbial and Viral Communities and Their Antibiotic Resistance Genes Throughout a Hospital Wastewater Treatment System. *Front Microbiol* **11**, 153 (2020).
15. Maestre-Carballa, L. *et al.* Insights into the antibiotic resistance dissemination in a wastewater effluent microbiome: bacteria, viruses and vesicles matter. *Environ Microbiol* **21**, 4582-4596 (2019).
16. Calero-Caceres, W., Ye, M. & Balcazar, J.L. Bacteriophages as Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance. *Trends Microbiol* **27**, 570-577 (2019).
17. Lekunberri, I., Subirats, J., Borrego, C.M. & Balcazar, J.L. Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environ Pollut* **220**, 981-984 (2017).
18. Du, F., Lv, X., Duan, D., Wang, L. & Huang, J. Characterization of a Linezolid- and Vancomycin-Resistant *Streptococcus suis* Isolate That Harbors *optrA* and *vanG* Operons. *Front Microbiol* **10**, 2026 (2019).
19. Gabashvili, E. *et al.* Phage Transduction is Involved in the Intergeneric Spread of Antibiotic Resistance-Associated *bla*CTX-M, *mel*, and *tetM* Loci in Natural Populations of Some Human and Animal Bacterial Pathogens. *Curr Microbiol* **77**, 185-193 (2020).
20. Lopez-Leal, G., Santamaria, R.I., Cevallos, M.A., Gonzalez, V. & Castillo-Ramirez, S. Letter to the Editor: Prophages Encode Antibiotic Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii*. *Microb Drug Resist* **26**, 1275-1277 (2020).
21. Castro-Mejia, J.L. *et al.* Optimizing protocols for extraction of bacteriophages prior to metagenomic analyses of phage communities in the human gut. *Microbiome* **3**, 64 (2015).
22. Boccara, M. *et al.* Full-field interferometry for counting and differentiating aquatic biotic nanoparticles: from laboratory to Tara Oceans. *Biomed Opt Express* **7**, 3736-3746 (2016).
23. Bolger, A.M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114-20 (2014).

24. Langmead, B. & Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**, 357-9 (2012).
25. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078-9 (2009).
26. Menzel, P., Ng, K.L. & Krogh, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat Commun* **7**, 11257 (2016).
27. Nissen, J.N. *et al.* Improved metagenome binning and assembly using deep variational autoencoders. *Nature Biotechnology* (2021).
28. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**, D590-6 (2013).
29. Roux, S., Enault, F., Hurwitz, B.L. & Sullivan, M.B. VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data. *PeerJ* **3**, e985 (2015).
30. Roux, S. *et al.* Cryptic inoviruses revealed as pervasive in bacteria and archaea across Earth's biomes. *Nat Microbiol* **4**, 1895-1906 (2019).
31. Potter, S.C. *et al.* HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Res* **46**, W200-W204 (2018).
32. Kieft, K., Zhou, Z. & Anantharaman, K. VIBRANT: automated recovery, annotation and curation of microbial viruses, and evaluation of viral community function from genomic sequences. *Microbiome* **8**, 90 (2020).
33. Shah, S.A. *et al.* Manual resolution of virome dark matter uncovers hundreds of viral families in the infant gut. 2021.07.02.450849 (2021).
34. Nayfach, S. *et al.* CheckV assesses the quality and completeness of metagenome-assembled viral genomes. *Nat Biotechnol* **39**, 578-585 (2021).
35. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **30**, 2068-9 (2014).
36. Gibson, M.K., Forsberg, K.J. & Dantas, G. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *ISME J* **9**, 207-16 (2015).
37. Ruppe, E. *et al.* Prediction of the intestinal resistome by a three-dimensional structure-based method. *Nat Microbiol* **4**, 112-123 (2019).
38. Bortolaia, V. *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* **75**, 3491-3500 (2020).
39. Bin Jang, H. *et al.* Taxonomic assignment of uncultivated prokaryotic virus genomes is enabled by gene-sharing networks. *Nat Biotechnol* **37**, 632-639 (2019).
40. Devoto, A.E. *et al.* Megaphages infect *Prevotella* and variants are widespread in gut microbiomes. *Nat Microbiol* **4**, 693-700 (2019).
41. Cornuault, J.K. *et al.* Phages infecting *Faecalibacterium prausnitzii* belong to novel viral genera that help to decipher intestinal viromes. *Microbiome* **6**, 65 (2018).
42. Cornuault, J.K. *et al.* The enemy from within: a prophage of *Roseburia intestinalis* systematically turns lytic in the mouse gut, driving bacterial adaptation by CRISPR spacer acquisition. *ISME J* **14**, 771-787 (2020).
43. Al-Shayeb, B. *et al.* Clades of huge phages from across Earth's ecosystems. *Nature* **578**, 425-431 (2020).
44. Gabler, F. *et al.* Protein Sequence Analysis Using the MPI Bioinformatics Toolkit. *Curr Protoc Bioinformatics* **72**, e108 (2020).
45. Sullivan, M.J., Petty, N.K. & Beatson, S.A. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* **27**, 1009-10 (2011).
46. Dion, M.B. *et al.* Streamlining CRISPR spacer-based bacterial host predictions to decipher the viral dark matter. *Nucleic Acids Res* **49**, 3127-3138 (2021).
47. Biswas, A., Staals, R.H., Morales, S.E., Fineran, P.C. & Brown, C.M. CRISPRDetect: A flexible algorithm to define CRISPR arrays. *BMC Genomics* **17**, 356 (2016).
48. Galiez, C., Siebert, M., Enault, F., Vincent, J. & Soding, J. WISH: who is the host? Predicting prokaryotic hosts from metagenomic phage contigs. *Bioinformatics* **33**, 3113-3114 (2017).
49. Sachsenroder, J., Twardziok, S.O., Scheuch, M. & John, R. The general composition of the faecal virome of pigs depends on age, but not on feeding with a probiotic bacterium. *PLoS One* **9**, e88888 (2014).
50. Kim, M.S., Park, E.J., Roh, S.W. & Bae, J.W. Diversity and abundance of single-stranded DNA viruses in human feces. *Appl Environ Microbiol* **77**, 8062-70 (2011).

51. Roux, S. *et al.* Towards quantitative viromics for both double-stranded and single-stranded DNA viruses. *PeerJ* **4**, e2777 (2016).
52. Hay, I.D. & Lithgow, T. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. *EMBO Rep* **20**, e47427 (2019).
53. Sweere, J.M. *et al.* Bacteriophage trigger antiviral immunity and prevent clearance of bacterial infection. *Science* **363**(2019).
54. Chopin, M.C., Rouault, A., Ehrlich, S.D. & Gautier, M. Filamentous phage active on the gram-positive bacterium *Propionibacterium freudenreichii*. *J Bacteriol* **184**, 2030-3 (2002).
55. Kim, A.Y. & Blaschek, H.P. Isolation and characterization of a filamentous viruslike particle from *Clostridium acetobutylicum* NCIB 6444. *J Bacteriol* **173**, 530-5 (1991).
56. Summer, E.J. *et al.* Genomic and functional analyses of *Rhodococcus equi* phages ReqiPepy6, ReqiPoco6, ReqiPine5, and ReqiDocB7. *Appl Environ Microbiol* **77**, 669-83 (2011).
57. Nishimura, Y. *et al.* ViPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinformatics* **33**, 2379-2380 (2017).
58. Ramayo-Caldas, Y. *et al.* Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. *ISME J* **10**, 2973-2977 (2016).
59. Yang, H. *et al.* Core gut microbiota in Jinhua pigs and its correlation with strain, farm and weaning age. *J Microbiol* **56**, 346-355 (2018).
60. Joyce, A., McCarthy, C.G.P., Murphy, S. & Walsh, F. Antibiotic resistomes of healthy pig faecal metagenomes. *Microb Genom* **5**(2019).
61. Price, W.H. Bacteriophage formation without bacterial growth; the effect of iodoacetate, fluoride, gramicidin, and azide on the formation of bacteriophage. *J Gen Physiol* **31**, 135-9 (1947).
62. Krueger, A.P., Cohn, T. & *et al.* Observations on the effect of penicillin on the reaction between phage and staphylococci. *J Gen Physiol* **31**, 477-88 (1948).
63. Maiques, E. *et al.* beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **188**, 2726-9 (2006).
64. Kaur, S., Harjai, K. & Chhibber, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage plaque size enhancement using sublethal concentrations of antibiotics. *Appl Environ Microbiol* **78**, 8227-33 (2012).
65. Comeau, A.M., Tetart, F., Trojet, S.N., Prere, M.F. & Krisch, H.M. Phage-Antibiotic Synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PLoS One* **2**, e799 (2007).
66. Los, J.M., Golec, P., Wegrzyn, G., Wegrzyn, A. & Los, M. Simple method for plating *Escherichia coli* bacteriophages forming very small plaques or no plaques under standard conditions. *Appl Environ Microbiol* **74**, 5113-20 (2008).
67. Santos, S.B. *et al.* The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique. *BMC Microbiol* **9**, 148 (2009).
68. Kamal, F. & Dennis, J.J. *Burkholderia cepacia* complex Phage-Antibiotic Synergy (PAS): antibiotics stimulate lytic phage activity. *Appl Environ Microbiol* **81**, 1132-8 (2015).
69. Berryhill, B.A., Huseby, D.L., McCall, I.C., Hughes, D. & Levin, B.R. Evaluating the potential efficacy and limitations of a phage for joint antibiotic and phage therapy of *Staphylococcus aureus* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**(2021).
70. Marbouty, M., Thierry, A., Millot, G.A. & Koszul, R. MetaHiC phage-bacteria infection network reveals active cycling phages of the healthy human gut. *Elife* **10**(2021).
71. De Paepe, M. *et al.* Carriage of lambda Latent Virus Is Costly for Its Bacterial Host due to Frequent Reactivation in Monoxenic Mouse Intestine. *PLoS Genet* **12**, e1005861 (2016).
72. Gregory, A.C. *et al.* The Gut Virome Database Reveals Age-Dependent Patterns of Virome Diversity in the Human Gut. *Cell Host Microbe* **28**, 724-740 e8 (2020).

Supplementary tables

Supplementary Table 1: pig samples, and antibiotic treatments

sample #	Animal type	Antibiotic treatments on animal sampled
3	adult, female	oxytretracycline
5	adult, female	
6	adult, female	
9	adult, female	oxytretracycline
11	adult, female	dexalone, marbofloxacin
13	adult, female	doxycycline
15	adult, female	
16	adult, female	TMP, sulfadiazin, tylosin, amoxicillin, marbofloxacin
17	adult, female	
2	piglet	millicoli, tiamvet
4	piglet	oxytetracycline
7	piglet	
8	piglet	lyncomycin, colistine
12	piglet	oxytetracycline

Supplementary Table 2: bacterial DNA contamination of virome samples

Sample	Filtered	Total reads	Reads mapped on 16S (Silva)	Freq 16S reads	viromeQC enrichment
VP2		45 413			
		231	1287	2.83E-05	7
VP3		38 432			
		018	23	5.98E-07	100
VP4	YES	39 665			
		645	68	1.71E-06	100
VP5	YES	44 131			
		406	2	4.53E-08	100
VP6		41 894			
		101	44	1.05E-06	100
VP7		43 350			
		198	769	1.77E-05	26
VP8		48 854			
		252	281	5.75E-06	62
VP9		46 636			
		927	171	3.67E-06	100
VP11		37 192			
		968	104	2.80E-06	100
VP12		43 095			
		618	63	1.46E-06	100
VP13		40 804			
		259	104	2.55E-06	100
VP15	YES	39 981			
		040	4	1.00E-07	100
VP16		43 004			
		890	19	4.42E-07	100
VP17	YES	43 630			
		846	11	2.52E-07	100

Suppl. Table 3: Properties of circular inoviruses: too large for printing, see online version when paper is accepted.

Supplementary Table 4: vCONTACT2 VP clusters with largest numbers of contigs

Name	N VP contigs	ref phage	av size complete genome
cluster_1	94	Faecalibacterium phage Oengus	58 kb
cluster_23	38	None	38 kb
cluster_62	17	None	125 kb
cluster_99	17	Lactococcus phage r1t	33 kb
cluster_100	16	None	29 kb
cluster_88	8	Bacteroides phage B40-8	46 kb
cluster_328	7	Bacteroides Crassphage01	90 kb

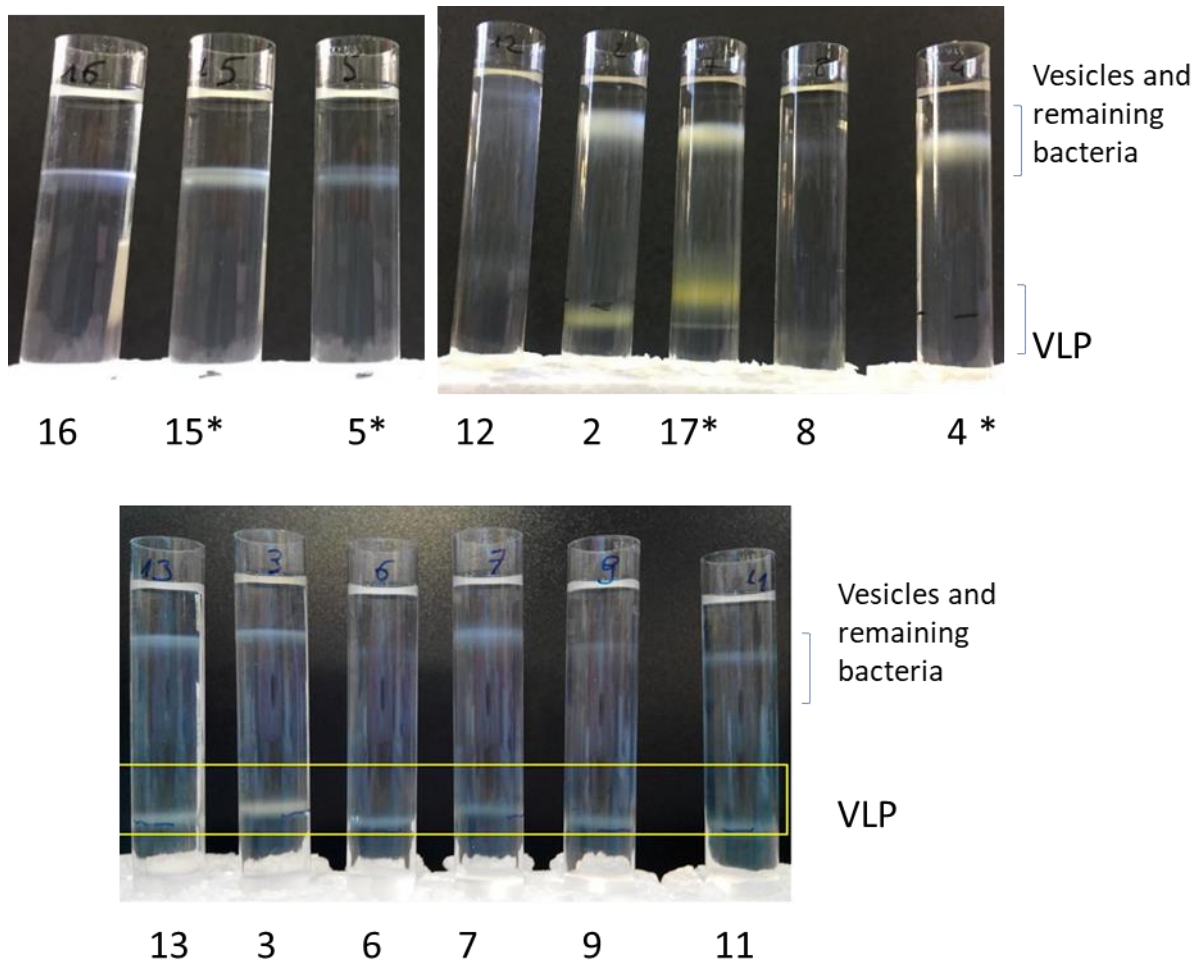
Suppl. Table 5: Abundance matrix of most abundant VP contigs from virome samples: too large for printing, see online version when paper is accepted.

Suppl. Table 6: Abundance table of most abundant microbiota, or P contigs: too large for printing, see online version when paper is accepted.

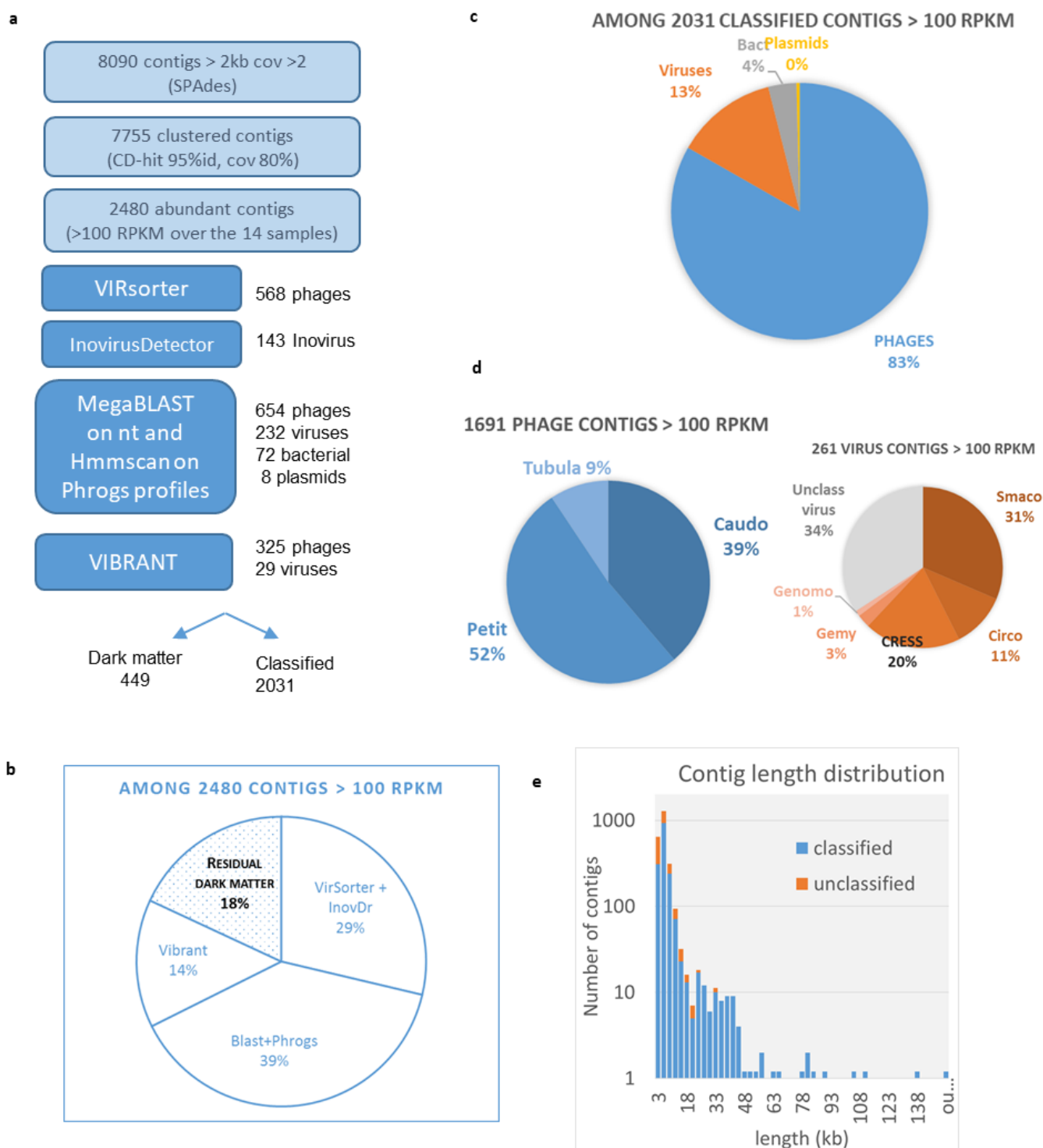
Suppl. Table 7: ARG detection in microbiota, global statistics

Supplementary Table 7: ARG detection in microbiota, global statistics									
Sample	animal type	N ORF	Mb, all contigs	N ARG ResFam	N ARG Resfinder	ARG ResFam /N ORF	ARG ResFam /Mb	ARG Resfinder /N ORF	ARG Resfinder /Mb
P3	adult	98 507	97.868	102	19	1.04E-03	1.04	1.93E-04	0.19
P5	adult	128 655	132.811	89	26	6.92E-04	0.67	2.02E-04	0.20
P6	adult	154 692	148.622	101	19	6.53E-04	0.68	1.23E-04	0.13
P9	adult	143 904	141.983	98	21	6.81E-04	0.69	1.46E-04	0.15
P11	adult	125 978	127.457	175	26	1.39E-03	1.37	2.06E-04	0.20
P13	adult	121 095	117.966	86	19	7.10E-04	0.73	1.57E-04	0.16
P15	adult	124 547	120.031	100	19	8.03E-04	0.83	1.53E-04	0.16
P16	adult	112 647	114.048	161	31	1.43E-03	1.41	2.75E-04	0.27
P17	adult	77 636	76.678	122	16	1.57E-03	1.59	2.06E-04	0.21
P2	piglet	91 912	92.012	131	11	1.43E-03	1.42	1.20E-04	0.12
P4	piglet	144 329	144.556	183	20	1.27E-03	1.27	1.39E-04	0.14
P7	piglet	72 106	71.658	106	20	1.47E-03	1.48	2.77E-04	0.28
P8	piglet	117 983	118.835	143	11	1.21E-03	1.20	9.32E-05	0.09
P12	piglet	111 326	113.541	167	21	1.50E-03	1.47	1.89E-04	0.18
sum		1 087 661	1 077.46	1034	196				
average						1.13E-03	1.13	1.77E-04	0.18
std dev						3.54E-04	0.35	5.49E-05	0.05

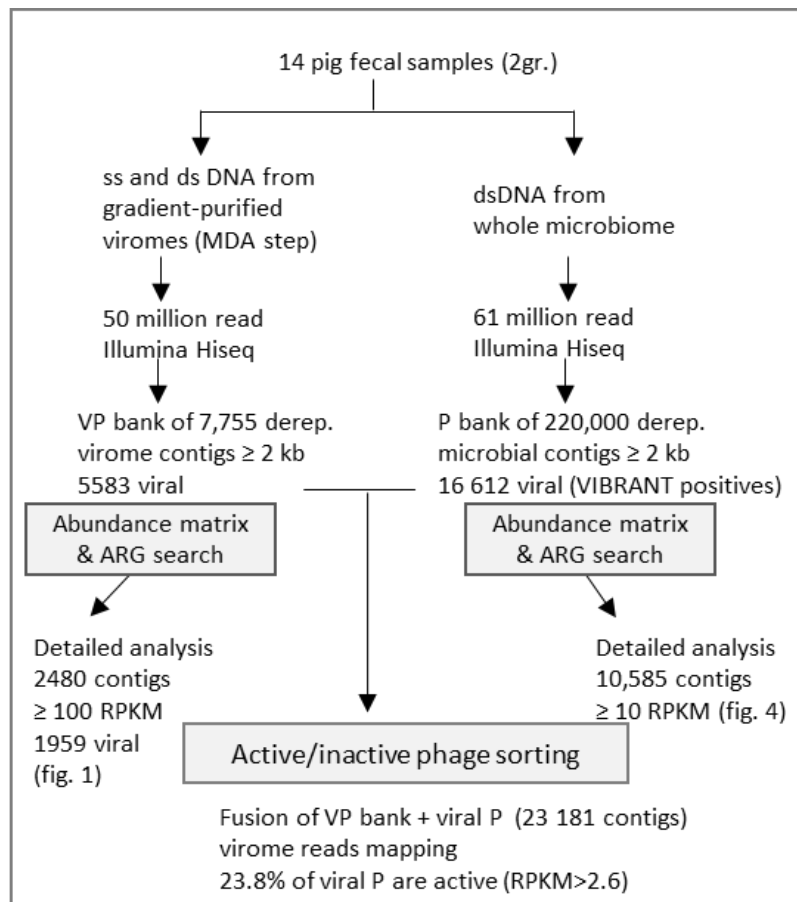
Suppl. Table 8: Detailed properties of all ARG positive contigs from microbiota sample: too large for printing, see online version when paper is accepted.



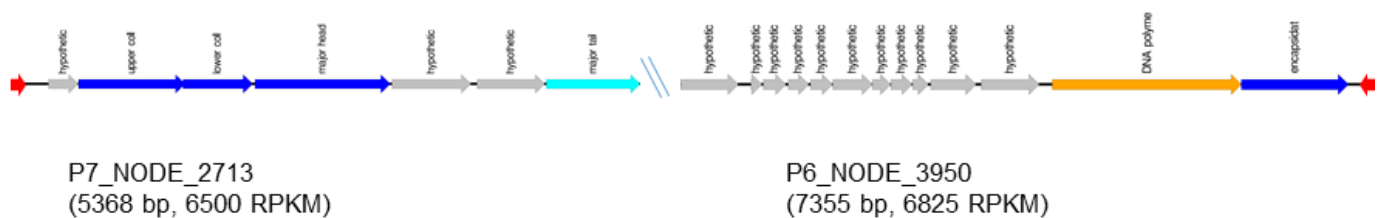
Supplementary Figure 1: Iodixanol gradients of the 14 pig samples (sample number is below each tube). A * indicates VLP samples that were filtered at 0,2 μ m, after gradient purification.



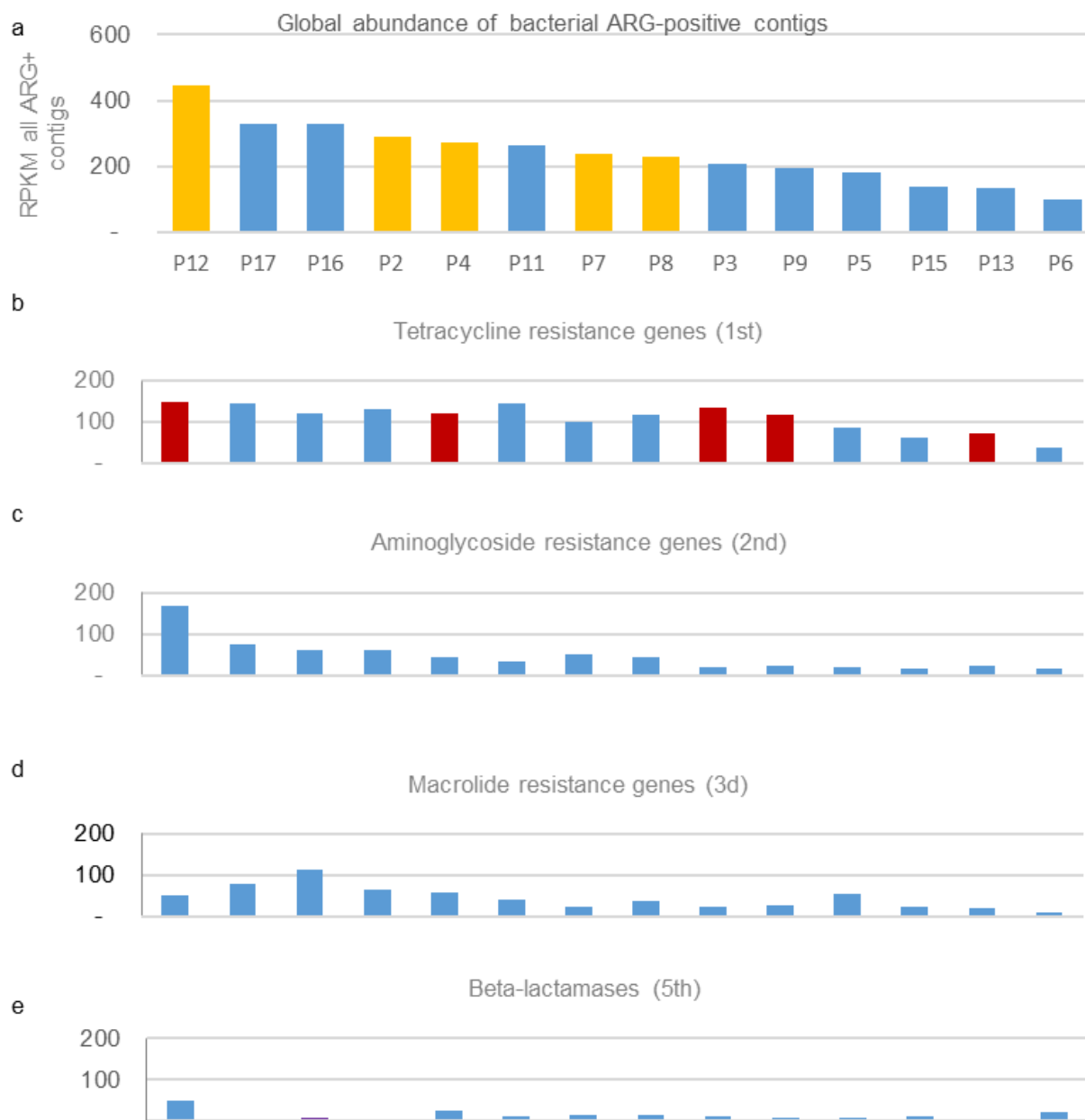
Supplementary Figure 2: Classification of 2480 VP contig with high abundance and size > 2kb. A. Strategy to affiliate contigs. B. 82 % of contigs >2kb are affiliated. C. Most recognized contigs are phages. D. Main categories of phages and viruses. Inoviridae constitute 9 % of all phage contigs, and Smacoviruses is the most populated category of viruses in pig viromes. E. Size distribution of contigs, and proportion of unclassified in each size class.



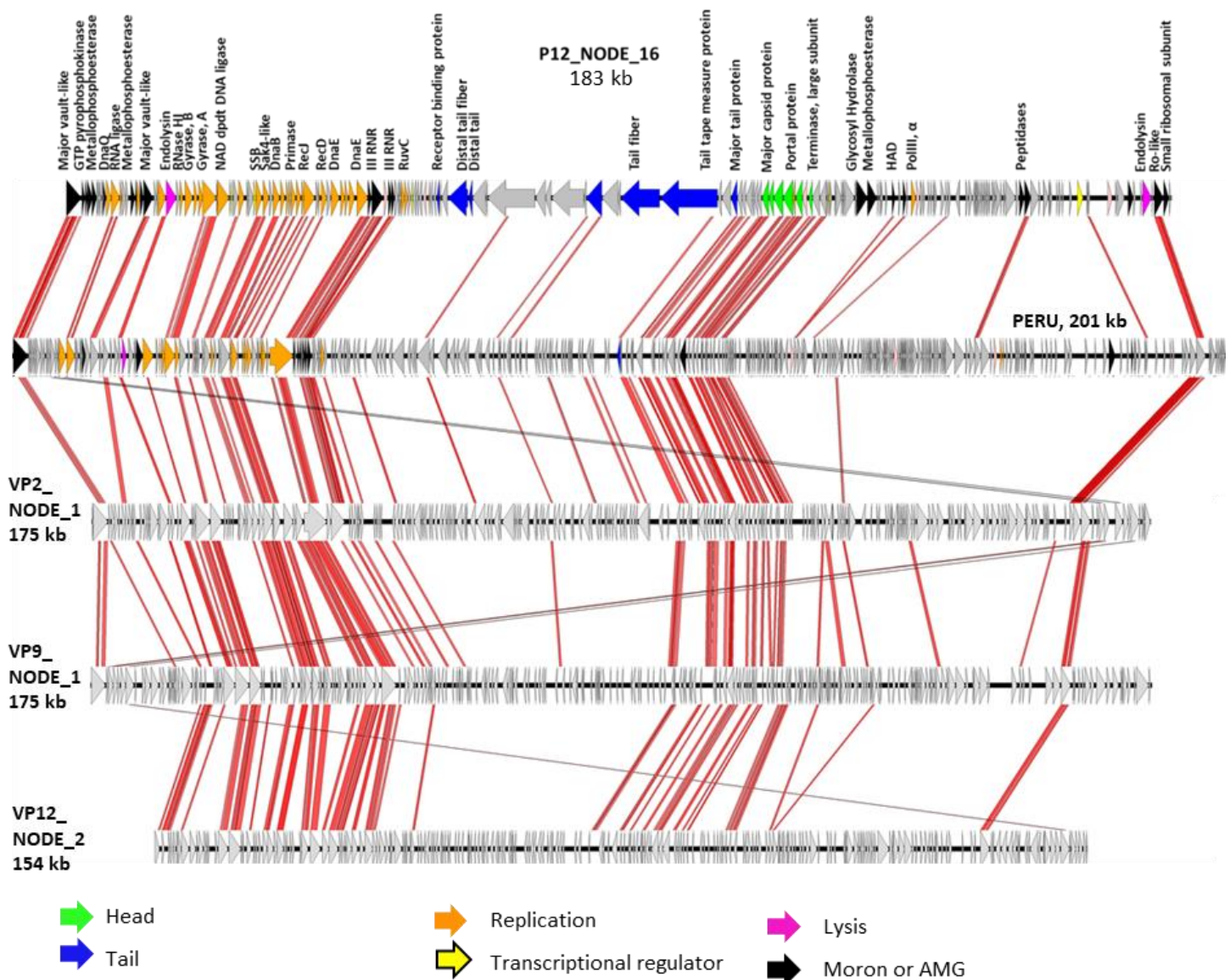
Supplementary Figure 3: Method for detection of viral contigs in microbiomes and partition between active and inactive ones.



Supplementary Figure 4 The genetic map of the dominant phage in sample P7 reveals a typical Picovirinae organisation. Contigs were annotated with Hhpred, 259 bp terminal inverted repeats are shown in red. The P7_NODE_2713 contig was recognized as viral by VIBRANT, unlike the othercontig.



Supplementary Figure 5. **a.** Global abundance of ARG-positive contigs in the 14 pig fecal sample microbiota. Piglet samples are shown in yellow, adults in blue. **b to e**, in the same order as in A, abundance of the main categories of antibiotic resistance genes (rank of abundance. Red bars: animals treated with tetracycline. Purple bar: animal treated with beta-lactams.



Supplementary Figure 6. Pairwise comparisons between a pig microbiota contig, AOT2015-SM02_PERU (201 kb), and 3 pig virome contigs by tBLASTx, (minimal id. 30%, minimal length 100 bp) using Easyfig. +1 positions were translated on the pig contigs, to fit PERU starting position. P12_NODE6 was annotated manually, gene abbreviations: DnaQ, DnaQ exonuclease; SSB, single- stranded DNA binding protein; Sak4, Sak4-like recombinase; DnaB, DnaB helicase; RecJ, RecJ single-stranded DNA specific exonuclease; RecD, RecD helicase; DnaE, DnaE DNA polymerase III epsilon subunit; III RNR for Class III ribonucleotide reductase; RuvC, RuvC crossover junction endodeoxyribonuclease; HAD, haloacid dehalogenase-like hydrolase, polIII α , DNA polymerase III alpha subunit. P12_NODE16 differs from all other genomes by the presence of clear and long tail genes.

2. Etudes des Phages de *Pseudomonas aeruginosa*

2.1. Etudes de quatre phages virulents infectant *Pseudomonas aeruginosa*

Comme vu dans l'introduction, *Pseudomonas aeruginosa* fait partie des 6 bactéries pathogènes multi-résistants aux antibiotiques composant le groupe ESKAPE (Boucher et al., 2009). *P. aeruginosa* est une bacille Gram négative, qui peut être retrouvée dans la plupart des environnements aquatiques et terrestres. Cette bactérie pathogène opportuniste est responsable notamment d'infections nosocomiales, telles que les infections ostéo-articulaires, pulmonaires pour les personnes sous respirateur ou atteintes de mucoviscidose, elle infecte aussi les brûlures plus ou moins étendues (Jonckheere et al., 2018; Ramírez-Estrada et al., 2016). Avec l'apparition de souches multi-résistantes voire pan-résistantes aux antibiotiques, ces infections deviennent de plus en plus difficiles à soigner, et il devient urgent de trouver des traitements alternatifs, tels que la phagothérapie (Forde and Hill, 2018; Pires et al., 2020).

Concernant *P. aeruginosa*, la plupart des phages infectant cette espèce ont pour récepteur les LPS ou le pilus de type IV (Ceyssens et al., 2009; Harvey et al., 2018; Yang et al., 2020). Des récepteurs tels que la porine OprM des pompes à efflux MexAB et MexXY ont été découverts plus récemment (Chan et al., 2016). Tout ces récepteurs sont des facteurs de virulence chez la bactérie : les mutants résistants aux phages qui émergent ont souvent perdu ou modifié leur récepteur, donnant des mutants avec une virulence compromise qui peuvent être plus facilement éliminés par le système immunitaire de l'hôte (Forti et al., 2018; Kortright et al., 2019b) ou de nouveau sensibles aux antibiotiques (Chan et al., 2016). L'utilisation de phages ayant pour récepteur des facteurs de virulence pourrait rendre la phagothérapie encore plus efficace : les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques seraient obligées par le phage à évoluer vers la résistance et donc à compromettre leurs capacités à survivre chez leur hôte ou à résister aux antibiotiques. Il est donc important de connaître les récepteurs des phages qui sont utilisés pour la phagothérapie. Pour l'étude effectuée ici, quatre phages provenant de l'entreprise Pherecydes Pharma et utilisés pour la phagothérapie sont étudiés : leur comportement dans différents milieux de culture ainsi que leurs récepteurs sont analysés.

Les résultats sont décrits dans l'article « Phage killing differs with bacterial growth conditions in *Pseudomonas aeruginosa* », et résumés ici en renvoyant aux figures et tableaux situés dans l'article.

2.1.1. Etudes des génomes des 4 phages virulents

Les quatre phages virulents de cette étude ont été sélectionnés par Pherecydes Pharma pour leur efficacité sur un large spectre de souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Pour déterminer si ces phages étaient génétiquement proches de phages déjà connus et caractérisés, une analyse BLASTn avec les paramètres par défaut a été effectuée pour chacun des phages. Deux d'entre eux, les myovirus PP1450 et PP1777, sont génétiquement proches du phage Ab27 (Latino et al., 2016) (Figure 1A, page 102) et les deux autres, les podovirus PP1792 et PP1797, sont génétiquement proches du phage Luz24 (Ceyssens et al., 2008) (Figure 1B, page 102). Seuls les résultats pour les phages PP1450 et PP1792 sont présentés et analysés ici.

2.1.2. La capacité de croissance des phages dépend du milieu de culture

Les phages étudiés ici ont pour but d'être utilisés en phagothérapie : une fois sur le lieu de l'infection, ils seront en contact avec des bactéries qui ne seront pas dans leurs conditions optimales de croissance (Palmer et al., 2007). Nous avons donc testé différentes conditions pour nous rapprocher des conditions *in vivo*. Les milieux qui ont été testés sont les suivants : LB Lennox (milieu riche, classiquement utilisé en laboratoire), Modified MOPS Medium avec de l'acétate à 20mM (MMMa), Sputum medium, ou LB Lennox avec un apport limité en O₂. Les cultures bactériennes cultivées dans ces différents milieux ont ensuite été infectées soit avec chaque phage séparément, PP1450 ou PP1792, soit avec les deux phages ensemble.

Le podovirus PP1792 n'est pas capable de lyser la LMG3Δ (nommée wild type dans la suite, WT) en milieu riche LB Lennox. En revanche, il est capable de lyser cette souche dans toutes les autres conditions testées, comme observable sur la Figure 2 (page 104). Pour le myovirus PP1450, c'est l'inverse : il est capable de lyser efficacement la WT en LB Lennox. En revanche, dans les trois autres conditions testées, il n'y a pas de lyse observée, la DO a continué d'augmenter, bien que moins vite que le contrôle négatif (sans phage). La capacité d'infection et de croissance d'un phage sur une même souche dépend donc du milieu de culture. De plus, dans toutes les conditions testées, l'infection par le mélange des deux phages était le plus efficace (Figure 3), comparé aux infections avec un seul des deux phages.

2.1.3. Quel est le récepteur de ces phages ?

Pour trouver les récepteurs des phages de cette étude, les mutants résistants aux phages ont été cherchés en LB Lennox pour les myovirus, et en milieu MMMa pour les podovirus.

Pour les myovirus, sur les 12 mutants résistants testés, 11 avaient une mutation au niveau du gène *wzy*. *Wzy* est une polymérase impliquée dans la synthèse de l'antigène O des LPS. Le

12^{ème} mutant avait une délétion de 329 240 pb contenant le gène *galU*, aussi nécessaire à la synthèse de l'antigène O de la chaîne des LPS. Ces deux mutations donnent des LPS avec des chaînes O tronquées voire inexistantes. De plus, la capacité d'adsorption du phage PP1450 sur un des mutants *wzy* ayant une mutation résultant en une protéine Wzy tronquée de 54 acides aminés (aas) au lieu de 438 aas, a été testée (Figure 3A, page 108). La capacité d'adsorption du phage sur ce mutant (*wzy1*) est significativement diminuée ($p\text{-value} < 0.0005$) comparé à la souche WT. Ces données indiquent que le récepteur pour les phages PP1450 et PP1777 sont les LPS, comme attendu d'après les études publiées sur Ab27 (Latino et al., 2016).

Quatre mutants résistants à PP1792 ont été obtenus lors d'une infection en milieu minimum MOPS acétate. La capacité d'adsorption du phage PP1792 a été testée sur ces mutants. Trois des 4 mutants testés empêchaient l'adsorption du phage PP1792 (Figure 3B, page 10). Ces mutants ont été entièrement séquencés : 2 sur les 3 avaient une mutation dans le gène *pslA* (mutants *pslA1* et *pslA2*), et un avait une mutation dans *pslD* (mutant *pslD1*) (Tableau 4, page 109). Les gènes *pslA* et *pslD* sont nécessaires à la biosynthèse des exopolysaccharides psl. Pour confirmer ces résultats, les souches mutantes *pslA1* et *pslD1* ont été complémentées avec les plasmides pPSVA (exprimant *pslA*) et pPSVD (exprimant *pslD*). Comme le montre le Tableau 5 (page 110 ainsi que la Figure 4 (page 111), PP1792 est capable de s'adsorber et de lyser les souches complémentées comme la souche WT, mais n'était pas capable de s'adsorber ni de lyser les mutants *pslA1* et *pslD1*. Le récepteur des podovirus PP1792 et PP1797 est donc l'exopolysaccharide psl.

En conclusion, dans cette étude nous avons démontré l'importance du choix du milieu de culture lorsque l'on souhaite étudier l'infection des phages et déterminer leur spectre d'hôtes. Nous avons aussi trouvé le récepteur des phages de la famille du Luz24 qui est l'exopolysaccharide psl. Bien que Luz24 soit isolé depuis longtemps, son récepteur n'avait pas été trouvé avant, sûrement car la plupart des études publiées étaient effectuées en milieu riche.

2.2. Manuscrit de l'article n°2

Phage killing differs with bacterial growth conditions in *Pseudomonas aeruginosa*

Maud Billaud^{1,2}, Emma Ollivier¹, Marie-Agnès Petit¹, Gaëlle Demarre²

1. Université Paris-Saclay, INRAE, MICALIS, Jouy en Josas, France
2. Pherecydes-Pharma, Romainville, France

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is an ubiquitous Gram-negative bacterium found in numerous freshwater and terrestrial environments. It is also an opportunistic pathogen that causes various infections in humans such as bloodstream, urinary tract, burn wounds infections as well as airways infections in cystic fibrosis patients and pneumoniae in patients on ventilator (Jonckheere et al. 2018; Ramírez-Estrada, Borgatta, et Rello 2016). Moreover, *Pseudomonas aeruginosa* is one of the six pathogens of the group ESKAPE (Boucher et al. 2009) formed of multi-drug resistant bacteria which infections are getting harder to clear, with fewer antibacterial drugs still efficient against them, resulting in higher mortality and morbidity rate. For this reason, novel therapeutic strategies beside antibiotics must be developed. Phage therapy is one of these promising alternative strategies (Forde et Hill 2018; Pires et al. 2020).

Phage bacteria coevolution has been known for decades. It was observed *in vitro*, but also in the mouse gut (De Sordi, Khanna, et Debarbieux 2017; Cornuault et al. 2020) as well as in patients treated with phage therapy (Schooley et al. 2017). In short term experiments with *P. aeruginosa*, bacterial resistance to phage consists either in acquiring CRISPR spacers against the phage, or mutating the phage receptor (Alseth et al. 2019; Hesse et al. 2020; Yang et al. 2020)

To maintain phage infectivity regardless of bacterial evolution, using different phages (both in terms of taxonomy and bacterial receptor) will be a good strategy. It will impede the arising of phage resistant bacteria in patient submitted to phage therapy. One can expect that the generation of double mutants (either having acquired two spacers or mutated in the two receptors) in the same bacterium is less likely to happen (Yang et al. 2020). Moreover, it was recently demonstrated that CRISPR-Cas System is associated with an infection-induced fitness cost: although mutants acquiring spacers are initially selected for, the receptor mutants are selected in the long-term (Meaden et al. 2021).

For *P. aeruginosa*, most characterized phages have as receptor the lipopolysaccharide (LPS) or the type IV pili (Yang et al. 2020; Ceyssens et Lavigne 2010; Harvey et al. 2018). Recently, phages with other receptors were found, such as phage OMKO1 (ϕ KZ-like) which uses OprM, an outer membrane porin of two multidrug efflux pumps, MexAB and MexXY, as a receptor binding-site (Chan et al. 2016). These receptors are all virulence factors. When bacteria resistant to these phages emerge, they are often selected against, and have fitness trade-offs which make it harder for them to survive *in vivo* (Kortright et al. 2019; Forti et al. 2018) or restore their sensitivity to antibiotic (Chan et al. 2016). The use of phages targeting virulence

factors as receptors could make phage-therapy doubly effective: it would drive multi-drug resistant bacterial pathogens to evolve towards phage resistance, thereby decreasing their fitness and ability to survive in the host. Thus, it is important to know the receptor of virulent phages that might be used in phage therapy.

Here we report the precise measurement of the frequency of resistance-conferring mutation for four *P. aeruginosa* infecting phages, two myoviruses similar to Ab27 (Latino et al. 2016), and two podoviruses of the Luz24 species (Ceyssens et al. 2008), upon propagation on a PAO1 derivative strain, which is devoid of CRISPR-Cas system. We identified the genes impacted by a mutation in the resistant strains and demonstrated their role in phage adsorption. In the course of this work, we also found that phage growth was deeply modified by culture conditions, especially when growth medium and aeration were chosen to mimic those encountered in the lungs or wounds (minimum medium, sputum medium, partial anaerobia) (Palmer, Aye, et Whiteley 2007; LaBauve et Wargo 2012).

Materials and Methods

Bacterial Strains, Plasmids and Culture Conditions

Bacterial strains and plasmids used and constructed in this study are listed in Table 1. Unless indicated, *E. coli* and *P. aeruginosa* strains were grown at 37°C, 200 rpm in Luria Bertani Broth 5 g/L Na Cl (LB Broth, Formedium) or on LB agar. When using minimal medium for *P. aeruginosa*, Modified MOPS media with 20 mM acetate (MMMa) was used. Compared to the usual MOPS medium (Neidhardt, Bloch, et Smith 1974), CaCl₂ and FeCl₂ were added, following the instruction of LaBauve and Wargo (2012). Sputum Medium was prepared as described in Palmer, Aye and Whiteley in 2007 (with the correction from 2009). To grow strains in partial aerobiosis, the LB medium, was covered with 2mL of sterile paraffine over the 10 mL culture, and incubated without agitation in a 50 mL falcon tube. Moreover, KNO₃ was added at 100 mM to favor *P. aeruginosa* anaerobic growth (Pallett et al. 2019).

When required, 10mM of MgSO₄ and 1mM of CaCl₂ where added to the medium.

For *E. coli* strains, when required gentamicin (Gm) was added at 30µg/mL. For *P. aeruginosa* strains when required antibiotic and chemicals were added at the following concentration: Gm: 10µg/mL, and Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG): 0,5 mM.

Bacterial clones were stored at -80°C in LB or MMMa with 20% glycerol.

Strain or plasmid	Genotype and/ or relevant characteristics	Source or reference
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 strains		
LMG3Δ	LMG12228 ΔPf4::FRT Δrep_Pf6::FRT ΔtoxA	Pherecydes Pharma, M. Billaud
MB079	LMG3Δ wzy1	This study
MB132	LMG3Δ pslA1	This study
MB133	LMG3Δ pslA2	This study
MB119	LMG3Δ pslD1	This study
<i>E. coli</i> strains		
JM105	endA1 glnV44 sbcB15 rpsL thi-1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR4(rK-mK+)	Yanisch-Perron, C. et al. 1985
Plasmids		
pPSV35	Shuttle vector with gentamicin resistance gene (aacCA1), PA origin, lacI q, and lac UV5 promoter	Rietsch, A., et al., 2005
pPSVA	pslA gene from LMG3Δ cloned into pPSV35	This study
pPSVD	pslD gene from LMG3Δ cloned into pPSV35	This study

Table 1: Bacterial strains and plasmids used in this study

Plasmid constructions

Primers used in this study are listed in Supplementary Table 1. All PCR were done using Phusion High Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs). All plasmid-cloning steps were performed in *E. coli* strain JM105.

Plasmid for complementation

To complement *pslA*, the *pslA* gene was PCR amplified using primers *pslA*_5' and *pslA*_3' (Supplementary Table 1), and the PCR product was digested by KpnI and EcoRI and

cloned into the KpnI/EcoRI digested plasmid pPSV35 to generate pPSVA. This approach was also used to complement *pslD* in WT (Table1).

Phages

The four phages used in this study, PP1450, PP1777, PP1792 and PP1797 were isolated from wastewater samples, at Pherecydes Pharma, and screened for their host range on a panel of clinical isolates (not shown).

Growth monitoring of bacteria during phage infection

Overnight cultures were diluted up to OD₆₀₀=0.05 in fresh medium with 10mM MgSO₄ and 1mM CaCl₂. At OD₆₀₀ =0.5, corresponding to 1x10⁸ Colony Forming Unit (CFU)/mL, bacterial cultures were infected with phage at a multiplicity of infection (MOI) of 1, incubated with no agitation for 10 minutes at 37°C, then diluted 10-fold and incubated at 37°C for several hours with shaking. The OD₆₀₀ was followed over time.

Fluctuation assay (*Luria Delbrück test* (*Luria and Delbrück 1943*))

Fluctuation assay were performed either in LB or MMa. Overnight cultures were diluted 100-fold and incubated at 37°C with shaking. At OD₆₀₀ =0.5, the culture was diluted up to 10⁶ CFU/mL, and dispatched into 90 wells of the 96 well plate (100 µL) and mixed with 10⁸ PFU (100 µL) of phages. Among the six controls wells: 2 wells were inoculated with the studied fresh medium; 2 wells with the studied fresh medium plus phages alone; and finally, 2 wells with the studied fresh medium plus the tested bacterial strain. The plate was then wrapped in parafilm to avoid evaporation and incubated at 37°C, 200 rpm for 24 h or more. The bacterial concentration of the inoculum was determined by plating.

To calculate the frequency, the following formula was used: $\frac{-LN(P)}{N}$

With P = the proportion of wells without bacterial growth

N = Number of bacteria per wells (determined by plating)

Selection of bacterial strain resistant to phage, sequencing, and mutation analysis

Bacterial mutants were recovered at the end of either large batch of phage infected cultures or small-scale fluctuation assays. For large batch cultures, the culture the next morning was serially diluted 10⁶ and 10⁷-fold and plated. For fluctuation test assays, three wells with bacterial growth per experiment were chosen randomly and streaked to gather phage resistant

mutants. Each mutant was streaked three times on either LB or MMMa to eliminate phages. After the purification process, mutants were grown overnight in LB or MMMa at 37°C, 200rpm and stored at -80°C with 20% glycerol.

DNA from mutants resistant to Ab27-like phages or Luz24-like phages or both was extracted, and either entirely sequenced (Illumina Hiseq) or sequenced only for the genes of interest by Sanger technology. Shotgun sequencing was performed on an Illumina Hiseq platform (Eurofins Genomics, 2 x 125 bp, depth: 9 million reads). Mutations were identified on reads using Breseq, with LMG3Δ as the reference genome.

Spot test and efficiency of plating assay (EOP)

The plating efficiency of the four phages on *P. aeruginosa* mutant strains was determined by spot assay: 10 µl of a serial 100-fold dilutions of a phage preparation were spotted on double layer agar plates on which a specific bacterial host was plated. In the second layer (Top Agar) MgSO₄ and CaCl₂ were added at a final concentration of 10mM and 1mM respectively. The number of plaques observed after overnight incubation was compared to the tested phage titer in its reference strain: LMG3Δ for PP1450 and PP1777; LMG3Δ *wzy1* (MB079) in LB and NAR71 in MMMa for PP1792 and PP1797. To determine the efficiency of plating, the phage solutions were diluted in series by 100-fold steps.

Adsorption assay

Bacteriophage adsorption assay was performed as previously described (Kropinski 2009). Briefly, overnight bacterial cultures incubated at 37°C were diluted in fresh medium at OD₆₀₀ of 0.05 and incubated at 37°C until reaching OD₆₀₀= 0.5. Phages were then added at MOI 0.01, and the adsorption proceeded at 37°C for 10 minutes without shaking. Then, samples were collected and centrifuged at 10 000g 5 minutes and titrated by spot test. A negative control, with only the phage was performed and titrated (t₀). The phage adsorption rate was calculated as follow: adsorption = (t₀-t₁)/t₀.

Results

The four virulent phages infecting *P. aeruginosa* are closely related to either Ab27 or Luz24 phages

Four *P. aeruginosa* infecting phages were selected for therapeutic use, based on their efficient lytic capacities and good coverage of a large panel of clinical strains (not shown). Their genomes were sequenced and compared to publicly available genomes at NCBI (BLASTn). Two of them, PP1450 and PP1777 were closely related to the myovirus Ab27 (Latino et al. 2016), sharing respectively 98.11% and 97.41% nucleotide identity over 97% of their genome length with Ab27 (Figure 1A). The other two phages, PP1792 and PP1797 were closely related to the podovirus Luz24 (Ceyssens et al. 2008), sharing respectively 97.02% and 96,59% nucleotide identity over 94% of their genome length with Luz24 (Figure 1B).

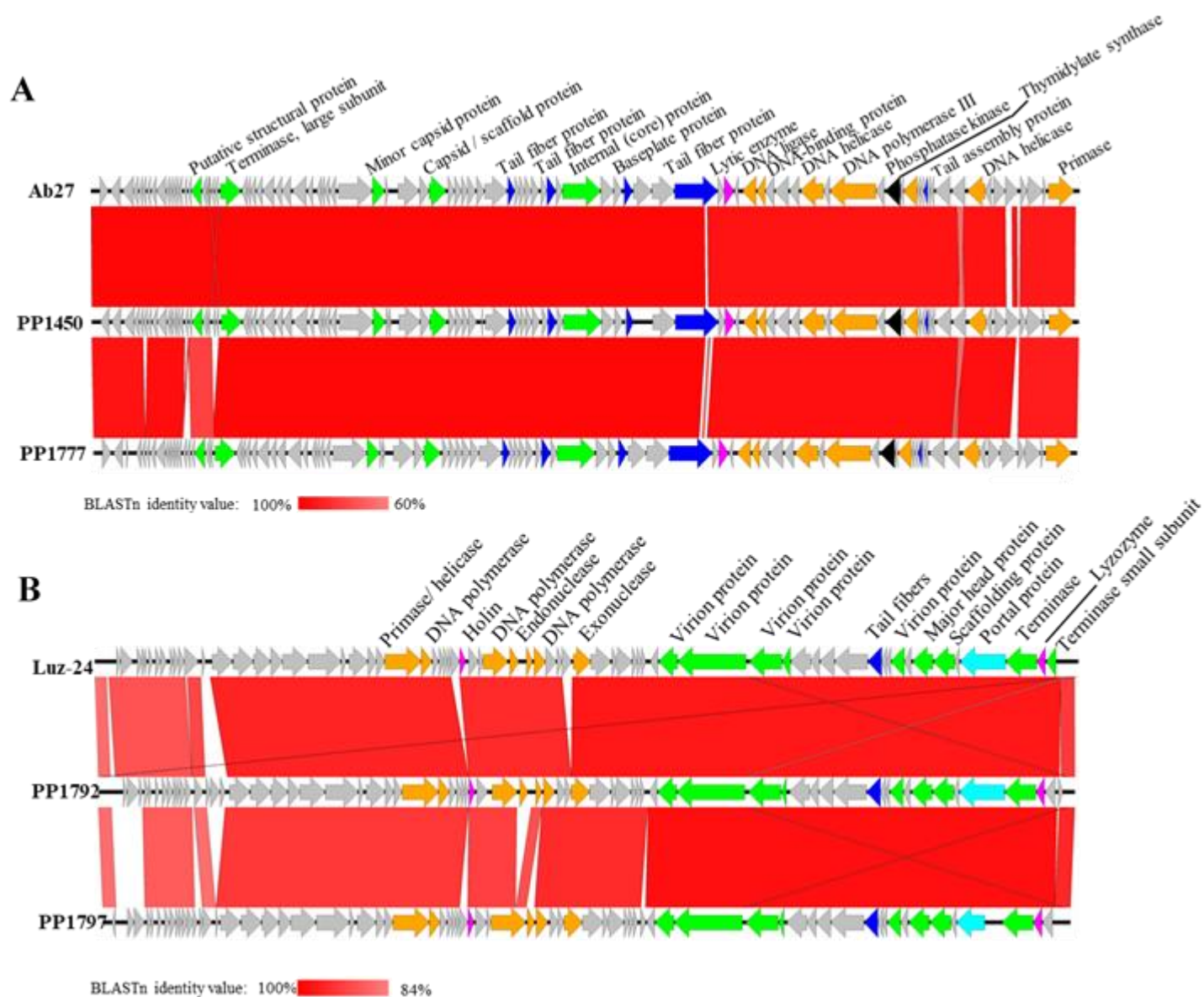


Figure 1: **A.** Genomic alignment of phages PP1450 and PP1777 with Ab27. **B.** Genomic alignment of phages PP1792 and PP1797 with Luz24. Genes are coloured according to their functional modules. Green, capsid and encapsidation; light blue, connector; dark blue, tail; orange, DNA replication; pink, lysis; black, morons, grey, hypothetical proteins. The gradient of red between the phage maps represents the BLASTn identity value.

Bacterial sensitivity to phage depends on the growth medium

As PP1450 and PP1777 are genetically close, only PP1450 results are presented below (PP1777 results were similar). Similarly, PP1792 being genetically close to PP1797, most of the following results are shown for PP1792 only, except for the LB with limited O₂ where PP1797 was used.

The phages of this study were selected for phage therapy. Bacteria infecting a patient are not likely to grow in optimal conditions like in LB medium (Palmer, Aye, and Whiteley 2007). To test the effects of growth medium closer to *in vivo* conditions on phage infection and provide more details regarding the lysis kinetics of phage in each growth condition, phage growth on WT propagated in various conditions were compared. LB medium, MMMa, Sputum medium, as well as LB medium with limited O₂ were used (see material and methods). These cultures were infected with either individual phages, one myovirus or one podovirus, or both phages at an MOI of 1, and the optical density (OD₆₀₀) was monitored over 4 hours (Figure 2). The podovirus was not able to inhibit WT growth in LB medium as displayed in Figure 2A, where the OD₆₀₀ was not significantly affected compared to the non-infected control. However, in the three other conditions it became able to efficiently inhibit WT growth especially in MMMa (Figure 2B) where an inhibition of the WT growth started one hour after the infection with the phages. In LB medium with limited O₂ and Sputum medium (Figure 2C and 2D), the podovirus could inhibit WT growth, as indicated by the relatively stable OD₆₀₀. Conversely, the myovirus was able to kill WT efficiently in LB medium where a decrease of OD₆₀₀ was observed after 2 hours. In the three other conditions, when infected with PP1450, the WT strain's OD₆₀₀ continued to increase, though less than the non-infected control. In three out of four conditions, the assembly of both phages was more efficient than individual phage to inhibit WT growth: in LB medium, LB with limited O₂ and Sputum medium, a decrease of the OD₆₀₀ was visible between 1 and 2 hours after infection. The decrease was stronger than with the phages alone, as shown Figure 2.

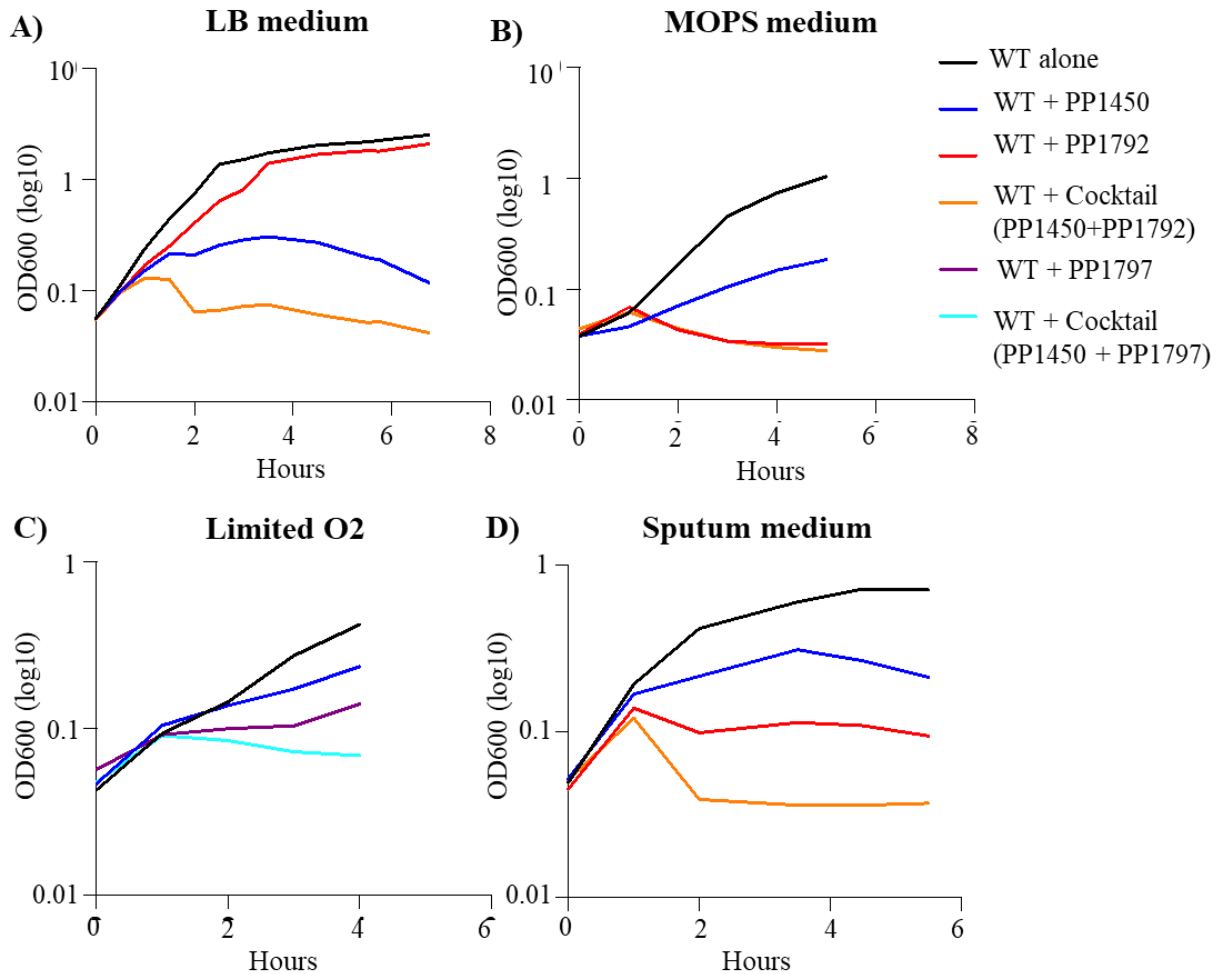


Figure 2: Growth kinetics of the WT strain (LMG_3delta) in presence or absence of single phage strains or the phage cocktail in liquid cultures of LB medium **(A)**, MOPS medium **(B)**, LB medium with limited O₂ **(C)** and Sputum medium **(D)**. Black lines represent densities of the WT strain (negative control). The dark blue lines represent densities of the WT strain infected by phage PP1450. The red lines represent densities of the WT strain infected by phage PP1792. The purple line represents the density of the WT strain infected by phage PP1797 **(C)**. Orange lines represent densities of the WT strain infected by phage cocktail (PP1450+ PP1792). Light blue line represents density of the WT strain infected by phage cocktail (PP1450 + PP1797) **(C)**. A representative replicate of each experiment is displayed. Each experiment was repeated at least 3 times.

We conclude that the efficiency of phage is dependent of the growing medium used. Interestingly, phage behavior was similar in all three conditions of slower growth (generation times 40 to 80 min), closer to wound or lung environments, such as MOPS, LB medium with limited O₂ and Sputum medium. The condition where both phages' behaviors changed drastically was the rich, LB medium with unlimited O₂ (generation time 30 min), Figure 2A. Therefore, optimal growth conditions change the behavior of phages compared to the other conditions.

When treated with the two-phages simultaneously, growth of WT cultures decreased about 1 to 2 hours after phage infection in all the conditions tested (Figure 2), indicating that using both phages at once was effective in all tested conditions, and did so in a similar timeframe as the challenge with the individual effective phages.

P. aeruginosa phage resisting mutants arise at frequencies around 10^{-5}

To measure the frequency at which mutants resistant to each phage arise, classical fluctuation assays were performed, for this, PP1450 and PP1777 were grown on strains propagated in LB medium while PP1792 and PP1797 were grown in MMMa. Exponentially growing WT diluted at a concentration of approximately 10^6 CFU/mL was infected by phages PP1450, PP1777, PP1792 and PP1797 individually, in 90 replicates 100 μ L cultures, with excess amounts of phages (MOI 100). After overnight growth, the number K of cultures in which all bacteria were killed was monitored. If K was between 10 and 80, we considered that the fraction K/90 was an estimation of the first term of the Poisson law with mean lambda, describing the occurrence of a mutation with low frequency in the population (see details in Materials and Methods). Well grown cultures were obtained after 24 hours of incubation for phages PP1450, PP1777 and PP1797, and after 42 hours for PP1792. Mutants occurred at a frequency of $\sim 10^{-5}$ for the podovirus and $\sim 0.5 \times 10^{-5}$ for the myovirus (Table 1) as observed previously (Shen et al. 2018).

Table 1: Phage-resistant mutant frequencies. The data was calculated from three biological replicates. The growth medium used for the experiments is specified in the table.

Phages	Growth medium	Mutation frequency (mean)
PP1450	LB	$6.1 (\pm 4.1) \times 10^{-6}$
PP1777	LB	$7.0 (\pm 1.7) \times 10^{-6}$
PP1792	MMMa	$1.5 (\pm 0.6) \times 10^{-5}$
PP1797	MMMa	$1.6 (\pm 0.8) \times 10^{-5}$

The receptor of the myovirus Ab27-like phages is the O-antigen of the lipopolysaccharide.

To find the receptor of the myoviruses, we screened for WT mutants resistant to them in LB medium. After infection, cultures where bacterial growth was visible were selected, and mutants isolated by 3 successive streaks on LB medium.

Out of the 12 myovirus resistant mutants selected, 11 had a mutation in gene *wzy* (91.7%). *Wzy* is a polymerase involved in the biosynthesis of the O-antigen chain of the lipopolysaccharide (LPS). The mutations occurred mostly in a run of 7 A at 136 nucleotides (7 out of the 11 *wzy* mutants; 63.6%) resulting in a truncated protein of either 54 amino acids (loss of an A) or 74 aa (addition of an A) instead of 438 aa. The other mutations observed in *wzy* were in a run of G at 625 nucleotides (2 out of 11), and the deletion or modification of the base G at 901 nucleotides resulting in either a truncated protein or a change of amino acid. This was in line with mutants already reported for Ab27 (Latino et al. 2016).

The 12th mutant had a large deletion of 329 240 pb including the gene *galU* which is also needed for the biosynthesis of LPS. Its defect results in the absence of the O-antigen chain and a defective outer core. This type of huge deletion has been observed repeatedly with *P. aeruginosa* PAO1 strain, including during infection by phages other than Ab27 (Yang et al. 2020; Shen et al. 2018).

Table 2: Mutations detected after infection by the myoviruses (PP1450 or PP1777) in the resistant mutants.

Strains name	Gene affected	Detected mutation	Protein modification	Number of time it was detected	Detection by Whole genome or Sanger sequencing
MB075	<i>Wzy</i>	A:7→8 (136th nt)	Protein of 74aas instead of 438 aas	1	Whole genome sequencing
	<i>gloA2</i>	G→A (149th)	R50H		
MB076	16S ribosomal RNA	T→C	-	1	Whole genome sequencing
	<i>Wzy</i>	G:6→7 (625th nt)	Protein of 209 aas instead of 438 aas		
MB080; MB081; MB082; MB083; MB084	<i>Wzy</i>	A:7→8 (136th nt)	Protein of 74aas instead of 438 aas	5	Whole genome sequencing (MB081) and Sanger sequencing
MB077	<i>Wzy</i>	G:6→7 (625th nt)	Protein of 209 aas instead of 438 aas	1	Sanger analysis
MB078	numerous	Δ329240 bp	ΔgalU	1	Whole genome sequencing
MB079	<i>wzy</i>	A:7→6 (136th nt)	Protein of 54 aas instead of 438 aas	1	Whole genome sequencing
MB085	<i>wzy</i>	G→A (901rst nt)	G301R	1	Sanger analysis

One of the *wzy* mutants of this study, *wzy1* (Table 2) with a deletion of an A in a run of 7 As resulting in a truncated protein of 54 amino acids, was kept for further study (Figure 3A). In comparison to WT, the adsorption of PP1450 on *wzy1* was significantly decreased (p-value < 0.0005). These data, as well as what was already described in the literature (Latino et al. 2016), strongly indicates that the O-antigen chain LPS is the receptor of Ab27 like phage PP1450.

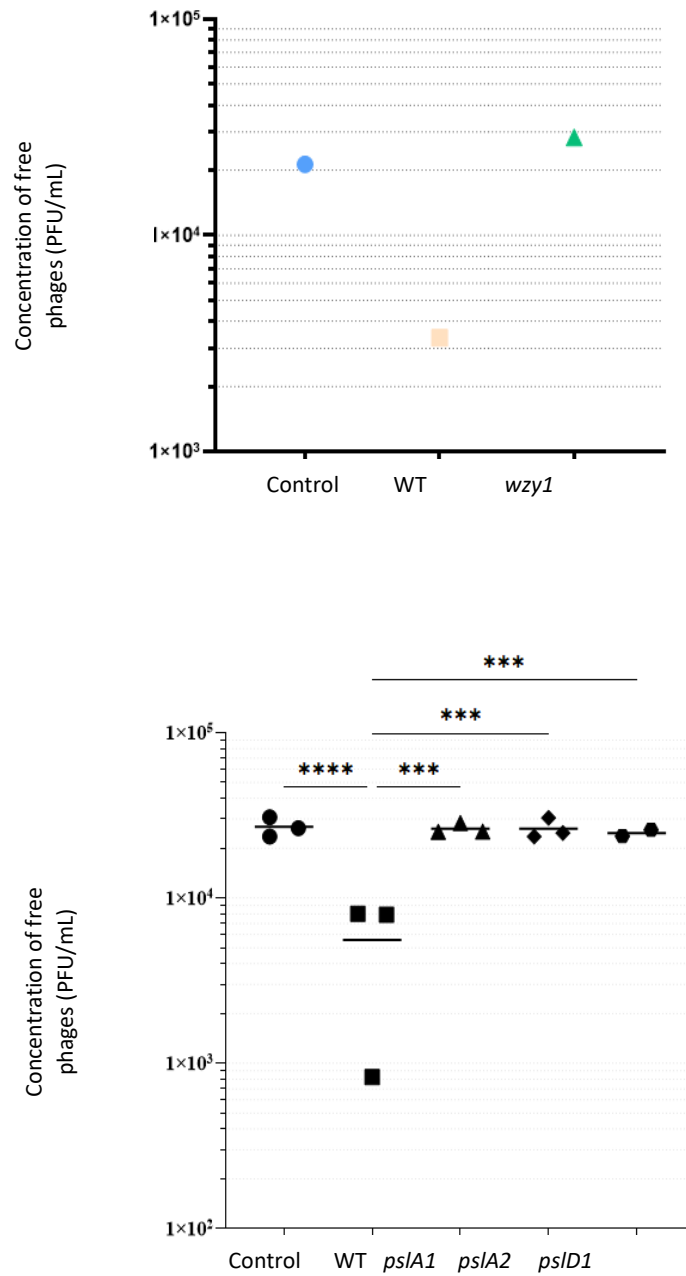


Figure 3: Adsorption assay of PP1450 in LB medium (A) and PP1792 in MOPS medium (B). The concentrations of free phages are plotted. The lines represent mean values. **A)** PP1450 adsorption was decreased in *wzy1* (tringles) compared to the LMG3Δ (squares). **B)** PP1792 adsorption was significantly decreased in all mutants (triangles, diamonds and hexagons) compared to LMG3Δ (squares) (p-value<0.0001, One way ANOVA, n=3).

The receptor of the podovirus Luz24- like phages is the exopolysaccharide psl.

Contrary to phages of the Ab27 species, the Luz24 receptor remained unknown at the onset of this study. This might be related to its poor growth on rich medium. We therefore investigated the PP1792 resistant mutants arising upon growth in MMMa. Three mutants isolated and confirmed to be PP1792 resistant were analyzed. The adsorption of PP1792 was checked on them and revealed that all three abolished PP1792 adsorption (Figure 3B). The whole genome sequencing of those mutants revealed a mutation in the locus *psl*: Mutants 1 (MB132) and 2 (MB133) contained a mutation in *pslA*, while mutant 3 (MB119) had a mutation in *pslD* (Table 3). Mutants 1 and 3 were named *pslA1* and *pslD1*, respectively. These genes are involved in the biosynthesis of the exopolysaccharide psl.

Table 3: Mutations found in podovirus resistant mutants with decrease of adsorption

Strains name	Gene mutated	Detected mutation	Protein modification	Number of time it was detected	Detection by Whole genome or Sanger sequencing
<i>pslA1</i> (MB132); <i>pslA2</i> (MB133)	<i>pslA</i>	Δ13 bp (928-940nt/1437nt)	Y327*	2	Whole genome sequencing
<i>pslD1</i> (MB119)	<i>pslD</i>	Δ17 bp (133-149nt/795nt)	N80*	1	Whole genome sequencing

Strains *pslA1* and *pslD1* were transformed with plasmid pPSVA expressing constitutively *pslA*, and plasmid pPSVD expressing *pslD*, respectively (Table 3). These strains were examined for susceptibility to PP1792 and PP1797. As shown in Table 3, PP1792 and PP1797 were able to lyse the complemented strains with the same efficiency of plaquing (EOP) as the WT strain but did not kill the *psl* mutant strains *pslA1* and *pslD1*.

Table 4: EOP of single phages on a panel of mutants derived from WT complemented or not. The killing efficiency of each phage strain were determined by an EOP assay. (+) = EOP of 1; (-) = EOP < 10⁻⁵. pPSV35 is the empty plasmid.

Bacterial strain	Complementation plasmid	Efficiency of plaquing	
		PP1792	PP1797
LMG_3delta	pPSV35	+	+
<i>pslD1</i>	pPSV35	-	-
<i>pslD1</i>	pPSVD	+	+
<i>pslA1</i>	pPSV35	-	-
<i>pslA2</i>	pPSVA	+	+

These complemented strains were also checked for their capacity to adsorb PP1792. As shown in Figure 4, phage PP1792 was able to adsorb on WT derived strains with full exopolysaccharide *psl* such as the WT strain, as well as the *pslA* and the *pslD* complemented strains. All together, these data strongly indicate that the receptor for the luz24-like phage PP1792 is the exopolysaccharide *psl*.

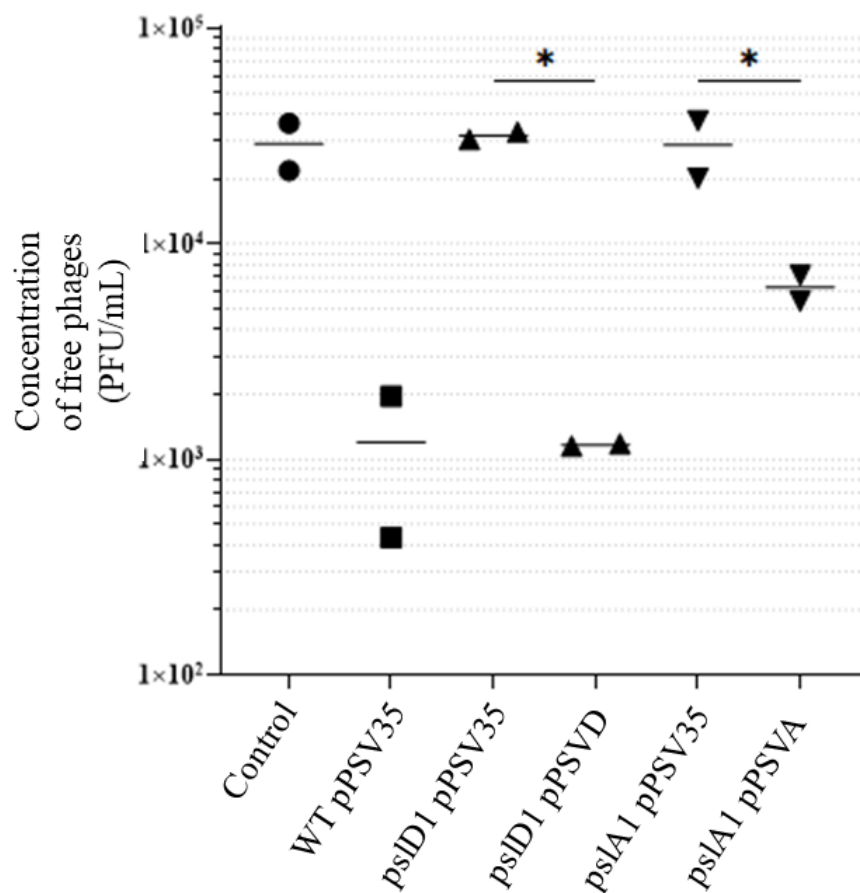


Figure 4: Adsorption assay of PP1792 in LB medium. The concentrations of free phages are plotted. The lines represent mean values. Phage adsorption was significantly restored by complementation with plasmids pPSVD (pslD gene) and pPSVA (pslA) in the pslD1 (triangles) and the pslA (reverse triangles) mutants, respectively. (*:p-value<0.05; **:p-value<0.0001).

Discussion

The choice of medium is important for the study and characterization of phages.

Most previous studies of *P. aeruginosa* bacteriophage development reported in the literature were carried out under optimal growth conditions for the bacterium, such as high aeration, 37°C, rich medium. However, these conditions might not be matching the *in vivo* situation, and even, it might not be optimal for phage growth. Indeed, *P. aeruginosa* faces unfavorable growth conditions in its environment, such as human airways or burn wounds. For phage therapy, which aims to kill bacteria infecting patients, it is critical to better understand phage growth as a function of the physiological state of the bacteria. That led us to study phage growth in conditions closer to *in vivo* by using minimum media and limited oxygen.

As seen in Figure 2, phage PP1450 and PP1792 do not have the same behavior depending on the medium used. Surprisingly, while these phages each have the same behavior in all the limited growth conditions tested, they behave very differently in aerated LB medium, which are the usual growth conditions used for phage study in the literature; while PP1450 prefers aerated LB medium to grow, PP1792 grows better on minimal media or limited oxygen availability.

Moreover, in this study, we were able to find the receptor of PP1792 by using minimal medium as the growth medium, since PP1792 is far less efficient in LB medium when infecting WT, a PAO1 derivative (Figure 2). Indeed, no lysis was observed in LB medium liquid culture, and only turbid spots at high phage concentrations were visible on LB agar plates, but no isolated PFUs were ever observed (data not shown). This could explain why Luz24 receptor was not found so far.

The receptor for the Luz24 phage species is the exopolysaccharide psl.

The receptor of Ab27 phage species was already found to be the O-antigen of the LPS (Latino et al. 2016) with the most common mutations occurring in gene *wzy*. Here, we confirmed this with our phages, by conducting adsorption assays on *wzy1*, where PP1450 was unable to adsorb itself on this mutant with an impaired O-antigen chain.

However, the receptor of Luz24 phage was still unknown. In the current study, we determined that Luz24-like phage PP1792 uses the exopolysaccharide *psl* to bind to the bacteria. *P. aeruginosa* strains can synthesize at least three types of exopolysaccharides: alginate, *psl* and *pel* (Wu et al. 2019). The proteins encoded by *pslA* and *pslD* are necessary for

the synthesis of the exopolysaccharide psl (Byrd et al. 2009). This last exopolysaccharide is the less characterized of the three: Psl biosynthesis resembles the EPS/CPS capsular biosynthesis pathway of *Escherichia coli* (Franklin et al. 2011). Our results, as well as this study, suggest it might rather be a capsular sugar tightly linked to the bacterial surface, rather than produced in the supernatant, if it serves as phage receptor.

Since PP1792 is genetically close to Luz24, we can propose that Luz24 receptor is also the exopolysaccharide psl (Ceyssens et al. 2011). As stated above, the difficulty to find Luz24 receptor so far might be explained by the choice of medium, as previous studies on Luz24 were carried out on LB medium (Ceyssens et al. 2008; Essoh et al. 2015)). Moreover, previous studies were mostly conducted on strain PAO1, which contains two active filamentous prophages, Pf4 and Pf6, both of which were inactivated in the strain used in the present work. One of them, Pf4, can randomly become superinfectious in LB medium and produce high titer of virions (Secor et al. 2020). This leads to the selection of mutants in genes for the synthesis of type IV pili, the receptor for Pf4. This phage competition might make it even harder to obtain mutants resisting to Luz24, explaining why it was not found so far.

The use of multiple phages allows to treat the infections whichever state the bacteria is in.

While PP1450 multiplies efficiently on bacteria grown in aerated LB medium, PP1792 has the opposite behavior, multiplying more efficiently on bacteria grown in minimal media or limited oxygen availability. This difference in behavior for these two phages could be beneficial in the frame of phage therapy: on an infection site, there might be bacteria in different physiological states and by combining these two phages, more bacteria could be killed whichever state they are in.

Moreover, the use of phages which target different receptors could limit the emergence of resistant mutants (Yang et al. 2020; Hesse et al. 2020), and as phage receptor are often virulence factors for the bacteria, the resistant mutants able to emerge would be more easily cleared by the host immune system. In a similar way, the psl exopolysaccharide is important for biofilm growth, so that psl mutants should have decreased fitness in vivo.

Finally, to continue to improve the odds of success of phage therapy, the combined use of different phages with antibiotics should also be considered. Indeed, Torres-Barcelo et al. have already demonstrated that the combined use of antibiotics and phage could limit the emergence of both antibiotic and phage resistant mutants (Torres-Barceló et al. 2016) and allow for a better bacterial control (Torres-Barceló et al. 2014).

References

- Alseth, Ellinor O, Elizabeth Pursey, Adela M Luján, Isobel McLeod, Clare Rollie, et Edze R Westra. 2019. « Bacterial biodiversity drives the evolution of CRISPR-based phage resistance ». *Nature* 574 (7779): 549-52. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1662-9>.
- Boucher, Helen W., George H. Talbot, John S. Bradley, John E. Edwards, David Gilbert, Louis B. Rice, Michael Scheld, Brad Spellberg, et John Bartlett. 2009. « Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 48 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1086/595011>.
- Byrd, Matthew S., Irina Sadovskaya, Evgueny Vinogradov, Haiping Lu, April B. Sprinkle, Stephen H. Richardson, Luyan Ma, et al. 2009. « Genetic and Biochemical Analyses of the *Pseudomonas Aeruginosa* Psl Exopolysaccharide Reveal Overlapping Roles for Polysaccharide Synthesis Enzymes in Psl and LPS Production ». *Molecular Microbiology* 73 (4): 622-38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x>.
- Ceyssens, Pieter-Jan, Thea Glonti, Andrew M Kropinski, Rob Lavigne, Nina Chanishvili, Leonid Kulakov, Nino Lashkhi, Marina Tediashvili, et Maya Merabishvili. 2011. « Phenotypic and genotypic variations within a single bacteriophage species ». *Virology Journal* 8 (mars): 134. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-134>.
- Ceyssens, Pieter-Jan, Kirsten Hertveldt, Hans-W. Ackermann, Jean-Paul Noben, Mekonnen Demeke, Guido Volckaert, et Rob Lavigne. 2008. « The Intron-Containing Genome of the Lytic *Pseudomonas* Phage LUZ24 Resembles the Temperate Phage PaP3 ». *Virology* 377 (2): 233-38. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.038>.
- Ceyssens, Pieter-Jan, et Rob Lavigne. 2010. « Bacteriophages of *Pseudomonas* ». *Future Microbiology* 5 (7): 1041-55. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.66>.
- Chan, Benjamin K., Mark Siström, John E. Wertz, Kaitlyn E. Kortright, Deepak Narayan, et Paul E. Turner. 2016. « Phage Selection Restores Antibiotic Sensitivity in MDR *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Scientific Reports* 6 (1): 26717. <https://doi.org/10.1038/srep26717>.
- Cornuault, Jeffrey K., Elisabeth Moncaut, Valentin Loux, Aurélie Mathieu, Harry Sokol, Marie-Agnès Petit, et Marianne De Paepe. 2020. « The Enemy from within: A Prophage of *Roseburia Intestinalis* Systematically Turns Lytic in the Mouse Gut, Driving Bacterial Adaptation by CRISPR Spacer Acquisition ». *The ISME Journal* 14 (3): 771-87. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0566-x>.
- De Sordi, Luisa, Varun Khanna, et Laurent Debarbieux. 2017. « The Gut Microbiota Facilitates Drifts in the Genetic Diversity and Infectivity of Bacterial Viruses ». *Cell Host & Microbe* 22 (6): 801-808.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.010>.
- Essoh, Christiane, Libera Latino, Cédric Midoux, Yann Blouin, Guillaume Loukou, Simon-Pierre A. Nguetta, Serge Lathro, et al. 2015. « Investigation of a Large Collection of *Pseudomonas Aeruginosa* Bacteriophages Collected from a Single Environmental Source in Abidjan, Côte d'Ivoire ». *PLOS ONE* 10 (6): e0130548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130548>.
- Forde, Amanda, et Colin Hill. 2018. « Phages of Life - the Path to Pharma ». *British Journal of Pharmacology* 175 (3): 412-18. <https://doi.org/10.1111/bph.14106>.
- Forti, Francesca, Dwayne R. Roach, Marco Cafora, Maria E. Pasini, David S. Horner, Ersilia V. Fiscarelli, Martina Rossitto, et al. 2018. « Design of a Broad-Range Bacteriophage Cocktail That Reduces *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms and Treats Acute Infections in Two Animal Models ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (6): e02573-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02573-17>.

- Franklin, Michael J., David E. Nivens, Joel T. Weadge, et P. Lynne Howell. 2011. « Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl ». *Frontiers in Microbiology* 2 (août): 167. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00167>.
- Harvey, Hanjeong, Joseph Bondy-Denomy, Hélène Marquis, Kristina M. Sztanko, Alan R. Davidson, et Lori L. Burrows. 2018. « *Pseudomonas Aeruginosa* Defends against Phages through Type IV Pilus Glycosylation ». *Nature Microbiology* 3 (1): 47-52. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0061-y>.
- Hesse, Shayla, Manoj Rajaure, Erin Wall, Joy Johnson, Valery Bliskovsky, Susan Gottesman, et Sankar Adhya. 2020. « Phage Resistance in Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* ST258 Evolves via Diverse Mutations That Culminate in Impaired Adsorption ». *MBio* 11 (1): e02530-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02530-19>.
- Jonckheere, Leander, Petra Schelstraete, Leen Van Simaey, Eva Van Braeckel, Julie Willekens, Sabine Van Daele, Frans De Baets, et Mario Vaneechoutte. 2018. « Establishing the Diagnosis of Chronic Colonization with *Pseudomonas Aeruginosa* of Cystic Fibrosis Patients: Comparison of the European Consensus Criteria with Genotyping of *P. Aeruginosa* Isolates ». *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 17 (6): 729-35. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.03.004>.
- Kortright, Kaitlyn E., Benjamin K. Chan, Jonathan L. Koff, et Paul E. Turner. 2019. « Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria ». *Cell Host & Microbe* 25 (2): 219-32. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.014>.
- Kropinski, Andrew M. 2009. « Measurement of the Rate of Attachment of Bacteriophage to Cells ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 501: 151-55. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_15.
- LaBauve, Annette E., et Matthew J. Wargo. 2012. « Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa* ». *Current protocols in microbiology* 0 6 (mai): Unit-6E.1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06e01s25>.
- Latino, Libera, Cédric Midoux, Yolande Hauck, Gilles Vergnaud, et Christine Pourcel. 2016. « Pseudolysogeny and Sequential Mutations Build Multiresistance to Virulent Bacteriophages in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Microbiology (Reading, England)* 162 (5): 748-63. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000263>.
- Luria, S. E., et M. Delbrück. 1943. « Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance ». *Genetics* 28 (6): 491-511.
- Meaden, Sean, Loris Capria, Ellinor Alseth, Sylvain Gandon, Ambarish Biswas, Luca Lenzi, Stineke van Houte, et Edze R. Westra. 2021. « Phage Gene Expression and Host Responses Lead to Infection-Dependent Costs of CRISPR Immunity ». *The ISME Journal* 15 (2): 534-44. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00794-w>.
- Neidhardt, Frederick C., Philip L. Bloch, et David F. Smith. 1974. « Culture Medium for Enterobacteria ». *Journal of Bacteriology* 119 (3): 736-47.
- Pallett, Ross, Laura J. Leslie, Peter A. Lambert, Ivana Milic, Andrew Devitt, et Lindsay J. Marshall. 2019. « Anaerobiosis Influences Virulence Properties of *Pseudomonas Aeruginosa* Cystic Fibrosis Isolates and the Interaction with *Staphylococcus Aureus* ». *Scientific Reports* 9 (1): 6748. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42952-x>.
- Palmer, Kelli L., Lindsay M. Aye, et Marvin Whiteley. 2007. « Nutritional Cues Control *Pseudomonas aeruginosa* Multicellular Behavior in Cystic Fibrosis Sputum ». *Journal of Bacteriology* 189 (22): 8079-87. <https://doi.org/10.1128/JB.01138-07>.
- Pires, Diana P., Ana Rita Costa, Graça Pinto, Luciana Meneses, et Joana Azeredo. 2020. « Current Challenges and Future Opportunities of Phage Therapy ». *FEMS Microbiology Reviews* 44 (6): 684-700. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa017>.

- Ramírez-Estrada, Sergio, Bárbara Borgatta, et Jordi Rello. 2016. « Pseudomonas Aeruginosa Ventilator-Associated Pneumonia Management ». *Infection and Drug Resistance* 9: 7-18. <https://doi.org/10.2147/IDR.S50669>.
- Schooley, Robert T., Biswajit Biswas, Jason J. Gill, Adriana Hernandez-Morales, Jacob Lancaster, Lauren Lessor, Jeremy J. Barr, et al. 2017. « Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant Acinetobacter Baumannii Infection ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (10): e00954-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00954-17>.
- Secor, Patrick R., Elizabeth B. Burgener, M. Kinnersley, Laura K. Jennings, Valery Roman-Cruz, Medeea Popescu, Jonas D. Van Belleghem, et al. 2020. « Pf Bacteriophage and Their Impact on Pseudomonas Virulence, Mammalian Immunity, and Chronic Infections ». *Frontiers in Immunology* 11 (février). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00244>.
- Shen, Mengyu, Huidong Zhang, Wei Shen, Zhenyu Zou, Shuguang Lu, Gang Li, Xuesong He, et al. 2018. « Pseudomonas Aeruginosa MutL Promotes Large Chromosomal Deletions through Non-Homologous End Joining to Prevent Bacteriophage Predation ». *Nucleic Acids Research* 46 (9): 4505-14. <https://doi.org/10.1093/nar/gky160>.
- Torres-Barceló, Clara, Flor I. Arias-Sánchez, Marie Vasse, Johan Ramsayer, Oliver Kaltz, et Michael E. Hochberg. 2014. « A Window of Opportunity to Control the Bacterial Pathogen Pseudomonas Aeruginosa Combining Antibiotics and Phages ». *PloS One* 9 (9): e106628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106628>.
- Torres-Barceló, Clara, Blaise Franzon, Marie Vasse, et Michael E. Hochberg. 2016. « Long-Term Effects of Single and Combined Introductions of Antibiotics and Bacteriophages on Populations of Pseudomonas Aeruginosa ». *Evolutionary Applications* 9 (4): 583-95. <https://doi.org/10.1111/eva.12364>.
- Wu, Huijun, Di Wang, Maomao Tang, et Luyan Z. Ma. 2019. « The Advance of Assembly of Exopolysaccharide Psl Biosynthesis Machinery in Pseudomonas Aeruginosa ». *MicrobiologyOpen* 8 (10): e857. <https://doi.org/10.1002/mbo3.857>.
- Yang, Yuhui, Wei Shen, Qiu Zhong, Qian Chen, Xuesong He, Jonathon L. Baker, Kun Xiong, et al. 2020. « Development of a Bacteriophage Cocktail to Constrain the Emergence of Phage-Resistant Pseudomonas aeruginosa ». *Frontiers in Microbiology* 11 (mars). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00327>.

Supplementary Table 1: Primers used in this study

Name	Description	Sequence
GmF	forward primer for the amplification of the gentamicin cassette	CGAATTAGCTTCAAAAGCGCTCTGA
GmR	reverse primer for the amplification of the gentamicin cassette	CGAATTGGGGATCTTGAAGTTCCT
Pf4_BG_5'	forward primer for the amplification of Pf4 left border (restriction enzyme: KpnI)	CATGGTACCTGGCAGCAGACCCAGGACGC
Pf4_BG_3'	reverse primer for the amplification of Pf4 left border	AGGAACTTCAAGATCCCCAATTCGCGTCATGAGCTTGGGAAGCT
Pf4_BD_5'	forward primer for the amplification of Pf4 right border	TCAGAGCGCTTTTGAAGCTAATTCGGATCCCAATGCAAAGCCCC
Pf4_BD_3'	reverse primer for the amplification of Pf4 right border (restriction enzyme: HindIII)	CATAAGCTTTCTGGAATACGACGGGGGC
Pf4_del_5'	forward primer to confirm the deletion of Pf4	GGCAACCTGGTCAACGAAAC
Pf4_del_3'	reverse primer to confirm the deletion of Pf4	TCGAGCGGAAGTGATACGAG
Pf6_rep_BG_5'	forward primer for the amplification of the left border of Pf6 <i>rep</i> gene (restriction enzyme: KpnI)	CATGGTACCAGTAGCGTTGCTCGTGATTG
Pf6_rep_BG_3'	reverse primer for the amplification of the left border of Pf6 <i>rep</i> gene	AGGAACTTCAAGATCCCCAATTCGGGCGATATGACGGTACGCAAG
Pf6_rep_BD_5'	forward primer for the amplification of the right border of Pf6 <i>rep</i> gene	TCAGAGCGCTTTTGAAGCTAATTCGATCATTTGTGCCTCCAG
Pf6_rep_BD_3'	reverse primer for the amplification of the right border of Pf6 <i>rep</i> gene (restriction enzyme: HindIII)	CATAAGCTTGCTGCGCCTGTTGATCTG
exoA_BG_5'	forward primer for the amplification of the left border of <i>exoA</i> (restriction enzyme: HindIII)	CATAAGCTTCTCGATAGTCGCCAGGACAC
exoA_BG_3'	reverse primer for the amplification of the left border of <i>exoA</i> (restriction enzyme: BamHI)	CATGGATCCGAAGGATGAGGCTGATCGAG
exoA_BD_5'	forward primer for the amplification of the right border of <i>exoA</i> (restriction enzyme: BamHI)	CATGGATCCATCCTGATAGGTAATCCGC
exoA_BD_3'	reverse primer for the amplification of the right border of <i>exoA</i> (restriction enzyme: EcoRI)	CATGGAATTCGGACATCACCGAGTAGATGC
pEX18Ap_5'	forward primer for the verification of the construction of plasmids pMB02 and pMB03	CTGCAACTGTTGGGAAG
pEX18Ap_3'	reverse primer for the verification of the construction of plasmids pMB02 and pMB03	GAGTTAGCTCACTCATTAG

Name	Description	Sequence
pEXG2_5'	forward primer for the verification of the construction of plasmid pMB06	ATAGTGAACGGCAGGTAAGC
pEXG2_3'	reverse primer for the verification of the construction of plasmid pMB06	GTCCTCAACGACAGGAGCAC
Pf4_xis_5' (Pf4 excisionase)	forward primer for the verification of the presence or absence of Pf4	CAGGCACTCCATTCTGTTT
Pf4_xis_3' (Pf4 excisionase)	reverse primer for the verification of the presence or absence of Pf4	TCTTCCGTGCTCACGCGAATC
Pf4_recBact_5' (Pf4 deletion)	forward primer for the verification of the deletion of Pf4	GGCAACCTGGTCAACGAAAC
Pf4_recBact_3' (Pf4 deletion)	reverse primer for the verification of the deletion of Pf4	TCGAGCGGAAGTGATACGAG

3. Resensibilisation d'un mutant *wzy* aux podovirus : par quel mécanisme ?

3.1. Le mutant *wzy* est resensibilisé au phage PP1792, et partiellement à PP1797.

Parmi les 12 mutants résistants aux phages Ab27-like PP1450 et PP1777 analysés dans l'article n°2 (Partie Résultats, II), nous avons observé que 11 (91.7%) avaient une mutation dans le gène *wzy* provoquant une modification des LPS au niveau de l'antigène O, dont la chaîne est alors tronquée. Afin de caractériser les souches mutantes, leur sensibilité aux quatre phages a été testée, par efficacité de lyse sur LB Lennox agar (« efficiency of plaquing », EOP). Les résultats pour 8 de ces mutants sont présentés Tableau 1. Les mutants *wzy* étaient entièrement résistants à PP1450 et partiellement résistants à PP1777 (EOP réduite, plages très turbides au lieu des plages claires observées sur la souche WT).

De manière inattendue, lors de la titration des podoviridae PP1792 et PP1797 sur 8 des 11 mutants *wzy* en LB Lennox agar, des plages larges et claires étaient visibles sur les boîtes, alors qu'aucune plage n'était visible sur la WT (Tableau 1). En effet, pour rappel, la souche WT ne permet pas la croissance sur LB Lennox agar de ces phages. Pour le PP1792, on arrive même à rétablir la EOP observée sur la souche de titration des podoviridae, NAR71 (Tableau 1). En conclusion, l'invalidation du gène *wzy* suffit à restaurer la croissance de PP1792 sur la souche WT en milieu riche sur boîte.

Dans le cas du mutant MB075, il restait résistant aux podovirus, malgré sa mutation dans *wzy*. Ce mutant avait aussi une mutation dans le gène *gloA2*, consistant en une substitution d'une arginine en histidine en position 50 de la protéine. Ce gène code pour une lactoylglutathione lyase impliquée dans la transformation du méthylglyoxal en (R)-lactate (<https://pseudomonas.com/>). Cette mutation était la seule différence de génotype entre MB075 et les autres mutants *wzy*. On peut donc supposer que cette mutation permet de résister à l'infection par les podovirus PP1792 et PP1797 malgré une mutation dans *wzy*. Nous n'avons pas d'hypothèse à proposer concernant l'étape de l'infection à laquelle pourrait intervenir cette mutation.

Souches bactériennes	Efficacité de lyses sur LB Lennox de				Isolée après infection avec le phage	Mutation détectée	Impact sur la protéine Wzy
	PP1450	PP1777	PP1792	PP1797			
LMG_3Δ	+++	+++	-	-	--	NA	Protéine sauvage de 438aa
NAR71	-	-	+++	+++	--	NA	NA
MB079	-	++	+++	+++	PP1777	wzy1 (at 136 nt, A:7 → 6)	Protéine de 54 aa
MB080	-	++	+++	+	PP1450	wzy2 (at 136 nt, A:7 → 8)	Protéine de 74 aa
MB081	-	+	+++	+	PP1450	wzy2 (at 136 nt, A:7 → 8)	Protéine de 74 aa
MB082	-	++	++	++	PP1450	wzy2 (at 136 nt, A:7 → 8)	Protéine de 74 aa
MB083	-	+	+++	+	PP1777	wzy2 (at 136 nt, A:7 → 8)	Protéine de 74 aa
MB084	-	++	+++	+	PP1777	wzy2 (at 136 nt, A:7 → 8)	Protéine de 74 aa
MB085	+	++	+++	+	PP1777	wzy3 (at 901 nt, G → A)	301 aa : Glycine → Arginine
MB075	-	+	-	-	PP1450	wzy2 (at 136 nt, A:7→8), gloA2 (R50H),	Protéine de 74 aa
MB078	+	-	-	-	PP1777	Δ329240 pb (galU)	NA

Tableau 1 : EOP des 4 phages sur un panel de 7 mutants ponctuels wzy, d'un double mutant wzy gloA, ainsi qu'un mutant comportant une large délétion de 329 kb. Tous ces mutants sont dérivés de la souche WT, et ont été isolés après infection par un des deux myovirus, PP1450 ou PP1777. L'efficacité de lyse de chaque phage est déterminée par un test d'EOP. (+) = EOP > 0.1; (+/-) = EOP entre 0.1 and 0.01; (-/+) = EOP entre 0.001 and 0.0001; (-) = EOP < 0.00001.

Pour le mutant MB078, dont les colonies ont une coloration rouge, une délétion de 329 kb est observable. Cette délétion, déjà décrite dans la littérature (Le et al., 2014; Shen et al., 2018; Yang et al., 2020) contient notamment les gènes *hmgA* et *galU*. Le gène *hmgA* code pour une enzyme, une dioxygénase qui convertit l'acide homogentisique en 4-maleylacetoacetate. La délétion de ce gène provoque l'accumulation de cet acide et confère cette pigmentation rouge aux colonies. Le gène *galU*, lui, code pour une pyrophosphorylase UDP-D-glucose qui convertit le Glc-1-phosphate en UDP-D-Glc, un sucre prédominant dans le corps externe des oligosaccharides. Un mutant *galU* perd son antigène O et synthétise un LPS défectueux. C'est la délétion de ce gène qui explique la résistance aux myovirus observée sur boîte (Tableau 1) : pour rappel, le récepteur des myovirus PP1450 et PP1777 sont les LPS. Les podovirus ne poussent pas sur ce mutant, comme attendu car la délétion englobe aussi le locus *psl*, codant pour le récepteur de ces podovirus.

Pour les 3 derniers mutants *wzy* obtenus, l'efficacité de lyse n'a pas pu être mesurée. En effet, ceux-ci présentaient un défaut majeur de croissance et n'étaient pas capables de former un tapis bactérien continu sur boîte (seules des colonies éparses étaient présentes sur boîte). Nous avons alors recherché si ces souches étaient devenues pseudolysogènes pour PP1450 ou PP1777 (Latino et al., 2016), mais aucune trace d'ADN phagique n'a été retrouvée lors du séquençage de ces mutants, ni par amplification par PCR.

Nous avons voulu vérifier si PP1792 était capable de lyser les mutants *wzy* également en culture liquide en milieu riche. La cinétique d'infection par PP1792 sur une de ces souches (MB079, qui sera utilisée pour tous les autres tests, appelée simplement *wzy1* par la suite) en LB Lennox liquide montre qu'une lyse par le phage est observable sur la souche *wzy1*, entre 2 et 4 heures après infection (Figure 6).

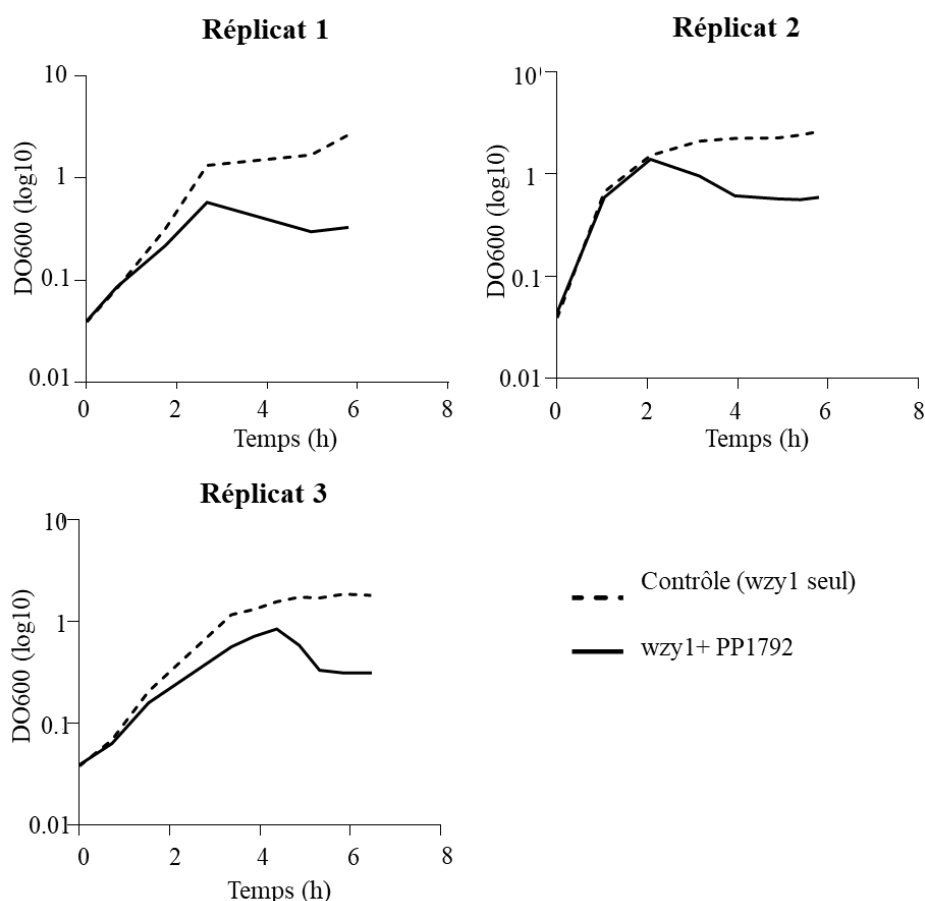


Figure 6 : Suivi de croissance de la souche *wzy1* en milieu LB Lennox sans (lignes pointillées) et avec (lignes continues) infection par le phage PP1792 (MOI=1).

3.2. L'adsorption de PP1792 est améliorée sur un mutant *wzy*, mais seulement en milieu minimum

Notre première hypothèse pour expliquer ce résultat a été que la production de LPS à la surface bactérienne pourrait constituer une barrière contre les podovirus (effet « shielding »), en masquant leur récepteur. Dans cette hypothèse, une meilleure adsorption du phage sur le mutant, comparé à la souche WT, était attendue. Nous avons donc comparé l'adsorption de PP1792 sur ces deux souches, et observé qu'en milieu riche, PP1792 s'adsorbait déjà de manière efficace sur la souche WT (Figure 8, comparer les valeurs obtenues pour « - » le contrôle dans lequel le phage est seul dans la solution, et « WT » où le phage peut s'adsorber aux bactéries sauvages), et que la mutation *wzy1* n'augmentait pas le taux d'adsorption, il avait même tendance à la diminuer, mais de manière statistiquement non significative (Figure 8, points noirs, comparer WT et *wzy1*). Nous concluons donc à l'absence apparente d'effet « shielding » en milieu riche, puisque les podovirus s'adsorbent avec une efficacité similaire

sur la souche sauvage et le mutant *wzy1*, donc l'hypothèse selon laquelle la mutation *wzy1* supprimerait un effet « shielding » dû aux LPS semble être exclue, en tout cas en milieu riche.

Ayant montré au préalable (voir Article n°2) que PP1792 se multiplie mieux en milieu minimum qu'en milieu riche, l'expérience d'adsorption a été répétée dans le milieu minimum MOPS acétate. Une amélioration significative de l'adsorption a été observée pour la souche *wzy1* (Figure 7, points bleus, comparer WT et *wzy1*, p-value = 0.0121) comparé à la souche WT (Figure 7, colonne 5). L'effet direct de la mutation *wzy1* est d'empêcher la synthèse de la chaîne O des LPS. L'hypothèse la plus simple est donc la suivante : le phage s'adsorbe mieux en milieu minimum sur la souche *wzy1* car il y a moins de LPS à la surface de la bactérie, il arrive donc plus facilement à atteindre son récepteur. On suppose donc qu'il y a un effet « shielding » observable en milieu minimum. Nous avons également remarqué que les plages de lyses formées sur milieu minimum par PP1792 étaient claires sur le tapis *wzy1*, alors qu'elles étaient turbides sur la souche WT. Ceci pourrait également s'expliquer par l'effet « shielding » des LPS

Le paradoxe concerne surtout le comportement de la souche WT : pourquoi l'adsorption des podovirus est-elle aussi bonne en milieu riche sur la souche WT ? Tout se passe comme si les LPS, au lieu de produire un effet « shielding », produisaient un effet d'engluement, rendant le podovirus incapable d'accéder à son véritable récepteur psl. Il se pourrait que celui-ci soit en concentration beaucoup plus faible en milieu riche qu'en milieu minimum. Il est en effet connu que le milieu minimum à base de MOPS et acétate favorise la formation du biofilm (surtout avec l'ajout de CaCl₂, (LaBauve and Wargo, 2012), et que les exopolysaccharides psl interviennent dans la formation de ce biofilm, en aidant les bactéries à s'accrocher entre elles et aux surfaces. Il se pourrait donc que PP1792, incapable d'infecter la souche WT en milieu riche, le soit en milieu minimum grâce à la plus importante production de psl, lui permettant de surmonter le shielding des LPS.

En accord avec ces hypothèses, sur un mutant *wzy1*, PP1792 s'adsorbe moins bien en milieu riche qu'en milieu minimum. Ayant supprimé avec cette mutation tout effet de « shielding » ou d'engluement, ici le paramètre limitant l'adsorption serait uniquement la quantité de psl présents à la surface des bactéries.

Dans ces différentes hypothèses (récapitulées en Figure 9 page 133), le milieu de culture joue un rôle important dans le cycle du phage. Pour les vérifier, il serait donc intéressant de mesurer le niveau d'expression des gènes tels que *wzy*, *pslA* et *pslD*, impliqués dans les voies

de synthèse des LPS et de psl, dans les différents milieux et sur les différentes souches. Une expérience de qRT PCR est en cours de réalisation dans ce but.

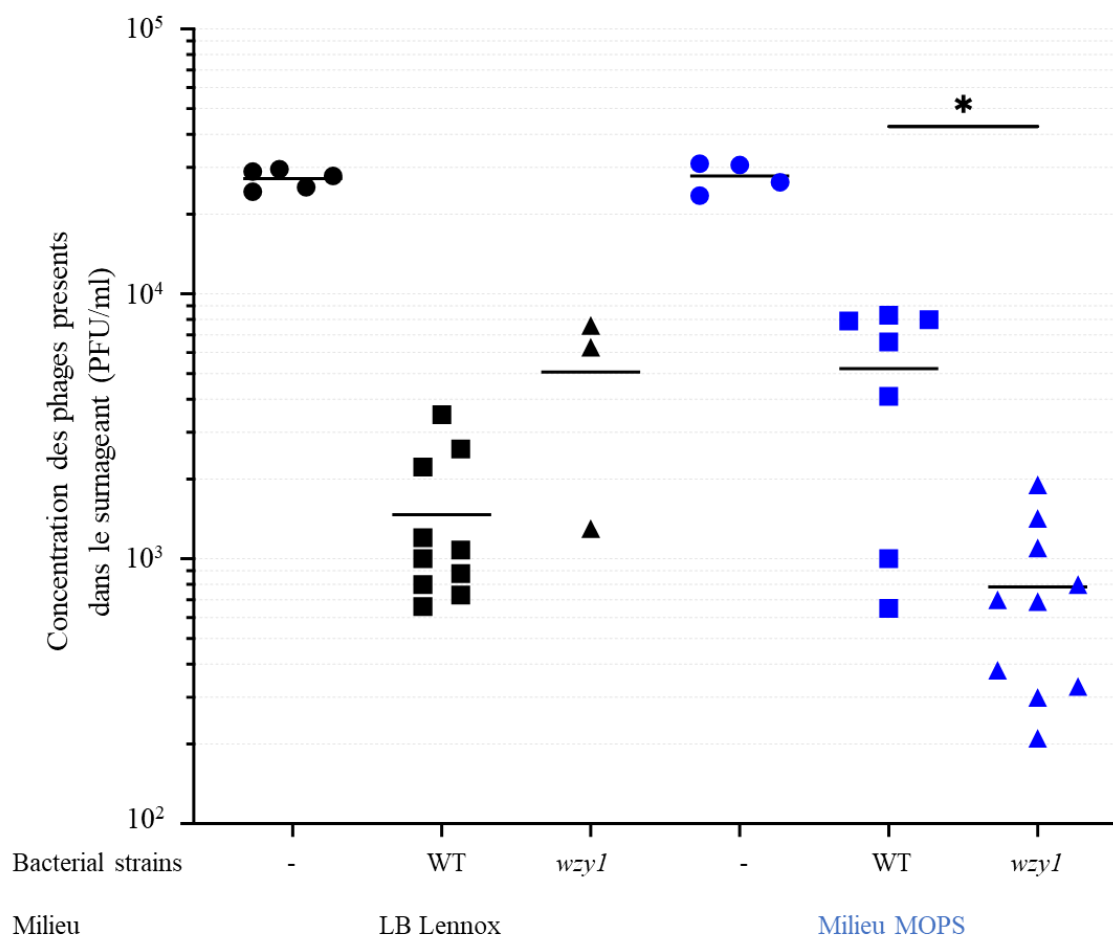


Figure 7 : Test d'adsorption du phage PP1792 sur les souches WT (carré) et *wzy1* (triangle) en milieu riche (noir) et en MMMa (bleu). Le nombre de phages présents dans le surnageant après 10 minutes d'adsorption est reporté en ordonnée. Les traits horizontaux représentent la valeur moyenne. * :p-value<0.05.

3.3. Les gènes *flbB* et *rocS1* sont impliqués dans la résistance aux podoviridae en milieu riche.

Une autre approche pour tenter de comprendre les effets de la mutation *wzy* sur la croissance du podovirus PP1792 en milieu riche, consiste à rechercher des mutations supprimant l'effet de la mutation *wzy1*. Pour cela, la souche *wzy1* a été infectée avec PP1792 en LB Lennox en liquide, dans les mêmes conditions que celles décrites pour les tests de fluctuation, afin d'isoler des mutants résistants au phage. Étonnamment, une pousse résiduelle en biofilm était

observable au fond de tous les puits pour ces tests de fluctuation. Seuls certains puits avaient une croissance bactérienne complète (culture trouble), et leur nombre était constant (entre 5 et 10), quelle que soit la quantité de bactéries initiales utilisée (entre 10^4 et 10^7 bactéries/puits).

Ce résultat, bien qu'étrange n'en est pas moins intéressant : notre hypothèse est qu'une sous-population bactérienne semble résister phénotypiquement (et non génétiquement) à l'infection par les podovirus en se mettant sous la forme de biofilm, permettant ainsi à la bactérie de survivre jusqu'à l'apparition de mutations permettant la résistance aux phages. Aucune fréquence de mutation n'a donc pu être calculée pour cette expérience.

Les cultures où une croissance bactérienne était observable ont été sélectionnées et purifiées par trois stries successives sur LB Lennox agar. Quatorze souches ont été ainsi récupérées et l'EOP des quatre phages a été calculée sur chacune d'entre elles en milieu riche (Tableau 2).

Sur les 14 mutants, 13 avaient un phénotype semblable (92.8%) : ils étaient résistants aux podovirus, tout en continuant à être totalement résistants au myovirus PP1450, et partiellement résistants au PP1777 (EOP réduite, plages très turbides). Le seul mutant avec un phénotype différent était le mutant MB099, pour lequel la résistance aux deux podovirus était différente : bien que résistant au PP1797, ce mutant n'était que partiellement résistant au PP1792 avec une EOP réduite. Cinq de ces mutants ont été entièrement séquencés, dont le mutant MB099. Les quatre mutants partageant le même phénotype (MB087, MB091, MB092, MB096) avaient tous une mutation au niveau du gène *flb*, tandis que MB099 avait une mutation au niveau du gène *rocS1*.

Pour déterminer si les 9 autres souches mutantes étaient mutées au niveau d'un de ces gènes, les deux gènes ont été amplifiés par PCR sur les 9 souches restantes, et séquencés. Aucune mutation dans *rocS1* n'a été détectée pour ces 9 mutants. En revanche, pour 5 des 9 mutants, une mutation dans *flb* a été observée.

Afin de déterminer la mutation responsable de la résistance à PP1792 dans les 4 dernières souches qui semblaient intactes au niveau des gènes *rocS1* et *flb*, celles-ci ont été entièrement séquencées. Ces 4 souches contenaient elles aussi des mutations dans *flb*, qui n'avait pas été détectée lors de l'analyse ciblée par séquençage de produit PCR. Pour 77% des mutants *flb*, la mutation provoque la synthèse d'une protéine tronquée (de 3 aas à 81 aas au lieu de la protéine sauvage de 253aas). Les deux autres mutations observées étaient le changement d'un acide aminé au niveau du peptide signal (15.3%) et le changement d'une

glycine (neutre et apolaire) en une aspartate (chargé négativement, polaire) (7.7%), ce qui peut impacter la conformation de la protéine.

En conclusion, 13 des 14 mutants (92.8%) avaient une mutation dans le gène *flb* (Tableau 2). Seule la souche MB099 avait une mutation au niveau de *rocS1* (7,1%), changeant une proline en une leucine au 724^{ème} acide aminé.

3.3.1. *rocS1* pourrait être impliqué dans la régulation de l'expression génétique du récepteur des podovirus

Le gène *rocS1*, aussi appelé *sadS* dans la littérature, code pour une histidine kinase qui fait partie d'un système à deux composants (« two-component system », TCS, (Sivaneson et al., 2011) avec :

- Deux senseurs, des histidine kinases capables d'autophosphorylation (ici, RocS1 et RocS2),
- Trois régulateurs auquel le phosphate est transféré (ici, RocA1, RocA2 et RocR)

RocA1 et RocA2 sont des régulateurs ayant un domaine HTH (Helix-turn-helix) de liaison à l'ADN. RocR, lui, dégrade le c-di-GMP avec une fonction phosphodiesterase contenue dans un domaine EAL. RocA1 active l'expression du gène *cupC* codant pour les fimbriae, tandis que RocA2 inhibe l'expression de la pompe à efflux MexAB-OprM. De manière intéressante, l'activité de RocR diminue les niveaux de c-di-GMP dans la cellule, réduisant ainsi l'expression des gènes des fimbriae CupB et CupC.

La mutation *rocS1* ne confère pas à la bactérie une résistance totale au PP1792 (Tableau 2). Cependant, comme il est possible d'observer dans la Figure 8, la capacité d'adsorption du PP1792 a été significativement diminuée sur la souche *wzy1 rocS1* (MB099) (Figure 8, colonnes 4 et 8), comparée à *wzy1* (Figure 9, colonnes 1 et 5), que ce soit en milieu riche ou en milieu minimum. La mutation *rocS1* observée ici entraîne donc la diminution de l'adsorption de PP1792 dans un mutant *wzy*.

Bacterial strain	Efficiency of plating of				Detected mutations	Fklb protein: amino acid changes
	PP1450	PP1777	PP1792	PP1797		
LMG_3Δ	+++	+++	-	-	NA	Protéine sauvage de 253 aa
Nar71	-	-	+++	+++	<i>rocS1</i> : S27T; <i>fklB</i> : S46N	NA
<i>wzy1</i> (MB079)	-	-	+++	+	<i>wzy</i> (136 nt, A:7 → 6)	NA
MB086	-	++	-	-	<i>fklB</i> : Δ(161 → 183nt)	Protéine de 69aa
MB087	-	++	-	-	<i>fklB</i> : Q74*	Protéine de 74 aa
MB088	-	++	-	-	<i>fklb</i> Δ1nt au 212ème	Protéine de 79 aa
MB089	-	++	-	-	<i>fklB</i> (à 119nt, G→A)	40ème aa: Glycine (neutre, apolaire) → Aspartate (chargé négativement, polaire)
MB096	-	++	-	-	<i>fklB</i> : V13D	Protéine de 253aa
MB097	-	++	-	-	<i>fklB</i> (à 217nt, C→T)	Protéine de 72 aa
MB098	-	++	-	-	<i>fklb</i> (à 207, +C)	Protéine de 69 aa
MB090	-	++	-	-	<i>fklB</i> (à 170nt, C→A)	Protéine de 56 aa
MB091	-	++	-	-	<i>fklB</i> : Q74*	Protein of 74 aa
MB092	-	++	-	-	<i>fklB</i> : V13D	13ème aa: Valine → Aspartate (signal peptide)
MB093	-	++	-	-	<i>fklb</i> Q3*	Protéine de 3 aa
MB094	-	++	-	-	<i>fklB</i> (à 244nt, G→T)	Protéine de 81 aa
MB095	-	++	-	-	<i>fklB</i> V13D	13ème aa: Valine → Aspartate
Wzy1 <i>rocS1</i> (MB099)	-	-	++	-	<i>rocS1</i> : P724L	NA

Tableau 2: EOP des 4 phages sur un panel de mutants résistants aux podovirus, dérivés de la souche *wzy1* (MB079). L'efficacité de lyse de chaque phage est déterminée par un test d'EOP en milieu riche. (+) = EOP > 0.1; (+/-) = EOP entre 0.1 and 0.01; (-/+) = EOP entre 0.001 and 0.0001; (-) = EOP < 0.00001 in LB Lennox medium.

Ce résultat nous fait supposer que RocS1 aurait un rôle dans la régulation de l'expression du récepteur des podoviridae, les exopolysaccharides psl. L'un des régulateurs contrôlés par RocS1 est RocR, qui, comme expliqué plus haut, dégrade le c-di-GMP (Rao et al., 2008). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, il s'avère que la formation de biofilm ainsi que la production de psl sont régulées en partie par la concentration en c-di-GMP dans la cellule (Chang, 2018). En effet, la concentration en c-di-GMP augmente l'activation du récepteur membranaire WspA lorsque celui-ci entre en contact avec une surface. La production de c-di-GMP provoque la sous-régulation des appareils moteurs (flagelle) et une augmentation de la production des composants de la matrice, tels que les exopolysaccharides, les pilis, l'eDNA et les adhésines. Lorsque la concentration en c-di-GMP est élevée, cela active aussi l'expression des opérons des exopolysaccharides psl et pel. Mon hypothèse est donc la suivante : la mutation de RocS1 provoque l'activation (ou sur-activation) de RocR, qui dégrade alors le c-di-GMP présent dans la cellule. La concentration en c-di-GMP diminue alors, provoquant l'inhibition de l'opéron psl, et donc une sous-production de psl (Figure 9). La cellule produit alors peu de psl à sa surface, rendant l'adsorption du phage plus difficile. Cela expliquerait l'impact sur l'adsorption de la mutation *rocS1* observé en Figure 9.

3.3.2. *La mutation fklB n'affecte pas la formation du récepteur des podovirus en milieu riche.*

Le gène *fklB* code pour un type de peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase). Les PPIases accélèrent le repliement de protéines. Elles catalysent l'isomérisation du lien peptidyl-prolyl d'une conformation cis à trans, et inversement, ce qui aboutit à un changement d'orientation de la chaîne peptidique dans l'espace. Ici, la protéine FklB synthétisée fait partie de la famille de FkpA d'*Escherichia coli*, qui a deux fonctions (Cumby et al., 2015) : un domaine N-ter qui a une fonction de chaperon (aide d'autres protéines à se replier correctement), et un domaine C-ter qui contient la fonction PPIase. FkpA se situe dans le périplasme, cependant, dans la même famille de protéines on trouve aussi la protéine Mip, de *Legionella pneumophila* qui se trouve à la surface de la bactérie (Debroy et al., 2006). Il est donc difficile de conclure sur la localisation probable de cette protéine chez *Pseudomonas* par la littérature.

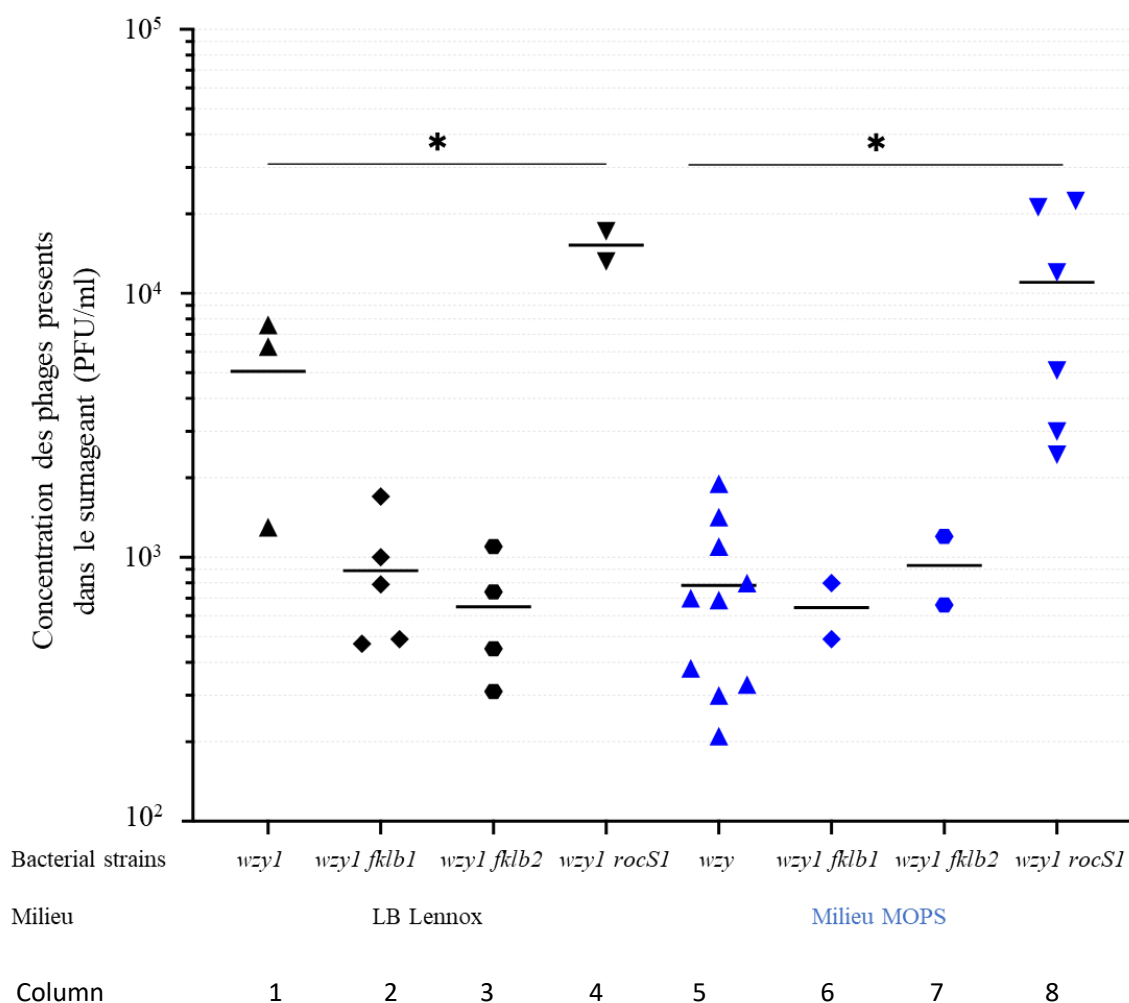


Figure 8 : Test d'adsorption du phage PP1792 sur les souches *wzy1* (triangle), *wzy1 fklb1* (losange), *wzy1 fklb2* (hexagone) et *wzy1 rocS1* (triangle inversé) en milieu riche (noir) et en milieu minimum (bleu). Les lignes représentent la valeur moyenne. Par rapport à *wzy1*, écart statistiquement significatif selon un test de Student pour *wzy1 rocS1* en milieu riche et en milieu minimum ($p < 0.05$, correction de Welch).

La première hypothèse pour expliquer la résistance aux podovirus de ces souches est que FklB contribue à la formation du récepteur en aidant au repliement d'une protéine nécessaire à la synthèse de psl.

Pour l'étude des double mutants *wzy fklB*, les souches MB091 (appelée *wzy1 fklB1* plus bas), qui synthétise une protéine FklB tronquée de 74 acides aminés (aas) au lieu d'une protéine de 253 aas, et MB092 (appelée *wzy1 fklB2* plus bas), qui a un changement d'acide aminé au niveau du peptide signal, ont été utilisées.

Dans l'hypothèse présentée ci-dessus, une adsorption diminuée du phage sur les mutants, comparée à la souche *wzy1*, était attendue. Les capacités d'adsorption du PP1792 sur ces deux souches ont donc été mesurées (Figure 9, colonnes 2, 3 et 6, 7) et comparées avec celle de *wzy1* (Figure 8, colonnes 1 et 5). Nous n'avons observé aucun changement significatif des capacités d'adsorption de PP1792 sur *wzy1*. Les mutations de *fkIB* n'impactent pas significativement l'adsorption, que ce soit en milieu riche ou en milieu minimum. Nous concluons donc que le gène *fkIB* n'est pas nécessaire à la formation du récepteur des podovirus.

3.3.3. *Les doubles mutants wzy fkIB confèrent une résistance seulement partielle aux podoviridae en milieu minimum*

La mutation *fkIB* n'a jamais été obtenue lorsque nous avons isolé des mutants résistants aux podovirus sur milieu minimum. Nous avons donc recherché si la résistance conférée par les doubles mutants *wzy fkIB* était spécifique de la croissance en milieu riche. L'efficacité de lyse des podovirus sur les mutants *wzy fkIB* a été mesurée en MMMa (Tableau 2). Effectivement, contrairement au milieu riche, des plages de lyse ont été observées avec une EOP de 1 en MMMa. Ces plages étaient très turbides, comparables à celles formées en milieu minimum sur la souche WT. Les mutations dans le gène *fkIB* en contexte *wzy* restaurent le phénotype sauvage, soit une résistance totale aux podoviridae en milieu riche, et partielle en milieu minimum. En conclusion, FkIB a bien un rôle dans la résistance aux podovirus, à une étape en aval de l'adsorption. L'ensemble des observations est rassemblé Figure 9, qui tente de formuler une explication possible à celles-ci.

Deux autres fonctions ont été rapportées pour FkIB, toutes deux étant impliquées dans l'infection d'un phage. Les protéines homologues à FkIB chez *E. coli* sont dénommées FkpA et SlyD. La première, FkpA, joue un rôle au moment de l'injection de l'ADN du phage HK97 : elle guide la « tape measure » protéine (TMP) du phage dans le périplasme pour l'aider à s'accrocher à la membrane interne au niveau du transporteur de glucose PtsG et ainsi permettre l'injection de l'ADN du phage dans le cytoplasme (Cumby et al., 2015). La deuxième, SlyD, stabilise la protéine de lyse E du phage ϕ X174 : sans elle, E n'est pas stable et se dégrade trop vite, elle n'atteint alors pas une concentration suffisante pour inhiber MraY et provoquer la lyse de la bactérie (Bernhardt et al., 2002). Le phage ne peut donc pas lyser la bactérie hôte à la fin de son cycle, et ne peut donc pas former de plages de lyse.

Ces découvertes ont été faites chez *E. coli* et, comme le montre ces différents papiers, les FK506 binding protein (FKBP)-type PPIase peuvent intervenir dans de nombreux

mécanismes. Par conséquent, les hypothèses formulées ci-dessous restent à vérifier et sont hautement spéculatives.

Dans notre cas, nous nous sommes d'abord demandé si FklB chez *Pseudomonas aeruginosa* avait le même rôle que FkpA et intervenait au moment de l'injection. Cela expliquerait l'absence de plages de lyse visibles en milieu riche, ainsi que le maintien de la capacité d'adsorption du phage sur les souches *wzy1 fklB1* et *wzy1 fklB2* (Figure 9) en milieu riche et en milieu minimum. Concernant les plages de lyse turbides observées en milieu minimum, elles pourraient être expliquées par la meilleure adsorption du phage dans ce milieu : une plus grande quantité de phages s'adsorbe sur la population bactérienne, car il y a une plus grande concentration de psl, augmentant les chances de succès d'une injection de l'ADN du phage dans le cytoplasme sans l'aide de FklB. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait tester si le phage arrive à compléter son cycle une fois l'ADN du phage introduit par électroporation dans le cytoplasme (expérience en cours). C'est cette hypothèse qui est choisie en Figure 5, mais à ce stade nous n'avons pas de raison d'exclure l'hypothèse alternative du paragraphe suivant.

On peut également formuler l'hypothèse que la protéine FklB de *Pseudomonas aeruginosa* jouerait un rôle identique à SlyD. Dans cette hypothèse, FklB interviendrait en bloquant l'étape de lyse du cycle du phage. Ceci expliquerait les phénotypes observés en milieu riche et en milieu minimum MOPS. En effet, en milieu minimum MOPS, on observe des plages de lyses turbides (Tableau 2). Elles peuvent être expliquées en supposant qu'en milieu minimum, la population bactérienne se multiplie moins vite et soit encore plus ralentie quand un phage s'y multiplie, et que les plages de lyses turbides soient dûes à un retard de croissance plus qu'à une lyse bactérienne. En milieu riche LB Lennox, la bactérie est dans des conditions optimales de croissance elle pousse vite et n'est pas gênée par la réplication du phage, si bien qu'aucune plage de lyse ni retard de croissance n'est visible sur boîte. Selon cette hypothèse, l'infection des souches *wzy1 fklB1* et *wzy1 fklB2* par le phage PP1792 en culture liquide en milieu minimum MOPS ne devrait pas mener à la lyse, mais à un simple retard de croissance (expérience en cours).

Dans tous les cas, nous avons observé un effet du milieu de croissance sur les capacités des phages à se multiplier. Comme énoncé plus haut (Chapitre 3.2.), il est donc prévu de quantifier (par qRT PCR) la transcription des gènes clés qui ont pu être identifiés au cours de cette analyse, lors de la croissance dans différents milieux.

Ces résultats mettent en avant la complexité des interactions phages-bactéries ainsi que l'importance du choix de milieu de culture pour étudier le comportement des phages. Les bactéries semblent avoir recours à de nombreux mécanismes pour résister à l'infection par les phages, et ces mécanismes semblent en plus varier selon le milieu de culture dans lequel elles sont cultivées : en milieu riche, l'adsorption est empêchée par les LPS auxquels les podovirus « s'engluent », et l'injection ou la lyse est inactivée par la mutation de FklB (hypothétiquement), en milieu minimum, l'adsorption est partiellement empêchée par les LPS et complètement par la mutation des récepteurs, les psl.

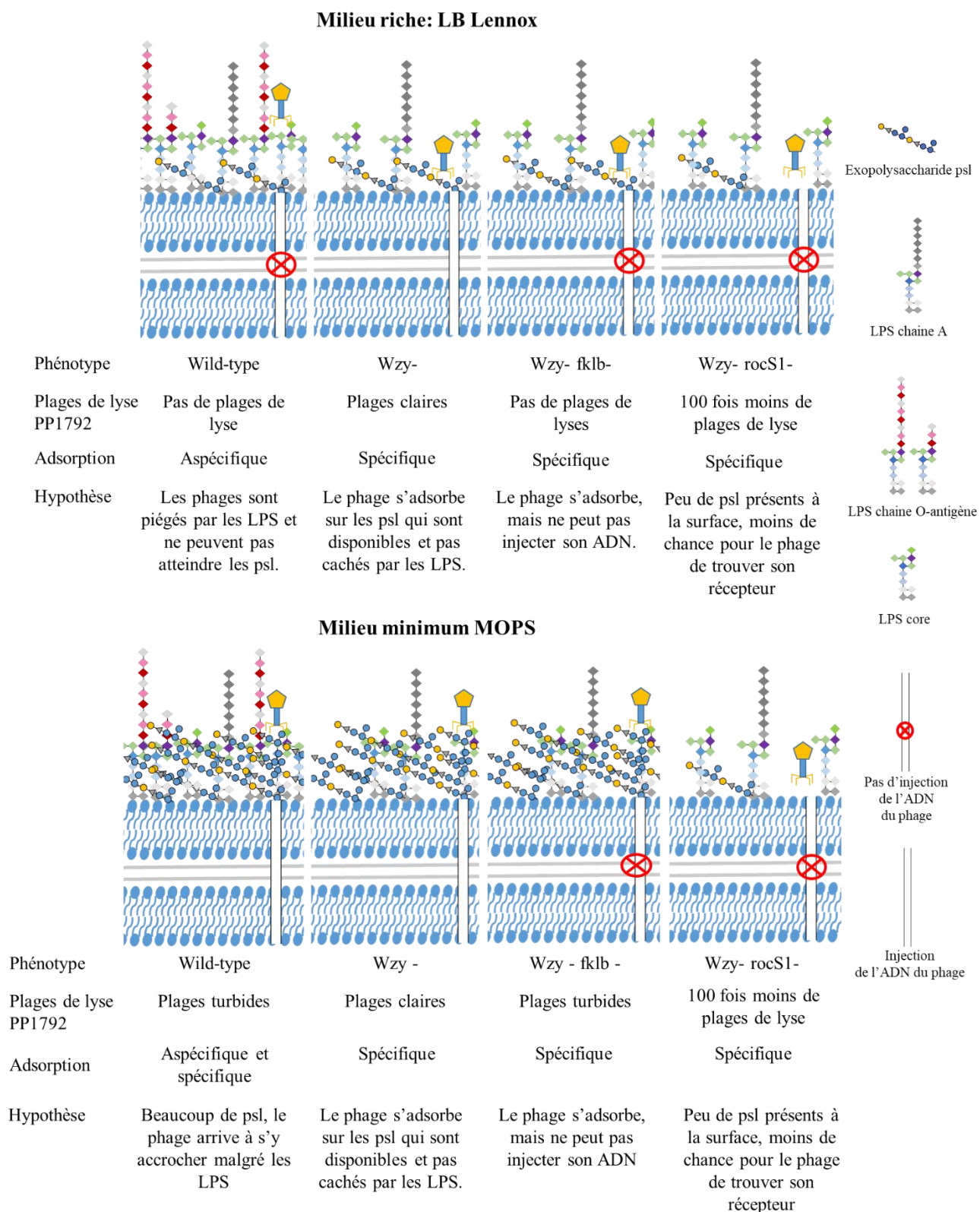


Figure 9 : Infection par le phage PP1792 de la souche WT et des souches mutantes *wzy1* ; *wzy1 fklb* et *wzy1 rocS1* ; hypothèses concernant la surface de la bactérie en fonction du milieu de culture, des différentes mutations et phénotypes observés.

Discussion

Les phages sont les prédateurs naturels des bactéries, et pourraient représenter un traitement alternatif aux infections bactériennes résistantes aux antibiotiques. En effet, l'antibiorésistance est considérée comme un problème de santé majeur et global : si rien n'est fait pour utiliser les antibiotiques de manière plus raisonnée et en s'appuyant sur des traitements alternatifs, les décès liés aux infections bactériennes résistantes pourraient devenir la première cause de mortalité au monde. Cela représenterait 10 millions de morts dans le monde, contre environ 700 000 en 2014 (<https://amr-review.org/>; Jim O'Neil, 2014). Depuis maintenant un siècle, la phagothérapie est utilisée dans les Pays d'Europe de l'Est et en Russie. La crise de l'antibiorésistance a réveillé l'intérêt des pays occidentaux pour celle-ci, il reste cependant un long chemin réglementaire avant de régulariser son utilisation. Certains critères ont tout-de-même déjà été définis grâce aux connaissances accumulées et aux essais cliniques effectués.

Afin de se rapprocher au maximum des normes de la pharmacopée, et d'encourager les institutions réglementaires à être en faveur de la phagothérapie, nous avons décidé ici de répondre dans un premier temps à la question suivante : « Est-ce que les phages sont des vecteurs de gènes de résistances aux antibiotiques ? ». Nous nous sommes ensuite penchés sur l'optimisation de la production des phages anti-*Pseudomonas* et leur caractérisation, en vue de la production aux normes BPF et la commercialisation de ces phages.

Les phages ne sont pas des vecteurs de transmission des gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs).

Au cours de ma thèse, j'ai collaboré à un article visant à déterminer si les phages étaient des vecteurs de transmission des ARGs, au même titre que les plasmides conjugatifs ou que les ICEs. Dans cet article sur les viromes de porcs présenté dans le chapitre 1 de la partie résultats, il est démontré que les ARGs sont peu présents dans les génomes de phages, avec une probabilité 1000 fois plus basse d'en trouver que dans un génome bactérien. Ce résultat suggère qu'il y a peu de chance qu'un phage virulent utilisé pour la phagothérapie soit porteur d'ARGs. En plus, cela est facile à vérifier, une fois le phage séquencé. Néanmoins, il reste important de vérifier si le phage est en mesure de faire de la transduction généralisée : pour rappel, ce phénomène consiste en l'encapsidation d'un fragment du génome bactérien de la même taille que celui du phage (ou d'un plasmide) lors du cycle infectieux de ce dernier. Ce fragment d'ADN peut alors être transféré à une autre bactérie lors de l'infection suivante. Ce système peut mener au transfert de gènes de résistance d'une bactérie à une autre. Cependant, lorsque le phage est transducteur, la fréquence à laquelle un gène est transduit (c'est-à-dire transféré et intégré au génome d'une autre bactérie) varie entre 10^{-10} et 10^{-4} . Soit une fréquence basse

(Kenzaka et al., 2007; Masters, 1999; Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004). L'utilisation de phages comme traitements thérapeutiques est donc possible, et avec peu de risque de transfert de gènes de résistance. Pour limiter ce risque, la vérification que le génome du phage ne contient pas d'ARGs est facile à effectuer, et il convient de tester également sa capacité de transduction.

Les conditions de culture des phages : nécessaire à la bonne production et utilisation des phages

Lors de mes travaux de thèses, afin de caractériser au mieux les phages et confirmer leur efficacité en conditions *in vivo*, je me suis rapprochée au maximum de ces conditions en modifiant le milieu de culture (milieu MOPS ou Sputum media au lieu du milieu LB Lennox) et la disponibilité en oxygène (pas d'agitation, par ajout de paraffine et de KNO₃). C'est alors que j'ai remarqué que le comportement des 4 phages étudiés changeait drastiquement lors de la modification d'un de ces deux paramètres comparés aux conditions en LB Lennox (milieu riche) avec agitation (pas de limitation en oxygène) : les myovirus PP1450 et PP1777 infectaient mieux la souche LMG3Δ quand elle était en LB Lennox avec agitation, alors que c'était l'inverse pour les podovirus PP1792 et PP1797, qui l'infectaient mieux lorsqu'elle n'était pas dans ces conditions. Ce résultat met bien en évidence que les conditions optimales de croissance de la bactérie ne sont pas forcément les conditions optimales de croissance du phage qui l'infecte.

Intérêt pour la phagothérapie :

Optimisation de la production de phages

Dans le cadre de la phagothérapie, il est intéressant de connaître les conditions optimales de cultures du phage étudié afin de pouvoir avoir le meilleur rendement de production possible. De nombreux papiers où les conditions de cultures ont été étudiés portent d'ailleurs sur l'optimisation de la production de phages à des fins industrielles (Agboluaje and Sauvageau, 2018; González-Menéndez et al., 2018; Grieco et al., 2012; Jurač et al., 2019; Šivec and Podgornik, 2020; Warner et al., 2014). Parmi les paramètres il y a : la température, le pH, la physiologie de l'hôte (phase exponentielle ou phase stationnaire), le milieu de culture (nutriments et source de carbone), la force ionique, les besoins en électrolytes (Mg²⁺ et Ca²⁺), les co-facteurs d'adsorption (L-tryptophan pour T4) et l'agitation (mouvement et disponibilité en oxygène).

Ces paramètres peuvent influencer sur la capacité d'infection du phage à différents niveaux : au niveau des récepteurs, en fonction de l'expression des protéines de surface et de la taille de la bactérie, et au niveau de la physiologie de l'hôte. Si celui-ci est dans un métabolisme ralenti (phase stationnaire) la phase de latence -où le phage a infecté la bactérie, mais n'a pas encore commencé à se répliquer-, la phase d'éclipse -où le phage se multiplie dans la bactérie-, le rendement de lyse ou « burst size » (nombre de virions relâchés par une bactérie infectée au moment de la lyse) et le taux d'adsorption peuvent varier (Hadas et al., 1997).

D'un point de vue économique et industriel, pour avoir un rendement de production optimale, il est important de déterminer ces paramètres.

Vers un diagnostic plus fiable

L'autre point que soulève ces changements d'efficacité des phages en fonction des conditions de culture concerne l'étape du diagnostic, c'est-à-dire le phagogramme. Cette technique est utilisée pour déterminer la sensibilité d'une souche à des phages, sur le même principe qu'un antibiogramme. En fonction des conditions de culture utilisées pour déterminer la capacité du phage thérapeutique à infecter et lyser la souche du patient, il est possible de ne pas avoir le même résultat. C'est ce que nous avons démontré avec les podovirus de cette étude. En LB Lennox agar aucune plage de lyse n'est visible, et en liquide seul un léger retard de croissance est observé. En revanche, lorsque les paramètres de croissance sont modifiés pour se rapprocher des conditions *in vivo* (plaies cutanées et poumons), les podovirus deviennent capable de lyser cette même souche : cela se traduit par l'apparition de plages de lyse en milieu MOPS agar, et à une chute ou stabilisation de la DO₆₀₀ en culture liquide en milieu MOPS, Sputum Medium et en LB avec limitation en oxygène.

Actuellement, les phagogrammes sont effectués en milieu riche, sans limitation d'oxygène, à 37°C, loin des conditions *in vivo* dans lequel le phage devra ensuite infecter la souche clinique. Ce test, pour être le plus fiable possible, devrait donc être fait dans des conditions plus proches du *in vivo*, en modifiant le milieu de culture (MOPS, Sputum Medium), mais aussi éventuellement la température : en cas d'inflammation ou de fièvre, la température sur le lieu d'infection pourrait être supérieure à 37°C. L'efficacité du phage en condition de biofilm serait aussi à tester, car les bactéries sont régulièrement dans cet état lors d'infections humaines (plaies cutanées, prothèse infectées, poumon...) (Bjarnsholt et al., 2018; Scott A Rice et al., 2009).

Cependant, le phagogramme prend déjà du temps à l'heure actuelle, avec un diagnostic en environ 48h : le but ici étant de traiter des patients critiques, le temps est un facteur essentiel pour que le traitement soit administré au plus tôt. Or, dans des milieux minimum et avec des quantités d'oxygène restreintes, les bactéries prennent en général plus de temps à croître, ce qui pourrait allonger le temps nécessaire au diagnostic. Il faudrait faire des études en amont, pour déterminer les conditions les moins contraignantes, avec le meilleur rapport temps/fiabilité possible. Une possibilité consiste à passer d'un test en goutte sur boîte à un test en liquide en plaque 96 puits (Xie et al., 2018).

Enfin, connaître les conditions optimales pour le phage peut permettre de faire quelques ajustements à la solution dans laquelle il est stocké et administré au patient : ajouter des électrolytes ou des co-facteurs d'adsorption quand cela est possible pourrait ainsi maximiser les chances de réussites du traitement.

Recherche de nouveaux phages : être au plus proche des conditions environnementales ?

Enfin, à ma connaissance, les phages sont principalement étudiés, isolés et cultivés dans les conditions de croissance optimales de leur hôte, c'est-à-dire en milieu riche (Carey-Smith et al., 2006; Mizuno et al., 2020; Oliveira et al., 2009). Or, comme nous l'avons montré dans ces travaux de thèse ainsi que quelques papiers où différentes conditions de cultures sont étudiées, ces conditions ne sont pas toujours celles optimales pour le phage (Abedon et al., 2001; Golec et al., 2014; Hadas et al., 1997; Mizuno et al., 2020; Sillankorva et al., 2004; You et al., 2002). C'est pourquoi, pour isoler de nouveaux phages, une solution envisageable est de tenter de les cultiver en se rapprochant au maximum des conditions de leurs environnements naturels (eaux, plantes, intestin, plaies ...), pour augmenter leur chance de pouvoir infecter et lyser la bactérie.

Par exemple, Babich et Stotzky (1980) ont étudié l'inactivation de phages d'*E. coli* et de *Staphylococcus aureus* dans l'eau du lac Kauneonga (New York). La présence d'argile minérale dans l'eau ralentirait l'inactivation des virions, en particulier l'attapulgit, la vermiculite, la montmorillonite et la kaolinite. D'autres études avaient aussi montré cet effet de stabilisation de la kaolinite et de la montmorillonite chez les phages T2 et T7 (Bitton and Mitchell, 1974; Gerba and Schaiberger, 1975). C'est bien en étudiant l'environnement naturel que cette particularité de l'argile a été trouvée, et pourrait permettre d'augmenter les chances de

découvrir d'autres phages, comme des phages plus instables qui s'inactivent en très peu de temps s'ils ne sont pas en présence de leur hôte ou d'un agent stabilisateur comme l'argile.

Conclusion générale

Ces travaux de thèse avaient pour objectif d'améliorer le procédé de production des phages comme traitement thérapeutique. A travers les expériences et les résultats présentés, nous avons pu démontrer que les phages sont des outils efficaces dans la lutte contre l'antibiorésistance, et qu'il reste encore beaucoup d'améliorations possibles pour optimiser la production de phages, les outils diagnostic et les traitements. Enfin, nous avons pu mettre de nouveau en avant l'importance d'étudier et de comprendre les interactions entre les phages et leur hôte et ce, dans différentes conditions de cultures.

Références bibliographiques

- 5.1.10 Guidelines for using the test for bacterial endotoxins, 2016.
- Abedon, S.T., Herschler, T.D., Stopar, D., 2001. Bacteriophage latent-period evolution as a response to resource availability. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4233–4241. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4233-4241.2001>
- Ackermann, H.-W., 2011. Ruska H. Visualization of bacteriophage lysis in the hypermicroscope. *Naturwissenschaften* 1940; 28:45–6. *Bacteriophage* 1, 183–185. <https://doi.org/10.4161/bact.1.4.17624>
- Adriaenssens, E.M., Sullivan, M.B., Knezevic, P., van Zyl, L.J., Sarkar, B.L., Dutilh, B.E., Alfenas-Zerbini, P., Łobocka, M., Tong, Y., Brister, J.R., Moreno Switt, A.I., Klumpp, J., Aziz, R.K., Barylski, J., Uchiyama, J., Edwards, R.A., Kropinski, A.M., Petty, N.K., Clokie, M.R.J., Kushkina, A.I., Morozova, V.V., Duffy, S., Gillis, A., Rumnieks, J., Kurtböke, İ., Chanishvili, N., Goodridge, L., Wittmann, J., Lavigne, R., Jang, H.B., Prangishvili, D., Enault, F., Turner, D., Poranen, M.M., Oksanen, H.M., Krupovic, M., 2020. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018-2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. *Arch. Virol.* 165, 1253–1260. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04577-8>
- Agboluaje, M., Sauvageau, D., 2018. Bacteriophage Production in Bioreactors, in: Azeredo, J., Sillankorva, S. (Eds.), *Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice*, *Methods in Molecular Biology*. Springer, New York, NY, pp. 173–193. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_15
- Alanis, A.J., 2005. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Arch. Med. Res., Infectious Diseases: Revisiting Past Problems and Addressing Future Challenges* 36, 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009>
- Alseth, E.O., Pursey, E., Luján, A.M., McLeod, I., Rollie, C., Westra, E.R., 2019. Bacterial biodiversity drives the evolution of CRISPR-based phage resistance. *Nature* 574, 549–552. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1662-9>
- Aminov, R.I., 2010. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front. Microbiol.* 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Azam, A., Ahmed, A.S., Oves, M., Khan, M.S., Memic, A., 2012. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains. *Int. J. Nanomedicine* 7, 3527–3535. <https://doi.org/10.2147/IJN.S29020>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P., 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Bernhardt, T.G., Roof, W.D., Young, R., 2002. The Escherichia coli FKBP-type PPLase SlyD is required for the stabilization of the E lysis protein of bacteriophage phi X174. *Mol. Microbiol.* 45, 99–108. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02984.x>
- Bernheim, A., Sorek, R., 2020. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 113–119. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0278-2>
- Bertani, G., Weigle, J.J., 1953. Host controlled variation in bacterial viruses. *J. Bacteriol.* 65, 113–121. <https://doi.org/10.1128/jb.65.2.113-121.1953>
- Bigger, J., 1944. TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS WITH PENICILLIN BY INTERMITTENT STERILISATION. *The Lancet* 244, 497–500. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
- Bin Jang, H., Bolduc, B., Zablocki, O., Kuhn, J.H., Roux, S., Adriaenssens, E.M., Brister, J.R., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Lavigne, R., Turner, D., Sullivan, M.B., 2019. Taxonomic assignment of

- uncultivated prokaryotic virus genomes is enabled by gene-sharing networks. *Nat. Biotechnol.* 37, 632–639. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0100-8>
- Bitton, G., Mitchell, R., 1974. Effect of colloids on the survival of bacteriophages in seawater. *Water Res.* 8, 227–229. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(74\)90159-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(74)90159-6)
- Bjarnsholt, T., Buhlin, K., Dufrêne, Y.F., Gomelsky, M., Moroni, A., Ramstedt, M., Rumbaugh, K.P., Schulte, T., Sun, L., Åkerlund, B., Römling, U., 2018. Biofilm formation – what we can learn from recent developments. *J. Intern. Med.* 284, 332–345. <https://doi.org/10.1111/joim.12782>
- Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E.R., Buckling, A., Guttman, D.S., Davidson, A.R., Maxwell, K.L., 2016. Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *ISME J.* 10, 2854–2866. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.79>
- Bortolaia, V., Kaas, R.S., Ruppe, E., Roberts, M.C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R.L., Rebelo, A.R., Florensa, A.F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J.K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B.B., Malhotra-Kumar, S., Westh, H., Pinholt, M., Anjum, M.F., Duggett, N.A., Kempf, I., Nykäsenoja, S., Olkkola, S., Wiecek, K., Amaro, A., Clemente, L., Mossong, J., Losch, S., Ragimbeau, C., Lund, O., Aarestrup, F.M., 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 75, 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- Botka, T., Pantůček, R., Mašlaňová, I., Benešík, M., Petráš, P., Růžicková, V., Havlíčková, P., Varga, M., Žemličková, H., Koláčková, I., Florianová, M., Jakubů, V., Karpíšková, R., Doškař, J., 2019. Lytic and genomic properties of spontaneous host-range Kayvirus mutants prove their suitability for upgrading phage therapeutics against staphylococci. *Sci. Rep.* 9, 5475. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41868-w>
- Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J., 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 48, 1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>
- Brathwaite, K.J., Siringan, P., Connerton, P.L., Connerton, I.F., 2015. Host adaption to the bacteriophage carrier state of *Campylobacter jejuni*. *Res. Microbiol.* 166, 504–515. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.05.003>
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., Balaban, N.Q., 2016. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 320–330. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>
- Brum, J.R., Schenck, R.O., Sullivan, M.B., 2013. Global morphological analysis of marine viruses shows minimal regional variation and dominance of non-tailed viruses. *ISME J.* 7, 1738–1751. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.67>
- Burgener, E.B., Sweere, J.M., Bach, M.S., Secor, P.R., Haddock, N., Jennings, L.K., Marvig, R.L., Johansen, H.K., Rossi, E., Cao, X., Tian, L., Nedelec, L., Molin, S., Bollyky, P.L., Milla, C.E., 2019. Filamentous bacteriophages are associated with chronic *Pseudomonas* lung infections and antibiotic resistance in cystic fibrosis. *Sci. Transl. Med.* 11, eaau9748. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau9748>
- Burns, N., James, C.E., Harrison, E., 2015. Polylysogeny magnifies competitiveness of a bacterial pathogen in vivo. *Evol. Appl.* 8, 346–351. <https://doi.org/10.1111/eva.12243>
- Calero-Cáceres, W., Ye, M., Balcázar, J.L., 2019. Bacteriophages as Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance. *Trends Microbiol.* 27, 570–577. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.02.008>
- Carey-Smith, G.V., Billington, C., Cornelius, A.J., Hudson, J.A., Heinemann, J.A., 2006. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 258, 182–186. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00217.x>
- Cars, O., Högberg, L.D., Murray, M., Nordberg, O., Sivaraman, S., Lundborg, C.S., So, A.D., Tomson, G., 2008. Meeting the challenge of antibiotic resistance. *BMJ* 337, a1438. <https://doi.org/10.1136/bmj.a1438>

- Castillo, D., Kauffman, K., Hussain, F., Kalatzis, P., Rørbo, N., Polz, M.F., Middelboe, M., 2018. Widespread distribution of prophage-encoded virulence factors in marine *Vibrio* communities. *Sci. Rep.* 8, 9973. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28326-9>
- Cenens, W., Makumi, A., Govers, S.K., Lavigne, R., Aertsen, A., 2015. Viral Transmission Dynamics at Single-Cell Resolution Reveal Transiently Immune Subpopulations Caused by a Carrier State Association. *PLoS Genet.* 11, e1005770. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005770>
- Cenens, W., Makumi, A., Mebrhatu, M.T., Lavigne, R., Aertsen, A., 2013a. Phage-host interactions during pseudolysogeny: Lessons from the *Pid/dgo* interaction. *Bacteriophage* 3, e25029. <https://doi.org/10.4161/bact.25029>
- Cenens, W., Mebrhatu, M.T., Makumi, A., Ceyssens, P.-J., Lavigne, R., Van Houdt, R., Taddei, F., Aertsen, A., 2013b. Expression of a novel P22 ORFan gene reveals the phage carrier state in *Salmonella typhimurium*. *PLoS Genet.* 9, e1003269. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003269>
- Ceyssens, P.-J., Hertveldt, K., Ackermann, H.-W., Noben, J.-P., Demeke, M., Volckaert, G., Lavigne, R., 2008. The intron-containing genome of the lytic *Pseudomonas* phage LUZ24 resembles the temperate phage PaP3. *Virology* 377, 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.038>
- Ceyssens, P.-J., Lavigne, R., 2010. Bacteriophages of *Pseudomonas*. *Future Microbiol.* 5, 1041–1055. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.66>
- Ceyssens, P.-J., Noben, J.-P., Ackermann, H.-W., Verhaegen, J., Vos, D.D., Pirnay, J.-P., Merabishvili, M., Vaneechoutte, M., Chibeu, A., Volckaert, G., Lavigne, R., 2009. Survey of *Pseudomonas aeruginosa* and its phages: de novo peptide sequencing as a novel tool to assess the diversity of worldwide collected viruses. *Environ. Microbiol.* 11, 1303–1313. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01862.x>
- Chain, E., Florey, H.W., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Orr-Ewing, J., Sanders, A.G., Peltier, L.F., 2005. THE CLASSIC: Penicillin as a Chemotherapeutic Agent. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 439, 23–26. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000183429.83168.07>
- Chan, B.K., Siström, M., Wertz, J.E., Kortright, K.E., Narayan, D., Turner, P.E., 2016. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* 6, 26717. <https://doi.org/10.1038/srep26717>
- Chang, C.-Y., 2018. Surface Sensing for Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02671>
- Chen, J., Novick, R.P., 2009. Phage-Mediated Intergeneric Transfer of Toxin Genes. *Science* 323, 139–141. <https://doi.org/10.1126/science.1164783>
- Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Chiang, Y.N., Bacigalupe, R., Fillol-Salom, A., Chee, M.S.J., Fitzgerald, J.R., Penadés, J.R., 2018. Genome hypermobility by lateral transduction. *Science* 362, 207–212. <https://doi.org/10.1126/science.aat5867>
- Choi, J., Kotay, S.M., Goel, R., 2010. Various physico-chemical stress factors cause prophage induction in *Nitrosospira multiformis* 25196—an ammonia oxidizing bacteria. *Water Res.* 44, 4550–4558. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.04.040>
- Chopin, M.-C., Rouault, A., Ehrlich, S.D., Gautier, M., 2002. Filamentous phage active on the gram-positive bacterium *Propionibacterium freudenreichii*. *J. Bacteriol.* 184, 2030–2033. <https://doi.org/10.1128/JB.184.7.2030-2033.2002>
- Chung, I.-Y., Bae, H.-W., Jang, H.-J., Kim, B., Cho, Y.-H., 2014a. Superinfection exclusion reveals heteroimmunity between *Pseudomonas aeruginosa* temperate phages. *J. Microbiol. Seoul Korea* 52, 515–520. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4012-5>
- Chung, I.-Y., Jang, H.-J., Bae, H.-W., Cho, Y.-H., 2014b. A phage protein that inhibits the bacterial ATPase required for type IV pilus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 11503–11508. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403537111>
- Cobián Güemes, A.G., Youle, M., Cantú, V.A., Felts, B., Nulton, J., Rohwer, F., 2016. Viruses as Winners in the Game of Life. *Annu. Rev. Virol.* 3, 197–214. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-054952>

- Cohen, D., Melamed, S., Millman, A., Shulman, G., Oppenheimer-Shaanan, Y., Kacen, A., Doron, S., Amitai, G., Sorek, R., 2019. Cyclic GMP-AMP signalling protects bacteria against viral infection. *Nature* 574, 691–695. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1605-5>
- Colomb-Cotin, M., Lacoste, J., Brun-Buisson, C., Jarlier, V., Coignard, B., Vaux, S., 2016. Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 5, 56. <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0154-z>
- Cornuault, J., 2018. Impact des phages tempérés sur la stabilité du microbiote intestinal : la lysogénie n'est pas un long fleuve tranquille (phdthesis). Université Paris Saclay (COMUE).
- Coronavirus : chiffres clés et évolution de la COVID-19 en France et dans le Monde [WWW Document], 2021. URL /dossiers/coronavirus-covid-19/coronavirus-chiffres-cles-et-evolution-de-la-covid-19-en-france-et-dans-le-monde (accessed 6.16.21).
- Cortés, P., Cano-Sarabia, M., Colom, J., Otero, J., Maspoch, D., Llagostera, M., 2018. Nano/Micro Formulations for Bacteriophage Delivery. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1693, 271–283. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_20
- Cosgrove, S.E., 2006. The Relationship between Antimicrobial Resistance and Patient Outcomes: Mortality, Length of Hospital Stay, and Health Care Costs. *Clin. Infect. Dis.* 42, S82–S89. <https://doi.org/10.1086/499406>
- Cumby, N., Reimer, K., Mengin-Lecreulx, D., Davidson, A.R., Maxwell, K.L., 2015. The phage tail tape measure protein, an inner membrane protein and a periplasmic chaperone play connected roles in the genome injection process of E. coli phage HK97. *Mol. Microbiol.* 96, 437–447. <https://doi.org/10.1111/mmi.12918>
- D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W.L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., Wright, G.D., 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477, 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- De Oliveira, D.M.P., Forde, B.M., Kidd, T.J., Harris, P.N.A., Schembri, M.A., Beatson, S.A., Paterson, D.L., Walker, M.J., 2020. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 33. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>
- De Smet, J., Hendrix, H., Blasdel, B.G., Danis-Wlodarczyk, K., Lavigne, R., 2017. Pseudomonas predators: understanding and exploiting phage–host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 517–530. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.61>
- Debroy, S., Aragon, V., Kurtz, S., Cianciotto, N.P., 2006. Legionella pneumophila Mip, a surface-exposed peptidylproline cis-trans-isomerase, promotes the presence of phospholipase C-like activity in culture supernatants. *Infect. Immun.* 74, 5152–5160. <https://doi.org/10.1128/IAI.00484-06>
- Dedrick, R.M., Guerrero-Bustamante, C.A., Garlena, R.A., Russell, D.A., Ford, K., Harris, K., Gilmour, K.C., Soothill, J., Jacobs-Sera, D., Schooley, R.T., Hatfull, G.F., Spencer, H., 2019. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant Mycobacterium abscessus. *Nat. Med.* 25, 730–733. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>
- D'Herelle, F., 2007. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Res. Microbiol.* 158, 553–554. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.07.005>
- Dion, M.B., Oechslin, F., Moineau, S., 2020. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- Doi, Y., Arakawa, Y., 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 45, 88–94. <https://doi.org/10.1086/518605>
- Drake, J.W., 1991. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 7160–7164.
- Duda, R.L., Teschke, C.M., 2019. The amazing HK97 fold: versatile results of modest differences. *Curr. Opin. Virol.* 36, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.02.001>

- Em, E., Ek, L., A, H., Rr, C., 2004. Polylysogeny and prophage induction by secondary infection in *Vibrio cholerae*. *Environ. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00603.x>
- Enault, F., Briet, A., Bouteille, L., Roux, S., Sullivan, M.B., Petit, M.-A., 2017. Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J.* 11, 237–247. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.90>
- European Centre for Disease Prevention and Control, European Medicines Agency, 2009. The bacterial challenge : time to react : a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. Publications Office, LU.
- Fang, Y., Mercer, R.G., McMullen, L.M., Gänzle, M.G., 2017. Induction of Shiga Toxin-Encoding Prophage by Abiotic Environmental Stress in Food. *Appl. Environ. Microbiol.* 83. <https://doi.org/10.1128/AEM.01378-17>
- Filippov, A.A., Sergueev, K.V., He, Y., Huang, X.-Z., Gnade, B.T., Mueller, A.J., Fernandez-Prada, C.M., Nikolich, M.P., 2011. Bacteriophage-resistant mutants in *Yersinia pestis*: identification of phage receptors and attenuation for mice. *PloS One* 6, e25486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025486>
- Finley, R.L., Collignon, P., Larsson, D.G.J., McEwen, S.A., Li, X.-Z., Gaze, W.H., Reid-Smith, R., Timinouni, M., Graham, D.W., Topp, E., 2013. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 57, 704–710. <https://doi.org/10.1093/cid/cit355>
- Forde, A., Hill, C., 2018. Phages of life - the path to pharma. *Br. J. Pharmacol.* 175, 412–418. <https://doi.org/10.1111/bph.14106>
- Forti, F., Roach, D.R., Cafora, M., Pasini, M.E., Horner, D.S., Fiscarelli, E.V., Rossitto, M., Cariani, L., Briani, F., Debarbieux, L., Ghisotti, D., 2018. Design of a Broad-Range Bacteriophage Cocktail That Reduces *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and Treats Acute Infections in Two Animal Models. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e02573-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02573-17>
- Freschi, L., Vincent, A.T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J.-G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M.-J., Charette, S.J., Boyle, B., Levesque, R.C., 2019. The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biol. Evol.* 11, 109–120. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy259>
- Gabashvili, E., Osepashvili, M., Koulouris, S., Ujmajuridze, L., Tskhitishvili, Z., Kotetishvili, M., 2020. Phage Transduction is Involved in the Intergeneric Spread of Antibiotic Resistance-Associated blaCTX-M, mel, and tetM Loci in Natural Populations of Some Human and Animal Bacterial Pathogens. *Curr. Microbiol.* 77, 185–193. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01817-2>
- Galani, Irene, Souli, M., Daikos, G.L., Chrysouli, Z., Poulakou, G., Psychogiou, M., Panagea, T., Argyropoulou, A., Stefanou, I., Plakias, G., Giamarellou, H., Petrikos, G., 2012. Activity of plazomicin (ACHN-490) against MDR clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Enterobacter* spp. from Athens, Greece. *J. Chemother. Florence Italy* 24, 191–194. <https://doi.org/10.1179/1973947812Y.0000000015>
- Galani, I., Souli, M., Panagea, T., Poulakou, G., Kanellakopoulou, K., Giamarellou, H., 2012. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Enterobacteriaceae* isolates from a Greek university hospital. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, E52-54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03738.x>
- Galiez, C., Siebert, M., Enault, F., Vincent, J., Söding, J., 2017. WISH: who is the host? Predicting prokaryotic hosts from metagenomic phage contigs. *Bioinformatics* 33, 3113–3114. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx383>
- Gerba, C.P., Schaiberger, G.E., 1975. Effect of particulates on virus survival in seawater. *J. - Water Pollut. Control Fed.* 47, 93–103.
- Gharpure, S., Akash, A., Ankamwar, B., 2020. A Review on Antimicrobial Properties of Metal Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 20, 3303–3339. <https://doi.org/10.1166/jnn.2020.17677>

- Gibson, M.K., Forsberg, K.J., Dantas, G., 2015. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *ISME J.* 9, 207–216. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.106>
- Goldfarb, T., Sberro, H., Weinstock, E., Cohen, O., Doron, S., Charpak-Amikam, Y., Afik, S., Ofir, G., Sorek, R., 2015. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO J.* 34, 169–183. <https://doi.org/10.15252/emboj.201489455>
- Golec, P., Karczewska-Golec, J., Łoś, M., Węgrzyn, G., 2014. Bacteriophage T4 can produce progeny virions in extremely slowly growing *Escherichia coli* host: comparison of a mathematical model with the experimental data. *FEMS Microbiol. Lett.* 351, 156–161. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12372>
- González-Menéndez, E., Arroyo-López, F.N., Martínez, B., García, P., Garrido-Fernández, A., Rodríguez, A., 2018. Optimizing Propagation of *Staphylococcus aureus* Infecting Bacteriophage vB_SauM-phiPLA-RODI on *Staphylococcus xylosus* Using Response Surface Methodology. *Viruses* 10, 153. <https://doi.org/10.3390/v10040153>
- Gordillo Altamirano, F.L., Barr, J.J., 2019. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clin. Microbiol. Rev.* 32. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18>
- Grieco, S.-H.H., Wong, A.Y.K., Dunbar, W.S., MacGillivray, R.T.A., Curtis, S.B., 2012. Optimization of fermentation parameters in phage production using response surface methodology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 1515–1522. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1148-3>
- Haaber, J., Leisner, J.J., Cohn, M.T., Catalan-Moreno, A., Nielsen, J.B., Westh, H., Penadés, J.R., Ingmer, H., 2016. Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. *Nat. Commun.* 7, 13333. <https://doi.org/10.1038/ncomms13333>
- Hadas, H., Einav, M., Fishov, I., Zaritsky, A., 1997. Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*. *Microbiol. Read. Engl.* 143 (Pt 1), 179–185. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-1-179>
- Hall, A.R., De Vos, D., Friman, V.-P., Pirnay, J.-P., Buckling, A., 2012. Effects of Sequential and Simultaneous Applications of Bacteriophages on Populations of *Pseudomonas aeruginosa* In Vitro and in Wax Moth Larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5646–5652. <https://doi.org/10.1128/AEM.00757-12>
- Hancock, R.E., Lehrer, R., 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16, 82–88. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(97\)01156-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(97)01156-6)
- Harvey, H., Bondy-Denomy, J., Marquis, H., Sztanko, K.M., Davidson, A.R., Burrows, L.L., 2018. *Pseudomonas aeruginosa* defends against phages through type IV pilus glycosylation. *Nat. Microbiol.* 3, 47–52. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0061-y>
- Hay, I.D., Lithgow, T., 2019. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. *EMBO Rep.* 20, e47427. <https://doi.org/10.15252/embr.201847427>
- Huber, K.E., Waldor, M.K., 2002. Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. *Nature* 417, 656–659. <https://doi.org/10.1038/nature00782>
- Hui, J.G.K., Mai-Prochnow, A., Kjelleberg, S., McDougald, D., Rice, S.A., 2014. Environmental cues and genes involved in establishment of the superinfective Pf4 phage of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00654>
- Hutinet, G., Besle, A., Son, O., McGovern, S., Guerois, R., Petit, M.-A., Ochsenbein, F., Lecoite, F., 2018. Sak4 of Phage HK620 Is a RecA Remote Homolog With Single-Strand Annealing Activity Stimulated by Its Cognate SSB Protein. *Front. Microbiol.* 9, 743. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00743>
- Jacoby, G.A., Munoz-Price, L.S., 2009. The New β -Lactamases [WWW Document]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra041359>. <https://doi.org/10.1056/NEJMra041359>
- Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J.P., Que, Y.-A., Resch, G., Rousseau, A.F., Ravat, F., Carsin, H., Le Floch, R., Schaal, J.V., Soler, C., Fevre, C., Arnaud, I., Bretaudeau, L., Gabard, J., 2019. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect. Dis.* 19, 35–45. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30482-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30482-1)

- Jonckheere, L., Schelstraete, P., Van Simaey, L., Van Braeckel, E., Willekens, J., Van Daele, S., De Baets, F., Vaneechoutte, M., 2018. Establishing the diagnosis of chronic colonization with *Pseudomonas aeruginosa* of cystic fibrosis patients: Comparison of the European consensus criteria with genotyping of *P. aeruginosa* isolates. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 17, 729–735. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.03.004>
- Jurač, K., Nabergoj, D., Podgornik, A., 2019. Bacteriophage production processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 685–694. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9527-y>
- Kauffman, K.M., Hussain, F.A., Yang, J., Arevalo, P., Brown, J.M., Chang, W.K., VanInsberghe, D., Elsherbini, J., Sharma, R.S., Cutler, M.B., Kelly, L., Polz, M.F., 2018. A major lineage of non-tailed dsDNA viruses as unrecognized killers of marine bacteria. *Nature* 554, 118–122. <https://doi.org/10.1038/nature25474>
- Kenzaka, T., Tani, K., Sakotani, A., Yamaguchi, N., Nasu, M., 2007. High-Frequency Phage-Mediated Gene Transfer among *Escherichia coli* Cells, Determined at the Single-Cell Level. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3291–3299. <https://doi.org/10.1128/AEM.02890-06>
- Kieser, S., Sarker, S.A., Berger, B., Sultana, S., Chisti, M.J., Islam, S.B., Foata, F., Porta, N., Betrisey, B., Fournier, C., Descombes, P., Mercenier, A., Sakwinska, O., Brüssow, H., 2017. Antibiotic Treatment Leads to Fecal *Escherichia coli* and Coliphage Expansion in Severely Malnourished Diarrhea Patients. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 458–460.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.11.014>
- Kleiner, M., Bushnell, B., Sanderson, K.E., Hooper, L.V., Duerkop, B.A., 2020. Transductomics: sequencing-based detection and analysis of transduced DNA in pure cultures and microbial communities. *Microbiome* 8, 158. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00935-5>
- Knezevic, P., Adriaenssens, E.M., 2021. ICTV Virus Taxonomy Profile: Inoviridae.
- Knezevic, P., Adriaenssens, E.M., Ictv Report Consortium, null, 2021. ICTV Virus Taxonomy Profile: Plectroviridae. *J. Gen. Virol.* 102. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001597>
- Knezevic, P., Obrecht, D., Curcin, S., Petrusic, M., Aleksic, V., Kostanjsek, R., Petrovic, O., 2011. Phages of *Pseudomonas aeruginosa*: response to environmental factors and in vitro ability to inhibit bacterial growth and biofilm formation. *J. Appl. Microbiol.* 111, 245–254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05043.x>
- Knezevic, P., Voet, M., Lavigne, R., 2015. Prevalence of Pf1-like (pro)phage genetic elements among *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Virology* 483, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.04.008>
- Kortright, K.E., Chan, B.K., Koff, J.L., Turner, P.E., 2019a. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe* 25, 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.014>
- Kortright, K.E., Chan, B.K., Koff, J.L., Turner, P.E., 2019b. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe* 25, 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.014>
- Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P., Pelletier, J., 2006. Comparative Genomic Analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages. *J. Bacteriol.* 188, 1184–1187. <https://doi.org/10.1128/JB.188.3.1184-1187.2006>
- LaBauve, A.E., Wargo, M.J., 2012. Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 0 6, Unit-6E.1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06e01s25>
- Labrie, S.J., Samson, J.E., Moineau, S., 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Latino, L., Midoux, C., Hauck, Y., Vergnaud, G., Pourcel, C., 2016. Pseudolysogeny and sequential mutations build multiresistance to virulent bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* 162, 748–763. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000263>
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K.M., Wertheim, H.F.L., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A.Q., Qamar, F.N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z.A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G.D., Brown, E.D., Cars, O., 2013. Antibiotic resistance—the

- need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* 13, 1057–1098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)
- Le, S., Yao, X., Lu, S., Tan, Y., Rao, X., Li, M., Jin, X., Wang, J., Zhao, Y., Wu, N.C., Lux, R., He, X., Shi, W., Hu, F., 2014. Chromosomal DNA deletion confers phage resistance to *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* 4, 4738. <https://doi.org/10.1038/srep04738>
- Lekunberri, I., Subirats, J., Borrego, C.M., Balcázar, J.L., 2017. Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 220, 981–984. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.059>
- León, M., Bastías, R., 2015. Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria. *Front. Microbiol.* 6, 343. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00343>
- Lewis, K., 2008. Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells, in: Romeo, T. (Ed.), *Bacterial Biofilms, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 107–131. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_6
- Li, Y., Liu, X., Tang, K., Wang, P., Zeng, Z., Guo, Y., Wang, X., 2019. Excisionase in *Pf* filamentous prophage controls lysis-lysogeny decision-making in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 111, 495–513. <https://doi.org/10.1111/mmi.14170>
- Lossouarn, J., Briet, A., Moncaut, E., Furlan, S., Bouteau, A., Son, O., Leroy, M., DuBow, M.S., Lecoite, F., Serror, P., Petit, M.-A., 2019. Enterococcus faecalis Countermeasures Defeat a Virulent Picovirinae Bacteriophage. *Viruses* 11, E48. <https://doi.org/10.3390/v11010048>
- Maestre-Carballa, L., Lluesma Gomez, M., Angla Navarro, A., Garcia-Heredia, I., Martinez-Hernandez, F., Martinez-Garcia, M., 2019. Insights into the antibiotic resistance dissemination in a wastewater effluent microbiome: bacteria, viruses and vesicles matter. *Environ. Microbiol.* 21, 4582–4596. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14758>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Malik, D.J., Sokolov, I.J., Vinner, G.K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladislavljevic, G.T., Clokie, M.R.J., Garton, N.J., Stapley, A.G.F., Kirpichnikova, A., 2017. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv. Colloid Interface Sci., Recent nanotechnology and colloid science development for biomedical applications* 249, 100–133. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>
- Marr, A.K., Gooderham, W.J., Hancock, R.E., 2006. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 468–472. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>
- Marrie, T.J., Nelligan, J., Costerton, J.W., 1982. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* 66, 1339–1341. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.66.6.1339>
- Masters, M., 1999. Gene Transfer : Transduction Generalized Transduction [WWW Document]. URL <https://www.semanticscholar.org/paper/Gene-Transfer-%3A-Transduction-Generalized-Masters/9ca6b9ad1dba24ea731e1c583e6882698758c557> (accessed 7.5.21).
- McElroy, K.E., Hui, J.G.K., Woo, J.K.K., Luk, A.W.S., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Rice, S.A., Thomas, T., 2014. Strain-specific parallel evolution drives short-term diversification during *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E1419–E1427. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314340111>
- Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Weber-Dąbrowska, B., Fortuna, W., Letkiewicz, S., Szufnarowski, K., Pawełczyk, Z., Rogóż, P., Kłak, M., Wojtasik, E., Górski, A., 2012. Clinical aspects of phage therapy. *Adv. Virus Res.* 83, 73–121. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00003-7>

- Mizuno, C.M., Luong, T., Cederstrom, R., Krupovic, M., Debarbieux, L., Roach, D.R., 2020. Isolation and Characterization of Bacteriophages That Infect *Citrobacter rodentium*, a Model Pathogen for Intestinal Diseases. *Viruses* 12, 737. <https://doi.org/10.3390/v12070737>
- Mutti, M., Corsini, L., 2019. Robust Approaches for the Production of Active Ingredient and Drug Product for Human Phage Therapy. *Front. Microbiol.* 10, 2289. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02289>
- Nash, H.A., 1977. Integration and Excision of Bacteriophage λ , in: Arber, W., Henle, W., Hofschneider, P.H., Humphrey, J.H., Klein, J., Koldovsky, P., Koprowski, H., Maaløe, O., Melchers, F., Rott, R., Schweiger, H.G., Syruček, L., Vogt, P.K. (Eds.), *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 171–199. https://doi.org/10.1007/978-3-642-66800-5_6
- Neshani, A., Zare, H., Akbari Eidgahi, M.R., Khaledi, A., Ghazvini, K., 2019. Epinecidin-1, a highly potent marine antimicrobial peptide with anticancer and immunomodulatory activities. *BMC Pharmacol. Toxicol.* 20, 33. <https://doi.org/10.1186/s40360-019-0309-7>
- Nishimura, Y., Yoshida, T., Kuronishi, M., Uehara, H., Ogata, H., Goto, S., 2017. ViPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 33, 2379–2380. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx157>
- Oechslin, F., 2018. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses* 10. <https://doi.org/10.3390/v10070351>
- Oechslin, F., Piccardi, P., Mancini, S., Gabard, J., Moreillon, P., Entenza, J.M., Resch, G., Que, Y.-A., 2017. Synergistic Interaction Between Phage Therapy and Antibiotics Clears *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Endocarditis and Reduces Virulence. *J. Infect. Dis.* 215, 703–712. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw632>
- Ofir, G., Melamed, S., Sberro, H., Mukamel, Z., Silverman, S., Yaakov, G., Doron, S., Sorek, R., 2018. DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nat. Microbiol.* 3, 90–98. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0051-0>
- Oliveira, A., Sillankorva, S., Quinta, R., Henriques, A., Sereno, R., Azeredo, J., 2009. Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1919–1927. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04145.x>
- Oliveira, P.H., Touchon, M., Rocha, E.P.C., 2014. The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts. *Nucleic Acids Res.* 42, 10618–10631. <https://doi.org/10.1093/nar/gku734>
- O’Neil, J., 2014. The Review on Antimicrobial Resistance.
- Ooi, M.L., Drilling, A.J., Morales, S., Fong, S., Moraitis, S., Macias-Valle, L., Vreugde, S., Psaltis, A.J., Wormald, P.-J., 2019. Safety and Tolerability of Bacteriophage Therapy for Chronic Rhinosinusitis Due to *Staphylococcus aureus*. *JAMA Otolaryngol. Neck Surg.* 145, 723–729. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2019.1191>
- Paepe, M.D., Hutinet, G., Son, O., Amarir-Bouhram, J., Schbath, S., Petit, M.-A., 2014. Temperate Phages Acquire DNA from Defective Prophages by Relaxed Homologous Recombination: The Role of Rad52-Like Recombinases. *PLOS Genet.* 10, e1004181. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004181>
- Palmer, K.L., Aye, L.M., Whiteley, M., 2007. Nutritional Cues Control *Pseudomonas aeruginosa* Multicellular Behavior in Cystic Fibrosis Sputum. *J. Bacteriol.* 189, 8079–8087. <https://doi.org/10.1128/JB.01138-07>
- Panosian Dunavan, C., 2020. Superbug vs. Superphage: A Review of The Perfect Predator and an Interview with Dr. Chip Schooley. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 102, 245–248. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0770>
- Petrovich, M.L., Zilberman, A., Kaplan, A., Eliraz, G.R., Wang, Y., Langenfeld, K., Duhaime, M., Wigginton, K., Poretsky, R., Avisar, D., Wells, G.F., 2020. Microbial and Viral Communities and Their Antibiotic Resistance Genes Throughout a Hospital Wastewater Treatment System. *Front. Microbiol.* 11, 153. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00153>

- Pires, D.P., Costa, A.R., Pinto, G., Meneses, L., Azeredo, J., 2020. Current challenges and future opportunities of phage therapy. *FEMS Microbiol. Rev.* 44, 684–700. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa017>
- Pirnay, J.-P., Blasdel, B.G., Bretaudeau, L., Buckling, A., Chanishvili, N., Clark, J.R., Corte-Real, S., Debarbieux, L., Dublanquet, A., De Vos, D., Gabard, J., Garcia, M., Goderdzishvili, M., Górski, A., Hardcastle, J., Huys, I., Kutter, E., Lavigne, R., Merabishvili, M., Olchawa, E., Parikka, K.J., Patey, O., Pouillot, F., Resch, G., Rohde, C., Scheres, J., Skurnik, M., Vaneechoutte, M., Van Parys, L., Verbeken, G., Zizi, M., Van den Eede, G., 2015. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm. Res.* 32, 2173–2179. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1617-7>
- Pirnay, J.-P., De Vos, D., Verbeken, G., Merabishvili, M., Chanishvili, N., Vaneechoutte, M., Zizi, M., Laire, G., Lavigne, R., Huys, I., Van den Mooter, G., Buckling, A., Debarbieux, L., Pouillot, F., Azeredo, J., Kutter, E., Dublanquet, A., Górski, A., Adamia, R., 2011. The Phage Therapy Paradigm: Prêt-à-Porter or Sur-mesure? *Pharm. Res.* 28, 934–937. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0313-5>
- Ramírez-Estrada, S., Borgatta, B., Rello, J., 2016. *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management. *Infect. Drug Resist.* 9, 7–18. <https://doi.org/10.2147/IDR.S50669>
- Rao, F., Yang, Y., Qi, Y., Liang, Z.-X., 2008. Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190, 3622–3631. <https://doi.org/10.1128/JB.00165-08>
- Regulski, K., Champion-Arnaud, P., Gabard, J., 2018. Bacteriophage Manufacturing: From Early Twentieth-Century Processes to Current GMP | SpringerLink [WWW Document]. URL https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-319-40598-8_25-1 (accessed 6.23.21).
- Rhoads, D.D., Wolcott, R.D., Kuskowski, M.A., Wolcott, B.M., Ward, L.S., Sulakvelidze, A., 2009. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J. Wound Care* 18, 237–238, 240–243. <https://doi.org/10.12968/jowc.2009.18.6.42801>
- Rice, L.B., 2008. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J. Infect. Dis.* 197, 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>
- Rice, Scott A., Tan, C.H., Mikkelsen, P.J., Kung, V., Woo, J., Tay, M., Hauser, A., McDougald, D., Webb, J.S., Kjelleberg, S., 2009. The Biofilm Life-Cycle and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are Dependent on a Filamentous Prophage. *ISME J.* 3, 271–282. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.109>
- Rice, Scott A., Tan, C.H., Mikkelsen, P.J., Kung, V., Woo, J., Tay, M., Hauser, A., McDougald, D., Webb, J.S., Kjelleberg, S., 2009. The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *ISME J.* 3, 271–282. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.109>
- Ripp, S., Miller, R.V., 1997. The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiol. Read. Engl.* 143, 2065–2070. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-6-2065>
- Rohde, C., Resch, G., Pirnay, J.-P., Blasdel, B., Debarbieux, L., Gelman, D., Górski, A., Hazan, R., Huys, I., Kakabadze, E., Łobocka, M., Maestri, A., Almeida, G., Makalatia, K., Malik, D., Mašlačová, I., Merabishvili, M., Pantucek, R., Rose, T., Štveráková, D., Van Raemdonck, H., Verbeken, G., Chanishvili, N., 2018. Expert Opinion on Three Phage Therapy Related Topics: Bacterial Phage Resistance, Phage Training and Prophages in Bacterial Production Strains. *Viruses* 10, 178. <https://doi.org/10.3390/v10040178>
- Roux, S., Krupovic, M., Daly, R.A., Borges, A.L., Nayfach, S., Schulz, F., Sharrar, A., Matheus Carnevali, P.B., Cheng, J.-F., Ivanova, N.N., Bondy-Denomy, J., Wrighton, K.C., Woyke, T., Visel, A., Kyrpides, N.C., Elie-Fadrosh, E.A., 2019. Cryptic inoviruses revealed as pervasive in bacteria and archaea across Earth's biomes. *Nat. Microbiol.* 4, 1895–1906. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0510-x>

- Sakib, S.N., Reddi, G., Almagro-Moreno, S., 2018. Environmental role of pathogenic traits in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 200, e00795-00717. <https://doi.org/10.1128/JB.00795-17>
- Sanjuán, R., Nebot, M.R., Chirico, N., Mansky, L.M., Belshaw, R., 2010. Viral mutation rates. *J. Virol.* 84, 9733–9748. <https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10>
- Sarker, S.A., Sultana, S., Reuteler, G., Moine, D., Descombes, P., Charton, F., Bourdin, G., McCallin, S., Ngom-Bru, C., Neville, T., Akter, M., Huq, S., Qadri, F., Talukdar, K., Kassam, M., Delley, M., Loiseau, C., Deng, Y., El Aidy, S., Berger, B., Brüssow, H., 2016. Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. *EBioMedicine* 4, 124–137. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.12.023>
- Schmelcher, M., Donovan, D.M., Loessner, M.J., 2012. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* 7, 1147–1171. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.97>
- Schmerer, M., Molineux, I.J., Bull, J.J., 2014. Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails. *PeerJ* 2. <https://doi.org/10.7717/peerj.590>
- Secor, P.R., Jennings, L.K., Michaels, L.A., Sweere, J.M., Singh, P.K., Parks, W.C., Bollyky, P.L., 2015a. Biofilm assembly becomes crystal clear - filamentous bacteriophage organize the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix into a liquid crystal. *Microb. Cell Graz Austria* 3, 49–52. <https://doi.org/10.15698/mic2016.01.475>
- Secor, P.R., Michaels, L.A., Smigiel, K.S., Rohani, M.G., Jennings, L.K., Hisert, K.B., Arrigoni, A., Braun, K.R., Birkland, T.P., Lai, Y., Hallstrand, T.S., Bollyky, P.L., Singh, P.K., Parks, W.C., 2017. Filamentous Bacteriophage Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Alters the Inflammatory Response and Promotes Noninvasive Infection *In Vivo*. *Infect. Immun.* 85. <https://doi.org/10.1128/IAI.00648-16>
- Secor, P.R., Sweere, J.M., Michaels, L.A., Malkovskiy, A.V., Lazzareschi, D., Katznelson, E., Rajadas, J., Birnbaum, M.E., Arrigoni, A., Braun, K.R., Evanko, S.P., Stevens, D.A., Kaminsky, W., Singh, P.K., Parks, W.C., Bollyky, P.L., 2015b. Filamentous Bacteriophage Promote Biofilm Assembly and Function. *Cell Host Microbe* 18, 549–559. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.013>
- Shaeer, K.M., Zmarlicka, M.T., Chahine, E.B., Piccicacco, N., Cho, J.C., 2019. Plazomicin: A Next-Generation Aminoglycoside. *Pharmacotherapy* 39, 77–93. <https://doi.org/10.1002/phar.2203>
- Shen, M., Zhang, H., Shen, W., Zou, Z., Lu, S., Li, G., He, X., Agnello, M., Shi, W., Hu, F., Le, S., 2018. *Pseudomonas aeruginosa* MutL promotes large chromosomal deletions through non-homologous end joining to prevent bacteriophage predation. *Nucleic Acids Res.* 46, 4505–4514. <https://doi.org/10.1093/nar/gky160>
- Sillankorva, S., Oliveira, R., Vieira, M.J., Sutherland, I., Azeredo, J., 2004. *Pseudomonas fluorescens* infection by bacteriophage Φ S1: the influence of temperature, host growth phase and media. *FEMS Microbiol. Lett.* 241, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.058>
- Siringan, P., Connerton, P.L., Cummings, N.J., Connerton, I.F., 2014. Alternative bacteriophage life cycles: the carrier state of *Campylobacter jejuni*. *Open Biol.* 4, 130200. <https://doi.org/10.1098/rsob.130200>
- Sivaneson, M., Mikkelsen, H., Ventre, I., Bordi, C., Filloux, A., 2011. Two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an intricate network mediating fimbrial and efflux pump gene expression. *Mol. Microbiol.* 79, 1353–1366. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07527.x>
- Šivec, K., Podgornik, A., 2020. Determination of bacteriophage growth parameters under cultivating conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 8949–8960. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10866-8>
- Spellberg, B., Miller, L.G., Kuo, M.N., Bradley, J., Scheld, W.M., Edwards, J.E., 2007. Societal Costs Versus Savings from Wild-Card Patent Extension Legislation to Spur Critically Needed Antibiotic Development. *Infection* 35, 167. <https://doi.org/10.1007/s15010-007-6269-7>
- Stern, A., Mick, E., Tirosh, I., Sagy, O., Sorek, R., 2012. CRISPR targeting reveals a reservoir of common phages associated with the human gut microbiome. *Genome Res.* 22, 1985–1994. <https://doi.org/10.1101/gr.138297.112>

- Sweere, J.M., Belleghem, J.D.V., Ishak, H., Bach, M.S., Popescu, M., Sunkari, V., Kaber, G., Manasherob, R., Suh, G.A., Cao, X., Vries, C.R. de, Lam, D.N., Marshall, P.L., Birukova, M., Katznelson, E., Lazzareschi, D.V., Balaji, S., Keswani, S.G., Hawn, T.R., Secor, P.R., Bollyky, P.L., 2019. Bacteriophage trigger antiviral immunity and prevent clearance of bacterial infection. *Science* 363, eaat9691. <https://doi.org/10.1126/science.aat9691>
- Sybesma, W., Rohde, C., Bardy, P., Pirnay, J.-P., Cooper, I., Caplin, J., Chanishvili, N., Coffey, A., De Vos, D., Scholz, A.H., McCallin, S., Püschner, H.M., Pantucek, R., Aminov, R., Doškař, J., Kurtböke, D.İ., 2018. Silk Route to the Acceptance and Re-Implementation of Bacteriophage Therapy—Part II. *Antibiotics* 7, 35. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020035>
- Tang, C., Deng, C., Zhang, Y., Xiao, C., Wang, J., Rao, X., Hu, F., Lu, S., 2018. Characterization and Genomic Analyses of *Pseudomonas aeruginosa* Podovirus TC6: Establishment of Genus Pa11virus. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02561>
- Torres-Barceló, C., Arias-Sánchez, F.I., Vasse, M., Ramsayer, J., Kaltz, O., Hochberg, M.E., 2014. A window of opportunity to control the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* combining antibiotics and phages. *PloS One* 9, e106628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106628>
- Torres-Barceló, C., Gurney, J., Gougat-Barberá, C., Vasse, M., Hochberg, M.E., 2018. Transient negative effects of antibiotics on phages do not jeopardise the advantages of combination therapies. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy107>
- Twort, F.W., 1915. AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES. *The Lancet*, Originally published as Volume 2, Issue 4814 186, 1241–1243. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)20383-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)20383-3)
- Wang, M., Liu, P., Zhou, Q., Tao, W., Sun, Y., Zeng, Z., 2018. Estimating the contribution of bacteriophage to the dissemination of antibiotic resistance genes in pig feces. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 238, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.024>
- Warner, C.M., Barker, N., Lee, S.-W., Perkins, E.J., 2014. M13 bacteriophage production for large-scale applications. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 2067–2072. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1184-7>
- Webb, J.S., Lau, M., Kjelleberg, S., 2004. Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* 186, 8066–8073. <https://doi.org/10.1128/JB.186.23.8066-8073.2004>
- Weinbauer, M.G., 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 127–181. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001>
- Weinbauer, M.G., Rassoulzadegan, F., 2004. Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environ. Microbiol.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00539.x>
- Weynberg, K.D., Voolstra, C.R., Neave, M.J., Buerger, P., van Oppen, M.J.H., 2015. From cholera to corals: Viruses as drivers of virulence in a major coral bacterial pathogen. *Sci. Rep.* 5, 17889. <https://doi.org/10.1038/srep17889>
- Wright, A., Hawkins, C.H., Anggård, E.E., Harper, D.R., 2009. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin. Otolaryngol. Off. J. ENT-UK Off. J. Neth. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. Cervico-Facial Surg.* 34, 349–357. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x>
- Xie, Y., Wahab, L., Gill, J.J., 2018. Development and Validation of a Microtiter Plate-Based Assay for Determination of Bacteriophage Host Range and Virulence. *Viruses* 10, 189. <https://doi.org/10.3390/v10040189>
- Yang, Y., Shen, W., Zhong, Q., Chen, Q., He, X., Baker, J.L., Xiong, K., Jin, X., Wang, J., Hu, F., Le, S., 2020. Development of a Bacteriophage Cocktail to Constrain the Emergence of Phage-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00327>

- You, L., Suthers, P.F., Yin, J., 2002. Effects of *Escherichia coli* Physiology on Growth of Phage T7 In Vivo and In Silico. *J. Bacteriol.* 184, 1888–1894. <https://doi.org/10.1128/JB.184.7.1888-1894.2002>
- Yu, Z.-C., Chen, X.-L., Shen, Q.-T., Zhao, D.-L., Tang, B.-L., Su, H.-N., Wu, Z.-Y., Qin, Q.-L., Xie, B.-B., Zhang, X.-Y., Yu, Y., Zhou, B.-C., Chen, B., Zhang, Y.-Z., 2015. Filamentous phages prevalent in *Pseudoalteromonas* spp. confer properties advantageous to host survival in Arctic sea ice. *ISME J.* 9, 871–881. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.185>
- Zeng, Z., Liu, X., Yao, J., Guo, Y., Li, B., Li, Y., Jiao, N., Wang, X., 2016. Cold adaptation regulated by cryptic prophage excision in *Shewanella oneidensis*. *ISME J.* 10, 2787–2800. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.85>

Annexe

1. Rapport construction souche

Construction of the strain LMG12228 Δ Pf4: FRT, Δ repPf6::FRT, Δ exoA

I Objectives

The anti-*Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages PP1450, PP1777, PP1792 and PP1797 are produced with the *Pseudomonas aeruginosa* strain LMG12228. Its genome harbours two prophages (cf. Figure 1):

- Pf4 with a 12,408 bp long genome (attachment sites included: attL and attR) in the LMG12228 genome,
- Pf6 with a 12,149 bp long genome, (attachment sites included: attR_02 and attL_02).

These prophages are potentially harmful to humans as they help the bacteria to survive in wounds during infections (Sweere et al., 2019, Burgener et al., 2019). It was therefore decided that the LMG12228 strain would be deleted of its prophages in order to use it for the production of pharmaceutical bacteriophages.

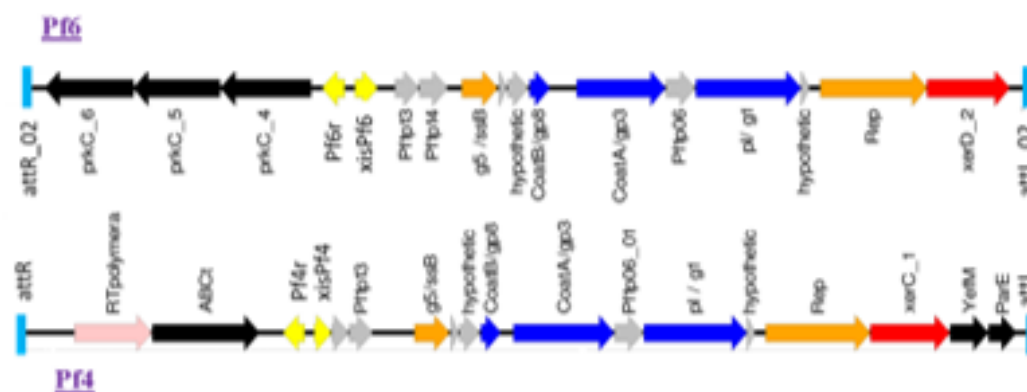


Figure 1: Schematic representation of Pf4 and Pf6 prophage genome.

Genes (arrows) are coloured by function: red, integrase; blue, structural proteins building up phage coat (Pf4 and Pf6 are filamentous phages, therefore their virion proteins are named 'coat' rather than 'capsid' proteins); orange, phage replication; yellow, lysogeny regulation; black, morons genes, and pink, reverse transcriptase. The genes with unknown functions are coloured in grey. Light blue rectangles: att sites.

Moreover, the LMG12228 strain genome also encodes a toxin: the exotoxine A. Since this toxin is released by the bacteria in the environment and might be found in the final product, it was also decided to delete the gene encoding it (*exoA*), which position is from 4,273,341 bp to 4,275,257 bp.

In this report, the steps of these successive deletions are detailed:

- First, the prophage Pf4 was deleted in its entirety. Both the attachment sites, *attL* and *attR*, were also deleted to impede the reintegration of the temperate phage into the bacterial genome.
- Second, the prophage Pf6 was partially deleted from the Pf4 deleted strain. Two deletions were performed in parallel, the deletion of the major coat protein encoding gene, *coatB*; and the deletion of the *rep* gene, which is essential for phage replication (Lin and Pratt, 1972), leading to the strains:
 - o LMG12228 Δ Pf4::FRT Δ repPf6::FRT and
 - o LMG12228 Δ Pf4::FRT Δ coatBPf6::FRT.

The strain LMG12228 Δ Pf4::FRT Δ repPf6::FRT was preferred for the next step.

- Finally, the *exoA* gene was deleted from the double deleted strain Δ Pf4::FRT Δ repPf6::FRT.

Each construction step was checked by PCR, and the final strain was checked by Illumina sequencing.

I. Material and methods

A. Bacterial strains

Bacterial strains used and constructed in this study are listed in Annex 3. They were grown in LB broth or on LB agar at 37°C (all LB media were with 5 g/L NaCl, also designated as “LB Lennox”, to distinguish it from the LB recipe with 10 g/L NaCl). Antibiotics were added when necessary at the following concentration: gentamicin (gm), 10 µg/mL; carbenicillin (carb), 200 µg/mL. Initial selection on gentamicin used 30 µg/mL as indicated in Rice *et al.* (2009), and then decreased to 10 µg/mL as it proved sufficient to counter-select sensitive bacteria. When necessary, sucrose was added to the plates at a 5% final concentration. For growth of *E.coli* 82163 strain, used as a donor in conjugation experiments, the medium was supplemented with 0,3 mM diaminopurine (DAP). Bacterial clones were stored at -80°C in LB Lennox + 20% glycerol.

B. Molecular biology

All plasmid cloning steps were performed in *E.coli* strain JM105 (Annex 3). PCR primers sequence and function are listed in Annex 2. Constructions were first analyzed by restriction digestion and gel electrophoresis, and sequencing of the insert region for two to three candidates per construction, to check for the absence of mutations. DNA extraction and purification kits were from Qiagen and used according to the supplier's instructions. Enzymes for PCR, restriction digestion and ligation were from New England Biolab and used according to the supplier's instructions.

To transfer plasmids into *P.aeruginosa*, two methods were used, either electroporation as described in Rice (2009), or conjugation. In this last case, the plasmid, which contained an *oriT* conjugation transfer origin, was first transformed into *E.coli* 82163 donor strain, which encodes in its chromosome all genes needed for the conjugation process.

To delete the *oacCA1* gene plasmid pFlp2 was transformed into the appropriate strain of *P. aeruginosa* by electroporation, and screening of strains with the *oacCA1* deletion was performed following the protocol of Hoang, T. T. *et al.*, Gene 212, 77–86 (1998).

The candidate *P. aeruginosa* deletion clones were checked by PCR, performed either directly on colony (a slight amount of the colony picked with a toothpick), or on purified genomic DNA, after extraction by phenol/chloroform precipitation protocol (Annex 12).

C. Plasmid constructions

The plasmids used and constructed in this study are listed in Annex 1A and 1B.

i. Construction of plasmid pMB01 for the deletion of Pf4.

To delete Pf4 in strain LMG12228 (see figure 2), the *P. aeruginosa* PAO1ΔPf4 strain was used as a starting point. PAO1 is identical to LMG12228 in the region of Pf4, therefore a fragment of the PAO1ΔPf4 genome, encompassing 300 bp upstream and downstream of the FRT-*oacCA1*-FRT construction was amplified with PCR with primers Pf4_BG_5' and Pf4_BD_3' (see primer sequences Annex 2), as represented in Figure 2, lower panel. The primers Pf4_BG_5' and Pf4_BD_3' were designed to include HindIII and KpnI restriction sites, respectively. The 1660pb PCR fragment was purified, digested by HindIII and KpnI and ligated with the 5799pb pEX18ApGW vector, also cut by HindIII and KpnI, leading to pMB01 (Annex 6 and 1B).

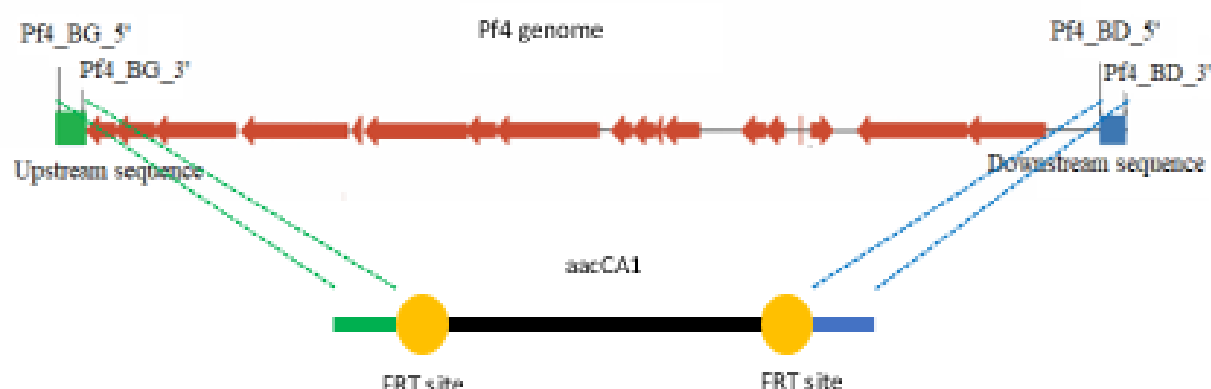


Figure 2: pMB01 insert for the Pf4 chromosomal deletion, and localization of primers.

The genomic organization of the Pf4 prophage in *P.aeruginosa* LMG1228 is shown (red arrows, upper panel), as well as the PAO1ΔPf4 genomic region cloned into pMB01 (lower panel). The homologous recombination will take place between the upstream (green, primer positions indicated with black lines) and the downstream (blue, primer positions indicated with black lines) sequences, which are identical in the two DNA molecules.

ii. Construction of plasmid pMB03 for the deletion of Pf6 rep gene.

Since several attempts to delete the complete Pf6 prophage failed, it suggests that Pf6 encodes genes essential to the bacterium. To inactivate Pf6, two partial deletions were done. Here, the method used for the construction of pMB03, to delete *repX* is described:

- 3 PCR products were first amplified individually, purified, mixed together and used as template for a 4th PCR amplification, to generate the fragment Pf6_rep_upstream-FRT-aacCA1-FRT_Pf6_rep_downstream.
- The 3 PCR products were amplified as follows:
 - o The 377 bp upstream region of *repX* was amplified with primers Pf6_rep_BG_5' and Pf6_rep_BG_3' (Annex 2) from LMG12228,
 - o The 1053 bp fragment harboring FRT-aacCA1-FRT was amplified from pPS856 (Annex1) using primers GmF and GmR (Annex 2),
 - o The 382 bp downstream region of *repX* was amplified with primers Pf6_rep_BD_5' and Pf6_rep_BD_3' (Annex 2) from LMG12228.
- The 4th PCR product was amplified by splicing overlap extension PCR (SOE PCR) (Horton *et al.*, 1990) from the mix of the 3 precedent amplifications using primers Pf6_rep_BG_5' and Pf6_rep_BD_3' (Annex 2 and Figure 3).

The final 1850 bp PCR product was digested by HindIII and KpnI and ligated to the 5799pb pEX18ApGW vector also cut by HindIII and KpnI, leading to pMB03 (Annex 7 and 1B). The sequence of the PCR amplified fragments is checked in the final construction by sequencing the plasmid pMB03 with primers pEX18Ap_5' and pEX18Ap_3' (Annex 2).

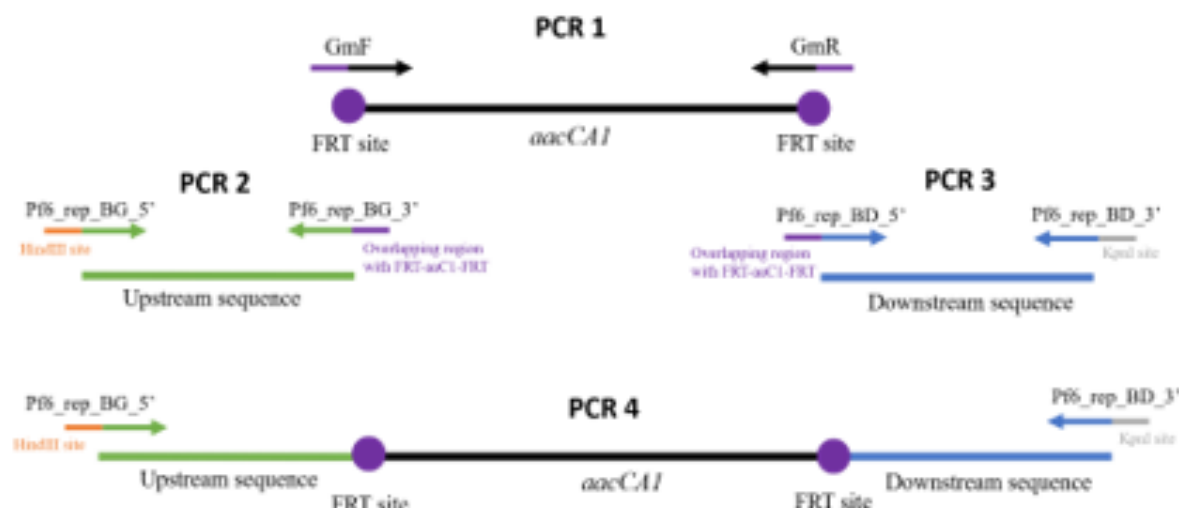


Figure 3: Schematic representation of the 'splicing overlap extension' strategy for the deletion of *Pf6 rep* gene. Thanks to the homology present at the tip of fragments PCR1, 2 and 3 (shown in purple), the PCR2 and PCR3 fragments will pair to PCR1 and allow PCR extension and formation of the desired complete fragment. This full length fragment will then be amplified further with the outside primers Pf6_rep_BG_5' and Pf6_rep_BD_3'.

iii. Construction of the plasmid pMB02 used for the deletion of the *coatB_{Pf6}* gene

The other partial deletion made to inactivate Pf6 was the deletion of the major coat protein of Pf6 (*coatB_{Pf6}*). For the construction of plasmid pMB02, a similar splicing overlap PCR strategy was used, with the 3 PCR products amplified as follows:

- The 350 bp upstream region of *coatB_{Pf6}* was amplified with primers Pf6_coatB_BG_5' and Pf6_coatB_BG_3' (Annex 2) from LMG12228.
- The 1053 bp fragment harboring FRT-*aacCA1*-FRT was amplified from pPS856 (Annex1) using primers GmF and GmR (Annex 2).
- The 370 bp downstream region of *coatB_{Pf6}* was amplified with primers Pf6_coatB_BD_5' and Pf6_coatB_BD_3' (Annex 2) from LMG12228.

The 4th PCR product was amplified by SOE PCR. The final 1770 bp PCR product was digested by HindIII and KpnI and ligated to the 5799pb pEX18ApGW vector also cut by HindIII and KpnI, leading to pMB02 (Annex 8 and 1B).

iv. Construction of the plasmid pMB06 used for the deletion of *exoA*.

To construct plasmid pMB06, the two segments to join to prepare the deletion, were amplified by PCR:

- The 335 bp upstream region of *exoA* was amplified with primers *exoA*_BG_5' and *exoA*_BG_3' (Annex 2) from LMG12228 and digested with HindIII and BamHI.
- The 341bp downstream region of *exoA* was amplified with primers *exoA*_BD_5' and *exoA*_BD_3' (Annex 2) from LMG12228 and digested by BamHI and EcoRI.
-

A map showing these segments, as well as the primer used is shown Figure 4. These two fragments were ligated together and to the 5040pb pEXG2 vector cut by HindIII and EcoRI, in a three fragments ligation, leading to pMB06 (Annex 9 and 1B).

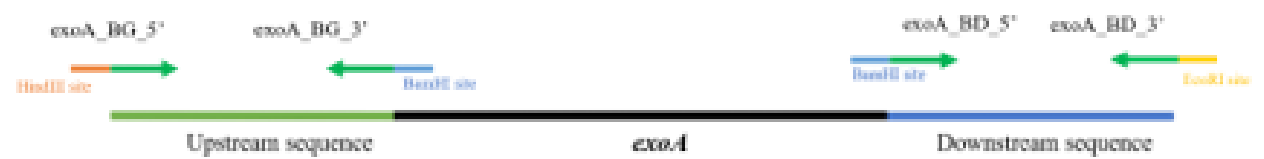


Figure 4: Representation of the amplified regions on LMG12228 genome and the primers used with their added restriction sites.

II. Results

Data in the literature, as well as our own experiments, had shown that a Pf4 deletion was viable, while complete Pf6 deletion was never obtained. To inactivate both prophages in strain LMG12228, we therefore decided to first delete completely Pf4, and then try two partial deletions of Pf6 that should completely inactivate the Pf6 phage cycle. The two targeted genes of Pf6 were the *rep* gene, necessary for Pf6 phage replication, and the *coat8* gene, which encodes the major component of the phage coat. Depending on the result of each of these two deletions, we would then complete strain construction by deleting *exoA* in one of them, preferably the *rep* mutant, as in such strain no Pf6 phage DNA amplification is expected.

To delete Pf4, *rep*, *coat8* and *exoA* from *Pseudomonas aeruginosa* LMG12228 strain, allelic exchange was used. In *P. aeruginosa*, allelic exchange depends on the use of plasmids with a ColE1 origin of replication, which replicate in *Escherichia coli* but not in *Pseudomonas aeruginosa*: they are called suicide vectors. Suicide vectors have an antibiotic resistance gene and a counter-selection marker for manipulating *P. aeruginosa*. To permit allelic replacement, the suicide vector is engineered with the DNA regions flanking the region or gene that is to be deleted. These regions are homologous to the recipient chromosome, allowing for homologous recombination to occur (Hmelo *et al.*, 2015). After the construction of this suicide delivery vector, allelic exchange involves two steps:

- In the first step (called pop-in), the suicide vector is introduced into *P. aeruginosa* by electroporation or conjugation (see Methods). A first chromosomal integration event, which is mediated by homologous recombination, must occur in order to obtain resistance to the antibiotic marker encoded on the suicide vector. This event is termed a single crossover.
- In the second step of allelic exchange (pop-out), the plasmid is excised from the chromosome through a rare second homologous recombination event, which will generate a double-crossover mutant. This double-crossover mutant is isolated by counter-selection: one selects for the loss of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene present on the plasmid vector. The *sacB* gene encodes levansucrase which activity confers acute sucrose sensitivity. Hence, double-crossover mutants can be selected by growing the first-crossover mutants on sucrose, as only those bacteria that have lost *sacB* gene expression can grow under this condition. Depending on which of the two possible recombination events that will take place, it will either restore the wild type gene or fix the desired deletion in the bacterial chromosome. In the case where the *aoxA1* gene is replacing the gene/prophage to delete, selection with gentamicin is applied, allowing to directly select the deleted strain.

A. Pf4 deletion

To delete Pf4 from LMG12228, pMB01 was transformed into LMG12228 by electroporation. Single cross-over transformants were selected on gentamicin. Next, to select plasmid loss and recovery of double-cross over deletions, two gentamicin resistant clones were plated on LB sucrose and incubated overnight at 30°C. Sucrose resistant clones were streaked on LB, LB gm and LB carb. Three independent gentamicin resistant and carbenicillin sensitive clones were obtained, giving strains PP0008, PP0009 and PP0010. Steps are shown in Figure 5.

Those candidates were checked by two series of PCR:

- the complete removal of Pf4 prophage with primers Pf4_recBact_5' and Pf4_recBact_3' (Annex 2),
- the absence of free replicative Pf4 form, with primers Pf4_xis_5' and Pf4_xis_3' (Annex 2),

The three candidates were confirmed, PP0008 was used for the next step. This step consisted in removing the *aacCA1* gene conferring gentamicin resistance to the strain, as shown in Figure 6. For this, pFlp2 plasmid was introduced into PP0008 by electroporation and transformants selected on carbenicillin. Several clones were streaked on LB sucrose to select the clones which had lost pFLP2, and patched on LB gentamicin to detect gentamicin sensitive clones, having lost the *aacCA1* gene. Finally, several gentamicin sensitive, and sucrose resistant clones were purified on LB and patched on carbenicillin to check for the loss of the plasmid pFLP2. Candidates were checked by PCR for the absence of *aacCA1*, with primers GmF and GmR (Annex 2). Strains PP0012 and PP0013 were considered right and PP0012 was used for the deletion of *repss*.

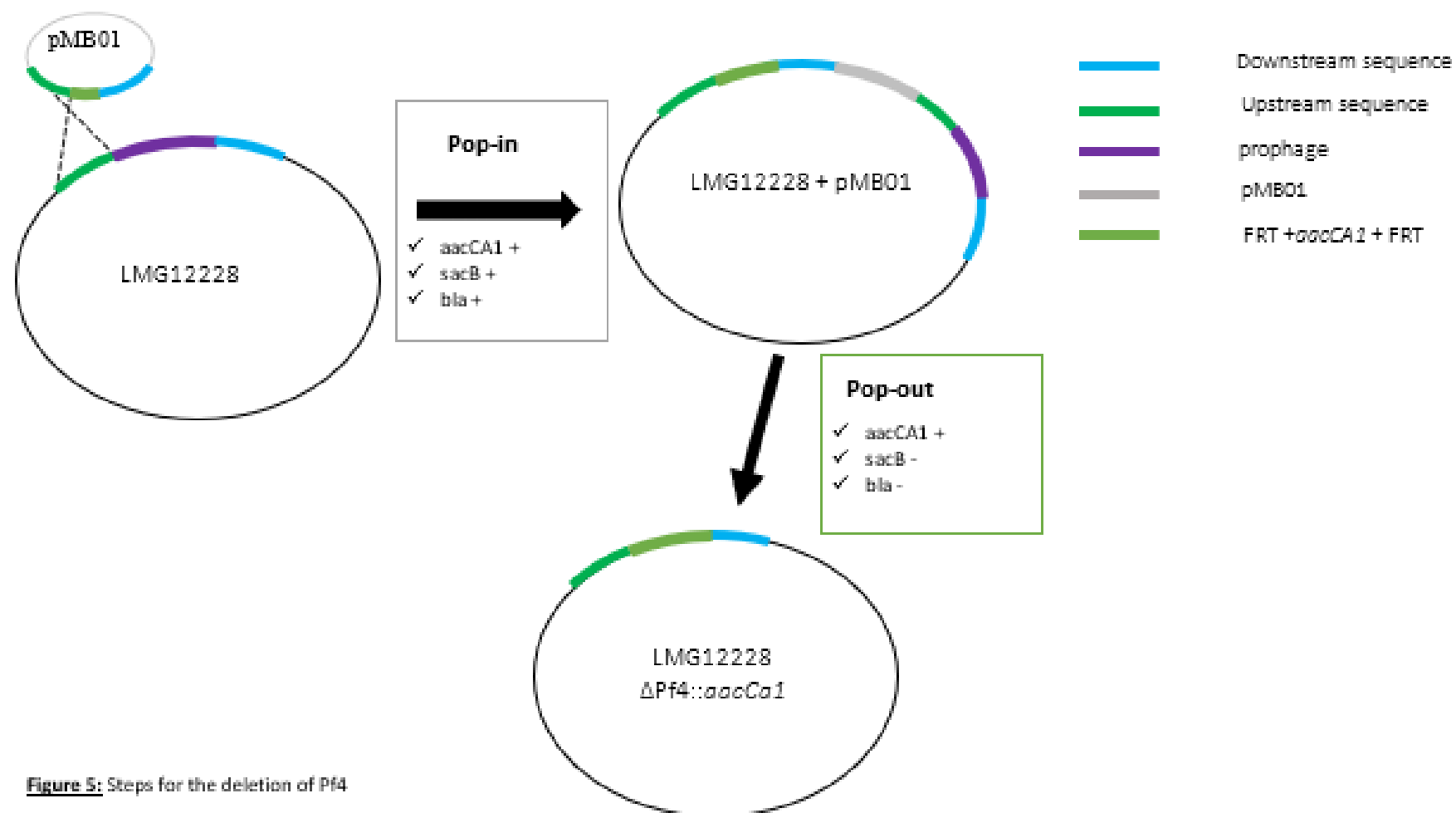


Figure 5: Steps for the deletion of Pf4

The pop-in event takes place between two homologous sequences of pMB01 and LMG1228. Here, it happens between the two green sequences of pMB01 and LMG1228. Next, selection on sucrose reveals clones in which pMB01 has popped-out between the blue sequences, removing the prophage Pf4.

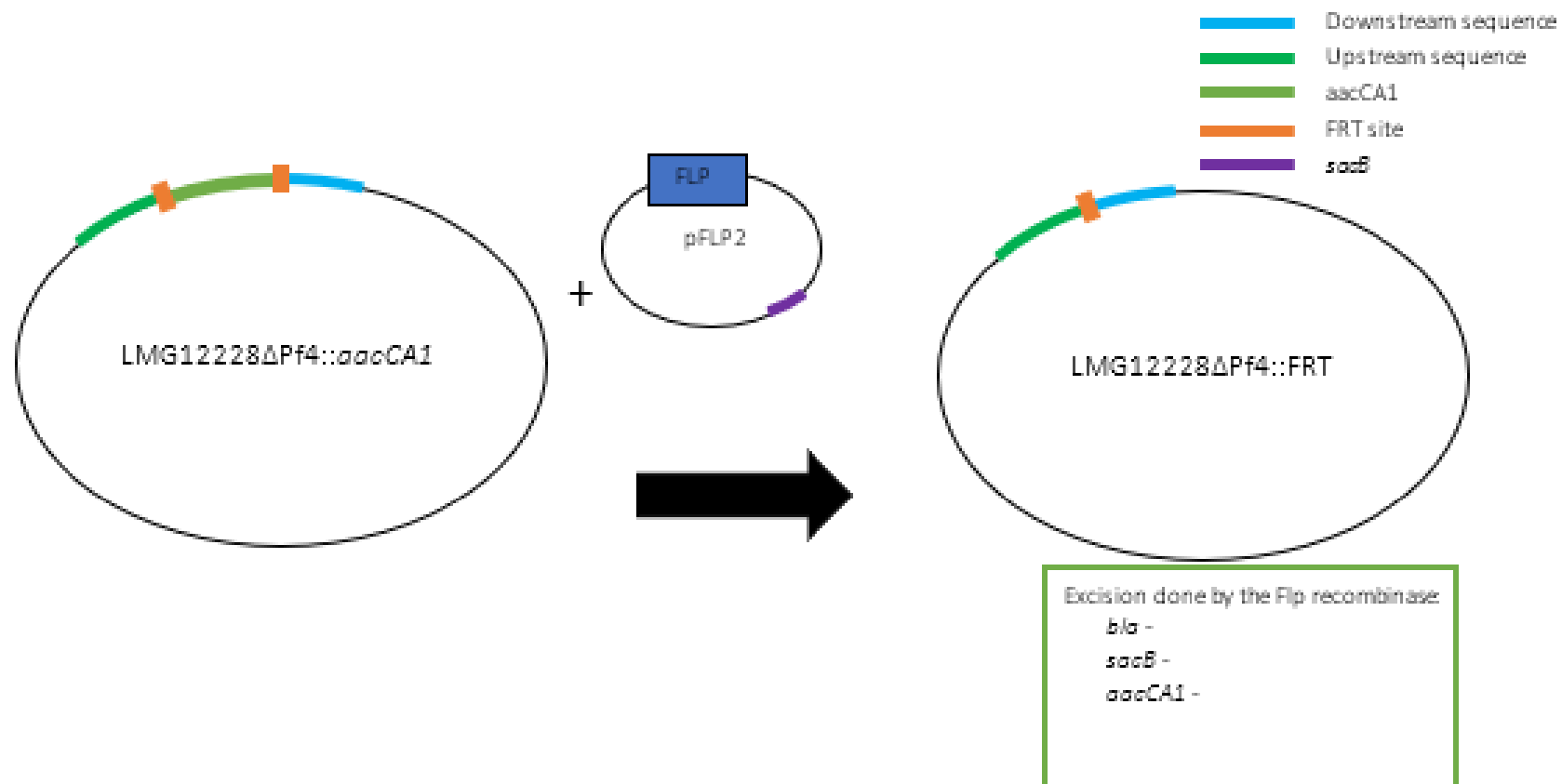


Figure 6: Schematic representation of the deletion of the FRT+*aacCA1*+FRT construction

B. Deletion of *repPf6* and *coatBPf6*

For *rep* deletion, pMB03 plasmid was introduced into strain LMG12228 Δ Pf4::FRT by conjugation and selection of ex-conjugants on gentamicin. Three gentamicin resistant clones were plated on LB sucrose + gm to select directly double-cross over mutants, and incubated overnight at 30°C. A few sucrose and gentamicin resistant clones were obtained and patched on LB gm and LB carb to verify the loss of the plasmid. Three gentamicin resistant and carbenicillin sensitive clones were obtained and purified, giving strains PP0046, PP0047 and PP0048. These candidates were checked by PCR for the absence of *rep* with the primers Pf6_rep_BG_5' and Pf6_rep_BD_3' (Annex 2). As a result, strains PP0046, PP0047 and PP0049 were considered right.

Once strain PP0046 (Pf4::FRT, rep_Pf6::FRT-*aacCA1*-FRT) was obtained, the steps for the deletion of the *aacCA1* gene were done as described above. The strain LMG12228 Δ Pf4::FRT, Δ rep::FRT was obtained and the clones named PP0060 and PP0061. Those candidates were checked by PCR for the absence of *aacCA1*, with primers GmF and GmR (Annex 2). PP0060 was kept for the deletion of *exoA*.

For the deletion of Pf6 *coatB*, the same steps described for *rep* were applied, starting from plasmid pMB02. The clones LMG12228 Δ Pf4::FRT, Δ coatB::FRT-*aacCA1*-FRT were named PP0037, PP0038 and PP0039. These candidates were checked by PCR for the absence of *coatB* with the primers Pf6_coatB_BG_5' and Pf6_coatB_BD_3' (Annex 2). Deletion of the *aacCA1* gene in strain PP0037 led to strains LMG12228 Δ Pf4::FRT, Δ coatB::FRT, which were named PP0052 and PP0053, and verified by PCR for the absence of *aacCA1* as above.

Since both *rep* and *coatB* deletions were successful, the PP0060 strain LMG12228 Δ Pf4::FRT, Δ rep::FRT was kept for the next steps rather than LMG12228 Δ Pf4::FRT, Δ coatB::FRT strains. Indeed, the deletion of Pf6 *coatB* gene prevent the prophage to be released in the environment, however it does not stop the phage from replicating itself. If Pf6 excises itself and begins its replication cycle, the DNA produced will be considered as residual host DNA. This will raise the level of residual host DNA found in the pharmaceutical phage productions.

C. Deletion of *exoA*

For this final deletion, no selection of the *exoA* deleted clones was available (see Methods): the clones in which the pop-out recombination occurred have a 50% probability to be wild-type clones and 50% probability to be deletion type clones. This is why, more clones were tested by PCR than for the previous deletion.

To delete *exoA*, pMB06 was introduced into PP0060 by conjugation. Ex-conjugants were selected on gentamicin, here in the backbone of the vector and not in place of the *exoA* gene. Then to select for plasmid removal, three gentamicin resistant clones were plated on LB sucrose and incubated at 30°C for 24 hours. Seventeen sucrose resistant clones were patched on LB and on LB gm to detect clones in which the pop-out recombination occurred, as shown in Figure 7. Seven gentamicin sensitive colonies were obtained and tested by PCR for the deletion of *exoA* with the primer *exoA*_BG_5' and *exoA*_BD_3'. Four clones showing the deletion led to the final strains PP0067, PP0068, PP0069 and PP0070.

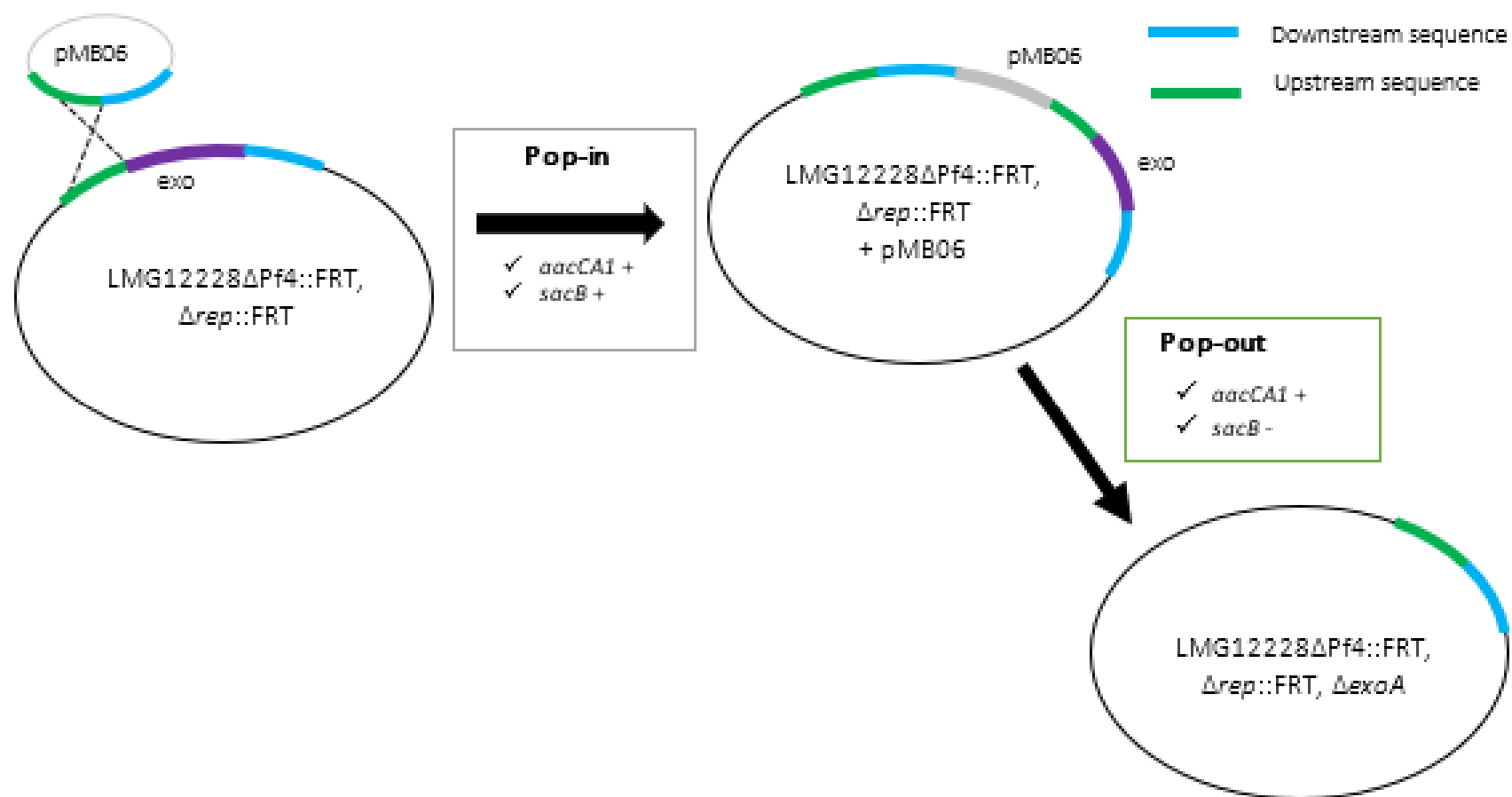


Figure 7: Steps for the deletion of *exoA*

D. PCR verification for the final construction

All along this work, strains' integrity was checked by PCR. Again, when the construction of the desired strain was achieved, called "LMG12228_3Δ", all PCR analyses were recapitulated as shown in Figure 11 below. Four candidates of the LMG12228_3Δ construction are shown (strains PP0067 to PP0070) and compared to their WT ancestor, LMG12228, as well as to the intermediate strain PP0008 in which only Pf4 is deleted and replaced by gene *aacCA1*, while *repM*, as well as *exoA* are intact.

i. Pf4 region

Final candidates were checked by three series of PCR in the Pf4 region, with

- primers flanking the Pf4 sequence on the chromosome to probe the complete removal of Pf4 prophage (Pf4_del_5' and Pf4_del_3');
- primers in the excisionase gene (Pf4_xis_5' and Pf4_xis_3') to probe the absence of free replicative Pf4 form;
- primers flanking *aacCA1* (GmF and GmR), to verify the absence of this gene. Results are shown on figure 11.

Verification of the Pf4 region after prophage deletion

PCR with primers set at the prophage border on the bacterial chromosome permitted to estimate the deletion size. In Figure 11 panel C, a band is visible of a size ~ 1500 pb, as expected for the regular deletion of the Pf4 prophage for strains PP0067 to PP0070. We observed that a light band was visible for the negative control LMG12228: this is normal, as a sub-population of the Wild-Type strain has Pf4 excised naturally.

Detection of the Pf4 excisionase

Panel A of figure 11 shows that no excisionase band was visible for the four strains PP0067 to PP0070, whereas the LMG12228 WT (= positive control) allowed the amplification of a band at 500pb, as expected. This indicates the absence of Pf4, neither integrated in the bacterial chromosome nor in a plasmidic form.

Absence of *aacCA1*

Panel B figure 11 shows that a band is visible for strain PP0008 (ΔPf4::FRT-*aacCA1*-FRT) as expected. It also reveals a faint band for strain PP0067, suggesting that the *aacCA1* gene is still present in a fraction of the PP0067 culture stock. This strain was therefore eliminated from the potential candidates. Finally, for strains PP0068 to PP0070, no band was visible, confirming the deletion of the gene in the total population of these clones.

ii. *Pf6* region

To examine the *Pf6* region, a set of primers flanking the *rep* gene (*Pf6_rep_BG_5'* and *Pf6_rep_BD_3'*) were used. Panel D of figure 11 shows that with these primers, a band is visible at 2500 bp for the LMG12228 initial strain, as expected. It is replaced by a shorter, 1000 bp band in all final clones. This corresponds to the size expected for the deletion of the *rep* gene. We conclude that *rep* is deleted in all the clones.

iii. *exoA* region

A similar strategy was used to analyse the *exoA* region: with the set of primers flanking *exoA* (*exoA_BG_5'* and *exoA_BD_3'*), a 654 bp long band should be present if the *exoA* gene is deleted, versus a 2500 bp long band, if the gene is intact. Panel E of figure 11, shows that all clones, PPO067 to PPO070, produce the short band, contrary to the LMG12228 which generates the 2500 bp band. We conclude to the deletion of the *exoA* gene in all the clones.

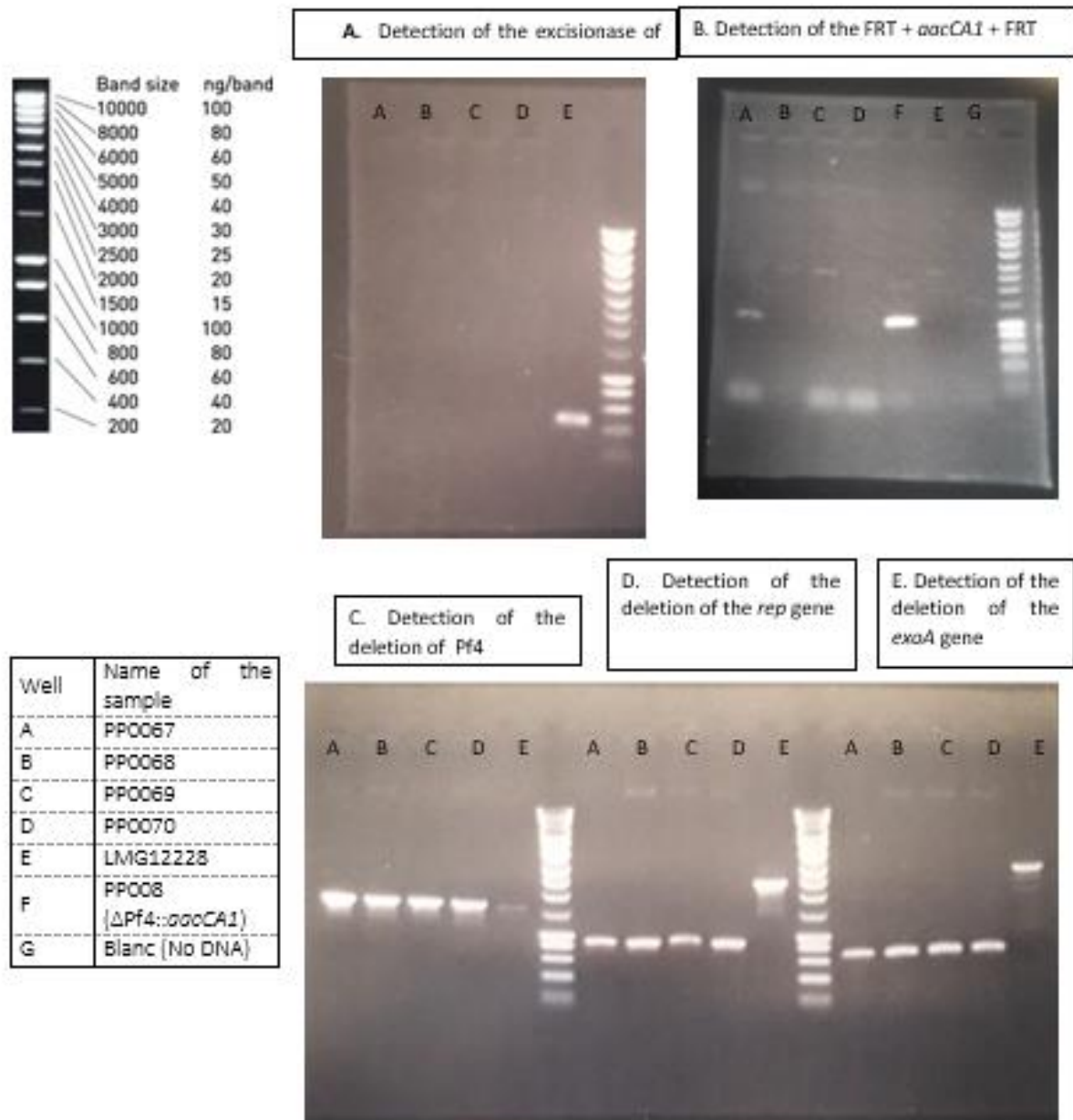


Figure 11: Results of the PCR on the clones PP0067, PP0068, PP0069 and PP0070 ($=\Delta Pf4::FRT \Delta rep ::FRT \Delta exoA$), and the control strains LMG12228 and PP0008 ($= \Delta Pf4::aacCA1$)

III. Conclusion

The verifications made by PCR confirmed the clones PP0068, PP0069 and PP0070 to be $\Delta Pf4::FRT$, $\Delta rep::FRT$, $\Delta exoA$. The strain PP0068 has been sent to Pherecydes Pharma at Romainville, after being plated on a Petri dish with LB (Reference file: 20200221_TransfertLMG122283delta.pdf).

The bacteriophages bank of Pherecydes Pharma has already the nomenclature: PPxxxx. To avoid any confusion, the strain PP0068 is re-named: "LMG12228 3Δ".

LMG12228 3Δ DNA was sent to be sequenced, in order to see if there is any mutation.

IV. References

- B.Burgener Elisabeth et al., (2019) Filamentous bacteriophages are associated with chronic *Pseudomonas* lung infections and antibiotic resistance in cystic fibrosis. *Science Translational Medicine*.
- Choi K-H, Schweizer H. (2005) An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. *BMC Microbiol* 5: 30–40.
- Hmelo L.R. et al., Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange, *Nat Protoc.* (2015) Nov; 10(11): 1820–1841.
- Hoang, T. T et al., (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212, 77–86.
- Horton RM, Cai Z, Ho SN, Pease LR . (1990) Gene splicing by overlap extension: tailor made genes using the polymerase chain reaction. *biotechniques* 8: 528–535. Norm S.-C.
- Lin and David Pratt (1972), Role of bacteriophage M13 Gene 2 in Viral DNA Replication, *J.Mol.Bio* (1972) 72, 37-49.
- Rice, S. A. et al., (2009) The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *The ISME Journal* 3, 271–282.
- Sweere, J. M. et al. (2019) Bacteriophage trigger antiviral immunity and prevent clearance of bacterial infection. *Science* 363 (2019).

V. Annexes

Annex 1A: List of published plasmids used for the constructions

Plasmid name	Accession number	Genes / Loci	Gene function	Origin
pEX18ApGW	AY928469	<i>bla</i>	β -lactamase-encoding gene, conferring resistance to carbenicillin	S.Rice
		<i>sacB</i>	<i>Bacillus subtilis</i> levansucrase-encoding gene, which makes sucrose toxic to the bacteria.	
		<i>ori</i>	ColE1-derived replication origin	
		<i>oriT</i>	origin of conjugal transfer	
		attR1 and attR2	bacteriophage λ recombination sites	
		<i>cat</i>	chloramphenicol acetyl transferase-encoding gene	
		<i>codB</i>	gene encoding gyrase-modifying enzyme	
pEXG2	KM887143	<i>sacB</i>	<i>Bacillus subtilis</i> levansucrase-encoding gene, which makes sucrose toxic to the bacteria.	Isabelle Vallet-Gely - CNRS
		<i>ori</i>	origin of replication	
		<i>oriT</i>	origin of conjugation	
		<i>aacCA1</i>	gentamicin -3-acetyltransferase	
		<i>rep_origin</i>	region containing broad-host-range origin of replication from pRO1600	
pFlp2	AF048702	<i>rep</i>	replication protein encoding gene	Isabelle Vallet-Gely - CNRS
		<i>sacB</i>	<i>Bacillus subtilis</i> levansucrase-encoding gene, which makes sucrose toxic to the bacteria.	
		<i>flp</i>	Flp recombinase encoding gene	
		<i>cI</i>	lambda repressor	
		<i>bla</i>	β -lactamase-encoding gene, conferring resistance to carbenicillin	
		<i>FRT + aacCA1 + FRT</i>	FRT sites flanking a gentamicin -3-acetyltransferase	
pPS856	Hoang et al. 1998			S.Rice

Annex 1B: Summary table of plasmid constructions

Plasmid name	Plasmid description	Insert				Vector		Origin
		Gene amplified by PCR	DNA template	Ol. 1 for PCR / ol. pair 1 for SOE PCR	Ol. 2 for PCR/ ol pair 2 for SOE PCR	Original plasmid	Digested by	
pMB01	For complete Pf4 deletion	FRT + <i>aacCA1</i> +FRT flanked by PAO1 regions	PAO1ΔPf4:: <i>aacA1</i>	Pf4_BG_5'	Pf4_BD_3'	pEX18ApGW	<i>Kpn I-Hind III</i>	This study
pMB03	For Pf6 <i>rep</i> deletion	FRT + <i>aacCA1</i> +FRT flanked by PAO1 regions	pPS856 and LMG12228	Pf6_rep_BG_5' and Pf6_rep_BG_3'	Pf6_rep_BD_5' and Pf6_rep_BD_3'	pEX18ApGW	<i>Kpn I-Hind III</i>	This study
pMB02	For Pf6 <i>coatB</i> deletion	FRT + <i>aacCA1</i> +FRT flanked by PAO1 regions	pPS856 and LMG12228	Pf6_coatB_BG_5' and Pf6_coatB_BG_3'	Pf6_coatB_BD_5' and Pf6_coatB_BD_3'	pEX18ApGW	<i>Kpn I-Hind III</i>	This study
pMB06	For <i>exoA</i> deletion	Left and right flanks of <i>exoA</i> on LMG12228	LMG12228	<i>exoA</i> _BG_5' and <i>exoA</i> _BG_3'	<i>exoA</i> _BD_5' and <i>exoA</i> _BD_3'	pEXG2	<i>EcoRI-Hind III</i>	This study

Annex 2: List of primers



Name	Description	Sequence
GmF	forward primer for the amplification of the gentamicin cassette	CGAATTAGCTTCAAAAGCGCTCTGA
GmR	reverse primer for the amplification of the gentamicin cassette	CGAATTGGGGATCTTGAAGTTCCT
Pf4_BG_5'	forward primer for the amplification of Pf4 left border (restriction enzyme: KpnI)	CATGGTACCTGGCAGCAGACCCAGGACGC
Pf4_BG_3'	reverse primer for the amplification of Pf4 left border	AGGAACTTCAAGATCCCCAATTGCGTCATGAGCTTGGGAAGCT
Pf4_BD_5'	forward primer for the amplification of Pf4 right border	TCAGAGCGCTTTGAAGCTAATTCGGA TCCCAATGCAAAAGCCCC
Pf4_BD_3'	reverse primer for the amplification of Pf4 right border (restriction enzyme: HindIII)	CATAAGCTTCTGGGAATACGACGGGGGC
Pf4_del_5'	forward primer to confirm the deletion of Pf4	GGCAACCTGGTCAACGAAAC
Pf4_del_3'	reverse primer to confirm the deletion of Pf4	TCGAGCGGAAGTGATACGAG
Pf6_rep_BG_5'	forward primer for the amplification of the left border of Pf6 <i>rep</i> gene (restriction enzyme: KpnI)	CATGGTACCAGTAGCGTTGCTCGTGA TTG
Pf6_rep_BG_3'	reverse primer for the amplification of the left border of Pf6 <i>rep</i> gene	AGGAACTTCAAGATCCCCAATTGCGGCGATATGACGGTACGCAAG
Pf6_rep_BD_5'	forward primer for the amplification of the right border of Pf6 <i>rep</i> gene	TCAGAGCGCTTTGAAGCTAATTCGATCATTGTGCCTCCAG
Pf6_rep_BD_3'	reverse primer for the amplification of the right border of Pf6 <i>rep</i> gene (restriction enzyme: HindIII)	CATAAGCTTGCTGCGCCTGTTGATCTG
Pf6_coatB_BG_5'	forward primer for the amplification of the left border of Pf6 <i>coatB</i> gene (restriction enzyme: KpnI)	CATGGTACCTAATTGCAGAAGCCCGTCGTG
Pf6_coatB_BG_3'	reverse primer for the amplification of the left border of Pf6 <i>coatB</i> gene	AGGAACTTCAAGATCCCCAATTGCTATGAAAGCCCGTGACCAG
Pf6_coatB_BD_5'	forward primer for the amplification of the right border of Pf6 <i>coatB</i> gene	TCAGAGCGCTTTGAAGCTAATTCGAA GAAGTGACGCGACCCAG
Pf6_coatB_BD_3'	reverse primer for the amplification of the right border of Pf6 <i>coatB</i> gene (restriction enzyme: HindIII)	CATAAGCTTCAAGGCCTAAGCCGTAG GAG
exoA_BG_5'	forward primer for the amplification of the left border of <i>exoA</i> (restriction enzyme: HindIII)	CATAAGCTTCTCGATAGTCGCCAGGAC AC
exoA_BG_3'	reverse primer for the amplification of the left border of <i>exoA</i> (restriction enzyme: BamHI)	CATGGATCCGAAGGATGAGGCTGATC GAG

exoA_BD_5'	forward primer for the amplification of the right border of <i>exoA</i> (restriction enzyme: BamHI)	CATGGATCCATCCTGATAGGTAATCCG C
exoA_BD_3'	reverse primer for the amplification of the right border of <i>exoA</i> (restriction enzyme: EcoRI)	CATGGAATTCGGACATCACCGAGTAG ATGC
pEX18Ap_5'	forward primer for the verification of the construction of plasmids pMB02 and pMB03	CTGCAACTGTTGGGAAG
pEX18Ap_3'	reverse primer for the verification of the construction of plasmids pMB02 and pMB03	GAGTTAGCTCACTCATTAG
pEXG2_5'	forward primer for the verification of the construction of plasmid pMB06	ATAGTGAACGGCAGGTAAGC
pEXG2_3'	reverse primer for the verification of the construction of plasmid pMB06	GTCCTCAACGACAGGAGCAC
Pf4_xis_5' (Pf4 excisionase)	forward primer for the verification of the presence or absence of Pf4	CAGGCACTCCATTCTCTGTTT
Pf4_xis_3' (Pf4 excisionase)	reverse primer for the verification of the presence or absence of Pf4	TCTTCCGTGCTCACGCGAATC
Pf4_recBact_5' (Pf4 deletion)	forward primer for the verification of the deletion of Pf4	GGCAACCTGGTCAACGAAAC
Pf4_recBact_3' (Pf4 deletion)	reverse primer for the verification of the deletion of Pf4	TCGAGCGGAAGTGATACGAG

Annex 3: Bacterial strains used for the constructions

Strain name	Characteristics / Genotype	Source
<i>E. coli</i>		
JM105	endA1 glnV44 sbcB15 rpsL thi-1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR4(rK-mK+)	INRAE Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Gene 33, 103
B2163	RP4-2- <i>tc</i> ::Mu, Δ <i>dapA</i> ::(erm ₊ <i>pir</i>)	INRAE - Demarre, G., <i>et al.</i> (2005). Res. Microbiol. 156:245-255
<i>P. aeruginosa</i>		
LMG12228	Pch+, biohazard group 2, contains prophages Pf4 and Pf6	Bank of the University of Ghent
PAO1 ΔPf4	Pch+, biohazard group 2, contains prophage Pf6	S.Rice (2009)
PP0008	LMG12228 delta_Pf4:: <i>oacCA1</i>	This work
PP0009	LMG12228 delta_Pf4:: <i>oacCA1</i> , different clone	This work
PP0010	LMG12228 delta_Pf4:: <i>oacCA1</i> , different clone	This work
PP0012	PP0008 delta_Pf4::FRT	This work
PP0013	PP0008 delta_Pf4::FRT, different clone	This work
PP0046	PP0012 delta_repPf6:: <i>oacCA1</i>	This work
PP0047	PP0012 delta_repPf6:: <i>oacCA1</i> , different clone	This work
PP0048	PP0012 delta_repPf6:: <i>oacCA1</i> , different clone	This work
PP0060	PP0046 delta_repPf6::FRT	This work
PP0061	PP0046 delta_repPf6::FRT , different clone	This work
PP0037	PP0012 delta_coatBPf6:: <i>oacCA1</i>	This work
PP0038	PP0012 delta_coatBPf6:: <i>oacCA1</i> , different clone	This work
PP0039	PP0012 delta_coatBPf6:: <i>oacCA1</i> , different clone	This work
PP0052	PP0037 delta_coatBPf6::FRT	This work
PP0053	PP0037 delta_coatBPf6::FRT, different clone	This work
PP0068, also named LMG 3 delta	PP0060 delta_exoA	This work. The starting strain for the construction of the new production strain is the batch 12072017 from Pherecydes Pharma
PP0069	PP0060 delta_exoA	This work
PP0070	PP0060 delta_exoA	This work

Titre : Les bacteriophages : des alliés dans le combat contre l'antibiorésistance

Mots clés : virome, porc, prophage, *Pseudomonas aeruginosa*, phagothérapie, interactions phages-bactéries

Résumé :

Ces dernières années, le traitement des infections bactériennes est devenu problématique : les bactéries ont développé des multi-résistances aux antibiotiques, rendant les traitements parfois inefficaces.

L'une des problématiques de l'antibiorésistance est que les gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs) peuvent se transmettre horizontalement d'une bactérie à une autre sur des éléments génétiques mobiles. Les bactériophages (dits phages, c'est à dire les virus attaquant spécifiquement les bactéries) en faisant partie, je me suis demandée s'ils présentaient eux aussi un risque de transmission des ARGs. Pour cela, la partie virale (virome) de 14 échantillons de feces de porcs a été étudiée, et a permis d'établir que la probabilité de trouver un ARG dans un génome de phage actif est environ 1000 fois plus basse que celle d'en trouver dans un génome de bactérie. Sur la base de cette étude d'échantillons fécaux de porcs, il s'avère que les phages ne sont pas des vecteurs importants de transmission des ARGs, contrairement aux plasmides et aux ICEs.

Une manière de traiter les infections multi-résistantes est la phagothérapie. La deuxième partie de ma thèse, qui est une thèse CIFRE co-encadrée par Pherecydes Pharma, a consisté à relever certains des défis rencontrés par une entreprise de production de phages thérapeutiques. Pour une phagothérapie optimale, il convient entre autres d'utiliser pour la production des

phages thérapeutiques une souche bactérienne contenant un minimum de facteur de virulence, de gènes de résistance aux antibiotiques et de prophages, et de caractériser les mutants résistants aux phages qui pourraient émerger lors du traitement. La souche de production *Pseudomonas aeruginosa* LMG12228 a été génotypiquement caractérisée, puis génétiquement optimisée afin de répondre à ces critères. J'ai montré que la souche résultante avait conservé ses performances de production des phages virulents.

Dans un second temps, les récepteurs des phages anti-*Pseudomonas* sélectionnés par l'entreprise ont été recherchés pour anticiper l'évolution vers la résistance des bactéries infectées, et estimer la fréquence des événements. Ceci m'a permis de caractériser pour la première fois le récepteur des deux phages de l'espèce Luz24, composé des exopolysaccharides codés par l'opéron *psl*.

En testant différents milieux de culture de plus en plus proches des conditions d'infection chez l'homme (anaérobiose, croissance lente, milieu pauvre), j'ai aussi mis en évidence que la croissance des phages sélectionnés par l'entreprise était fortement dépendante du milieu.

En conclusion, bien que la législation doive encore être précisée, les phages semblent être en bonne voie pour devenir une alternative aux antibiotiques et lutter contre l'antibiorésistance.

Title : Bacteriophages: allies in the fight against antibiotic resistance

Keywords : virome, pig, prophage, *Pseudomonas aeruginosa*, phage therapy, phage-bacteria interactions

Abstract :

In recent years, the treatment of bacterial infections has become problematic: bacteria have developed multidrug resistance to antibiotics, making treatments sometimes ineffective.

One of the problems of antibiotic resistance is that antibiotic resistance genes (ARGs) can be transmitted horizontally from one bacterium to another on mobile genetic elements. Bacteriophages (phages, i.e. viruses that specifically attack bacteria) being part of this, I wondered if they also presented a risk of transmission of ARGs. For this purpose, the viral part (virome) of 14 samples of pig feces was studied, and it was established that the probability of finding an ARG in an active phage genome is about 1000 times lower than that of finding one in a bacterial genome. Based on this study of swine fecal samples, it turns out that phages are not important vectors for ARG transmission, unlike plasmids and ICEs.

One way to treat multidrug-resistant infections is phage therapy. The second part of my thesis, which is a CIFRE thesis co-supervised by Pherecydes Pharma, consisted in addressing some of the challenges faced by a company producing therapeutic phages. For an optimal phage therapy, it is necessary to use for the production of therapeutic phages a bacterial strain containing a minimum of virulence factor,

antibiotic resistance genes and prophages, and to characterize the phage resistant mutants that could emerge during the treatment. The production strain *Pseudomonas aeruginosa* LMG12228 was genotypically characterized and then genetically optimized to meet these criteria. I showed that the resulting strain retained its virulent phage production performance.

In a second step, the receptors of the anti-*Pseudomonas* phages selected by the company were searched to anticipate the evolution towards resistance of the infected bacteria, and to estimate the frequency of the events. This allowed me to characterize for the first time the receptor of the two phages of the Luz24 species, composed of the exopolysaccharides encoded by the *psl* operon.

By testing different culture media more and more similar to human infection conditions (anaerobic, slow growth, poor medium), I also demonstrated that the growth of the phages selected by the company was strongly dependent on the medium.

In conclusion, although the legislation still needs to be clarified, phages seem to be on the right track to become an alternative to antibiotics and to fight against antibiotic resistance.