



**HAL**  
open science

# Impact des phages tempérés sur la stabilité du microbiote intestinal : la lysogénie n'est pas un long fleuve tranquille

Jeffrey Cornuault

► **To cite this version:**

Jeffrey Cornuault. Impact des phages tempérés sur la stabilité du microbiote intestinal : la lysogénie n'est pas un long fleuve tranquille. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLA020 . tel-02276624

**HAL Id: tel-02276624**

**<https://theses.hal.science/tel-02276624>**

Submitted on 3 Sep 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Impact des phages tempérés sur la stabilité du microbiote intestinal : la lysogénie n'est pas un long fleuve tranquille

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à AgroParisTech

**École doctorale n°581 agriculture, alimentation, biologie,  
environnement et santé (ABIÉS)**  
Spécialité de doctorat: Microbiologie

Thèse présentée et soutenue à Jouy en Josas, le 27 Septembre 2018, par

**Jeffrey Cornuault**

Composition du Jury :

M. Colin Tinsley Professeur, AgrosParisTech (unité MICALIS)	Président
M. David Bikard Responsable d'équipe, Institut Pasteur	Rapporteur
M. Harald Brüssow Visiting scientist, Université de Leuven (Institute of Gene Technology)	Rapporteur
Mme Ariane Bize Chargée de recherche, IRSTEA (BIOMIC)	Examineur
Mme Sylvie Miquel Maître de conférences, Université d'Auvergne (UMR 6023)	Examineur
Mme Marie-Agnès Petit Directrice de recherche, INRA (unité MICALIS)	Directrice de thèse
Mme Marianne De Paepe Chargée de recherche, INRA (unité MICALIS)	Co-Encadrante de thèse
M. Harry Sokol Pr, Médecin chercheur AP-HP (Hôpital Saint-Antoine)	Co-Encadrant de thèse

# Table des matières

Liste des Figures .....	3
Liste des Tableaux .....	5
Liste des abréviations.....	6
<b>Introduction bibliographique.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Diversité et évolution des bactériophages .....</b>	<b>8</b>
1.1 Historique de l'étude des bactériophages .....	8
1.2 Classification des phages.....	9
1.3 Phages virulents et phages tempérés .....	11
1.4 Les prophages défectifs et leurs dérivés .....	15
<b>2. Etablissement et sortie de la lysogénie .....</b>	<b>17</b>
2.1 Le paradigme du phage lambda .....	17
2.2 Les phages de mycobactéries.....	20
2.3 L'arbitrium du phage Phi3T .....	22
2.4 Le choix lyse-lysogénie, un mécanisme subtil.....	23
2.5 Evolution des phages tempérés vers la virulence : les ex-tempérés .....	23
2.6 L'induction spontanée des prophages (SPI) .....	24
2.7 L'induction des prophages provoquée par un stress .....	25
<b>3. Impact des phages sur les populations bactériennes.....</b>	<b>27</b>
3.1 Impact par la prédation.....	27
3.2 Avantages de la lysogénie sur la valeur sélective bactérienne .....	34
3.3 Aspect négatif de la lysogénie sur la valeur sélective de la bactérie .....	38
3.4 Impact écologique des interactions phage-bactéries .....	40
<b>4. Phages et microbiote intestinal .....</b>	<b>42</b>
4.1 Le microbiote intestinal humain .....	42
4.2 Les dysbioses intestinales liés aux MICI et espèces bactériennes clés .....	47
4.3 Rôle des phages dans la stabilité du microbiote intestinal humain.....	51
4.4 Impact des phages sur la composition du microbiote .....	54
<b>Résultats .....</b>	<b>58</b>
Avant-propos.....	59
<b>1. Etude des prophages dans un modèle de microbiote intestinal simplifié composé de 5 souches du microbiote humain.....</b>	<b>61</b>
1.1 Prédiction bioinformatique des prophages.....	61
1.2 Validation expérimentale de l'activité des prophages.....	63

1.1	Activité phagique dans le tube digestif de souris dans le modèle à 5 souches .....	67
2.	<b>Activité du prophage SopE<math>\phi</math> de Salmonella en lien avec l'inflammation intestinale</b> .....	69
3.	<b>Essai de guérison de prophage sans outils génétiques</b> .....	70
3.1	Détermination des molécules inductrices des prophages de la souche LF82.....	71
3.2	Essai de guérison des souches.....	73
4.	<b>Etude des prophages de <i>F. prausnitzii</i></b> .....	75
4.1	Etude des prophages de 14 souches de <i>F. prausnitzii</i> .....	75
4.2	Article 1 .....	78
5.	<b>Evolution en souris du prophage Shimadzu de <i>R. intestinalis</i> L1-82 vers la virulence</b> .....	104
5.1	Description des prophages de <i>R. intestinalis</i> L1-82.....	104
5.2	Manuscrit de l'article 3.....	108
6.	<b>Impact de l'inflammation intestinale sur l'activité des prophages de <i>R. intestinalis</i></b> .....	143
6.1	Modèle inflammatoire sur des souris colonisées depuis 3 semaines par <i>R. intestinalis</i> 143	
6.2	Modèle inflammatoire sur des souris colonisées depuis deux jours avec <i>R. intestinalis</i> 150	
6.3	Séquençage d'isolats de <i>R. intestinalis</i> .....	154
	<b>Conclusion</b> .....	158
	<b>Références bibliographiques</b> .....	165
	<b>Annexes</b> .....	188
1.	Prophages de <i>E. coli</i> LF82 .....	188
2.	Prophages de <i>R. gnavus</i> .....	189
3.	Liste des primers utilisés dans ce travail .....	190
4.	Article 2 .....	191



# Liste des Figures

<b>Figure 1:</b> Les différentes familles de phages. ....	10
<b>Figure 2 :</b> Etapes des cycles lytique, lysogénique, chronique ou pseudolysogénique. ....	14
<b>Figure 3:</b> Module de lysogénie du phage $\lambda$ . ....	18
<b>Figure 4:</b> Mécanisme décisionnel lyse-lysogénie des phages utilisant le modèle de l'immunité intégration dépendante chez <i>M. segmatis</i> . ....	21
<b>Figure 5:</b> Fonctionnement de l' <i>arbitrium</i> pour le phage Phi3T de <i>Bacillus subtilis</i> . ....	22
<b>Figure 6:</b> Facteurs intervenant dans l'induction des prophages ....	26
<b>Figure 7:</b> Mécanismes de résistance de la bactérie à l'infection phagique. ....	29
<b>Figure 8 :</b> Coévolution entre <i>E. coli</i> et le bactériophage PP01 <i>in vitro</i> ....	30
<b>Figure 9:</b> Stabilité des communautés bactériennes à l'échelle du taxon ....	31
<b>Figure 10 :</b> Fonctionnement général du DGR. ....	32
<b>Figure 11:</b> Modèles d'interactions phages-bactéries. ....	41
<b>Figure 12:</b> Localisation des différents groupes bactériens de la flore intestinale dans le tube digestif, et leur évolution avec l'âge. ....	43
<b>Figure 13:</b> Composition du microbiote intestinal humain, en termes de genre bactérien ou de groupe bactérien. ....	45
<b>Figure 14 :</b> Arbre phylogénétique d'une partie des Clostridium. ....	50
<b>Figure 15:</b> Evolutions de populations dans le tube digestif entre la naissance de l'enfant et ses trois ans. ....	52
<b>Figure 16:</b> BlastN d'une région suspectée d'héberger deux prophages chez <i>R. gnavus</i> ATCC 29149 (AAYG02000016.1). ....	62
<b>Figure 17:</b> Test PCR utilisé pour la mise en évidence de l'activité d'excision d'un prophage. ....	64
<b>Figure 18 :</b> Comparaison des génomes des prophages Gally et Perceval. ....	65
<b>Figure 19 :</b> Mapping des reads issus du séquençage de l'ADN contenu dans des capsides dans le surnageant de culture de <i>R. intestinalis</i> L1-82. ....	67
<b>Figure 20:</b> Titration du phage $\lambda$ extrait de fèces de souris, selon un comptage par la formation de plages de lyse, ou une quantification par PCR quantitative. ....	68
<b>Figure 21:</b> Quantification des phages SopE $\phi$ dans les fèces de souris dans différentes situations inflammatoires. ....	70
<b>Figure 22:</b> Principe général de la technique de guérison des souches pour leurs prophages actifs. .	71
<b>Figure 23:</b> Cinétiques de croissance d' <i>E. coli</i> LF82 en présence de différentes molécules potentiellement inductrices des prophages. ....	72
<b>Figure 24:</b> Quantification de la production de virions par les prophages de la <i>E. coli</i> LF82 ....	72
<b>Figure 25:</b> Plan d'expérience pour tester l'effet de l'inflammation intestinale sur l'induction des prophages de <i>R. intestinalis</i> . ....	143
<b>Figure 26 :</b> Caractérisation de l'inflammation intestinale déclenchée par addition de DSS dans l'eau de boisson des souris. ....	144
<b>Figure 27:</b> Evolution de la population intestinale de <i>R. intestinalis</i> dans les fèces ....	145
<b>Figure 28 :</b> Evolution de la population du phage Jekyll dans les différentes cages de l'expérience ....	146
<b>Figure 29 :</b> Corrélation entre le ratio Shimadzu/ <i>R. intestinalis</i> dans les souris de la cage DSS 2 au cours de l'expérience, et l'intensité d'inflammation de ces souris. ....	147
<b>Figure 30 :</b> Evolution de la population du phage Shimadzu dans les différentes cages de l'expérience ....	148
<b>Figure 31:</b> Caractérisation du phénotype des clones de <i>R. intestinalis</i> isolés de la cage DSS 3 ....	149

<b>Figure 32</b> : Plan d'expérience pour tester l'effet de l'inflammation intestinale sur l'induction des prophages de <i>R. intestinalis</i> .....	150
<b>Figure 33</b> : Caractérisation de l'inflammation des souris traitées au DSS après une colonisation courte par <i>R. intestinalis</i> .....	151
<b>Figure 34</b> : Evolution de la population de <i>R. intestinalis</i> dans les différentes conditions expérimentales testées.....	153
<b>Figure 35</b> : Evolution des populations de phages de <i>R. intestinalis</i> dans les expériences de colonisation courte avec la souche <i>evo1</i> .....	153

# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1:</b> points communs et différences entre la lysogénie instable, la pseudolysogénie et l'état porteur. ....	14
<b>Tableau 2:</b> Etat de l'assemblage des génomes bactériens disponibles au NCBI en Décembre 2014. ....	61
<b>Tableau 3 :</b> les différentes régions génomiques prédites comme prophages.....	62
<b>Tableau 4 :</b> Quantités de phage mesurés dans les fèces de souris colonisées avec la flore simplifiée à 5 souches. ....	68
<b>Tableau 5 :</b> liste des isolats de <i>R. intestinalis</i> séquencés.....	155
<b>Tableau 6 :</b> mutations observées dans les différents mutants, en fonction de leur phénotype. ....	157

# Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADN db : Acide désoxyribonucléique double brin

ADN sb : Acide désoxyribonucléique simple brin

AIEC : Adhéro-invasive *E. coli*

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

CFU : colony forming unit

CRISPRs: Clustered Regularly interspaced Short Palindromic Repeats

DGR : Diversity generating retroelement

DSS: Dextran Sulfate Sodium

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

LB: Lysogenic broth

M.O.I : multiplicity of infection

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase chain reaction

PFU : plaque-forming unit

pH : Potentiel Hydrogène

qPCR : quantitative PCR

ROS : Reactive oxygen species

SNP: Single nuclear polymorphism

VLP : virus like particles

UV: Ultraviolet

# Introduction bibliographique

# 1. Diversité et évolution des bactériophages

## 1.1 Historique de l'étude des bactériophages

Les bactériophages (dit également « phages ») sont les virus infectant spécifiquement les bactéries. Ceux-ci ont été découverts au début du XX<sup>ème</sup> siècle et de manière indépendante par deux chercheurs, Alan Twort et Félix d'Hérelle (D'Herelle 2007, Twort 1915). En 1915, Twort isole des phages sur des bactéries du genre *Micrococcus*, mais ne précise pas la nature de l'agent isolé. Deux ans plus tard, D'Hérelle isole un agent lysant de *Shigella dysenteriae*. Convaincu de la nature virale de l'agent découvert, il propose pour le désigner d'utiliser le terme de « bactériophage », signifiant « mangeur de bactéries » en Grec. Cette hypothèse virale ne sera confirmée qu'une vingtaine d'années plus tard, avec la première observation d'un phage par microscopie électronique (Ruska 1940). Dès la découverte des phages, F. D'Hérelle a l'idée de les utiliser comme agent antibactérien en médecine. Cette pratique est nommée par la suite phagothérapie et les phages sont ainsi étudiés et utilisés pour des applications thérapeutiques jusqu'aux années 30. La découverte des antibiotiques éclipse alors la phagothérapie en Occident. Celle-ci va perdurer néanmoins en URSS et en Europe de l'est, notamment à l'Institut Eliava en Géorgie, où D'Hérelle a travaillé.

A partir des années 1940, un groupe de recherche se forme, réunissant physiciens, biologistes et chimistes, dont Salvador Luria et Max Delbrück. Ce groupe, appelé par la suite « le groupe phage », utilise les phages comme des organismes modèles afin d'étudier les principes moléculaires de la vie et s'en servir en tant qu'outils génétiques. Ce groupe de chercheurs a contribué à de nombreuses grandes découvertes, à commencer par la nature aléatoire des mutations, comme prédite par la théorie de l'évolution darwinienne (Luria 1943). Une autre découverte importante est la confirmation que l'ADN constitue bien le support de l'hérédité, confirmant les conclusions des expériences d'Avery, Macleod et MacCarty en 1944 (Avery et al 1944, Hershey et al 1952). La même année, Zindler et Lederberg découvrent le phénomène de transduction chez Salmonelle (Zinder et al 1952). Les travaux de ce groupe furent notamment récompensés par un prix Nobel en 1969, récompensant Delbruck, Hershey et Luria pour la découverte « des mécanismes de réplication et la structure génétique des virus ».

L'intérêt pour les phages en tant qu'organismes modèles se confirmera à travers les travaux de Jacob et Monod, qui les utilisèrent afin de comprendre le contrôle de l'expression génétique (Jacob & Monod 1961). Ces travaux furent également salués par un prix Nobel remis à Jacob, Monod et Lwoff pour « leurs découvertes concernant le contrôle génétique des enzymes et la synthèse virale ».

L'étude approfondie de la biologie des phages a également permis le développement d'outils moléculaires, aujourd'hui utilisés un peu partout. On peut citer, entre autres exemples, le système d'expression de gènes basé sur la polymérase du phage T7 ; la polymérase du phage  $\phi$ 29 utilisée

notamment dans la technologie Pacbio ; ou encore des systèmes de recombinaison site-spécifique comme le Cre-Lox et le système Wanner-Datsenko (Datsenko & Wanner 2000, Eid et al 2009, Sauer 1987, Studier et al 1986). Le système du « phage display », inventé en 1985, est aujourd'hui une des techniques de prédilection dans la recherche contre le cancer (Smith et al 1985), (Wu et al 2016).

Durant les années 80, l'étude des phages a connu un déclin, mais, aujourd'hui, on observe une tendance inverse. Ce retour en grâce est dû premièrement au regain d'intérêt accordé à la phagothérapie et ce afin de faire face à l'émergence d'un grand nombre de pathogènes bactériens chez l'Homme, devenus multi-résistants aux antibiotiques (Kutter et al 2015). La description (ou la redécouverte) d'un mécanisme de résistance des bactéries à l'infection par les phages, appelé système CRISPR-cas (pour « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats » et CRISPR-associated proteins), a récemment permis le développement de la technologie CRISPR-Cas9, qui constitue un nouvel outil pour l'édition génomique (Barrangou et al 2007, Bolotin et al 2005). Enfin, un nombre grandissant de travaux font état du rôle écologique des phages sur des écosystèmes globaux, comme l'environnement marin par exemple.

## 1.2 Classification des phages

Les phages sont les entités biologiques les plus abondantes sur terre, mais également les plus diversifiées (Breitbart 2005, Rohwer et al 2003). La classification des micro-organismes se base aujourd'hui principalement sur la séquence nucléotidique de gènes conservés, comme celui codant l'ARNr 16S. Les phages ne peuvent être classés de la même manière pour plusieurs raisons.

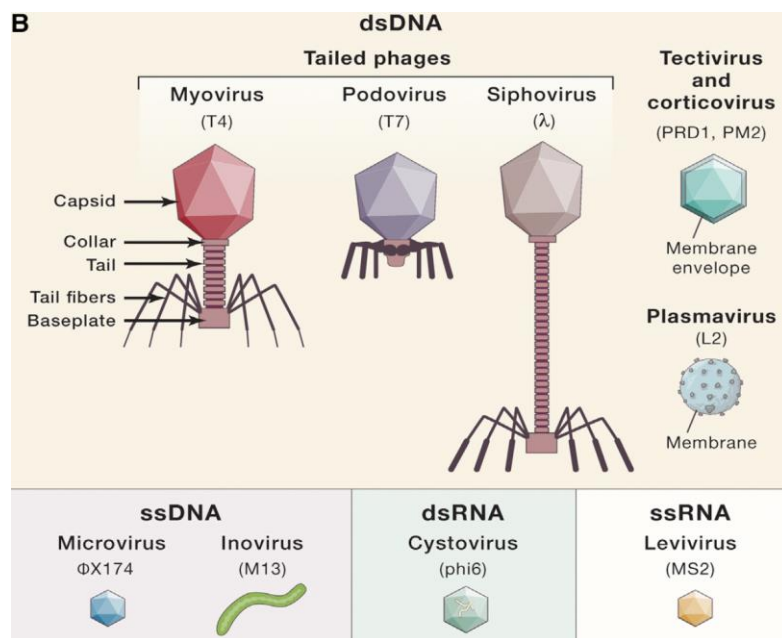
Premièrement, il n'existe pas de gène commun à tous les phages qui permettrait d'arriver à une phylogénie globale, à l'instar du 16S bactérien. Qui plus est, les phages sont connus pour avoir une vitesse d'évolution beaucoup plus élevée que celle des bactéries (Drake 1991, Sanjuan et al 2010).

Deuxièmement, d'abondants transferts horizontaux brouillent le signal phylogénétique. En effet, il est régulièrement observé, chez les phages tempérés, que certains génomes très différents partagent des régions de fortes homologies. Il est connu que les phages sont capables d'échanger des fragments de génome *via* des mécanismes de recombinaison homologue et de recombinaison illégitime. Ce phénomène, appelé mosaïsme, est retrouvé dans un grand nombre de phages, pour la plupart avec un style de vie tempéré, probablement du fait qu'avec la lysogénie, la probabilité de rencontre entre phages tempérés est plus élevée que chez les virulents (De Paepe et al 2014a, Hutinet et al 2018, Lopes et al 2010). Ce mécanisme trouverait en partie son origine dans différentes enzymes phagiques, les recombinases. Ces dernières permettraient la recombinaison homologue de séquences divergées.

L'ensemble de ces phénomènes contribuent à rendre difficile la classification des phages. La classification proposée par l'*International Comitee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) définit les virus

en ordres et familles sur la base de la morphologie du virion et sur le type d'acides nucléiques présent dans la capsid, ADN ou ARN, simple ou double brin (Figure 1). La très grande majorité des phages décrits sont à ADN double brin et 96% d'entre eux appartiennent à l'ordre des *Caudovirales*, qui se divise en 3 familles, les *Myoviridae*, les *Siphoviridae* et les *Podoviridae*. Ce chiffre pourrait prochainement évoluer, comme le montre une étude qui illustre les biais éventuels de protocole que l'on peut avoir lors de l'isolement de phages. Dans celle-ci, les auteurs ont isolé des plages de lyse en les laissant se développer deux semaines, sans traiter au préalable les échantillons au chloroforme et sans procéder à un gradient de densité au chlorure de césium pour purifier les virus. Cette approche, quelque peu différente de ce qui est fait habituellement, a mis en évidence l'existence de très nombreux phages à enveloppe dans l'environnement océanique, les *Autolykiviridae* (Kauffman et al 2018).

Cette classification traditionnelle, basée sur la morphologie, ne permet généralement pas de descendre en dessous de la famille virale, tandis que les approches moléculaires permettent de classer les phages jusqu'à l'espèce. Néanmoins, aucune approche n'est validée « officiellement » pour le moment. Ces approches moléculaires peuvent s'effectuer en utilisant une distance basée sur le pourcentage de protéines partagées entre les deux phages, à l'aide de programmes dérivés de BlastP. Elles peuvent aussi, dans le cas des *Caudovirales*, consister à appliquer une métrique basée uniquement sur les protéines du connecteur assurant l'assemblage entre la tête et la queue du phage (Adriaenssens et al 2015, Lavigne et al 2009, Lavigne et al 2008, Lopes et al 2014).



**Figure 1:** Représentation schématique des différentes familles de phages. Tiré de (Ofir et al 2018)



## 1.3 Phages virulents et phages tempérés

Les phages adoptent différents comportements pour infecter la cellule hôte, ces différences nous permettant de les classer en deux grands groupes, les phages virulents et les phages tempérés.

### 1.3.1 *Les phages virulents*

Les phages virulents sont caractérisés par le fait qu'ils ne peuvent effectuer qu'un seul type de cycle infectieux, le cycle lytique (Figure 2). Durant ce cycle, le phage infecte la cellule hôte en injectant son génome dans le cytoplasme de l'hôte. Celui-ci se réplique ensuite et initie la fabrication des différentes protéines composant le virion. Une fois la capsidie prête, le génome répliqué est encapsidé, la formation du virion achevée et la cellule hôte est lysée afin de libérer les virions nouvellement formés dans l'environnement.

### 1.3.2 *Les phages tempérés*

Les phages tempérés sont pour leur part capables d'effectuer deux types de cycles infectieux, le cycle lytique comme décrit précédemment, ou le cycle lysogénique. Le choix entre ces deux cycles est effectué juste après l'injection du génome dans le cytoplasme. Ce choix est influencé par de nombreux facteurs, que je décrirai dans la prochaine partie de mon introduction. Au cours du cycle lysogénique, le phage intègre le plus souvent son génome dans le chromosome de la bactérie hôte de manière stable en un lieu appelé site d'intégration, qui est soit aléatoire lorsque l'intégration se fait par transposition, soit une séquence spécifique si l'intégration se fait par recombinaison site-spécifique. Le phage entre alors en dormance et n'exprime pratiquement plus aucun gène. Le phage est alors appelé « prophage » et la bactérie est dite lysogène pour le phage (Figure 2). Certaines familles de phages n'intègrent pas leurs génomes dans le chromosome, et leurs génomes restent à l'état d'épisome dans la cellule, comme avec P1, N15 et cp32 (Eggers et al 1999, Lobočka et al 2004, Ravin et al 2011). Dans les deux cas, alors le prophage est répliqué avec le chromosome bactérien. Ainsi, au fur et à mesure des divisions de la bactérie lysogène, le prophage se réplique autant que le chromosome. Le prophage peut rester ainsi dans le chromosome bactérien pendant un grand nombre de générations. La sortie de l'état de dormance du prophage se nomme l'induction et ce phénomène peut être déclenché par un signal précis (plus de précisions seront apportées dans la partie II-1 de l'introduction) (Figure 2). L'induction sort le prophage du cycle lysogénique et dirige celui-ci vers un cycle lytique classique.

La lysogénie est un état très fréquent, le pourcentage de souches lysogènes varie fortement selon les groupes bactériens considérés et l'environnement (Ackermann et al 1987, Casjens et al 2005, Kim et al 2018, Roux et al 2015). Sur l'ensemble des génomes séquencés disponibles sur le NCBI, ce taux était de 46% en 2016, et de 40% pour l'environnement marin avec des expériences d'induction de prophage sur isolats marins (Jiang et al 1994, Jiang et al 1996, Touchon et al 2016). Il existerait

un avantage pour les phages à faire de la lysogénie, notamment dans des environnements instables, où dans les environnements dans lesquels la durée de vie du virion peut être très courte (Stewart et al 1983, Maslov et al 2015). Le fait même d'avoir plusieurs prophages dans le génome d'une bactérie (dite polylysogène) est loin d'être exceptionnel (Fischetti 2007, Matos et al 2013, Perna et al 2001). Les différents prophages d'une souche peuvent être totalement indépendants les uns des autres, tout comme développer des interactions complexes entre eux (Matos et al 2013). Un exemple extrême d'interaction est le parasitisme du phage P4 sur le phage P2 chez *E. coli* (Christie et al 1990, Six et al 1973).

### 1.3.3 *Les infections chroniques*

Si la majorité des phages décrits se répartissent dans l'une ou l'autre de ces deux catégories, d'autres types de relation sont également rapportées. Il existe des phages réalisant des infections dites chroniques comme le phage M13 (Figure 2). Dans ce cas-là, la bactérie infectée produit des virions en continu et ces derniers sont sécrétés dans l'environnement sans lyser la cellule hôte. Cet état d'infection chronique perdure tant que la cellule hôte est en croissance (Rakonjac et al 2011). Quand la bactérie arrive en phase stationnaire, le phage lyse la bactérie hôte.

### 1.3.4 *La pseudolysogénie*

Enfin, il existe un autre type d'interaction phage-bactérie à mi-chemin de la lyse et de la lysogénie, qui est la pseudolysogénie. Celle-ci a été décrite pour quelques phages, virulents et tempérés. Cet état a été décrit assez tôt, mais ce phénomène est encore très peu compris et étudié aujourd'hui (Baess et al 1971, Ripp et al 1997). La définition de cet état est donnée par Baess en 1971, complétée par Ripp et Miller en 1997 et présentée sous sa forme actuelle par Los (Los et al 2012) : la pseudolysogénie est le stade de développement bloqué d'un phage dans la cellule hôte, sans multiplication du génome phagique ou sa réplication synchronisée avec le cycle cellulaire, et le maintien de sa stabilité dans la lignée cellulaire, qui se poursuit sans dégradation du génome viral, permettant ainsi le redémarrage et la reprise du cycle viral ». En très résumé, la pseudolysogénie c'est quand le phage reste dans la cellule à attendre de meilleures conditions. Malgré cette définition, un certain nombre de cas décrits dans la littérature restent difficiles à classifier (Tableau 1). Il apparaît que la pseudolysogénie est un phénomène beaucoup plus fréquent lorsque la bactérie est dans un environnement pauvre en nutriments et énergie, notamment en carbone et en azote (Ripp et al 1998). Cela expliquerait pourquoi ce phénomène est beaucoup moins observé dans des conditions de laboratoire où les milieux sont généralement riches. Cela a été montré avec le phage T4, dont le gène *rI* est impliqué dans la pseudolysogénie (Los et al 2003). Il est supposé que ce type d'interaction est un phénomène répandu dans la nature, notamment dans l'environnement aquatique (Labonte et al 2015). Cela permettrait aux phages de perdurer plus longtemps dans la population bactérienne, sans affecter gravement celle-ci. Une possibilité est aussi que la durée de vie d'un virion dans un

environnement aux conditions difficiles pour la stabilité de celui-ci est plus courte que celle d'un génome de phage à l'abri dans une cellule (Ripp et al 1997).

La pseudolysogénie pourrait également être un moyen élaboré de défense de la bactérie contre un phage. Seule une sous-partie de la population bactérienne devient pseudolysogène, par conséquent le reste de la population *a priori* libre de tout prédateur peut évoluer, se multiplier et générer des mutants résistants à l'infection par le phage, limitant ainsi la propagation du phage dans la population (Latino et al 2016). Les mutants résistants seront sélectionnés par le phage issu de lyse de bactérie ou le/les phage(s) en question sont sortis de la pseudolysogénie, limitant l'impact de l'infection sur la population bactérienne.

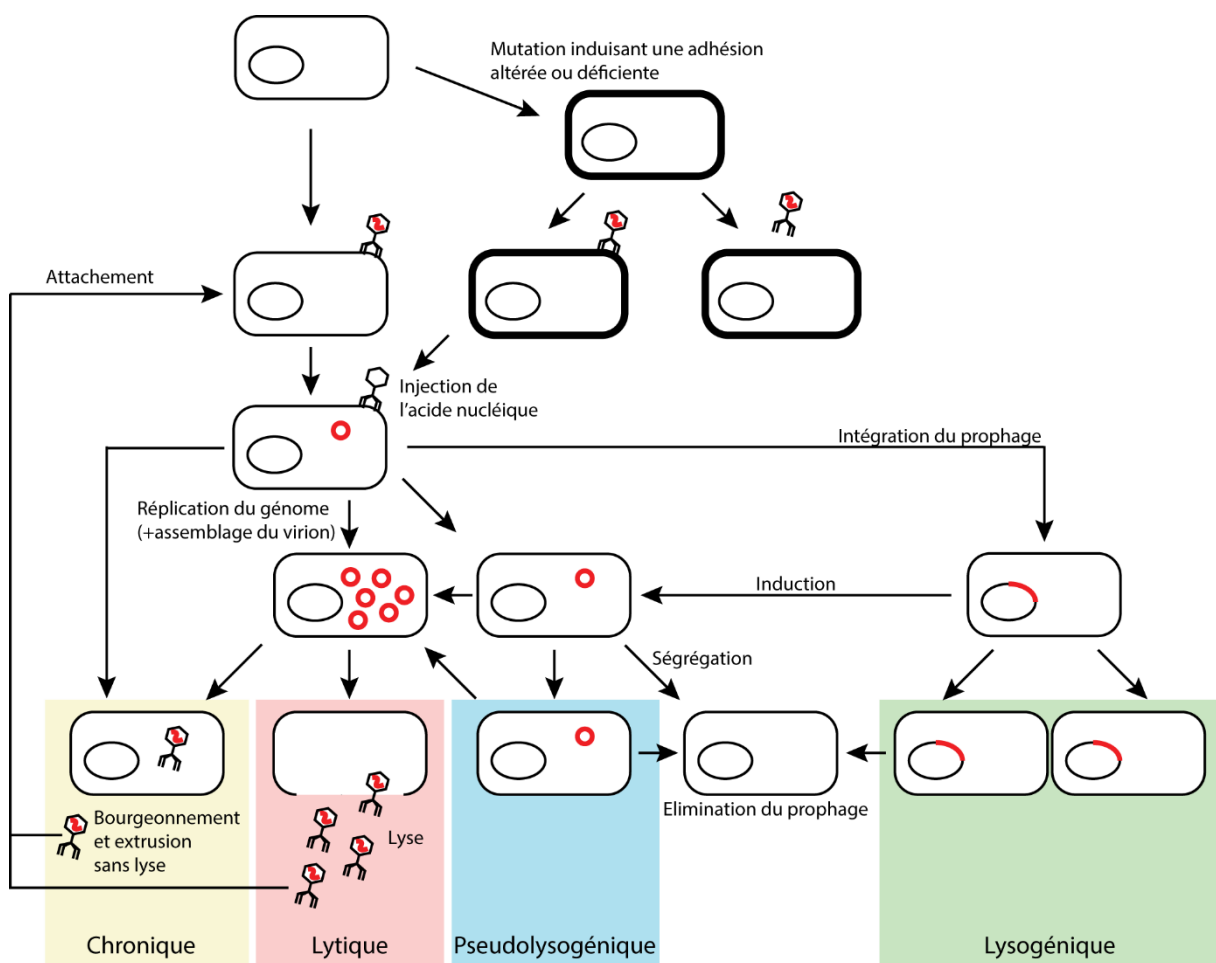
Le partage d'un certain nombre de phénotypes en commun avec la lysogénie instable fait que la pseudolysogénie et la lysogénie instable sont régulièrement confondues. La lysogénie instable correspond à un phage tempéré qui est engagé dans les voies de régulation de la lysogénie, mais dont le mode de maintien (réplication avec le chromosome ou la ségrégation lors de la division cellulaire si le phage est sous forme épisomique) n'est pas performant et permet l'apparition d'une population importante de bactéries guéries du prophage à chaque génération (Tableau 1)

#### 1.3.5 *L'état porteur*

Un dernier exemple récent d'interaction phage-bactérie est l'état porteur dit *carrier state* ou « état porteur ». Le *carrier state* est à l'origine défini par Lwoff en 1953 comme étant de la pseudolysogénie (Lwoff 1953). En vérité le phénomène observé par Lwoff était de la lysogénie instable (Tableau 1). Une étude récente effectuée sur *Salmonella typhimurium* et le phage P22, décrit une sous-population bactérienne dans laquelle le phage, lors de l'infection, ne s'intègre pas mais confère une immunité transitoire à la surinfection (Cenens et al 2013). Le génome du phage reste épisomique et se transmet dans une des cellules filles lors de la division de la bactérie. L'immunité transitoire est due au fait que le phage transcrit certains gènes conférant une immunité à la surinfection, comme *cII*, *sieA* et *gtrABC* (Cenens et al 2015). Les protéines restent dans les cellules filles au cours des divisions, jusqu'à ce que la concentration soit trop faible pour empêcher la réinfection par les P22 libres du milieu. Ce mécanisme permet de générer en permanence une sous-population de bactéries sensibles au phage, sur laquelle celui-ci peut se multiplier et évoluer. Les bactéries portant ce phage non intégré dans le chromosome mais présentant les caractéristiques de la lysogénie sont dites dans l'état « carrier state ». Il s'agirait ici non pas de pseudolysogénie, car le phage s'intègre et se multiplie dans une fraction de la population bactérienne, ce qui n'est pas le cas dans la pseudolysogénie. De plus cette interaction est stable au cours du temps (Siringan et al 2014).

	Lysogénie instable	État porteur	Pseudolysogénie
Immunité à la surinfection	+	+	<b>N.A</b>
Génome du phage se réplique	+	+ (dans la majorité des cellules)	-
Etat stable au cours des divisions	-	+	-
Vu chez tempérés	+	+/-	+
Vu chez virulents	-	+	+

**Tableau 1:** Tableau récapitulant les points communs et les différences entre la lysogénie instable, la pseudolysogénie et l'état porteur.



**Figure 2 :** Schéma décrivant les étapes des cycles lytique, lysogénique, chronique ou pseudolysogénique (adapté de (Weinbauer 2004)).

## 1.4 Les prophages défectifs et leurs dérivés

Sur le grand nombre de régions prophagiques qui peuvent être trouvées dans les génomes bactériens, un nombre restreint d'entre elles contient finalement toutes les fonctions nécessaires à la vie du phage (Module de lysogénie, module de répllication, module d'encapsidation, module de lyse) (Canchaya et al 2004, Casjens 2003, Matos et al 2013, Touchon et al 2016). Les régions dans lesquelles certains modules sont absents sont appelées prophages cryptiques ou défectifs (Wang et al 2010). Aux cours de la caractérisation des prophages endogènes d'une souche étudiée, il est important de bien différencier les prophages actifs des prophages non-actifs (inactifs), car ces indications guident ensuite les analyses qui sont faites pour caractériser l'activité des prophages de la souche étudiée. En effet certaines régions prophagiques semblent complètes mais ne n'ont plus d'activité (Matos et al 2013). Les régions complètes correspondent *a priori* des prophages actifs, mais ces prédictions doivent être confirmées par différentes analyses (test d'excision du prophage par PCR, test d'induction et plages de lyse). La découverte de séquences identiques aux prophages dans des viromes constituent des témoins indirects de l'activité du phage.

Chez *E. coli*, un grand nombre d'éléments prophagiques semblent en cours de dégradation (Asadulghani et al 2009). Cela peut s'expliquer par le fait que des séquences du génome bactérien qui n'ont plus de fonctions (dont les prophages inactifs), sont éliminées rapidement par des évènements génétiques comme la délétion (Bobay et al 2014, Kuo et al 2010). Au contraire, lorsque des fragments de prophages sont conservés dans le chromosome bactérien, cela suggère qu'un ou plusieurs des gènes contenus dans cette région apportent à la bactérie des fonctions améliorant sa valeur sélective. Ces gènes phagiques « avantageux » sont encore peu étudiés, et sont généralement appelés « morons ». Ils représentent un fort potentiel de découverte (Brussow et al 2004).

Les prophages défectifs étant des phages tempérés dégénérés, ceux-ci présentent encore de forte similarité de séquence nucléotidique avec des phages tempérés encore actifs. Ceux-ci, lors d'une infection de l'hôte se retrouveront alors dans la même cellule que le proche parent défectif. Il a été montré avec  $\lambda$  que des évènements de recombinaison homologue sur séquences divergées peuvent survenir (De Paepe et al 2014a, Hutinet et al 2018). Cet évènement permet un échange de gènes entre phage actif et phage défectif. Pour le phage actif, les prophages défectifs représentent un pool de gènes nouveaux dans lequel il peut piocher pour améliorer ses capacités d'évolution. Le phage défectif, selon son degré de dégénérescence, peut récupérer quant à lui les fonctions qui lui manquaient pour redevenir fonctionnel et ainsi « ressusciter ». Il a également été observé chez *E. faecalis* qu'un phage tempéré recombinant avec des prophages de la souche infectée aboutit à la création d'un phage virulent (Zhang et al 2013). Ces phénomènes sont, comme décrit plus haut, catalysés par des enzymes phagiques comme les recombinaisons et accélèrent l'évolution des génomes de phages (De Paepe et al 2014a, Mavrich et al 2017).

Les prophages défectifs et leurs dérivés peuvent avoir un fort impact sur la vie de la cellule hôte, cela sera abordé ultérieurement dans l'introduction (partie III).

## 2. Etablissement et sortie de la lysogénie

Comme présenté plus haut, lorsqu'un phage tempéré infecte une bactérie, celui-ci s'engage dans un des deux cycles infectieux possible, la lyse ou la lysogénie. Ce choix est généralement déterminé par une balance très finement régulée entre la quantité de protéines exprimées précocement, qui aboutit soit à la synthèse du répresseur du cycle lytique, soit à celle de l'activateur du cycle lytique. Si le répresseur est exprimé, alors le phage initie un cycle lysogénique et s'intègre dans le chromosome bactérien. La transcription de tous les gènes, à l'exception du répresseur et d'éventuels gènes « morons », sera éteinte. Si l'antirépresseur est exprimé, le phage effectuera son cycle lytique.

Je vais présenter ici les mécanismes décisionnels de certains phages pour le choix lyse-lysogénie. Même si chaque groupe de phage possède des spécificités, un fonctionnement global apparaît.

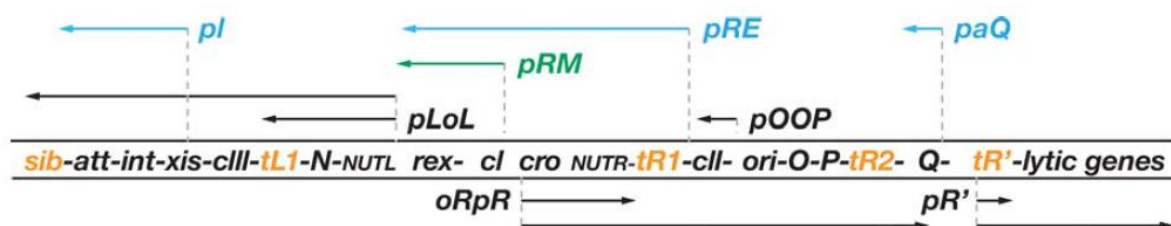
### 2.1 Le paradigme du phage lambda

Le phage  $\lambda$  a servi de modèle pour l'étude de la régulation génétique (Jacob & Monod 1961). L'essentiel des mécanismes de décisions se déroulent dans le module de lysogénie de  $\lambda$  (voir figure, tirée de (Oppenheim et al 2005)). Cette région est composée de deux promoteurs lytiques précoces,  $pL$  et  $pR$ , un promoteur lysogénique précoce  $PRM$ , et deux gènes,  $cI$  et  $cro$ , codant tous les deux des répresseurs transcriptionnels.  $CI$  et  $Cro$  se fixent sur les trois régions opératrices  $oR1$ ,  $oR2$  et  $oR3$ , ainsi que  $oL1$ ,  $oL2$  et  $oL3$ , régions chevauchant les boîtes promotrices -10 et -35 de  $PR$  et de  $PL$ . Dès l'entrée du phage dans la bactérie, il y a transcription à partir des promoteurs divergents  $PRM$  et  $PR$ . La régulation qui s'ensuit permettra soit la transcription de  $CI$ , qui mène  $\lambda$  à la lysogénie, soit à celle de  $Cro$  qui empêchera la transcription de  $cI$ , ce qui aboutit à la transcription des gènes impliqués dans le cycle lytique du phage (Folkmanis et al 1977).

#### 2.1.1 La régulation menant au cycle lytique

La cascade d'évènements aboutissants au déclenchement du cycle lytique est le programme de transcription par défaut, et se déroule comme suit :  $pL$  et  $pR$  sont transcrits, jusqu'au terminateur des deux transcrits,  $tR1$  et  $tL1$ . Ces transcrits précoces expriment notamment  $Cro$  et  $N$ . Le produit du gène  $N$ , un anti-terminateur situé juste avant  $tL1$ , modifie l'ARN polymérase de manière à ce que celle-ci transcrive au-delà des terminateurs  $tR1$ ,  $tL1$  et d'autres terminateurs en aval (Friedman et al 1995). Les gènes situés au-delà de  $tR1$  et  $tL1$  sont nécessaires pour la lyse et la lysogénie également. L'intégrase par exemple est exprimée à ce moment-là, ce qui donne lieu à des intégrations de  $\lambda$  dans le chromosome bactérien, même si le phage est en cycle lytique (Shao et al 2017). Dans le même temps,  $Cro$  inhibe la synthèse du gène  $cI$  déclencheur de la lysogénie. Parmi les gènes qui sont

transcrits après les terminateurs *tR1* et *tL1*, il y a notamment O et P, nécessaires à la réplication de l'ADN phagique, et également Q, un autre anti-terminateur. Après accumulation de Q dans la cellule, la modification du complexe ARN polymérase permet ainsi la transcription à partir du promoteur *pR'*, et donc l'expression des gènes tardifs du cycle lytique (responsables de l'expression des protéines du virion) (Marr et al 2001). Une cascade de transcription/régulation similaire est observée après induction d'un  $\lambda$  intégré dans le chromosome bactérien (Hendrix et al 1983). Une étude récente a mis en évidence un rôle de l'*orf63* de  $\lambda$  dans le processus de décision lyse-lysogénie (Dydecka et al 2017). Ce gène favoriserait le cycle lytique en intervenant dans la régulation des différents gènes évoqués plus haut.



**Figure 3:** Schéma représentatif du module de lysogénie du phage  $\lambda$  (Oppenheim et al 2005). Les flèches représentent le sens de transcription à partir des différents promoteurs identifiés.

### 2.1.2 La régulation menant à la lysogénie

La cascade d'événements aboutissant à la lysogénie est commune avec celle aboutissant au cycle lytique, jusqu'à la transcription des ARN précoces au-delà du terminateur *tR1*. Hormis *cI*, l'orientation vers le cycle lysogénique dépend essentiellement de deux gènes, *cII* et *cIII* (Court et al 1975, McMacken et al 1970). Ceux-ci se trouvent respectivement en aval de *tR1* et de *tL1*. Le rôle de la protéine CII est d'inhiber la transcription du gène Q, d'activer la transcription de *cI* et de l'intégrase, enzyme essentielle à l'insertion du génome phagique dans le chromosome bactérien par recombinaison site spécifique. CIII est également requise pour activer la transcription de *cI*. Une fois la transcription de *cI* établie, CII et CIII n'ont plus de rôle, CI activant sa propre transcription et inhibant celle de tous les autres gènes (Dodd et al 2005, Oppenheim et al 2005). Enfin, comme dit plus haut, CII promeut la transcription de *cI*. Le triple rôle est dû au fait que CII se fixe sur trois promoteurs, *pI*, *pRE* et *paQ*, et active leur transcription. *pI* et *pRE* activent la transcription respective de l'intégrase et de *cI*, le promoteur *paQ* permet la transcription d'un ARN anti-sens du gène Q, bloquant ainsi la transcription de ce gène. Pour avoir ces trois effets, CII a besoin d'être en forte quantité dans la cellule (Kobiler et al 2002, Kobiler et al 2005). Les mutations dans les 3 gènes pro-lysogénie que sont *cI*, *cII* et *cIII* aboutissent tous à des phénotypes de phage  $\lambda$  exclusivement virulent (Dodd et al 2005, Oppenheim et al 2005).



### 2.1.3 Influence de la physiologie bactérienne sur le choix lyse-lysogénie

CII est donc la clé de voûte de l'établissement de la lysogénie une fois la cellule infectée. Le niveau intracellulaire de CII est réduit par la protéase bactérienne HflB (Kobiler et al 2002). Le rôle de CIII est également important pour l'établissement de la lysogénie, bien qu'indirect. CIII inhibe HflB, permettant ainsi l'accumulation de CII pour activer les trois promoteurs de transcription (Herman et al 1997, Kaiser 1957, Kobiler et al 2002, Kobiler et al 2007). L'infection multiple d'une bactérie par  $\lambda$  résulte en une fréquence de lysogénisation bien plus élevée que celle mesurée avec une infection par un seul phage (Lieb 1953). Une interprétation de ce résultat est qu'une infection multiple permet de transcrire et traduire bien plus de cII et cIII, augmentant ainsi la probabilité que le phage lysogénise la bactérie. Il est à noter également que le niveau intracellulaire de HflB est dépendant de la physiologie bactérienne. En effet, il a été montré qu'une synthèse élevée d'AMPc dans la cellule inhibe l'activité catalytique de HflB (Belfort et al 1974). De même la quantité de HflB est régulée par la quantité de ppGpp dans la cellule, un métabolite impliqué dans la réponse stringente de la cellule (Slominska et al 1999), la quantité de ppGpp étant liée à la quantité d'AMPc cellulaire. La concentration d'AMPc est faible lorsque la cellule est métaboliquement très active, alors que sa synthèse augmente lorsque la cellule se retrouve dans un environnement appauvri en nutriments. Grâce à ces mécanismes fins de régulation, le phage  $\lambda$  voit sa fréquence de lysogénisation augmentée lorsque les conditions ne sont plus propices à une bonne réalisation du cycle lytique. Un argument supplémentaire de l'influence de l'état métabolique de la cellule sur la fréquence de lysogénisation du phage est apporté par une étude qui montre que le volume de la cellule au moment de l'infection corrèle avec le choix lyse/lysogénie (St-Pierre et al 2008) : plus la cellule est volumineuse, plus celui-ci aura tendance à choisir le cycle lytique. Or une *E. coli* volumineuse cultivée en LB est généralement associée à une cellule en phase exponentielle de croissance, tandis qu'une cellule de faible volume en LB est plutôt en phase stationnaire (Akerlund et al 1995). Il s'agirait ici d'un effet de « dilution » de cII dans le cytoplasme, du fait de la taille de la cellule. Chez  $\lambda$ , plusieurs facteurs environnementaux influençant le choix lyse-lysogénie ont été identifiés. Il y a tout d'abord la multiplicité d'infection (dite m.o.i). Comme dit plus haut, plus il y a de phages infectants la bactérie au même instant, plus la fréquence de lysogénisation est élevée (Lieb 1953). L'état métabolique de la cellule influence également le choix. La température joue enfin un rôle dans le processus décisionnel, ainsi que l'anaérobiose (Belfort et al 1974, Obuchowski et al 1997, Slominska et al 1999).

### 2.1.4 Le maintien de la lysogénie

Une fois la voie lysogénique entamée, le phage s'intègre dans le chromosome grâce à la synthèse de l'intégrase. La protéine CI, répresseur transcriptionnel de *pR*, *pRM* et *pL*, empêche la transcription de tous les gènes phagiques, y compris celle de son propre gène, *cI*. La répression des trois promoteurs par CI se fait *via* la fixation de celui-ci sur *oL1-oL2-oL3* et *oR1-oR2-oR3*, les zones opératrices. L'affinité de CI est différente pour chaque séquence opératrice, celles-ci ayant toutes une

séquence légèrement différente. CI se fixe préférentiellement sur *oR1-2* et *oL1-2*. CI est structurée en deux domaines protéiques, le N-terminal impliqué dans la fixation à l'ADN et le C-terminal impliqué dans l'oligomérisation coopérative de CI en dimère/tétramère (Dodd et al 2004). L'organisation des séquences opératrices chez  $\lambda$  (Figure 3) fait que lorsque les séquences *oL1/oL2* et *oR1/oR2* sont occupées par CI, les différentes protéines CI créent un complexe de deux octamères qui ferment l'ADN en une boucle, éteignant totalement les promoteurs *pL* et *pR*. Le *pRM* permet toujours la transcription de *cI* (Nickels et al 2002). La protéine CI se fixe alors sur les opérateurs de moindre affinité *oR3* et *oL3*, formant un tétramère qui empêche la transcription de *cI* lui-même (Revet et al 1999). Si jamais le tétramère est déstabilisé, le premier gène qui est transcrit est *cI*. La production de CI qui s'ensuit verrouille à nouveau le phage en lysogénie.

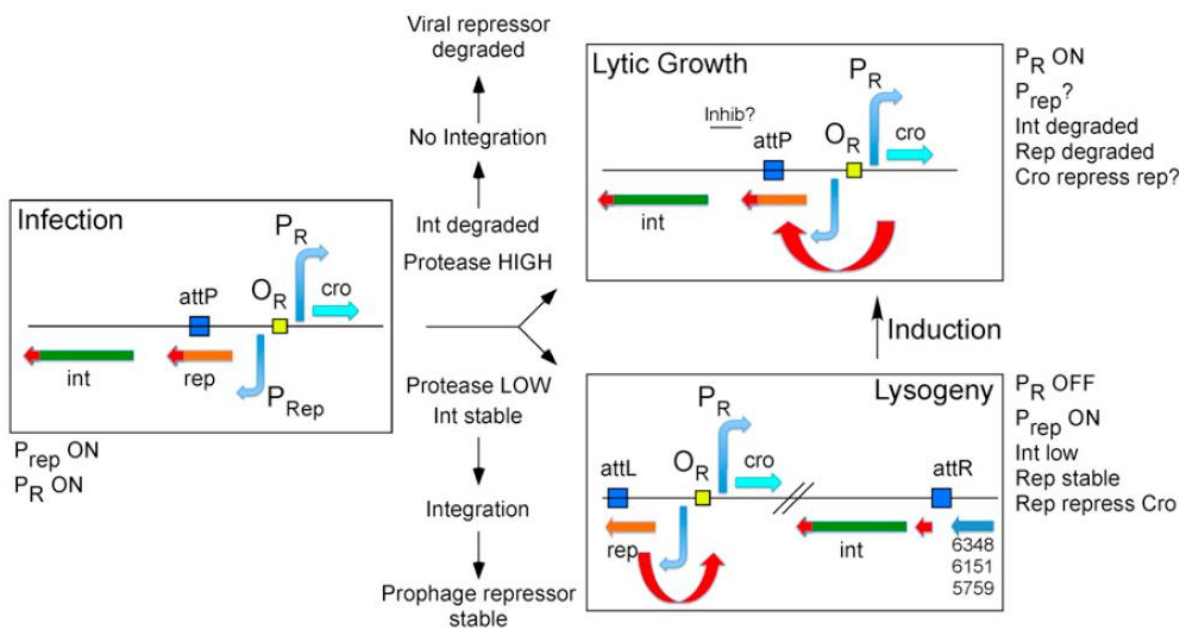
### 2.1.5 L'induction du phage $\lambda$

Pour  $\lambda$ , la lysogénie est donc un état très stable dont il est difficile de sortir. Seule l'induction *via* le système SOS parvient à ramener le phage vers le cycle lytique. Le SOS est une voie de signalisation de dégâts à l'ADN chez *E. coli*. Le régulateur transcriptionnel majeur du système SOS est LexA. Celui-ci régule notamment le gène *recA*, qui est impliqué dans la recombinaison homologue pour réparer les cassures double brin de l'ADN, lorsqu'il est activé. RecA possède également la propriété de se fixer à CI, activant alors l'autoprotéolyse de CI. Ainsi lors de l'activation du SOS, RecA active toutes les protéines CI de la cellule qui s'auto-clivent alors et libèrent les promoteurs *pR* et *pL*, permettant ainsi la transcription du programme lytique du phage *via* la transcription de *cro* (Roberts et al 1979). Il est à noter que dans une cellule dépourvue de RecA, de l'induction de  $\lambda$  est observée mais à une fréquence extrêmement faible. De plus les phages induits présentent tous des mutations dans *cI* ou *PRM* (Baek et al 2003). Ces mutations sont probablement nécessaires pour que  $\lambda$  sorte de la lysogénie. Une voie d'induction indépendante du SOS, passant par *rcaA* et *dsrA*, a également été proposée pour l'induction des prophages Lambdoïdes (Rozanov et al 1998). La surexpression de ces gènes induit le phage  $\lambda$ , probablement par une voie d'inactivation du répresseur phagique encore non décrite.

## 2.2 Les phages de mycobactéries

En 2013, Broussard *et al* ont mis en évidence un nouveau type de mécanisme pour la décision lyse-lysogénie chez certains phages de mycobactéries (Broussard et al 2013). La spécificité de ce mécanisme est que le site du génome phagique recombinant avec le chromosome bactérien, dit *attP*, est situé dans le gène du répresseur (Figure 4). Par conséquent, lors de l'intégration du phage dans le chromosome, la recombinaison crée une forme tronquée du gène du répresseur, qui n'a plus alors de motif *ssrA* (small stable RNA A). Des protéases bactériennes (de la famille des protéases Clp) reconnaissent normalement ce type de motif protéique et dégradent les protéines portant celui-ci. En temps normal, ce motif est ajouté aux protéines dont la transcription est restée bloquée, *via* le

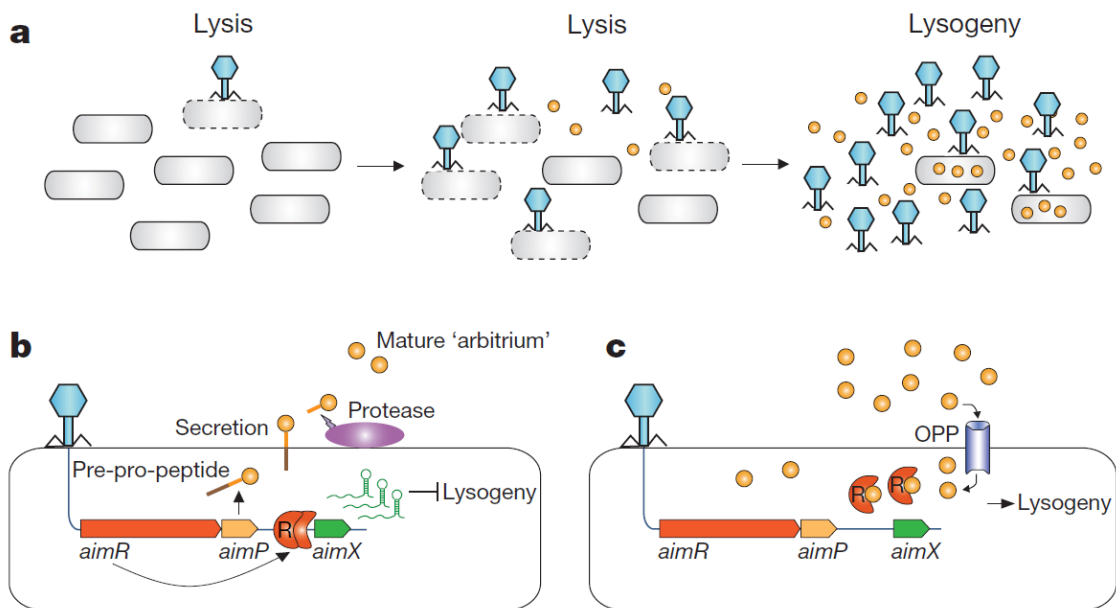
mécanisme de *ssrA* (Tu et al 1995). La délétion précise du motif protège ainsi le répresseur de la dégradation, et son accumulation dans la cellule lui permet de réprimer la transcription des gènes de lyse du phage. Notons que la décision lyse-lysogénie se joue en parallèle, avec l'intégrase qui semble posséder également un motif *ssrA*. A l'instar de la protéine CII de  $\lambda$ , s'il y a une concentration élevée de protéase bactérienne Clp, comme lorsque la bactérie est en croissance rapide par exemple, l'intégrase est donc dégradée, la délétion du motif *ssrA* dans le répresseur n'a pas lieu et il n'y a pas de répression des gènes de lyse (voie 1 figure 4). S'il n'y a pas assez de protéases, l'intégrase est stabilisée et son activité, mène à la lysogénie telle qu'explicité précédemment (voie 2, Figure 4). Les auteurs de l'étude font l'hypothèse d'une induction stochastique. Le hasard de la transcription fait que dans certaines cellules le répresseur n'est pas transcrit pendant un moment et sans répresseur, les gènes de lyse sont transcrits et le phage s'excise du chromosome. Une autre hypothèse proposée est qu'il pourrait y avoir un promoteur cryptique de l'intégrase non détecté encore. L'intégrase pourrait promouvoir l'intégration, mais également l'excision de celui-ci dans le chromosome. La transcription occasionnelle de ce promoteur faible amènerait à l'induction du prophage, par la production de l'intégrase. Ce dernier point reste néanmoins à démontrer. Les phages possédant ce système ne semblent pas inductibles par le système SOS, contrairement à beaucoup d'autres.



**Figure 4:** Schéma résumant le mécanisme décisionnel lyse-lysogénie des phages utilisant le modèle de l'immunité intégration dépendante chez *M. segmatis* (Broussard et al 2013).

## 2.3 L'arbitrium du phage Phi3T

Le mécanisme guidant le choix lyse-lysogénie du phage phi3T de *Bacillus subtilis* diffère grandement des deux mécanismes précédents (Erez et al 2017). Chez le phage phi3T, la décision lyse-lysogénie s'effectue *via* un système semblable au quorum-sensing bactérien, mais utilisé cette fois-ci au bénéfice du phage, et nommé dans ce cas précis *arbitrium* (Figure 5a). Dès le début du cycle lytique, les gènes *aimR* et *aimP* sont transcrits (Figure 5b). AimR, sous forme dimérique, active alors la transcription de *aimX*, un inhibiteur de la lysogénie. *aimX* est supposé être un ARN régulateur. Le gène *aimP* est quant à lui exprimé, et AimP synthétisée, et clivée avant d'être relâchée dans le milieu extracellulaire sous forme d'un peptide. Celui-ci s'accumule alors dans la culture bactérienne, tant qu'il y a de la lyse. A une certaine concentration extra-cellulaire, le peptide AimP est internalisé dans les cellule par le transporteur, *oligopeptide permease transporter* (*oppD*). Si une cellule est infectée par phi3T, alors cette fois-ci, AimP interagit avec AimR, inhibant son effet activateur de la transcription de *aimX* (Figure 5c). Sans AimX, c'est la voie lysogénique qui sera préférée à la lyse. Ce système, bien que très différent de celui décrit pour  $\lambda$  ou pour les mycophages, présente un point commun. Le phage utilise un système qui favorise la lysogénie lorsque la M.O.I dans l'environnement devient élevée, et donc que la majorité des bactéries sensibles présentes ont déjà été lysées.



**Figure 5:** Schéma représentant le fonctionnement de l'*arbitrium* pour le phage Phi3T de *Bacillus subtilis*. (Erez et al 2017)

## 2.4 Le choix lyse-lysogénie, un mécanisme subtil

Le nombre de gènes phagiques impliqués dans le processus décisionnel lyse-lysogénie semble varier dans chaque exemple. Selon des études de modélisation, les phages pourraient se satisfaire de deux gènes pour réguler leurs gènes (Avlund et al 2010). Néanmoins, l'existence de gènes supplémentaires est probablement un moyen pour les phages d'affiner leur contrôle et de permettre de prendre davantage de paramètres bactériens en considération pour faire pencher la balance lyse-lysogénie d'un côté ou de l'autre. En plus de cela, l'ajout de gènes supplémentaires intervenant dans le processus décisionnel lyse-lysogénie permet au phage de mieux gérer le phénomène de « bruit » génétique.

Tous les systèmes décrits précédemment fonctionnent avec une quantité finement régulée de répresseurs et d'activateurs du cycle lytique afin que le phage fasse toujours le meilleur choix. Leurs fréquences de lyse changent selon les conditions de l'infection (état de l'hôte, environnement, MOI, température (Rosner 1972) etc).

## 2.5 Evolution des phages tempérés vers la virulence : les ex-tempérés

Par-delà la régulation et les conditions de l'infection, différents événements tels que des mutations ponctuelles ou des événements de recombinaison suffisent parfois à faire basculer le phage du côté virulent ou tempéré. Quelques exemples connus sont les phages mutants P1<sub>vir</sub>, λ<sub>vir</sub>, ou des œnophages dits ex-tempérés (Bailone & Devoret 1978, Heinrich et al 1995, Jaomanjaka et al 2016). Dans chaque cas, l'abolition du caractère tempéré du phage peut avoir lieu grâce à une ou deux mutations ponctuelles dans les modules de lysogénie. Ces mutants sont décrits comme mutants virulents ou ex-tempérés. Ces phages conservent un génome très proche de celui des phages tempérés dont ils sont issus et peuvent recombiner avec des prophages défectifs ou des phages tempérés relativement proches. L'échange de gènes qui s'ensuit peut permettre la récupération d'un module de lysogénie fonctionnel et une restauration du phénotype tempéré. Un phage tempéré peut devenir un ex-tempéré s'il récupère un module de lysogénie non fonctionnel (Zhang et al 2013). Il en est de même pour des mutations ponctuelles.

Ce phénomène existe à plus large échelle. Plusieurs groupes de phages, constitués en fonction de la proximité génétique, comprennent à la fois des phages dits virulents et tempérés (Chopin et al 2001, Ford et al 1998, Lucchini et al 1999a, Mikkonen et al 1996). Dans certains cas, le module de lysogénie est le même pour une large famille de phages comprenant phages virulents et tempérés, comme observé avec les *Siphoviridae* infectant les bactéries Gram + à bas GC%. (Lucchini et al 1999b). En revanche, il existe également des groupes de phages uniquement constitués de phages virulents véritables.

La classification des phages en deux groupes, tempérés et virulents, est donc rendue floue par ces phages se trouvant à la frontière des deux. Hobbs et Abedon discutent ce point et suggèrent d'envisager des changements dans les termes utilisés. Ces auteurs proposent par exemple de préciser le terme « lytique professionnel » pour désigner les phages clairement virulents (Hobbs et al 2016).

## 2.6 L'induction spontanée des prophages (SPI)

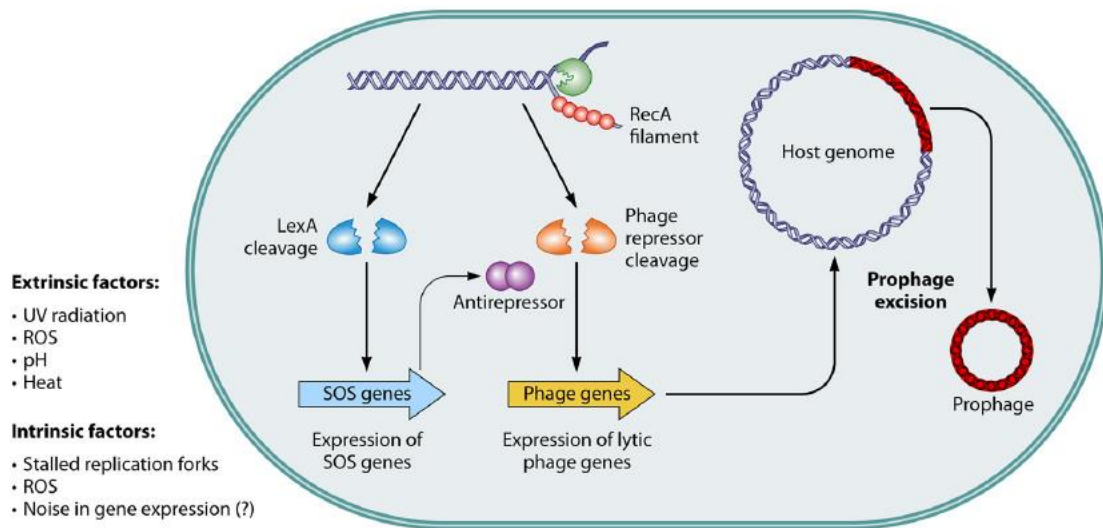
L'induction spontanée, dit SPI (*Spontaneous Prophage Induction*) est le phénomène responsable de la présence de virions dans le surnageant une culture lysogène en absence d'agents inducteurs connus. L'ampleur de ce phénomène varie grandement d'un phage à l'autre. On peut citer par exemple le phage LES400 qui ne présente que  $10^2$  PFU/mL (Fothergill et al 2011) dans une culture de nuit contre  $10^9$  PFU/mL du phage BTP1 chez *Salmonella typhimurium* (Owen et al 2017). Néanmoins cette valeur ne reflète que très mal le taux d'induction, car la quantité de phage dans un surnageant de culture dépend certes du taux d'induction, mais également du taux de d'adsorption du phage sur la bactérie. L'induction spontanée peut être due à une activation « accidentelle » du mécanisme d'induction du phage, par exemple une cassure accidentelle de l'ADN pour les phages inductibles par ce biais.

L'induction spontanée par activation accidentelle du SOS a été rapportée chez d'autres phages, comme le prophage CGP3 de *Corynebacterium glutamicum* (Nanda et al 2014). Mais l'induction peut également avoir une origine inconnue, indépendante du SOS. Il est supposé pour certains phages que ces SPI SOS indépendantes sont issues de l'expression stochastique des gènes de répression. Cela crée ainsi la possibilité que dans la cellule, il n'y ait plus de répresseur pour réprimer le phage, lançant ainsi son induction. Cette hypothèse est notamment faite par Broussard *et al.* pour les phages de mycobactéries (Broussard et al 2013). Une autre illustration de ce phénomène de SPI SOS indépendante vient du phage  $\phi$ NM1 de *Staphylococcus epidermidis*. La souche possède un système CRISPR-Cas de type III A qui tolère la présence du prophage dans la souche. Il s'agit d'un système CRISPR-Cas dans lequel la fixation à l'ADN cible dépend de la transcription de celui-ci. Ainsi, tant que le prophage  $\phi$ NM1 est éteint transcriptionnellement, le CRISPR-cas n'attaque pas le génome du prophage. Sur le long terme, il est néanmoins observé une perte de fitness de la bactérie possédant le CRISPR-cas IIIA portant un spacer contre son prophage par rapport à la même souche sans le prophage (Goldberg et al 2014, Goldberg et al 2018). Cela montre que même en état de lysogénie très stable, la transcription des gènes de phages varie malgré la répression transcriptionnelle. Cette hétérogénéité dans la population permet d'envisager les cas où la différence dans la transcription aboutit à l'induction du prophage. De plus, certains prophages possèdent des gènes qui ont pour fonction de garder les autres prophages dans la bactérie en lysogénie. Cela permet au prophage d'être

le seul à s'induire en cas d'avènement du signal d'induction (Pfeifer et al 2016) , pour éviter que sa production de virions diminue à cause de la production des autres phages (Refardt 2011).

## 2.7 L'induction des prophages provoquée par un stress

L'augmentation du niveau d'induction spontanée des prophages est généralement observée en réponse à un stress bactérien. Les facteurs augmentant l'induction peuvent être un signal environnemental ou cellulaire (système SOS) traduisant des problèmes dans certains processus de la bactérie (réplication-transcription). Pour les facteurs environnementaux, on peut citer l'effet du pH, différent selon les espèces, la présence de certains éléments inconnus dans l'environnement de la bactérie et la température, ou une combinaison de tous ces facteurs (Alves de Matos et al 2013, Choi et al 2010, Cordonnier et al 2016, Fang et al 2017, Lemaitre et al 2015, Lunde et al 2005, Rosner 1972). Dans certains cas, le changement de pH externe aboutit d'ailleurs à une induction du système SOS interne (Dri et al 1994, Schuldiner et al 1986). Celui-ci est activé suite à des cassures dans l'ADN qui peuvent être déclenchées par des facteurs externes, comme les UV, ou des antibiotiques comme la mitomycine C et les fluoroquinolones (Baluch et al 1978, Jiang et al 1994, Jiang et al 1996, Otsuji et al 1959, Sandvik et al 2015). Dans le même type de stress, les ROS (*Reactive Oxygen Species*) aboutissent indirectement à des dommages à l'ADN, et à l'activation de la voie SOS (Goerlich et al 1989). Même si le mécanisme d'induction semble le même entre inductions aux UV et aux ROS, il apparaît que des phages, comme le phage  $\phi 24_B$  de *E. coli*, soient capables de différencier différents stress inducteurs aboutissant à l'activation du SOS : en plus de la transcription des gènes classiques, une série de gènes inconnus de la région *exo-xis* sont nécessaires à une induction efficace du prophage en cas de stress oxydant (Licznarska et al 2016). Cela suggère une adaptation de  $\phi 24_B$  à l'induction par ce stress. Si le SOS semble être la voie d'induction des phages la plus fréquemment observée, le signal d'induction d'un certain nombre de phages n'est aujourd'hui encore pas connu, même parmi ceux ayant servi de modèle d'étude (P2, certains phages Mu). L'étude de ces phages se faisait, par conséquent, avec des mutants thermos inductibles et un grand nombre de mécanismes d'induction de prophages sont encore à élucider.



**Figure 6:** Schéma résumant les facteurs intervenant dans l'induction des prophages, tirée de (Nanda et al 2015).



## 3. Impact des phages sur les populations bactériennes

### 3.1 Impact par la prédation

#### 3.1.1 Impact écologique de la prédation

L'importance des phages dans les différents écosystèmes bactériens est aujourd'hui une certitude. Ils interagissent avec les bactéries de plusieurs façons, la plus évidente étant la prédation (terme que nous utiliserons ici, par abus de langage, pour désigner la mortalité bactérienne associée à l'infection par le phage). Les interactions des phages avec leurs proies peuvent être modélisées par plusieurs modèles, le plus simple étant celui de Lotka-Volterra, qui modélise les interactions proies-prédateurs (Lotka 1920, Volterra 1927). Le modèle « tuer le vainqueur » (*Kill the winner*, Figure 11A), est dérivé du modèle de Lotka-Volterra, mais avec une notion de « seuil » additionnel : seules les bactéries dominantes dans un écosystème sont soumises à la prédation par les phages, les phages ne pouvant pas se déplacer activement vers les bactéries, ils sont soumis au hasard pour la rencontre, et ils n'ont statistiquement aucune chance de rencontrer leur hôte, et donc se multiplier, si celui-ci est en dessous d'une certaine concentration (Wiggins et al 1985). Par conséquent, seules les bactéries à une concentration suffisante vont pouvoir être infectées, et donc seules les bactéries dominantes dans l'écosystème peuvent se faire infecter par les virus. Suite à l'épidémie phagique, une fois la population bactérienne retombée à un niveau plus bas, le phage aura beaucoup plus de mal à infecter à nouveau un hôte et sa population diminuera. La multiplication des phages aux dépens de leurs hôtes a logiquement posé la question de l'importance des communautés virales sur la mortalité bactérienne dans les écosystèmes microbiens. Quelques rares études dans les écosystèmes océaniques et terrestres ont observé de telles dynamiques de populations, où les évolutions temporelles de populations de phages et leur bactérie hôte oscillent, correspondant au modèle proposé du *Kill the winner* (Buckling et al 2002, Hennes et al 1995, Parsons et al 2012). Ainsi dans les écosystèmes océaniques, un très grand nombre d'infections virales ont lieu chaque jour, il est par exemple estimé qu'il y aurait près de  $10^{24}$  infections phagiques par seconde dans l'océan (Fuhrman 1999, Suttle et al 1992). Ce grand nombre d'infections est associé à une énorme mortalité bactérienne, jusqu'à 43% de la mortalité bactérienne observée pourrait être imputée à une infection virale (Clokic et al 2011, Fuhrman 1999). Ces infections virales et les lyses bactériennes, auxquelles elles contribuent, participent aux grands cycles géochimiques comme le cycle du carbone dans les océans.

### 3.1.2 Résistances bactériennes à l'infection par les phages

Les phages sont présents partout où leurs hôtes existent, et leurs nombres dépassent généralement celui des bactéries dans les environnements étudiés (Cobian Guemes et al 2016, Engelhardt et al 2014, Thomas et al 2011, Weinbauer 2004, Williamson et al 2013). La mortalité des bactéries due aux phages, crée une forte pression de sélection sur leurs hôtes pour acquérir une résistance aux phages. Les bactéries ont ainsi développé un grand nombre de stratégies pour résister à l'infection par les phages (Figure 7) (Labrie et al 2010, Stern et al 2011, van Houte et al 2016a). On peut citer les résistances liées à l'absorption du phage, comme l'inhibition de l'absorption du phage sur la bactérie par suppression ou modification du récepteur (Meyer et al 2012, Qimron et al 2006, Samuel et al 1999, Scanlan et al 2015, Seed et al 2014, van der Woude 2011)( Figure 7.1).

Intervenant juste après dans le cycle infectieux viral (Figure 7.5), le système Sie, pour *SuperInfection Exclusion*, est un système codé par des phages pour protéger leur hôte d'une surinfection par d'autres phages. Ce système inhibe soit l'injection du génome du phage invasif, soit la réplication de celui-ci. Des systèmes Sie sont retrouvés chez des phages de bactéries Gram+ et Gram -, et chez les phages tempérés comme chez les virulents (Chung et al 2014a, Chung et al 2014b, Mahony et al 2008, Lu & Henning 1994, Vostrov et al 1996).

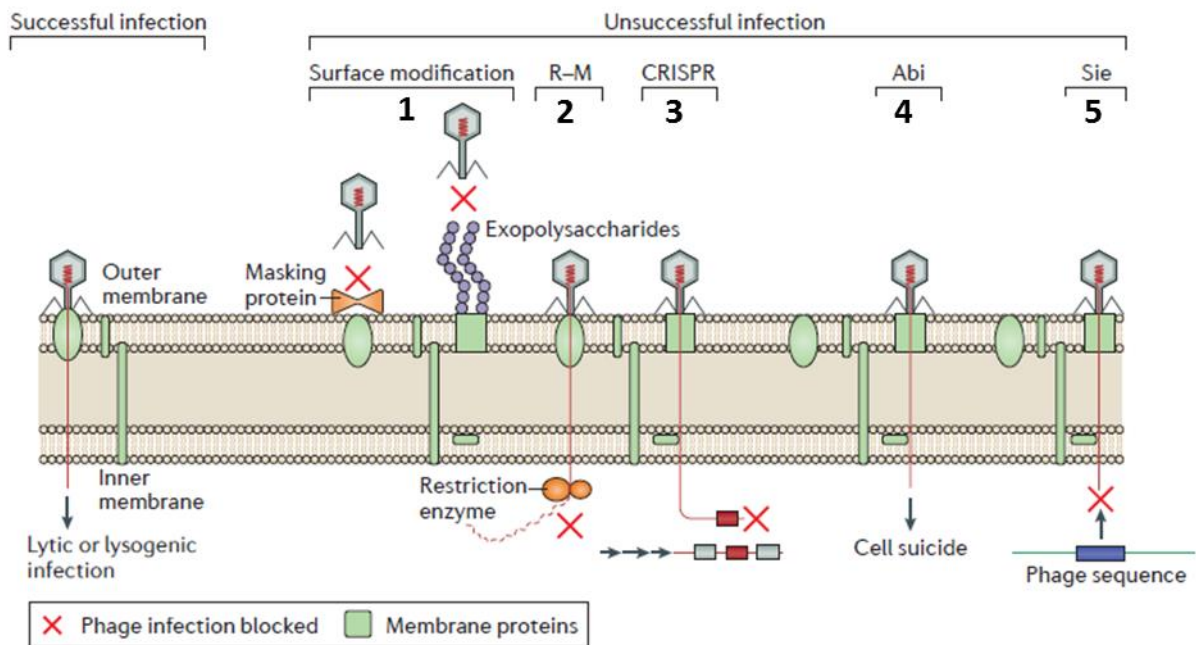
Il existe d'autres systèmes de défenses bactériens pour contrecarrer les étapes suivantes de l'infection par un phage. Les systèmes de restriction-modification (dit R-M) (Figure 7.3) peuvent couper le génome du phage après injection de celui-ci dans la cellule (Bertani et al 1953, Wilson et al 1991). Ce système consiste principalement en la méthylation de l'ADN endogène, ce qui permet à des endonucléases bactériennes de couper tout ADN non méthylé, considéré alors comme du non soit. Il existe aussi d'autres types de modifications de l'ADN. Les efficacités de ces systèmes sont très variables (Pleska et al 2018, Tock et al 2005). Ce système est très répandu et il est fréquemment retrouvé plusieurs systèmes RM par bactérie (Oliveira et al 2014, Wilson et al 1991). Le système DISARM récemment décrit est une variante des systèmes R-M (Ofir et al 2018).

Un des systèmes de résistance aux phages les plus étudiés actuellement est le système CRISPR-Cas (Figure 7.3) (Barrangou et al 2007, Makarova et al 2015, Marraffini 2015), appelé fréquemment système immunitaire adaptatif des procaryotes. Celui-ci permet de protéger la bactérie d'une infection par des phages ou des éléments génétiques mobiles, après avoir gardé en mémoire un fragment de l'ADN de ces derniers. Ce système nécessite qu'une infection ait échouée afin de créer l'immunité en incorporant une petite séquence ADN du phage, appelée spacer, entre deux séquences répétées, nommées Direct Repeat (DR). Les spacers du système CRISPR-Cas sont donc de véritables livres d'histoire des infections phagiques qu'a subies la bactérie étudiée (Stern et al 2012).

Les derniers mécanismes présentés en figure 7.4 sont les systèmes Abi, pour Abortive Infection. Il s'agit de systèmes d'apoptose de la bactérie, déclenchés lors d'une infection virale, qui entraînent une mort prématurée de la cellule infectée, empêchant la propagation du phage. Les

systèmes Abi peuvent être perçus comme des systèmes de sacrifice altruiste qui permettent à la communauté bactérienne de survivre à une infection virale (Chopin et al 2005, Depardieu et al 2016). Plusieurs systèmes ont été décrits dans des phages modèles, comme avec le système RexAB du phage  $\lambda$ , le gène *old* du phage P2 ou encore dans le gène *icd* du prophage déficient ea14 de *E. coli*, qui protège la bactérie de l'infection par le phage T4 (Molineux 1991, Snyder 1995, Kao et al 1988, Lindahl et al 1970). Plus récemment, un système Abi utilisant une sérine/thréonine kinase, enzyme d'ordinaire observée uniquement chez les eucaryotes, a été décrit chez *Staphylococcus epidermidis* (Depardieu et al 2016).

Régulièrement de nouveaux mécanismes bactériens de résistance aux phages sont découverts, comme le BREX, et bien d'autres le seront encore probablement dans le futur (Doron et al 2018, Goldfarb et al 2015).

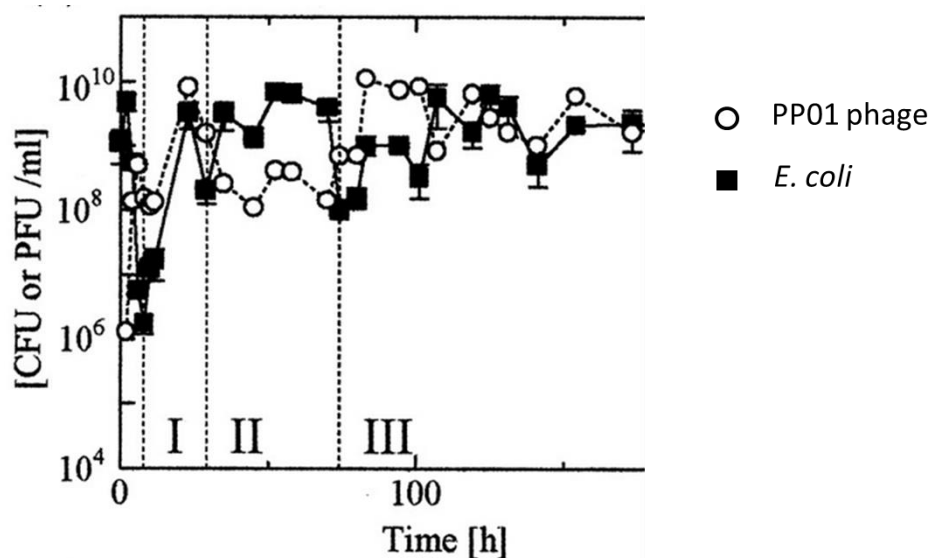


**Figure 7:** Schéma résumant les différentes étapes où la bactérie peut stopper le cycle infectieux phagique grâce à des mécanismes de résistance. Tiré de (Mirzaei et al 2017).

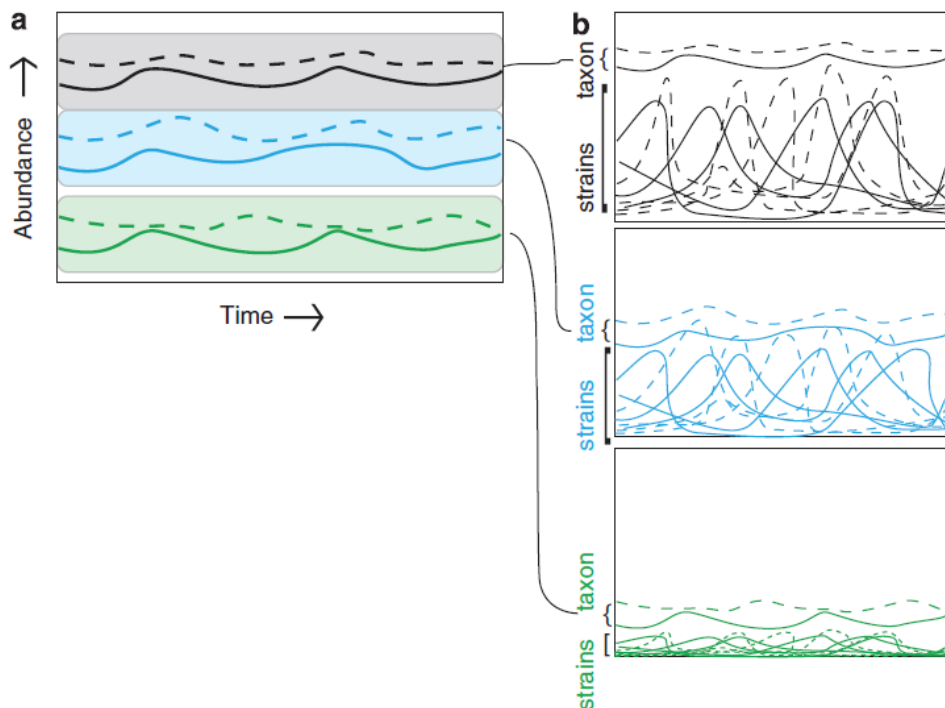
### 3.1.3 La course à l'armement

Lorsqu'une bactérie acquiert un gène ou une mutation la protégeant de l'infection d'un phage présent dans son environnement, celle-ci est positivement sélectionnée du fait d'une moindre mortalité. Dans des écosystèmes complexes, les espèces bactériennes sont en compétition les unes avec les autres. Par conséquent, une évolution permanente est nécessaire pour se maintenir dans l'écosystème, quand il existe des interactions antagonistes (prédation ou parasitisme). Ce phénomène évolutif est nommé « le paradoxe de la reine rouge » (Van Valen 1973) : la sélection de bactéries résistantes aux phages crée une pression de sélection pour l'acquisition par les phages de mutations

et/ou des gènes contrecarrant les résistances bactériennes, permettant de nouveau l'infection des bactéries. Celles-ci vont à nouveau évoluer pour résister au phage, et ainsi de suite. Cette dynamique, aussi appelée « course à l'armement », décrit très bien les évolutions de populations de phages et de bactéries observées dans différents environnements (Figure 8) (Gandon et al 2008, Woolhouse et al 2002, Dawkins et al 1979, Marston et al 2012, Middelboe et al 2009, Mizoguchi et al 2003). Cependant, la visualisation de cette dynamique à l'échelle d'un écosystème complexe a rarement été observée. Il est possible que cela résulte d'une mise en évidence difficile. En effet, l'impact des phages peut être masqué si les variations de populations dans les communautés bactériennes sont observées à une trop large échelle, ne mettant pas en évidence les sous-populations sensibles et résistantes aux phages respectivement (Figure 9).



**Figure 8 :** Schéma tiré de (Mizoguchi et al 2003), la figure représente la coévolution entre *E. coli* et le bactériophage PP01 *in vitro*. Les fortes variations de population du phage et de la bactérie correspondent à chaque fois à l'émergence soit d'un mutant bactérien capable de résister à l'infection par le phage, soit d'un phage mutant capable d'infecter le mutant bactérien.



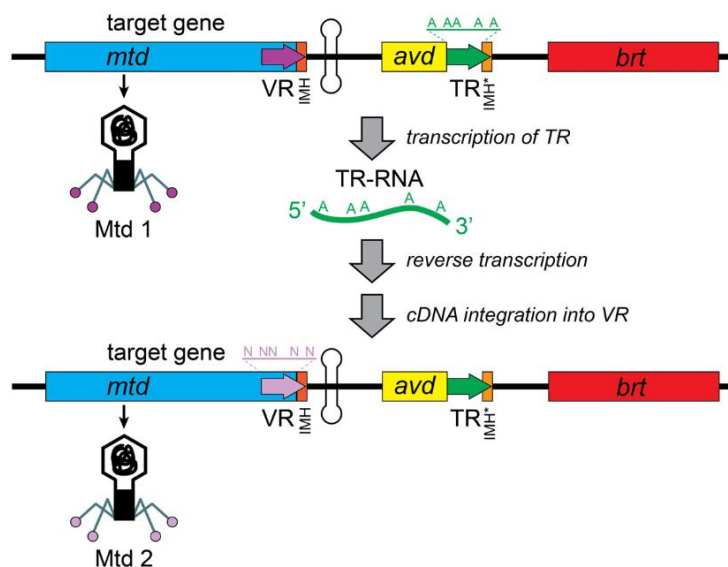
**Figure 9:** Schéma tiré de (Rodriguez-Brito et al 2010), la figure illustre que globalement la communauté semble stable, mais lorsque l'on regarde en détail la dynamique de chaque souche, il est possible qu'il existe des variations de populations des phages et de leurs bactéries hôtes qui sont d'abord sensibles, puis qui deviennent résistantes.

### 3.1.4 Les phages contre-attaquent : contre-mesures phagiques à la résistance bactérienne

En accord avec ces modèles évolutifs, un certain nombre de gènes et de mutations phagiques ont été décrits comme étant des contre-mesures phagiques aux mécanismes de défense bactériens. Par exemple certains phages ont acquis des gènes anti-CRISPR, ou bien ont évolué afin de ne plus avoir de sites de restriction reconnu par les systèmes RM, ou encore possèdent des gènes permettant de protéger ces sites (Bondy-Denomy et al 2013, Pawluk et al 2014, Rauch et al 2017, Pawluk et al 2018, Pawluk et al 2016, Sharp 1986, Lehman 1960). Concernant les modifications des récepteurs à la surface de la bactérie, les phages utilisent différentes stratégies. Ils peuvent utiliser leur capacité d'évolution afin de changer de récepteur grâce à des mutations ponctuelles, comme vu avec le phage  $\lambda$  (Meyer et al 2012). Mais certains possèdent des mécanismes moléculaires spécifiques permettant de générer à haute fréquence des variants de leur protéine impliquée dans la reconnaissance de l'hôte, ou RBP (pour receptor binding protein). Ils peuvent pour cela utiliser les invertases, comme décrit pour le phage Mu par exemple (Kahmann et al 1985). Ces enzymes catalysent une réaction de recombinaison entre deux sites spécifiques dans le génome du phage. La recombinaison a pour effet de changer l'orientation du brin d'ADN qui code la protéine RBP. Deux jeux de protéines sont

encodés dans ce segment d'ADN, chacun dans une orientation différente de l'ADN. Ainsi quand l'invertase change l'orientation du brin d'ADN, le phage exprime une autre RBP, qui peut lui permettre d'infecter un nouvel hôte.

Un autre système permettant au phage de changer de RBP, découvert récemment chez le phage BPP1 de *Bordetella bronchiseptica*, est le système DGR, pour *Diversity Generating Retroelement* (Liu et al 2002). Ce système, qui semble propre aux phages tempérés, permet de muter à très haute fréquence une trentaine d'acides aminés de la RBP (Figure 10) (Doulatov et al 2004); (Guo et al 2008, Wu et al 2018). Néanmoins, la protéine mutée n'a pas toujours de fonction connue (Schillinger et al 2012). Plusieurs études bio-informatiques font état d'une forte abondance de ce système dans les viromes et les phages de l'écosystème intestinal (Minot et al 2012, Ye 2014).



**Figure 10** : Fonctionnement général du DGR (Wu et al 2018). Le système de BPP1 est composé du gène cible *mtd*, avec une région (VR), le gène accessoire *avd*, la répétition modèle (TR) et la reverse transcriptase *brt*. La région TR est transcrite en ARN, puis rétrotranscrite en ADN par la reverse transcriptase. Celle-ci possède un taux d'erreur extrêmement élevé pour la rétrotranscription, notamment des Adénines. Par conséquent, n'importe lequel des quatre nucléotides est inséré dans la séquence ADN à la place de l'Adénine. L'ADNc aura donc un remplacement aléatoire des Adénines par un autre nucléotide dans sa séquence. L'ADNc est ensuite intégré dans l'ADN phagique en remplacement de la région VR initiale. La nouvelle région VR encode pour une nouvelle séquence protéique, créant ainsi une protéine de fibre de queue diversifiée.

Ces mécanismes permettent aux phages d'étendre leurs spectres d'hôtes. Même s'ils sont peu nombreux, certains phages possèdent un spectre d'hôte très étendu. Certains phages sont même capables d'infecter des bactéries très distantes phylogénétiquement, ils sont dits polyvalents (Flores et al 2013, Malki et al 2015, Moebus 1981, Paez-Espino et al 2016, Ross et al 2016). Comme les phages sont rarement testés sur des bactéries appartenant à des espèces différentes, il est fort possible que les phages polyvalents soient bien plus fréquents qu'on ne le pense. Cette idée est confortée par un certain nombre d'études expérimentales qui mettent en évidence un continuum entre des phages

spécialistes (spectre restreint) et généralistes (spectre large) (Flores et al 2011, Flores et al 2013, Martiny 2014, Poisot et al 2013, Weitz et al 2013).

Les premières études de coévolution entre phages et bactéries ont porté sur des phages modèles d'*E. coli*, dans des conditions de laboratoire. Une coévolution rapide a également été observée avec d'autres couples virus-hôtes en « mono souche » (1 bactérie et 1 phage à chaque fois) (Cowlshaw et al 1975, Middelboe et al 2001, Wei et al 2011, Wei et al 2010). Ces études n'observaient pas de coévolution allant d'au-delà de 1,5 cycles d'évolution réciproque. Ensuite, la bactérie acquérait toujours une mutation que le phage ne pouvait dépasser. (Dennehy 2012, Lenski 1985, Paynter 1969). Les mutations de ces études touchaient toujours la molécule de surface responsable de l'adhésion du phage sur la bactérie, ce qui bloquait ensuite son adsorption. Les auteurs Lenski et Levin en ont déduit que les phages et les bactéries ne possédaient pas le même potentiel évolutif (Lenski 1985). Cela s'explique car la bactérie peut modifier ou perdre le récepteur utilisé par le phage alors que ce dernier doit nécessairement outrepasser le changement de conformation du récepteur ou changer de récepteur, ce qui limite ses possibilités d'évolution par rapport à l'hôte. Néanmoins des cas opposés ont également été observés avec des coévolutions de type *arm-race* qui pouvaient durer jusqu'à 450 générations, comme pour le phage  $\phi 2$  et *Pseudomonas fluorescens* (Brockhurst et al 2007, Buckling et al 2002, Hall et al 2011a). À partir de 250 générations, la course à l'armement ralentit. Cela serait dû au coût évolutif du comportement généraliste de la bactérie et du phage (Hall et al 2011b). Concernant la bactérie, les résistances, liées à la modification des LPS de surface, ont un coût important (Brockhurst et al 2004, Buckling et al 2006). Pour le phage, le fait de ne plus être spécialisé pour une souche bactérienne, mais de devoir être capable d'infecter de nombreux variants, représente également un coût important (Hall et al 2011b, Poullain et al 2008). Les expériences effectuées avec *E. coli* l'avaient été avec la souche B, une souche de laboratoire qui présente de nombreuses parties manquantes dans son lipopolysaccharide (LPS), un site de fixation de nombreux phages, ce qui pourrait expliquer les possibilités limitées de coévolution phage-bactérie (Lenski 1985, Yoon et al 2012).

Des coévolutions phage-bactérie ont également été observées sur le long terme dans la nature (revue dans (Koskella et al 2014)). Néanmoins, on ne connaît pas, à l'heure actuelle, les facteurs environnementaux qui influencent la coévolution, même si certains facteurs sont suspectés comme la structure de l'environnement, la vitesse de croissance ou l'état de nutrition de l'hôte bactérien (Bohannan et al 1997, Schrag et al 1996).

L'impact des phages sur l'évolution des bactéries est aujourd'hui largement admis, et l'on observe de manière régulière de tels phénomènes de coévolution (Bouvier et al 2007, Weinbauer et al 2007). Les phages dirigent l'évolution de leurs hôtes bactériens, et poussent ceux-ci à continuellement évoluer et à se diversifier.

Par ailleurs, la prédation qu'exercent les phages sur leurs hôtes favorise l'émergence de bactéries capables d'évoluer plus rapidement. Cela a été montré dans une étude de 2007, dans laquelle la coévolution phage - bactérie a sélectionné des bactéries aux capacités modifiées pour le *mismatch repair* (Pal et al 2007). Les modifications augmentent le taux de mutation et de recombinaison des bactéries, et donc leur vitesse d'évolution. De récents travaux étudiant la coévolution entre bactéries et phages montrent que plus la population de bactéries infectées acquiert différents spacers contre le phage, plus la population bactérienne est résistante à la propagation du phage (van Houte et al 2016a, van Houte et al 2016b). Cela conforte l'idée que plus la population de la bactérie hôte possède différentes mutations conférant la résistance, plus le phage aura du mal à contrecarrer la résistance. Les mécanismes de résistance que les bactéries développent contre les phages ne sont pas sans impact sur la bactérie elle-même. Comme cité plus haut, selon le mécanisme de résistance de la bactérie, un coût plus ou moins important lié à la résistance peut être observé. Ainsi il est constaté, notamment pour les systèmes CRISPR-cas, que sans présence de phages dans l'environnement, ces systèmes ont tendance à être perdus par les bactéries, ce qui démontre qu'ils ont un coût pour celles-ci (Goldberg et al 2014, Goldberg et al 2018, van Houte et al 2016b, Vercoe et al 2013). Ce coût peut être dû à l'expression du CRISPR-cas en absence de menace et/ou au risque de coupures du génome bactérien liées à l'activation du CRISPR-cas (et à l'acquisition ou non de spacers « auto-immuns ») (Stern et al 2010). Enfin, des travaux de modélisation prédisent que la perte d'immunité périodique contre les phages, en tout cas pour le système CRISPR-cas, rendrait la coexistence phage-bactérie plus stable sur le long terme (Weissman et al 2018). Ce phénomène pourrait expliquer notamment pourquoi on ne retrouve des systèmes CRISPR-cas que dans 50% des bactéries, ou encore pourquoi il y a toujours des bactéries sensibles aux phages (Touchon et al 2016).

### **3.2 Avantages de la lysogénie sur la valeur sélective bactérienne**

Différents auteurs ont présenté de manière plus ou moins exhaustive les différents gènes portés par les prophages et influençant la fitness de la bactérie hôte (Bondy-Denomy 2014, Brussow et al 2004, Davies et al 2016, Feiner et al 2015, Howard-Varona et al 2018, Mirzaei et al 2017, Nanda et al 2015, Salmond & Fineran 2015). Ici, je vais présenter uniquement les informations qui m'ont semblées pertinentes pour les travaux que j'ai menés.

Au sein d'espèces bactériennes pathogènes opportunistes (*E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*...) la différence génétique entre des souches pathogènes et non pathogènes se situe souvent dans la présence de gènes de virulence localisés dans les régions variables des génomes. Or les phages représentent une partie non négligeable de ces régions, d'où le fait que régulièrement des études mettent en évidence la présence d'un gène important pour la survie ou le pouvoir pathogène de la bactérie dans un prophage. Lorsqu'un phage lysogénise une souche bactérienne, la survie et la multiplication du



phage dépendent alors en partie de la valeur sélective bactérienne. Il est compréhensible dans ce cas que les phages tempérés portent des gènes qui augmentent la valeur sélective de son hôte. Ces gènes, généralement exprimés au cours du cycle lysogénique, alors même que l'expression de la plupart des gènes phagique est éteinte, sont appelés morons. Régulièrement les morons sont nommés « facteur de virulence » à cause du biais de perception résultant de notre attention préférentielle concernant le pouvoir pathogène des bactéries, et que tout élément augmentant la survie du pathogène est en général associé à une plus forte virulence. Je vais ici décrire un certain nombre de mécanismes par lesquels les prophages améliorent la valeur sélective de leurs hôtes bactériens. Au vu du nombre encore très conséquent de gènes phagiques ayant une fonction inconnue, un nombre impressionnant de facteurs conférés par des morons restent encore probablement à découvrir.

Le fait que le phage apporte une nouvelle fonction à son hôte bactérien du fait de sa lysogénéisation est appelé « conversion lysogénique ». Les phages tempérés peuvent contribuer à la virulence ou la valeur sélective de leur hôte par quatre moyens : l'introduction d'un gène améliorant directement la valeur sélective, la disruption d'un gène, la lyse des compétiteurs, ou l'induction spontanée elle-même.

### 3.2.1 *Impact bénéfique par l'apport de toxines*

L'accroissement de la virulence bactérienne par des prophages a été décrit à de nombreuses reprises, et fait généralement intervenir des toxines. Un des exemples les plus connus concerne les Shiga-toxines (stx) de *E. coli*, portées par des phages lambdoïdes. Ces toxines ne sont pas exprimées durant la lysogénie, mais lors de l'induction du phage. Le taux d'induction spontané du phage portant la toxine suffit à produire suffisamment de toxines pour rendre la bactérie pathogène (Neely & Friedman 1998, Perna et al 1998, Tyler et al 2004). Un autre exemple très connu de toxine produite par un prophage est la toxine cholérique du phage CTXPhi. Cette toxine est responsable de la toxicité des souches pathogènes de *Vibrio cholerae* (Waldor & Mekalanos 1996). La protéine SopE de *Salmonella typhimurium*, fait partie d'un cocktail de protéines nécessaires à l'invasion des cellules eucaryotes par *Salmonella*. Dans un certain nombre de souches pathogènes, *sopE* est situé dans un prophage, SopEphi (Miold et al 1999). Enfin, chez *Streptococcus mitis*, un prophage exprime les protéines PlbA/B (Platelet Binding Protein), protéines qui font partie du virion du phage mais permettent aussi, une fois libérées dans l'environnement, aux bactéries d'adhérer aux cellules eucaryotes (Bensing et al 2001, Mitchell et al 2007). Les mêmes protéines ont été retrouvées dans un prophage de *Enterococcus faecalis* (Boyd 2012, Matos et al 2013).

### 3.2.2 *Impact bénéfique par l'apport de gène de résistance aux antibiotiques*

Il y a de rare cas également où les prophages apportent avec eux un gène de résistance à des antibiotiques (Banks et al 2003, Davies & Davies 2010, Schuch & Fischetti 2006). Un nouveau groupe de prophages plasmidiques P1-like retrouvés chez les *enterobacteriaceae*, notamment des

pathogènes, codent pour quelques gènes de résistance aux antibiotiques, mais il manque à l'heure actuelle des preuves d'activités de ces prophages (Bai et al 2017, Billard-Pomares et al 2014, Falgenhauer et al 2014, Gilcrease & Casjens 2018, Liu et al 2016, Shin & Ko 2015, Xu et al 2018, Yang et al 2017). Cette famille de phages représente pour l'instant une exception car les gènes de résistance aux antibiotiques ne sont pas fréquemment codés par les prophages, bien qu'une étude suggère que cela puisse être courant (Modi et al 2013). De grandes précautions doivent néanmoins être prises afin d'être sûr que les gènes détectés par homologie de séquences soient bien des gènes de résistance aux antibiotiques, et que les gènes de résistance détectés dans les virions ne proviennent en fait de transduction généralisée (Enault et al 2017).

### 3.2.3 Amélioration de la formation de biofilm

Les prophages peuvent également améliorer la compétitivité de leur hôte en améliorant leur capacité à former des biofilms. Cela provient paradoxalement du fait que l'induction des prophages et la lyse de la cellule hôte libère une grande quantité d'ADN dans l'environnement. Cet ADN extracellulaire (dit eADN) facilite la formation du biofilm. Ce fait est démontré chez *Pseudomonas aeruginosa* avec le phage Pf4, mais également chez *Shewanella oneidensis* et *Streptococcus pneumoniae* (Rice et al 2009, Webb et al 2003, Godeke et al 2011, Carrolo et al 2010). Pour *Neisseria meningitidis*, une protéine phagique Ig-like présente à la surface de la bactérie fixe les immunoglobulines circulantes IgG, facilitant l'agrégation des bactéries et la formation de biofilm (Muller et al 2013). Dans une autre souche de la même espèce, c'est le virion du phage MDA $\phi$  qui fixe les bactéries entre elles et leur permet de s'agglutiner, favorisant la formation du biofilm (Bille et al 2017).

### 3.2.4 Amélioration de la résistance à l'environnement

Les gènes morons portés par les phages peuvent également aider la bactérie à résister à certains stress environnementaux, à améliorer sa capacité de colonisation, d'adhésion ou de croissance. Deux morons ont été retrouvés chez le phage modèle  $\lambda$ . Ses gènes *bor* et *lom* participent respectivement à la résistance au sérum de l'hôte (complément) et à l'adhésion de *E. coli* aux cellules humaines (Barondess & Beckwith 1995, Vica Pacheco et al 1997). La souche d'*E. coli* MG1655 délétée de tous ses prophages cryptiques, dite  $\Delta 9$ , présente une résistance moindre aux stress osmotique, oxydatif, à l'acidité du milieu, elle a une moins bonne vitesse de croissance et une capacité réduite à former des biofilms (Wang et al 2010). Cependant, il faut noter que dans cette étude, le séquençage complet de la souche construite  $\Delta 9$  n'a pas été réalisé, ne permettant pas d'exclure que les phénotypes observés soient dûs à d'autres mutations que celles annoncées.

### 3.2.5 Les phages comme interrupteur génétique

Selon le site dans lequel ils s'intègrent, les phages peuvent inactiver ou non un gène de l'hôte. L'induction du phage, si elle ne mène pas à la lyse de l'hôte, aura pour effet de reformer le gène fonctionnel. Un cas des plus singuliers est celui du phage A118 avec *Listeria monocytogenes* (Loessner et al 2000). Le site d'intégration du phage se trouve dans le gène *comK*, régulateur transcriptionnel impliqué dans la pathogénicité de *Listeria* ce en permettant l'évasion de *Listeria* de la vacuole de phagocytose. Lorsque *Listeria* se retrouve dans la vacuole d'un macrophage, le prophage est induit, s'excise, active *comK*, puis se réintègre (Rabinovich et al 2012). Cela est étonnant, car en condition de laboratoire, lorsqu'il est induit, le phage lyse la cellule hôte (Loessner et al 2000). Cette observation laisse imaginer un type d'interaction phage-bactérie encore rarement observé, qui ne s'active que lors de la phagocytose de la bactérie. Ce phénomène de « *switch* » phénotypique associé à la présence d'un prophage dans un gène important pour la bactérie a également été décrit chez *Streptococcus* et *Vibrio* pour la mutagénèse et chez *Shewanella* avec un prophage cryptique pour l'adaptation au froid (Chu et al 2017, Scott et al 2012, Scott et al 2008, Zeng et al 2016).

### 3.2.6 La lyse des compétiteurs

L'avantage le plus évident qu'un prophage peut fournir à sa bactérie hôte est la lyse de compétiteurs. En effet, lorsqu'une souche de la même espèce sensible au phage en question entre en compétition avec la souche lysogène, les phages produits par la souche lysogène peuvent s'amplifier et lyser le compétiteur, libérant la niche écologique pour la souche lysogène (Bossi et al 2003). Le sacrifice d'une petite partie de la population bénéficie à la population isogénique (Hamilton 1964a, Hamilton 1964b). Cet avantage de la lysogène ne prévaut que les premiers temps de la compétition, puisque très rapidement toutes les bactéries sont lysogènes et donc il n'y a plus d'hôtes sensibles (Brown et al 2006, De Paepe et al 2016, Duerkop et al 2012, Gama et al 2013, Joo et al 2006). Un phénomène similaire, mais dans lequel il n'y a pas de phénomène d'amplification, est réalisé par des éléments dérivés d'éléments phagiques, comme le Système de Sécrétion de Type VI (TSS6), ou par des bactériocines du type F et R, observées originellement chez *Pseudomonas aeruginosa* et qui ressemblent à des protéines phagiques caudales (Bonemann et al 2010, Boyer et al 2009, Coetzee et al 1968, Gebhart et al 2012, Michel-Briand & Baysse 2002, Strauch et al 2001, Thompson & Pattee 1981, Zink et al 1995). En plus de lyser les concurrentes, le prophage apporte généralement à sa bactérie hôte une protection contre les autres phages, soit *via* l'immunité à la surinfection, soit *via* des systèmes d'exclusion de la surinfection (Brussow et al 2004).

### 3.2.7 Vecteur de transferts horizontaux

Il est estimé qu'à chaque seconde, il y a sur terre  $2 \cdot 10^{16}$  phénomènes de transferts horizontaux de gènes *via* des particules virales (Bushman 2002). Ce phénomène est majoritairement lié aux propriétés de transduction généralisée des phages et a été décrit depuis longtemps (Hershey et al 1952). Ce phénomène profite clairement à la bactérie hôte, à l'échelle de l'espèce, puisque c'est un moyen efficace d'augmenter la fréquence d'acquisition de nouveaux gènes, parfois aux dépens de souches compétitrices (Canchaya et al 2004, Haaber et al 2016). Certaines bactéries ont pris le contrôle d'un système exploitant ces propriétés de transduction des particules phagiques en formant des structures ressemblant aux capsides phagiques dédiées au transfert de gènes d'une bactérie à l'autre. Ils sont appelés GTA pour *Genes Transfert Agent*. Ces systèmes existent dans plusieurs clades bactériens différents des *α*-protéobactéries. Des systèmes similaires existent chez les *δ*-protéobactéries ou encore les *Firmicutes*, avec par exemple chez *Bacillus subtilis* le prophage défectif PBSX qui ressemble à un GTA (Lang & Beatty 2007, Lang et al 2012). Par ailleurs, chez *Staphylococcus aureus*, des éléments prophagiques nommés SapIs présentent de hautes capacités de transduction généralisée. Il est proposé que ces capacités viennent en partie de mécanismes d'encapsulation de génome de phage. En effet, ils utilisent une encapsulation du type Pac qui apparaît comme particulièrement favorable aux événements de transduction. Les SapIs sont généralement à proximité d'îlots de pathogénicité bactérienne, permettant la transduction de ceux-ci et des gènes de virulence localisés dans ces îlots, ce qui renforce l'intérêt porté à leurs études (Martinez-Rubio et al 2017, Penades et al 2015, Penades & Christie 2015).

### 3.2.8 Les phages comme source de nouveaux gènes

Un dernier point important est la capacité d'évolution des phages *via* les mutations et les événements de recombinaison, bien plus élevés que chez les bactéries (De Paepe et al 2014a, Drake 1991, Martinsohn et al 2008). Des gènes avec des fonctions nouvelles émergent donc continuellement du monde viral. Ces gènes sont ensuite apportés aux bactéries *via* la lysogénisation, ou *via* une recombinaison entre un phage actif et un prophage défectif qui conserve le nouveau gène pour la bactérie hôte, apportant de nouveaux phénotypes et créant ainsi de nouvelles souches bactériennes.

## 3.3 Aspect négatif de la lysogénie sur la valeur sélective de la bactérie

Malgré le fait que la lysogénie semble à l'avantage de la bactérie, la contrepartie est que la bactérie peut être lysée à n'importe quel instant par l'induction, spontanée ou induite, du prophage. La plupart des phages sont étudiés en conditions de laboratoire, dans lesquelles les populations de phages dans un surnageant de culture saturée sont généralement entre  $10^3$  et  $10^6$  PFU/mL (Fothergill et al 2011, Howe & Bade 1975). Ces niveaux de populations suggèrent un taux d'induction bas des

prophages, cependant il faut noter que la concentration de phages ne reflète que très mal le taux d'induction puisque les phages s'adsorbent aux bactéries très rapidement. Néanmoins quelques exceptions existent comme le phage BTP1 de *Salmonella typhimurium*, où la population du phage atteint  $10^9$  PFU/mL. Les auteurs de l'étude déduisent de cette population que le prophage représente un coût évolutif fort du fait de son apparente activité (Owen et al 2017). Dans les conditions naturelles, les choses semblent différentes. Ainsi il a été observé dans le tube digestif de souris axénique que le taux d'induction du phage  $\lambda$  est supérieur à celui mesuré *in vitro* (1,6% par rapport à 0.03%). Sur le long terme il apparaît que porter un prophage est un facteur négatif de compétitivité de la bactérie, lorsqu'elle est en concurrence avec une souche résistante au phage (De Paepe et al 2016). De plus la présence d'un prophage dans le chromosome bactérien crée une possibilité de mortalité massive pour la bactérie en cas d'induction massive. Un pourcentage important des phages connus est inductible par l'activation de la voie SOS. Or cette voie de signalisation est activable par certains antibiotiques génotoxiques. Quand de tels antibiotiques agissent sur une population de bactéries lysogènes, l'effet bactéricide est amplifié par l'induction des prophages. Un tel effet d'induction massif des prophages a pu être observé lors de traitements antibiotiques avec du carbadox, ou un mélange chlortétracycline/sulfaméthazine/pénicilline chez le porc, ou encore l'ampicilline et la ciprofloxacine chez la souris (Allen et al 2011, Modi et al 2013). Le traitement à la ciprofloxacine de la souche de *Staphylococcus aureus* NCTC8325 en dessous de la concentration minimale inhibitrice ne tue pas directement les bactéries, mais *via* l'induction d'un prophage qui lui tue la bactérie. La présence du prophage augmente donc la vulnérabilité de la bactérie à la ciprofloxacine (De Paepe et al 2014b, Sandvik et al 2015). Enfin, le fait d'avoir des prophages peut être une faiblesse exploitée par les compétiteurs de la niche. Dans l'étude de Selva *et al.*, *Streptococcus pneumoniae* colonise la niche écologique où se trouve *Staphylococcus aureus* via la production de ROS qui induisent un prophage de *S. aureus*. Par ailleurs, la présence régulière de systèmes d'additions dans les prophages est un argument supplémentaire allant dans le sens que la lysogénie présente un coût pour les bactéries, qui doit être compensé par la présence de gènes dans les prophages sélectionnant positivement les bactéries qui restent lysogènes (Lehnherr et al 1993, Pedersen et al 2003).

La théorie prédit que les prophages ne présentant pas d'utilité à l'hôte sont progressivement éliminés du chromosome bactérien (Bobay et al 2014, Wang et al 2010). Les prophages subiraient donc une pression de sélection soit pour être domestiqués - c'est-à-dire sous contrôle bactérien pour l'induction, soit pour être éliminés du génome bactérien (Menouni et al 2013). En effet, parmi les prophages décrits ci-dessus, un certain nombre sont d'anciens prophages domestiqués par la bactérie, n'ayant conservé que les fonctions utiles pour l'hôte. Dans certains environnements, comme dans l'intestin ou le vin, la lysogénie apparaît favorisée, suggérant une force évolutive favorisant ce mode de vie (Jaomanjaka 2016, Minot et al 2011, Reyes et al 2013). En résumé, les phages tempérés évoluent dans un équilibre dynamique entre une trop grande virulence qui leur serait coûteuse sur le long terme (perte de l'hôte sur lequel se multiplier) et une trop basse virulence qui ferait qu'ils ne se

propageraient pas assez pour compenser leur élimination inéluctable. Cet équilibre est dynamique car l'optimum entre virulence et tempérance est différent dans chaque environnement.

## 3.4 Impact écologique des interactions phage-bactéries

### 3.4.1 *Le modèle Kill the winner*

Il existe plusieurs façons de considérer les interactions entre les phages et les bactéries dans les différents écosystèmes microbiens. Le premier modèle est celui du « kill the winner » présenté plus haut en partie 3.1.1.

### 3.4.2 *Le modèle Kill the relative*

Le second modèle décrivant l'impact des phages sur des populations bactériennes est le modèle dit de « l'arme biologique » ou du *kill the relative* (Figure 11B). Ce modèle a déjà été mentionné plus haut : il décrit l'avantage d'une bactérie lysogène en compétition avec une souche susceptible au phage pour la même niche écologique (Bossi et al 2003, Brown et al 2006). Cela est d'autant plus efficace que la souche lysogène est présente en faible proportion par rapport à la souche sensible et que l'environnement permet un bon brassage de la population (*i.e* milieu liquide) (Duerkop et al 2012, Gama et al 2013) (Brown et al 2006). Les quelques études et observations faites sur ce modèle écologique s'accordent sur le fait que l'avantage évolutif ne sera que transitoire.

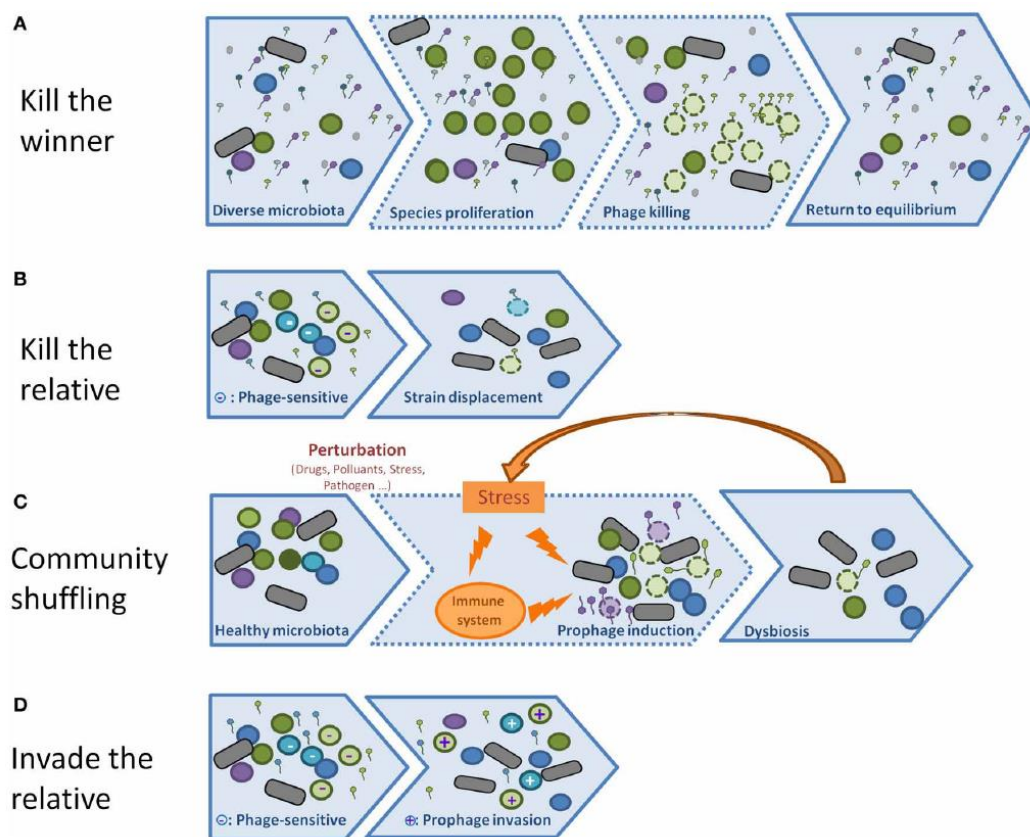
### 3.4.3 *Le modèle du community shuffling*

Comme je l'ai présenté plus haut, les prophages ne sont pas toujours avantageux pour leurs hôtes. Ceux-ci peuvent même fragiliser fortement leurs hôtes si un élément dans l'environnement augmente fortement le taux d'induction du phage. Les phages ont ainsi été comparés à des bombes à retardement moléculaire (Figure 11C). Dans les océans, ceux-ci peuvent être induits par des changements de salinité, ou la présence de polluants (Paul et al 2008). Dans d'autres environnements, les bactéries lysogènes peuvent lyser en présence de concentrations sous-inhibitrice d'antibiotique (Goerke et al 2006, Maiques et al 2006, Matos et al 2013, Meessen-Pinard et al 2012, Zhang et al 2000). De plus certaines bactéries peuvent utiliser les prophages pour tuer leurs compétitrices (Selva et al 2009). Ce phénomène a été observé dans certaines régions océaniques (Brum et al 2016) et certaines observations suggèrent que c'est également le cas dans le tube digestif des mammifères (De Paepe et al 2014b, De Paepe et al 2016, Mills et al 2013, Mirzaei 2017).

### 3.4.4 *Le modèle invade the relative*

Enfin, les phages en lysogénisant une souche peuvent apporter avec eux des gènes améliorant la *valeur sélective* de l'hôte, augmentant sa proportion dans l'écosystème et diversifiant l'écosystème

(Figure 11D). La forte fréquence de lysogénéisation observée dans certains environnements comme l'intestin suggère que les phages agiraient plus comme des vecteurs de transferts horizontaux de gène, que comme des prédateurs (De Paepe et al 2016).



**Figure 11:** les différents modèles proposés d'interactions phages-bactéries. Figure tirée de (De Paepe et al 2014b).

## 4. Phages et microbiote intestinal

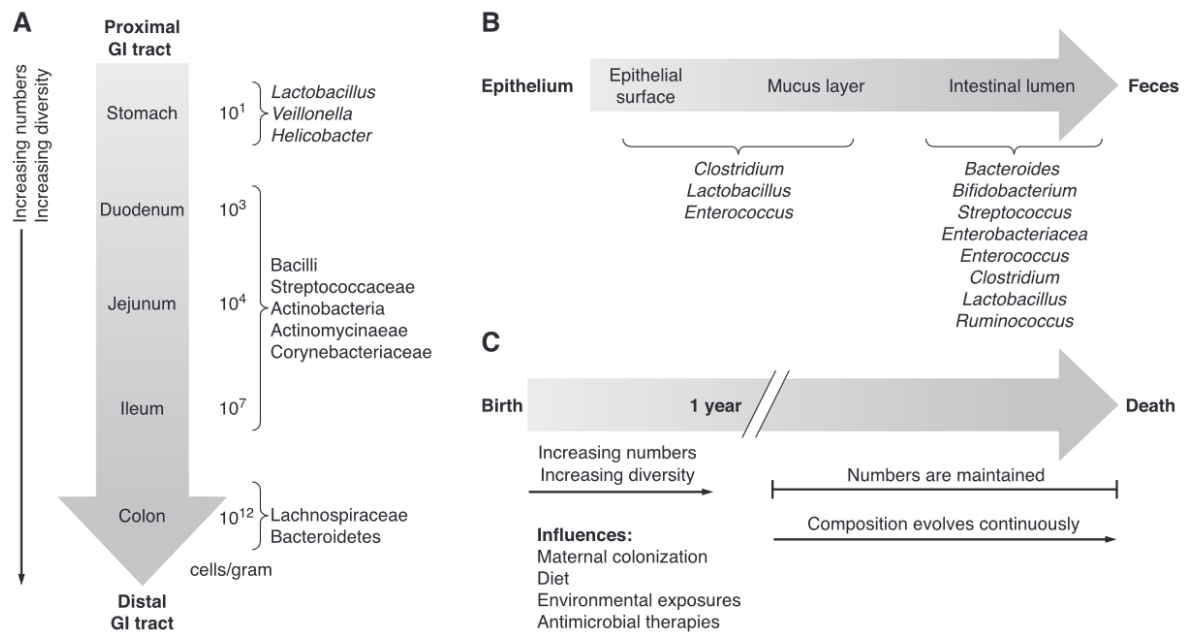
### 4.1 Le microbiote intestinal humain

Le microbiote intestinal est l'ensemble de la communauté microbienne qui peuple le tube digestif d'un hôte. Cette communauté microbienne est composée de  $5.10^{10}$  à  $5.10^{11}$  microorganismes/g ou /mL de fèces (la densité d'une fèces est proche de celle de l'eau chez l'Homme), en très grande majorité des bactéries (Vandeputte et al 2017). Néanmoins on y trouve également des virus (majoritairement des phages), des levures, des archées et des protistes (Qin et al 2010). La concentration bactérienne globale et la diversité en espèces du microbiote intestinal s'accroît du début à la fin du tractus digestif (Figure 12). La concentration bactérienne passe de  $10^1$ - $10^2$ /mL dans l'estomac à  $10^9$ - $10^{12}$ /mL dans l'iléon et le côlon. Le système immunitaire de l'hôte tolère la présence de cet écosystème microbien, mais les mécanismes de tolérance sont encore mal connus (Maynard et al 2012). La très grande majorité des bactéries du microbiote intestinal sont strictement anaérobies, et réside dans le gros intestin, probablement du fait de la distance de cette région de l'intestin par rapport aux stress que peuvent constituer les sels biliaires plus en amont, et du plus grand temps de rétention dans cette partie (Eckburg et al 2005). La production de mucus, plus importante dans le colon, peut aussi jouer un rôle dans cette plus forte abondance.

Les bactéries anaérobies strictes sont difficiles à cultiver, si bien que la diversité microbienne dans l'intestin a longtemps été sous-estimée. L'avènement du séquençage à haut débit a permis de découvrir l'extraordinaire diversité de cet écosystème microbien (Eckburg et al 2005). Le nombre global d'espèces bactériennes rencontrées dans le tube digestif est estimé être entre 500 et 1000 (Claesson et al 2009, Eckburg et al 2005). Par individu, le nombre moyen d'espèces est d'environ 150 (Qin et al 2010). Il existe un noyau d'espèces bactériennes clés présentes chez tous les individus : il y a ainsi 57 espèces présentes dans plus de 90% de la population (Dusko Ehrlich & Meta 2010). La flore intestinale humaine est très largement dominée par des *Bacteroidetes* (40%) et des *Firmicutes* (50%). Elles comprennent également des *Actinobacteries* (9%) et des *Proteobacteries* (1%) (Figure 13) (Arumugam et al 2011, Ley et al 2008, Tap et al 2009).

Les espèces bactériennes dont l'impact sur l'hôte est inconnu sont dites bactéries commensales. Les bactéries commensales qui peuvent devenir pathogènes si elles atteignent un niveau de population élevé dans le tube digestif sont appelées pathobiontes, ou pathogènes opportunistes. Les bactéries engagées dans une relation de bénéfice mutuel avec l'hôte sont dites bactéries mutualistes.





**Figure 12:** Schéma illustrant la localisation des différents groupes bactériens de la flore intestinale dans le tube digestif, et leur évolution avec l'âge. Tiré de (Sekirov et al 2010). a) Augmentation de la densité bactérienne le long du tractus digestif. b) répartition spatiale des lieux de résidence des différents groupes bactériens dans le tube digestif. c) Evolution du microbiote intestinal humain en fonction de l'âge.

#### 4.1.1 Le microbiote intestinal des nouveaux-nés

A la naissance, le tube digestif des nouveau-nés est stérile, puis il est colonisé rapidement par des bactéries essentiellement d'origine maternelle vaginale, digestive et cutanée. Dans les jours suivants viennent des bactéries de l'environnement (Mountzouris et al 2002). Les premières bactéries à coloniser le tube digestif sont appelées primo-colonisatrices. Celles-ci sont généralement aérobies ou anaérobies aéro-tolérantes, comme les Entérobactéries, les Entérocoques, les Staphylocoques ou encore les Lactobacilles (Bokulich et al 2016, Palmer et al 2007, Yassour et al 2016, Yatsunenکو et al 2012). La voie de naissance du nouveau-né a une incidence sur les espèces de primo-colonisatrices (Penders et al 2006).

La diversité microbienne est initialement faible, mais le microbiote intestinal de l'enfant connaît des changements rapides de composition, et la diversité ne cesse de croître pendant le développement de celui-ci jusqu'à atteindre le maximum de diversité entre deux et trois ans (Figure 12C) (Yatsunenکو et al 2012). A partir de cet âge la composition du microbiote intestinal se stabilise (Koenig et al 2011, Vanhoutte et al 2004).

#### 4.1.2 Facteurs expliquant la composition du microbiote intestinal chez l'adulte

La composition du microbiote intestinal diffère grandement d'un individu adulte à l'autre. Même si en termes d'espèce, le microbiote varie énormément d'un individu à l'autre, il apparaît une

certaine homogénéité dans la composition en grands taxons, mais la proportion relative de ces grands taxons varie d'un individu à l'autre.

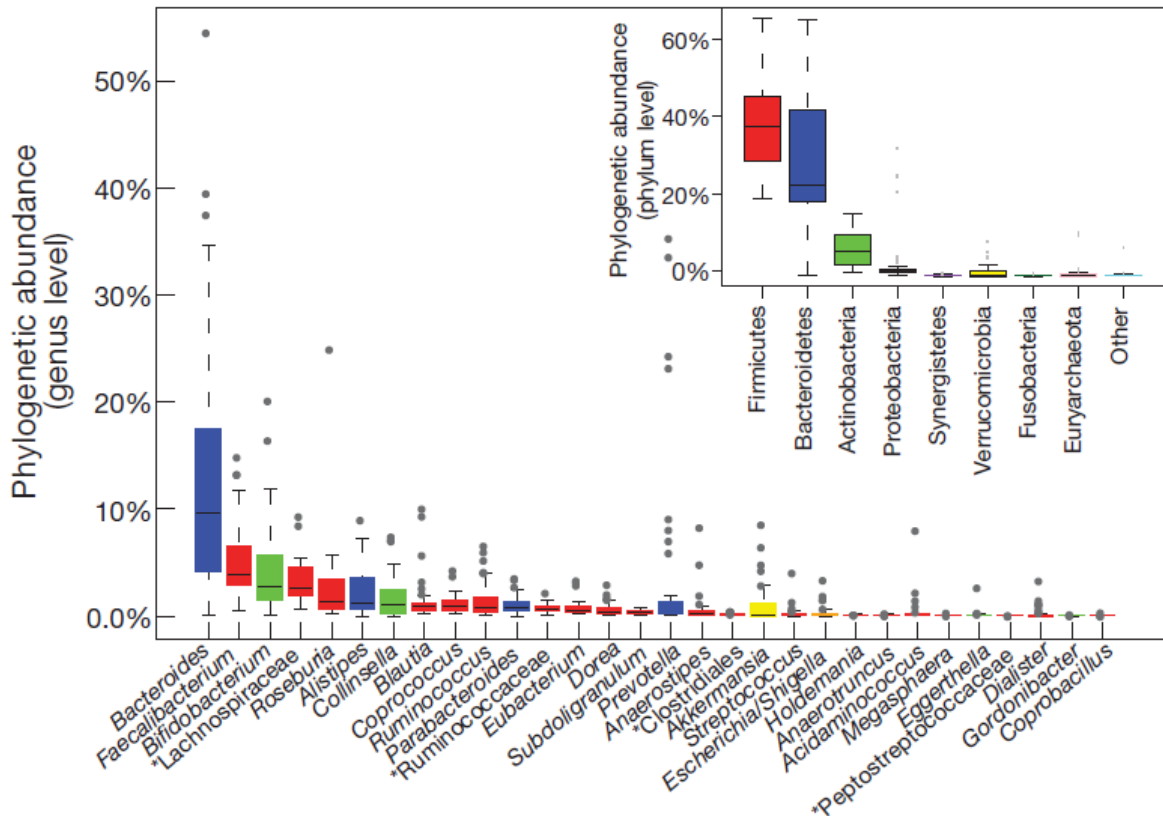
La composition de la flore intestinale est influencée par de nombreux facteurs environnementaux, comme l'alimentation, l'état immunitaire, l'origine géographique et l'activité physique de l'individu, ou encore la consommation d'antibiotique de l'individu. Cependant, l'ensemble de ces facteurs n'expliquent qu'une petite partie de la variation en composition (16,4%) (Falony et al 2016). La flore intestinale montre une forte résilience sur le long terme, et sitôt l'élément perturbateur disparu, la flore retourne généralement à l'état initial en quelques semaines ou mois (Qin et al 2010, Yatsunencko et al 2012, De Filippo et al 2010, Finegold 1983, Walker et al 2011, Claesson et al 2012, Bartosch 2004, Dethlefsen et al 2008, Dethlefsen & Relman 2011, Lambert et al 2015). Lorsque la composition de la flore intestinale est différente de ce qui est observé chez la majorité des individus, on parle de dysbiose intestinale. Les opinions divergent concernant la variabilité intra-individuelle (temporelle) du microbiote. Il semblerait que certains individus ont une composition du microbiote stable, et d'autres non (Brussow 2016). Lors du vieillissement, il est observé une modification progressive de la flore intestinale avec l'âge, caractérisée par un appauvrissement de la diversité, une baisse des Bacteroidetes et une augmentation relative des Enterococcus et des *E. coli* (Enck et al 2009, Jeffery et al 2016, Mariat et al 2009).

Récemment il était envisagé que les gènes de l'hôte avaient une influence majeure sur la composition du microbiote intestinal, notamment car la variabilité du microbiote intestinal inter-individuelle est supérieure à la variabilité du microbiote intra-individuelle, mais des études récentes remettent en cause ce postulat (Goodrich et al 2014, Rothschild et al 2018) : les variations de compositions du microbiote ne dépendraient que très peu de la génétique de l'hôte.

La composition du microbiote varie aussi selon la section du tube digestif (Jejunum, Duodenum, Ileum et Colon), en lien avec les différences de conditions physiologiques. Ainsi le pH du côlon proximal est de 5,5, contre 7 dans le côlon distal. Les espèces bactériennes varient elles aussi selon les segments intestinaux considérés (Donaldson et al 2016, Lepage et al 2005, Marteau et al 2001, Van den Abbeele et al 2011, Willing et al 2010). Enfin, les bactéries ne colonisent pas de manière identique la couche de mucus ou le lumen du tube digestif, et l'on peut parler de microbiote mucosal et luminal (Willing *et al.* 2010 ; Lepage *et al.* 2005 ; Zoetendal et al 2002). Le microbiote mucosal est majoritairement composé de Firmicutes et de Bacteroidetes, qui représentent 50.9% et 40.2% de la population respectivement (Figure 12B) (Hong et al 2011). L'environnement mucosal est riche en glycanes, issus du mucus, ce qui fournit une source d'énergie abondante pour les bactéries, en particulier celles qui sont capables de pénétrer dans le mucus et de le consommer.

Malgré les différences taxonomiques observées dans le microbiote intestinal de chaque individu, le microbiote intestinal humain possède les mêmes fonctions chez tous les individus. Cette homogénéité dans la fonction provient probablement de certaines espèces bactériennes clés et/ou des

fonctions métaboliques/génétiques constituant l'essentiel du microbiote humain. (Arumugam et al 2011, Tschop et al 2009). Par ailleurs, il existe une redondance dans les gènes et activités métaboliques impliqués dans des fonctions essentielles, plutôt qu'un lot d'espèces communes à tous (Turnbaugh et al 2009).



**Figure 13:** Composition du microbiote intestinal humain, en termes de genre bactérien ou de groupe bactérien. Tiré de (Arumugam et al 2011).

#### 4.1.3 Les fonctions du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal exerce de nombreuses fonctions liées directement à la santé de l'hôte. C'est pourquoi, aujourd'hui, celui-ci est considéré comme un organe du corps humain à part entière. La première de ces fonctions est la protection de l'hôte contre la colonisation de l'environnement mucosal par des pathogènes. Cette défense est fréquemment appelée « résistance à la colonisation » (Lawley & Walker 2013). Par exemple, les bactéries commensales colonisant la couche de mucus de l'intestin empêchent les pathogènes d'entrer en contact avec le tissu épithélial et d'envahir celui-ci (Kim et al 2008, Lee et al 2003). De plus, un certain nombre de bactéries intestinales synthétisent des composés antimicrobiens qui peuvent empêcher la colonisation par les pathogènes, comme les bactériocines (Croft et al 2011, Garcia-Gutierrez et al 2018). Les bactéries intestinales en consommant les nutriments disponibles réduisent les possibilités de colonisation d'éventuels pathogènes (Hooper et al 1999).

Le microbiote intestinal a un rôle primordial dans la nutrition de l'hôte (Gustafsson et al 1970, Resta 2009). Celui-ci dégrade les aliments non assimilés dans la partie supérieure du tractus digestif (Duodenum, Jéjunum, Iléum), notamment les fibres complexes, via la fermentation colique, et les transforme en composés assimilables par l'organisme. Chez l'homme, le microbiote synthétise les vitamines K et B12, ainsi que l'acide folique (Vitamine B9)(Resta 2009). La digestion des fibres complexes permet la synthèse d'acides gras à chaînes courtes (dit AGCC), notamment l'acétate, le propionate et le butyrate. 95% des AGCC sont absorbés par l'hôte, et servent notamment à la croissance des entérocytes (Macfarlane et al 1997). Seuls deux groupes bactériens effectuent la synthèse d'AGCC dans le microbiote intestinal : les *Clostridium* des clusters IV et XIVa (Van den Abbeele et al 2013). Beaucoup de bactéries appartenant aux *Clostridium*s sont encore non classées, d'où le fait que la nomenclature différencie juste des clusters d'espèces, et les grandes familles, comme les *Ruminococacae*, ou les *Lachnospiracae*. Les AGCC ont un rôle essentiel pour l'hôte et la santé humaine. Par exemple, le butyrate est une molécule dont les propriétés anti-inflammatoires sont de mieux en mieux décrites, par exemple sur la différenciation des lymphocyte T régulateur (treg), ainsi que la stimulation de production des cytokines IL-17, IL10 ou INF- $\gamma$ . (Chen et al 2017, Gibson & Rosella 1995, Peng et al 2009). De plus, la production des AGCC crée une acidification de l'environnement, ce qui constitue une autre barrière contre d'éventuels pathogènes dans le côlon (Duncan et al 2009). Enfin, le butyrate est utilisé comme source d'énergie par les colonocytes. Cela favorise le développement de la muqueuse et la maturation des cellules épithéliales, augmentant les capacités de l'épithélium à bloquer toute entrée bactérienne dans l'organisme (Soret et al 2010). L'acétate et le propionate sont utilisés comme source d'énergie au niveau du cœur, foie cerveau, etc. Le microbiote joue également un rôle dans la sensation de satiété, et donc dans les maladies comme l'obésité ou le diabète (Breton et al 2016).

Enfin, le dernier rôle majeur du microbiote intestinal concerne le développement postnatal et la maturation des tissus de l'hôte. L'élevage d'animaux axéniques (sans-germes) a mis en évidence des défauts dans le développement du tractus digestif, notamment au niveau des tissus épithéliaux, du réseau vasculaire et de la synthèse de mucus (Alam et al 1994, Cherbuy et al 2010, Gordon & Bruckner-Kardoss 1961, Gustafsson et al 1970, Savage et al 1981, Sharma et al 1995, Stappenbeck et al 2002). L'effet le plus important est sans doute sur dans le développement, l'éducation, et le maintien du système immunitaire de l'hôte (Nicaise et al 1993, Rooks & Garrett 2016).

Certains microorganismes ont co-évolué avec leur hôte depuis l'apparition des premières formes de vie pluricellulaires. Certaines espèces bactériennes ont développé des moyens de communiquer avec l'hôte *via* la production de signaux perceptibles par celui-ci. Ainsi *Bacteroidetes thetaiotaomicron*, espèce majoritaire de la flore intestinale humaine, émet un signal peptidique lorsque la concentration initiale en fibres est trop basse. L'hôte détecte le signal et augmente en réponse la synthèse de mucus, substrat utilisable par la bactérie (Mahowald et al 2009). Il en est de même pour l'espèce *Faecalibacterium prausnitzii*, une espèce dominante de la flore humaine très

sensible à l'oxygène : cette espèce produit un peptide, nommé MAM, qui a un effet anti-inflammatoire (Quevrain et al 2016a, Quevrain et al 2016b).

Etant donné l'importance du microbiote intestinal sur le fonctionnement du corps humain, plusieurs études se sont légitimement intéressées à l'implication de la flore intestinale dans les maladies humaines. On trouve ainsi une corrélation entre une dysbiose intestinale, qui se définit comme un déséquilibre durable de la composition du microbiote intestinal, et diverses maladies métaboliques et immunitaires, comme le diabète, l'obésité, les allergies, l'asthme, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, et même aujourd'hui des maladies mentales (Flint 2012, Marchesi et al 2016, Mayer et al 2015). La production de butyrate par le microbiote est fortement affectée chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Segain et al 2000). Des expériences effectuées chez des rongeurs axéniques et conventionnalisés ont clairement montré un rôle actif du microbiote intestinal dans l'obésité, le diabète et les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) (Backhed et al 2004, Kamada et al 2013, Larsen et al 2010, Ley et al 2006, Qin et al 2012).

## **4.2 Les dysbioses intestinales liés aux MICI et espèces bactériennes clés**

### *4.2.1 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin*

Parmi les dysbioses intestinales les mieux étudiées et caractérisées, on trouve celles associées aux Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI). Les MICI se caractérisent par des lésions inflammatoires le long de l'intestin et l'alternance de phases inflammatoires et de phases de rémission. Les symptômes incluent une perte de poids, de fortes douleurs abdominales, une diarrhée, des saignements gastro-intestinaux, une malnutrition et une grande fatigue. Même si elles ne menacent pas directement des individus, les MICI peuvent avoir d'importantes complications sur le long terme pour le patient. Le sigle MICI regroupe deux pathologies, la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (ou rectocolite hémorragique). La maladie de Crohn touche le tissu épithélial intestinal en profondeur, tandis que la colite ulcéreuse se caractérise par des lésions superficielles de l'épithélium. Même si les deux pathologies présentent des différences, le mécanisme global reste le même, elles sont les deux extrémités d'un continuum de pathologies inflammatoires de l'intestin (Bibiloni et al 2006, Gophna et al 2006, Vermeire et al 2012). Une inflammation anormale au niveau de l'épithélium modifie la composition du microbiote intestinal (dysbiose). La flore dysbiotique induit à son tour une réponse inflammatoire, et ainsi le cercle vicieux des MICI s'établit. Le rôle clé du microbiote dans ces maladies est connue depuis un certain nombre d'années, et se combine avec d'autres facteurs, comme les facteurs génétiques de l'hôte et les facteurs environnementaux. Ces derniers sont peu identifiés, hormis le fait d'être fumeur dans le cas de la maladie de Crohn (Chu et al 2016, Ni et al

2017, Ananthakrishnan 2015, Berkowitz et al 2018). Les traitements antibiotiques soulagent en partie les poussées inflammatoires, ce qui conforte l'idée que le microbiote intestinal joue un rôle important dans ces maladies. On ne sait pas en revanche si certaines espèces bactériennes participent au déclenchement, ou seulement à l'entretien de la maladie (Khan et al 2011, Seksik et al 2006, Wang et al 2012).

#### 4.2.2 Les dysbioses intestinales liées au MICI

L'arrivée de la métagénomique a permis d'explorer plus précisément la diversité bactérienne de la flore des patients et de la comparer à celle d'individus sains. Il est très vite apparu que les patients atteints de MICI présentent une flore microbienne altérée, et moins diversifiée que celle d'individus sains, que ce soit au niveau mucosal comme au niveau fécal (Joossens et al 2011, Lepage et al 2005, Manichanh et al 2006, Ott et al 2004, Sartor 2008, Sokol et al 2008, Willing et al 2010). La flore des patients atteints de MICI contient un nombre réduit de Firmicutes, dont une bonne partie sont des bactéries anaérobies productrices de butyrate, ainsi qu'une proportion augmentée de bactéries aérobies, notamment des *Enterobactéries* (Joossens et al 2011, Qin et al 2010, Sokol et al 2006, Willing et al 2010). Les malades atteints de la maladie de Crohn ont des populations d'*E. coli* plus élevées que chez les contrôles sains. De plus, les patients Crohn hébergent bien plus fréquemment en eux une population particulière de *E. coli*, les Adhéro-Invasives *Escherichia coli*, dites AIEC (Boudeau et al 1999). Ces AIEC sont suspectées de participer à la maladie de Crohn, du fait de leur forte prévalence chez les patients Crohn, (51,9 % chez les patients Crohn contre 16,7% chez les individus sains) (Martinez-Medina et al 2009). Le butyrate semble être un élément essentiel dans la tolérance du système immunitaire à la flore intestinale. La disparition ou la forte baisse de population des espèces productrices de butyrate pourrait être à l'origine du contexte pro-inflammatoire de l'intestin dans le cadre des MICI. De plus, cet environnement inflammatoire ne favorise pas le retour des bactéries productrices de butyrate. En effet, celle-ci sont extrêmement sensibles à l'oxygène et la grande quantité de ROS produite lors d'une inflammation ne permet pas leur croissance. Ainsi, certaines bactéries semblent particulièrement affectées, notamment l'espèce *Faecalibacterium prausnitzii*, dont la concentration dans le microbiote indique généralement si le patient est dans un épisode inflammatoire ou non, et les *Roseburia*, genre bactérien affecté dans un très grand nombre de pathologies humaines faisant intervenir une dysbiose intestinale (Machiels et al 2014, Mondot et al 2016, Sokol et al 2009, Tamanai-Shacoori et al 2017, Varela et al 2013). Certaines hypothèses basées sur la présence d'oxygène et le potentiel redox dans le tube digestif ont été avancées pour tenter d'expliquer les MICI (Albenberg et al 2014, Reese et al 2018, Rigottier-Gois 2013). Au contraire, certains pathobiontes prospèrent lors des inflammations intestinales, notamment les espèces *E. coli* et *Ruminococcus gnavus*. En résumé, les trois genres bactériens présentés ci-dessus, *Faecalibacterium*, *Roseburia* et *Escherichia* sont les marqueurs caractéristiques des dysbioses associées aux MICI et notamment à la maladie de Crohn. Mes travaux de thèse ont porté sur ces espèces bactériennes en particulier et sur leurs prophages.

### 4.2.3 *Faecalibacterium prausnitzii*

L'espèce *Faecalibacterium prausnitzii*, anciennement *Fusobacterium prausnitzii*, fut isolée dès 1974 et reconnue comme un des membres dominants de la flore intestinale humaine (Cato et al 1974, Duncan et al 2002b). Cette espèce est un clostridium appartenant au cluster IV, les *Ruminococcaceae* (Figure 14, carré rouge). C'est le second genre bactérien le plus abondant dans le microbiote intestinal humain (Arumugam et al 2011, Qin et al 2010). Cette espèce, extrêmement sensible à l'oxygène (EOS), est productrice de différents AGCC dont le butyrate. La bactérie n'est détectée chez l'enfant que entre 4 et 6 mois après la naissance, ce qui pose la question de l'origine de la colonisation et de la transmission des souches maternelles vers l'enfant (Hopkins et al 2005, Jost et al 2014). Reste-t-elle à l'état de spores dans le tube digestif de l'enfant jusqu'à ce que l'environnement devienne favorable ? ou bien colonise-t-elle le tube digestif *via* le lait maternel (Jost et al 2014)? Etrangement, le fait d'avoir des frères et sœurs plus âgés augmente la charge de *F. prausnitzii* dans le tube digestif des enfants de manière précoce (Laursen et al 2017). Cette espèce semble être une clé de voûte pour l'équilibre entre la flore intestinale et la réponse immunitaire, eu raison de ses capacités anti-inflammatoires (voir plus haut). Ainsi, l'absence ou la forte baisse de concentration de cette bactérie chez les patients de MICI, notamment dans le cadre de la maladie de Crohn, pourrait expliquer une partie du cercle vicieux observé dans ces maladies. L'utilisation de *F. prausnitzii* comme probiotique de nouvelle génération pourrait apporter un traitement permettant d'augmenter les chances de rémission après une poussée inflammatoire (Martin et al 2014). Une étude récente suppose également un rôle de *F. prausnitzii* dans l'asthme, car des enfants qui ne possèdent pas ou peu de *F. prausnitzii* à un an ont plus de risques d'être asthmatiques (Stokholm et al 2018). Cela traduit l'intérêt pour l'enfant d'être colonisé tôt par cette bactérie mutualiste.





(Patterson et al 2017, Thaddeus B. Stanton 1984, Van den Abbeele et al 2013). Tout comme *F. prausnitzii*, *Roseburia* semble être un genre bactérien clé dans l'équilibre de la flore intestinale. Enfin une étude a mis en évidence la synthèse de composés antimicrobiens contre *Bacillus subtilis* par *Roseburia*, participant probablement à la résistance du microbiote à l'invasion par des pathogènes (Hatzioanou et al 2013).

#### 4.2.5 Les *E. coli* AIEC

Les AIEC sont suspectées d'être une des causes de la maladie de Crohn, étant plus fréquentes chez les patients que chez les individus sains. Cette observation a été faite dans plusieurs pays développés (Darfeuille-Michaud et al 2004, Martin et al 2004, Sasaki et al 2007, Martinez-Medina et al 2009). La souche LF82 est la souche modèle pour l'étude des différents mécanismes à l'origine de la prolifération de ce groupe bactérien chez les patients (Miquel et al 2010). Il faut cependant noter que les AIEC composent un groupe hétérogène génétiquement, qui regroupe des souches faisant partie de tous les phylogroupes d'*E. coli* (Kotlowski et al 2007, Rakitina et al 2017). Ces *E. coli* ont la particularité d'adhérer aux cellules épithéliales dans le côlon et l'iléon et de les envahir *via* l'interaction entre OmpC et la protéine CEACAM6 de l'hôte (Barnich et al 2007, Carvalho et al 2009, Darfeuille-Michaud et al 1998, Martin et al 2004, Rolhion et al 2007). De plus, les AIEC sont capables de survivre et de se répliquer dans les macrophages (Lapaquette et al 2010). Chez les patients Crohn, il apparaît que les anticorps présents dans l'intestin reconnaissent en majorité des protéines de membranes et de flagelle d'*E. coli*. Or les AIEC activent leurs flagelles à l'approche de l'épithélium (en détectant le mucus), ainsi que dans le lumen, au contraire des souches commensales d'*E. coli* (Sevrin et al 2018). Les AIEC conservent donc une forte capacité immunogène à proximité de l'épithélium. Les AIEC participeraient donc au cercle vicieux de la maladie de Crohn en exacerbant la réponse inflammatoire, du fait du caractère immunogène de la bactérie et du contact direct avec l'épithélium.

### 4.3 Rôle des phages dans la stabilité du microbiote intestinal humain

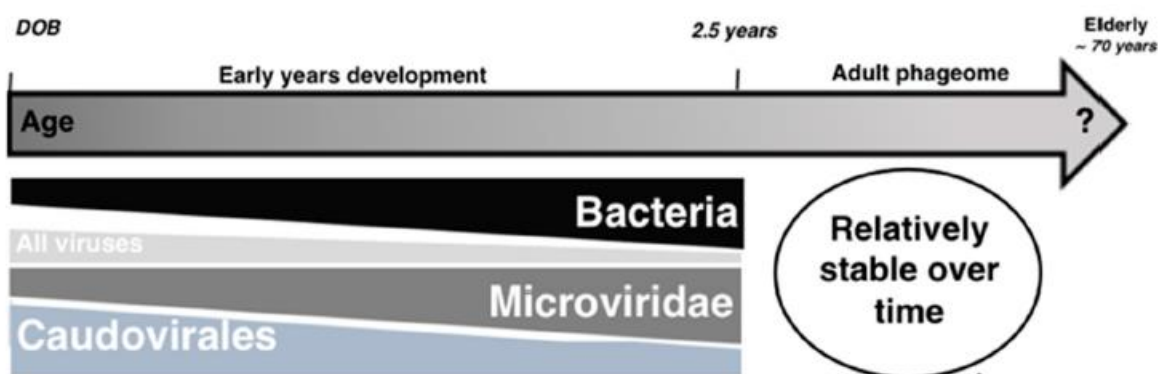
Différentes hypothèses ont été exposées plus haut pour expliquer les dysbioses intestinales associées aux MICI. Une hypothèse pas encore présentée repose sur la présence des phages dans l'intestin et leur impact sur les bactéries de l'intestin (Mills et al 2013, Rodriguez-Brito et al 2010), à l'instar de ce qui a été observé dans les océans. L'impact des phages sur le microbiote intestinal est encore mal connu, malgré un nombre croissant d'études s'attaquant au sujet.

#### 4.3.1 Les phages du microbiote intestinal chez les enfants

Quelques études se sont intéressées à la colonisation du tube digestif des nouveau-nés par les phages, entre quelques jours après la naissance et 3 ans, âge où la flore intestinale peut être considérée

comme « adulte » (Breitbart et al 2008, Lim et al 2015, Reyes et al 2015, Sharon et al 2013). Ces études ont montré que les phages colonisaient très tôt le tube digestif, entre un et quatre jours après la naissance, suivant donc de près les bactéries. La diversité des phages juste après la naissance (d'une semaine à trois mois) est très faible, mais dynamique avec des changements de communauté très rapides. La communauté phagique entre jeunes enfants se ressemble plus qu'entre adultes (Lim et al 2015, Reyes et al 2015). Avec le temps, on observe une baisse progressive de la proportion relative des phages à ADN double-brin, notamment les *Siphoviridae*, parallèlement à une augmentation progressive de phages à ADN sb (voir Figure 15). Il est attendu qu'une faible diversité et densité bactérienne entraîne une faible diversité virale, or, étonnamment, c'est le contraire qui est observé (Lim et al 2015). La conclusion de cette étude est à prendre avec précaution, étant basée sur l'analyse d'une faible proportion des séquences, il y a peut-être un biais. De plus les auteurs ont utilisé la technique du *multiple displacement amplification* (MDA) pour amplifier l'ADN phagiques. Cette technique présente une amplification préférentielle des ADNsb, c'est une source de biais supplémentaire dans ces analyses.

La source des phages colonisant le tube digestif des jeunes enfants est encore mal connue. Breitbart *et al.* ont montré que les phages ne semblent pas venir du lait maternel ou du lait en poudre, contrairement à ce qui est imaginé pour certaines bactéries. Les bactéries lysogènes sont une source évidente de phages dans l'intestin : les prophages contenus dans ces souches constituent un réservoir qui alimente la communauté virale (Morowitz et al 2011, Sharon et al 2013). Ces mêmes prophages peuvent être en partie responsables des changements de populations bactériennes chez l'enfant (Lugli et al 2016).



**Figure 15:** Schéma représentant les évolutions de populations dans le tube digestif entre la naissance de l'enfant et ses trois ans. Tiré de (Manrique et al 2017).

#### 4.3.2 Les phages du microbiote intestinal chez l'adulte

Chez l'adulte, beaucoup plus d'études ont été faites sur le virome intestinal. Ces études ont également montré que la très grande majorité des séquences virales obtenues ne possèdent aucun homologue connu dans les bases de données publiques. Ce manque de connaissances sur les phages de l'intestin peut s'expliquer par la sous-représentation des phages de *Firmicutes* et de *Bacteroidetes* intestinaux dans les banques de données publiques (Ogilvie & Jones 2015). Celles-ci sont fortement

biaisées, 75% des phages disponibles sur la virale database du NCB étant des phages de *Protéobactéries* ou de bactéries pathogènes.

Dans plusieurs études, les particules virales ont été extraites des fèces et analysées par microscopie électronique à transmission (TEM) (Castro-Mejia et al 2015, Hoyles et al 2014). Les images ont montré un grand nombre de *Caudoviridae* et de *Microviridae*. Selon ces mêmes études, la quantité de phages dans les fèces est aux alentours de  $10^9/g$  de fèces, soit 50 à 500 fois moins de phages que de bactéries. Ce ratio est fort différent de celui des autres écosystèmes bactériens étudiés, où le ratio V/M (le nombre de Virus divisé par le nombre de Microbes) est plutôt entre 1 et 100 (Cobian Guemes et al 2016, Knowles et al 2016). Il a également été observé que certains phages possèdent la capacité d'adhérer au mucus intestinal, et cela jouerait peut-être un rôle dans la quantité de virus récupérés dans les fèces (Barr et al 2013, Barr et al 2015). Plusieurs études ont montré la stabilité de la communauté virale intestinale chez l'adulte au cours du temps (Manrique et al 2017, Minot et al 2013, Minot et al 2011, Reyes et al 2010). Dans des chémostats inoculés avec des échantillons fécaux, le microbiote et le virome sont dans une dynamique stable pendant de longues périodes, et les virus de l'échantillon sont similaires à ceux de l'échantillon d'origine (Santiago-Rodriguez et al 2015).

Dans l'intestin, les phages ont en majorité un génome à ADN db et sb. Les rares phages à ARN proviendraient majoritairement de l'alimentation. Certaines études récentes ont tenté de résoudre le problème du manque de connaissances des phages intestinaux en constituant une collection de contigs de phage intestinaux, assemblés de reads issus de séquençage Shot-gun à haut débit (Manrique et al 2016, Minot et al 2011, Reyes et al 2015, Reyes et al 2010). De plus certains programmes efficaces ont été développés afin d'augmenter les séquences virales présentes dans les banques de données, en recherchant des séquences prophagiques dans les immenses collections de génomes bactériens disponibles (Paez-Espino et al 2016, Roux et al 2015). Il apparaît que quelques phages présents chez la majorité des individus représenteraient la majorité de la communauté phagique dans l'intestin (Manrique et al 2016, Minot et al 2011). Le plus prévalent, quasi ubiquitaire chez l'homme, est le Crassphage (Dutilh *et al.* 2014), dont l'hôte serait *Bacteroides intestinalis* (Shkoporov et al 2018). En plus de ce phage, il existerait un «core- phageome » intestinal de huit phages qui est retrouvé chez plus de 50% des individus testés (Dutilh et al 2014, Manrique et al 2016, Ogilvie et al 2013, Paez-Espino et al 2016, Reyes et al 2015, Stern et al 2012). Les personnes qui vivent dans le même environnement semblent partager certains phages (Robles-Sikisaka et al 2013). Certains de ces phages se transmettent entre personnes proches, chez les individus non traités aux antibiotiques (Ly et al 2016). Les données métagénomiques suggèrent que dans l'intestin il y a au moins autant de phages tempérés que de virulents, ce qui diffère de la situation marine, où la majorité des phages sont virulents (Minot et al 2011, Reyes et al 2010, Stern et al 2012). Etant donné la densité bactérienne observée, il est étonnant de ne pas observer une majorité de phages virulents, car la théorie prédit que la lysogénie est favorisée en milieu pauvre (Stewart & Levin 1984). Ces phages tempérés

proviennent très probablement de l'induction spontanée de prophages, comme le suggère le grand nombre de prophages dans les génomes de souches intestinales (Kim 2018, Santiago-Rodriguez et al 2015, Touchon et al 2016).

#### 4.3.3 *Le problème d'attribution des hôtes bactériens aux phages*

Le manque de connaissances sur les interactions phages-bactéries dans l'environnement intestinal provient notamment du manque de connaissances des hôtes bactériens des différents phages identifiés dans les viromes. C'était par exemple longtemps le cas du Crassphage, le phage le plus abondant dans l'intestin et pourtant on ne connaissait pas son hôte. Plusieurs méthodes ont été proposées pour associer un phage à son hôte et certaines, comme l'approche avec les K-mer, semblent prometteuses (Edwards et al 2016, Galiez et al 2017, Villarroel et al 2016). Cette approche consiste à rechercher dans les séquences les proportions de chaque combinaison de k nucléotides (k-mer). Chaque organisme possède un biais dans ces proportions de k-mer. Or les phages imitent souvent les caractéristiques du génome de leur hôte afin d'optimiser leurs cycles infectieux. Par conséquent, si un phage et une bactérie présentent un biais de k-mer identique, cela suggère que le phage infecte la bactérie en question. Une autre approche fréquemment utilisée repose sur l'analyse des spacers des systèmes CRISPR-cas. Une autre approche pour prédire l'hôte repose sur la proximité physique des ADN viraux et bactériens pendant le cycle lytique (Marbouty et al 2017, Marbouty & Koszul 2017). Une autre approche, mais limitée aux bactéries cultivables, est basée sur l'obtention de plage de lyse. Enfin, il est à noter une étude avec une excellente approche, où les auteurs ont colonisé des souris avec 15 espèces bactériennes intestinales, puis ont inoculé des VLP intestinales dans les souris (Reyes et al 2013). Ils ont ainsi pu observer la multiplication de plusieurs phages sur leurs hôtes bactériens en enregistrant les fortes baisses de population des bactéries hôtes. Deux couples phage-bactérie ont ainsi pu être identifiés. Cette approche réductionniste, utilisant des modèles animaux à flore simplifiée permet de mieux contrôler les variations de l'écosystème étudié, notamment au niveau de souches individuelles.

## 4.4 **Impact des phages sur la composition du microbiote**

L'idée que les phages soient importants pour la santé humaine et l'immunité, *via* la modulation de la composition de la flore intestinale, a commencé à émerger ces dernières années (De Paepe et al 2014b, Manrique et al 2017, Mills et al 2013, Mirzaei 2017). Il a aussi été proposé que certains phages, par leur capacité à se fixer au mucus intestinal, imprègnent le mucus et créent une barrière virale capable d'infecter toute bactérie qui tenterait de traverser le mucus pour envahir les tissus de l'hôte (Barr 2017). Ces phages constitueraient donc une sorte de mécanisme de défense innée contre les pathogènes.

#### 4.4.1 *Le virome intestinal chez les patients MICI*

Deux études se sont intéressées en particulier à la communauté virale du microbiote des patients atteints de MICI (Manrique et al 2016, Norman et al 2015). Les phages dominants y sont en plus faible concentration, et une plus grande diversité virale est observée. Étonnement, il apparaît y avoir plus de particules virales dans le mucus de patients atteints de MICI que chez des individus sains (Lepage et al 2008). Ces différences dans le virome de patients par rapport aux contrôles peut indiquer que le « phageome » humain possède une fonction de régulation de la flore microbienne. Cela est appuyé par une série de travaux récents sur le transfert de flore intestinale pour soigner des infections à *Clostridium difficile* (Broecker et al 2016, Broecker et al 2013, Broecker et al 2017, Chehoud et al 2016). Les viromes des patients greffés changent, pour finir par ressembler fortement aux viromes des donneurs. De plus ces nouveaux viromes sont stables dans le temps, comme s'ils parvenaient à recréer un équilibre intestinal après les dysbioses intestinales créées par *C. difficile*. Le plus surprenant est une étude de greffe fécale de la fraction filtrée de fèces (donc virus et vésicules) du donneur (Chehoud et al 2016). La greffe virale a fonctionné et guéri le patient. Cela suggère que la guérison à l'infection par *C. difficile* est due à des phages qui auraient soit lysé *C. difficile*, soit lysogénisé des souches bactériennes en leur conférant la capacité de chasser *C. difficile* de la flore intestinale. Il faut cependant rester prudent car cette étude a été menée sur un très petit nombre de patients. Enfin, comme plusieurs travaux ont montré qu'il existait des phages ayant de très large spectre d'hôte, il n'est pas impossible que des phages infectant des espèces commensales proches de *C. difficile* aient infecté celui-ci, conduisant à sa disparition.

#### 4.4.2 *Le modèle kill the winner dans l'environnement intestinal*

La modification de la composition de la population phagique dans le cadre des MICI d'une part, ainsi que les potentiels effets bénéfiques de viromes sains sur les infections à *C. difficile* suggèrent que les phages jouent un rôle important sur l'équilibre de la flore microbienne intestinale. Il apparaît donc important de s'intéresser à la population phagique dans les dysbioses intestinales. Le rôle des phages pourrait s'exercer *via* les différentes interactions que nous avons détaillées précédemment. Parmi ces interactions, une dynamique de type « *kill the winner* » (lyse d'une partie importante de la population bactérienne) a été observée dans une étude de Reyes *et al.* : les phages introduits chez les souris gnotobiotiques lysent une fraction importante de certaines espèces (Reyes et al 2013). Néanmoins, les bactéries lysées ne sont pas maintenues longtemps à un bas niveau de population, même si le phage perdure dans l'environnement intestinal. Ce phénomène a déjà été observé dans des études employant également des modèles de souris à microbiote simplifié (Chibani-Chennoufi et al 2004, Maura & Debarbieux 2012, Weiss et al 2009): le phage se multiplie, mais pas à un niveau suffisant pour impacter durablement les populations bactériennes. De plus, les auteurs de ces études ne sont pas parvenus à isoler des souches bactériennes résistantes aux phages de ces souris, montrant que la pression de sélection par le phage est relativement faible. Enfin, des dynamiques de

populations correspondant à ce modèle n'ont jamais été observées dans le tube digestif des mammifères (homme, porc, cheval) (Allen et al 2011, Golomidova et al 2007, Reyes et al 2010). La raison généralement invoquée est le problème d'échelle de temps, car il y a superposition des échelles écologiques et évolutives, et l'apparition de mutants masquent les interactions (dynamique de la reine rouge discutée précédemment). Une autre raison pour laquelle de telles dynamiques ne sont pas observées pourrait être la différence de structure de l'environnement intestinal. Le tube digestif, par sa structure semi-solide et son organisation qui permet facilement à une bactérie d'échapper à son phage et de s'en cacher, permettrait de protéger des bactéries sensibles de l'infection par les phages (Brussow 2013). Cela est probablement dû à l'organisation tridimensionnelle de l'environnement intestinal. De plus, la majorité des bactéries dans le tube digestif sont en concentration supérieure au seuil de population théoriquement nécessaire à l'infection virale. Et contrairement à l'océan, on observe des espèces bactériennes qui restent dominantes sur le long terme dans la population (Donaldson et al 2018). L'ensemble de ces résultats suggèrent une dynamique différente de ce qui est attendu par le modèle *kill the winner*. Un nouveau modèle a été proposé récemment, nommé *Piggyback the winner* (Knowles et al 2016). Ce modèle mathématique inclut la forte présence des phages tempérés et propose que la lysogénie est favorisée lorsque les bactéries atteignent des hautes densités de population, comme dans le tube digestif. L'étude sur l'arbitrium appuie ce modèle (Erez et al 2017).

#### 4.4.3 *Le modèle de l'arme biologique dans l'environnement intestinal*

Le second modèle proposé concernant l'impact des phages sur les populations bactériennes est celui de « l'arme biologique », où les prophages d'une souche lui servent d'armes pour lyser les bactéries compétitrices, généralement phylogénétiquement proches. Dans l'environnement intestinal, même si cela a été démontré deux fois, l'avantage conféré par le prophage n'était que transitoire, du fait de la lysogénisation des concurrentes (De Paepe et al 2016, Duerkop et al 2012). Or, il a été observé que la fréquence de lysogénisation d'un prophage pouvait être plus élevée dans le tube digestif qu'*in vitro* (De Paepe et al 2016). De plus, dans un écosystème complexe tel que l'intestin, il y a peu de chances que le phage de l'espèce invasive puisse lyser toutes les bactéries de l'environnement vu que celles-ci sont éparpillées et surtout très diverses. Ces éléments rendent peu probable que les interactions phage-bactérie dans l'intestin correspondent majoritairement à ce modèle.

#### 4.4.4 *Le modèle community shuffling dans l'environnement intestinal*

Le dernier modèle d'interaction pouvant lier les phages à l'apparition des dysbioses intestinales est le modèle du *community shuffling*, dit également modèle de la bombe à retardement moléculaire. Un certain nombre d'études confortent l'idée que ce modèle d'interaction reflète au mieux les interactions phages-bactéries dans l'intestin. Premièrement, le fait qu'il y ait plus de particules virales dans l'intestin des patients MICI (Lepage et al 2008), pourrait s'expliquer par une

plus forte induction des prophages en conditions inflammatoires. En effet, l'inflammation génère des ROS dans l'intestin, qui pourraient générer des dégâts à l'ADN et induire les prophages : quelques cas ont été rapportés où la présence de ROS induit les prophages de souches bactériennes même aérobies, comme *E. coli*, ou *Staphylococcus aureus* (Selva et al 2009). Les ROS présents dans l'environnement seraient alors responsable de l'activation des prophages (Rigottier-Gois 2013). Or, comme vu précédemment, la lysogénie est très répandue dans les espèces intestinales, ce qui rend possible la disparition de nombreuses bactéries du fait de l'induction (Kim 2018, Touchon et al 2016)

Dans l'étude de Kim *et al.*, des rats obèses subissent une inflammation intestinale bas bruit (Kim & Bae 2016). Cette inflammation a pour effet de modifier grandement la flore bactérienne mucoale, mais pas la luminale, ainsi que la communauté virale mucoale, suggérant une induction des prophages par l'inflammation bas bruit. Ces observations confortent l'idée que l'inflammation induit des prophages, mais comme montré plus tard dans mes résultats, cette observation n'est pas généralisable.

Ce modèle de *community shuffling* par les prophages est inspiré de ce qui a été observé précédemment pour la flore vaginale (Pavlova & Tao 2000). Cette flore est dominée par les Lactobacilles, mais lorsque ceux-ci sont absents la colonisation par des bactéries pathogènes est favorisée. Or il s'avère que les femmes fumeuses ont plus de risques de faire des infections à *E. coli* à répétition. Les auteurs ont testé différents composés de cigarette et en ont trouvé certains capables d'induire les prophages de certaines souches de *Lactobacilles*. De plus ces phages sont capables d'infecter un large spectre de souches, ce qui pourrait favoriser la dysbiose vaginale à l'origine des infections. En conclusion, un faisceau d'indices et d'études montre la validité du modèle d'interaction phage-bactérie de la bombe à retardement moléculaire.

Comme j'ai pu le montrer au cours de cette introduction, un faisceau d'éléments suggère que les phages pouvaient avoir un impact sur la stabilité du microbiote intestinal. Néanmoins, ce sujet est encore très récent, ce qui explique le faible nombre d'études effectuées, et le manque de connaissances sur de nombreux éléments concernant l'interaction entre les phages et les bactéries dans le tractus digestif. Afin d'approfondir les connaissances concernant ce sujet, nous avons choisi d'étudier l'impact des phages tempérés sur la stabilité de souches bactériennes mutualistes de la flore intestinale humaine, *F. prausnitzii* et *R. intestinalis*. Devant les problèmes rencontrés par les approches globales et omiques, nous avons décidé de faire cette étude dans un modèle réductionniste, avec des souris gnotobiotiques, afin d'avoir le contrôle sur le plus grand nombre possible de paramètres dans l'expérience. Les dynamiques des populations bactériennes et phagiques ont été suivies chez les souris contrôles, et également chez des souris ayant subi une inflammation intestinale. L'objectif était initialement de déterminer si l'inflammation intestinale déclencherait l'induction des prophages, avec des espèces bactériennes clés pour l'équilibre du microbiote et son interaction avec l'hôte. Cependant, en raison d'interactions antagonistes entre la molécule utilisée pour déclencher l'inflammation et

l'activité des phages, mon travail de thèse s'est tourné principalement vers l'étude de la coévolution phage-bactérie dans l'intestin de souris axéniques.

## Résultats



## Avant-propos

Au point de départ de cette thèse, le choix des souches du microbiote simplifié a découlé naturellement des travaux du groupe de Harry Sokol, de l'équipe ProbiHôte, avec qui j'ai collaboré. Un microbiote intestinal simplifié à cinq souches avait été mis au point dans cette équipe (non publié à ce jour), composé de *F. prausnitzii* A2-165, *Bacteroides thetaioaomicron* VPI-5482, *Ruminococcus gnavus* ATCC 29149, *Escherichia coli* LF82 et *Roseburia intestinalis* L1-82. Cette flore intestinale simplifiée était constituée de genres bactériens présentant de fortes variations de concentration chez les patients atteints de MICI : *F. prausnitzii* et *R. intestinalis* baissent en population, tandis que les *E. coli* et *R. gnavus* augmentent fortement en population (Willing et al 2010). Enfin *B. thetaioaomicron* représente les Bacteroidetes, groupe bactérien qui n'est pas affecté par la pathologie des MICI. Nous avons pour intention d'utiliser cette flore intestinale pour tester l'induction des prophages résidant dans ces souches, lors d'épisodes inflammatoires chez la souris gnotobiotique en utilisant le dextrane sulfate sodium (DSS) pour induire l'inflammation.

Le chapitre 1 de cette section décrira les travaux entrepris sur ce microbiote à cinq souches. Bien qu'elles soient séquencées, leurs prophages n'étaient pas décrits, mis à part une partie de ceux de la souche LF82 d' *E. coli*. Une recherche *in silico* de ces prophages et de leurs activités *in vitro* a donc été entreprise. Néanmoins, suite à l'analyse des fèces de souris colonisées par les cinq souches, fournies par nos collaborateurs, nous avons observé qu'avec la sensibilité de nos tests qPCR, seul un phage d' *E. coli* était détectable *in vivo*. Nous avons par conséquent supprimé les espèces *B. thetaioaomicron* et *R. gnavus* du microbiote, ce qui a permis d'augmenter les niveaux de colonisation de *F. prausnitzii* et *R. intestinalis*, et de détecter leurs phages. L'analyse des prophages de *B. thetaioaomicron* et *R. gnavus* est donc restée à une phase préliminaire.

Nous nous sommes alors focalisés sur l'étude des prophages de *F. prausnitzii*, *R. intestinalis* et *E. coli* du fait de l'activité de leurs prophages et de l'implication de *F. prausnitzii* et *R. intestinalis* en santé humaine. Chaque souche a été analysée de manière similaire, avec détection des prophages, détermination de leurs activités *in vitro* et *in vivo*, et mesure de l'impact sur la souche hôte dans l'environnement intestinal, y compris en situation inflammatoire. Les résultats des expériences *in vivo* pour les bactéries *F. prausnitzii* et *R. intestinalis* sont présentés dans les chapitres 4 (correspondant à l'article n°1) et 5 (correspondant au manuscrit soumis), respectivement. Cependant, dans ces manuscrits, les résultats concernant les prophages d' *E. coli* ne sont pas présentés, ils le seront donc dans le chapitre 1.

Le chapitre 2 des résultats présentera une étude de l'induction du prophage sopEΦ de *Salmonella typhimurium* en condition inflammatoire, réalisée dans le laboratoire du Pr Hardt, et à laquelle j'ai participé.

Dans le chapitre 3, un ensemble de tentatives de constructions de souches guéries de leurs prophages, en vue des analyses *in vivo*, sera décrit.

Les chapitres 4 et 5 correspondent au cœur de mes travaux de thèse, ils ont été rédigés sous forme d'articles, l'un paru, l'autre soumis. Le chapitre 4 décrit le comportement atone des deux prophages de la souche A2-165 de *F. prausnitzii in vivo*, et élargit ensuite l'analyse *in silico*, à 18 autres prophages de souches de cette espèce. Nous concluons que pour certains d'entre eux, le titre viral est significativement augmenté dans les fèces de patients atteints de MICI, ce qui conforterait l'hypothèse d'un rôle possible des prophages dans la dysbiose.

Le chapitre 5 décrit le comportement des deux prophages de *R. intestinalis* L1-82 dans le tractus murin, et montre une très forte dynamique évolutive entre le prophage Shimadzu et son hôte, conduisant à un effondrement transitoire de la population de *R. intestinalis*.

Au chapitre 6 qui clôt la section des résultats, les résultats obtenus avec *R. intestinalis* en situation inflammatoire induite par le DSS, seront décrits. Nous avons pu observer que le DSS possédait un effet antagoniste sur les phages de *R. intestinalis*, qui nous a empêchés de répondre à la question initiale. Ces derniers résultats font l'objet d'un dépôt de brevet, la confidentialité sur les résultats de cette partie est donc de rigueur.

Durant la grande majorité de ce travail, j'ai eu la chance d'être aidé par Elisabeth Moncaut, technicienne de recherche dans notre équipe, qui a travaillé avec moi sur ce projet.

# 1. Etude des prophages dans un modèle de microbiote intestinal simplifié composé de 5 souches du microbiote humain

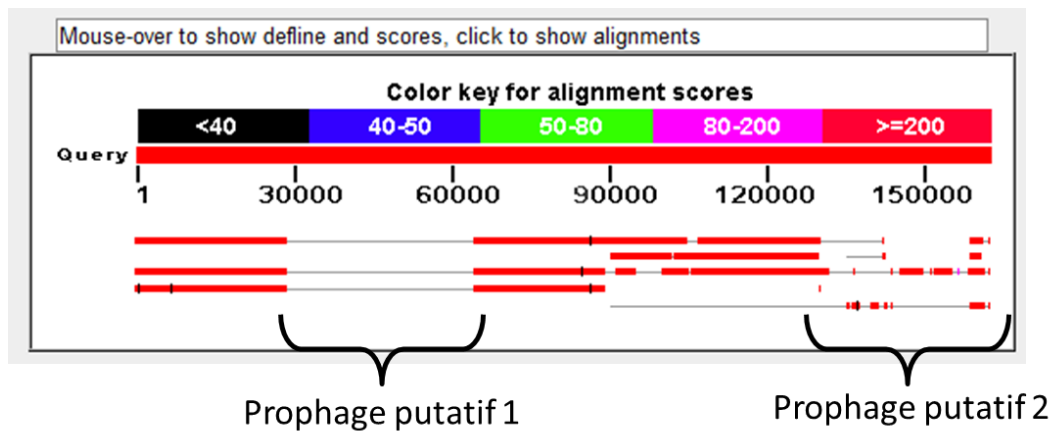
## 1.1 Prédiction bioinformatique des prophages

La première étape de ce projet a été de prédire la présence ou non de prophages dans les différentes souches choisies pour le microbiote simplifié, et de caractériser leur activité *in vitro*. La prédiction de régions prophagiques dans les différents génomes a été faite en utilisant principalement les programmes PHAST (Arndt et al 2016) et PHASTER (Arndt et al 2017). L'analyse a été faite sur les génomes, et les plasmides associés, de ces 5 souches, disponibles dans la base de données du NCBI en décembre 2014. Il est à noter que seuls les génomes de *B. thetaiotomicron* VPI-5482 et *E. coli* LF82 étaient entièrement séquencés et assemblés à l'époque (Tableau 2).

Nom de la souche	Etat d'assemblage du chromosome (nombre de contig)
<i>B. thetaiotomicron</i> VPI-5482	Génome complet + p5482
<i>E. coli</i> LF82	Génome complet + pLF82
<i>F. prausnitzii</i> A2-165	Génome en 20 contigs
<i>Ruminococcus gnavus</i> ATCC 29149	Génome en 43 contigs
<i>Roseburia intestinalis</i> L1-82	Génome en 102 contigs

**Tableau 2:** Etat de l'assemblage des génomes bactériens disponibles au NCBI en Décembre 2014.

La prédiction des régions prophagiques a été effectuée comme décrit dans les articles 1 et 2. Dans le cas de *F. prausnitzii*, l'analyse a ensuite été étendue à 13 autres génomes (article 1). Brièvement, toutes les prophages potentiels prédits par PHAST ou PHASTER, ont été examinées manuellement. Les régions hébergeant un ou plusieurs transposons, ou ne présentant aucun gène prophagique impliqué dans la formation du virion ont été éliminés. Ensuite, les bornes des prophages ont été délimitées plus précisément de différentes manières : d'une part en cherchant l'intégrase, qui est située dans la très grande majorité des cas à une borne du prophage (Bobay et al 2014) ; et d'autre part en effectuant un alignement de la région génomique contenant le prophage (+5 kb de chaque côté) avec le génome d'autres souches de la même espèce, quand ceux-ci étaient disponibles : les limites de zones d'homologies indiquent souvent les bornes du prophage car il s'agit d'une insertion génétique récente (Figure 16).



**Figure 16:** BlastN d'une région suspectée d'héberger deux prophages chez *R. gnavus* ATCC 29149 (AAYG02000016.1). La région contenant le prophage 1, entre 30 et 60 000 pb, n'est pas présente dans les autres génomes, indiquant un insert génétique récent, permettant de déduire les bornes probables du prophage associé. La région 2 présente des traces moins évidentes d'insertion génétique. Les bornes du prophage sont par conséquent plus difficiles à déterminer par cette approche.

L'analyse a révélé l'existence de 14 prophages complets putatifs, répartis dans 4 des 5 souches étudiées (Tableau 3). Le génome des prophages de la souche A2-165 de *F. prausnitzii* sont représentés dans l'article n°1. Ceux des prophages de *R. intestinalis* dans l'article n°2. Les génomes des prophages d' *E. coli* LF82 et de *R. gnavus* ATCC 29149 sont présentés en annexe 1 et 2.

Souche	Nom phage	Taille (kb)	Phage proche	Coordonnées (n° accession molécule)	Excision montrée par PCR (+/-)	Génomes/mL de culture non induite	Prédiction antérieure
<i>F. prausnitzii</i> A2-165	Lagaffe	48,2	/	472 865 - 521 124 (GG697151.2)	-	n.d	
	Mushu	37	/	74 000 - 112 781 (GG697157.2)	-	5.10 <sup>6</sup>	Toussaint et al., 2013
<i>R. intestinalis</i> L1-82	Prophage 1	21	/	28 309 - 49 232 (GG692714.1)	-	3.10 <sup>7</sup>	
	Prophage 2	n.d	/	238 716 - fin contig (GG692714.1)	-	3.10 <sup>7</sup>	
	Jekyll	45,6	/	62 509 - 108 219 (GG692725.1)	+	8.10 <sup>8</sup>	
<i>E. coli</i> LF82	Gally	38,7	P22	999 943 - 1 037 635 (CU651637.1)	+	3.10 <sup>9</sup>	Bobay & al., 2013
	Perceval	50,3	λ	1 173 098 - 1 223 240 (CU651637.1)	+	3.10 <sup>6</sup>	Bobay & al., 2013
	Prophage 3	46,3	Cdt1	1 583 922 - 1 630 286 (CU651637.1)	+	1.10 <sup>4</sup>	Bobay & al., 2013
	Prophage 4	33	SopEφ	2 735 941 - 2769 354 (CU651637.1)	+	1.10 <sup>5</sup>	Bobay & al., 2013
	Cyrano	108	SSU5	Tout le plasmide (CU638872.1)	+	2.10 <sup>6</sup>	
<i>R. gnavus</i> ATCC 29149	Prophage 1	46	/	52 528 - 98 491 (AAYG02000002.1)	+	n.d	
	Prophage 2	36	/	28 974 - 64 468 (AAYG02000016.1)	+	n.d	
	Prophage 3	n.d	/	130 213 - Fin de contig (AAYG02000016.1)	-	n.d	
	Prophage 4	n.d	/	Début - 39 725 (AAYG02000018.1)	-	n.d	
<i>B. thetaiotaomicron</i> VPI-5482	/	/	/	/	/	/	

**Tableau 3 :** Tableau récapitulant les différentes régions génomiques prédites comme prophages, et les mesures de leur activité par estimation de la concentration de virions dans un surnageant de culture. La méthode de dosage des virions par qPCR est décrite dans l'article n°1. Les primers utilisés pour la qPCR sont listés en annexe 3 (n.d, non déterminé).

Étonnamment, aucun prophage n'a été trouvé dans le génome de *B. thetaiotaomicron*, malgré des données métagénomiques suggérant le contraire (Minot et al 2011). Il est possible que le protocole

utilisé ne soit pas approprié pour prédire la présence de prophages ayant de petits génomes, comme les *Microviridae* (Krupovic & Forterre 2011).

Pour la souche *E. coli* LF82, les quatre prophages chromosomiques avaient été prédits dans deux études précédentes (Bobay et al 2013, Miquel et al 2010). Néanmoins, le plasmide de la souche n'est pas décrit comme un prophage dans ces études. Ce phage-plasmide fait partie d'une famille phagique apparentée au phage P1, récemment décrite (Gilcrease & Casjens 2018), et présente essentiellement chez des souches pathogènes d'*E. coli* et de Salmonelle.

Pour *Ruminococcus gnavus*, quatre prophages ont été prédits, mais pour deux d'entre eux, les bornes n'ont pu être décrites précisément, car les prophages se situent en bordure de contig. Ce phénomène est régulièrement observé avec les génomes dont l'assemblage n'est pas complet, ce qui a tendance à sous-estimer le nombre de prophages (Kim & Bae 2018).

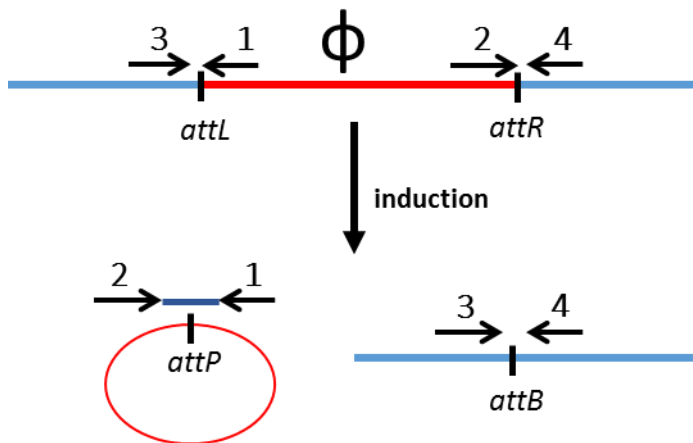
Pour *F. prausnitzii* A2-165, deux prophages ont été prédits et analysés en détail dans l'article n°1.

Enfin pour *R. intestinalis* L1-82, trois prophages ont été prédits, dont deux prophages incomplets, l'un d'eux étant en bordure d'un contig également.

## **1.2 Validation expérimentale de l'activité des prophages**

### *1.2.1 Détection de la capacité d'excision des prophages*

Deux aspects de l'activité des prophages ont été déterminés : i) la capacité du prophage à s'exciser et ii) la capacité du prophage à produire des virions et donc à lyser son hôte. L'activité d'excision a été mise en évidence par un test PCR détectant la formation des site *attP* et/ou *attB* (Figure 17). Des paires d'amorces ont été dessinées pour chaque région prophagique où ce test était possible (Annexe 3). Le phage Mushu ne peut être soumis à ce test, du fait que les phages de la famille des *Saltoviridae*, à laquelle il appartient, ne se circularisent pas. Le produit de PCR est ensuite séquencé pour vérification. Les résultats sont résumés dans le tableau 3.



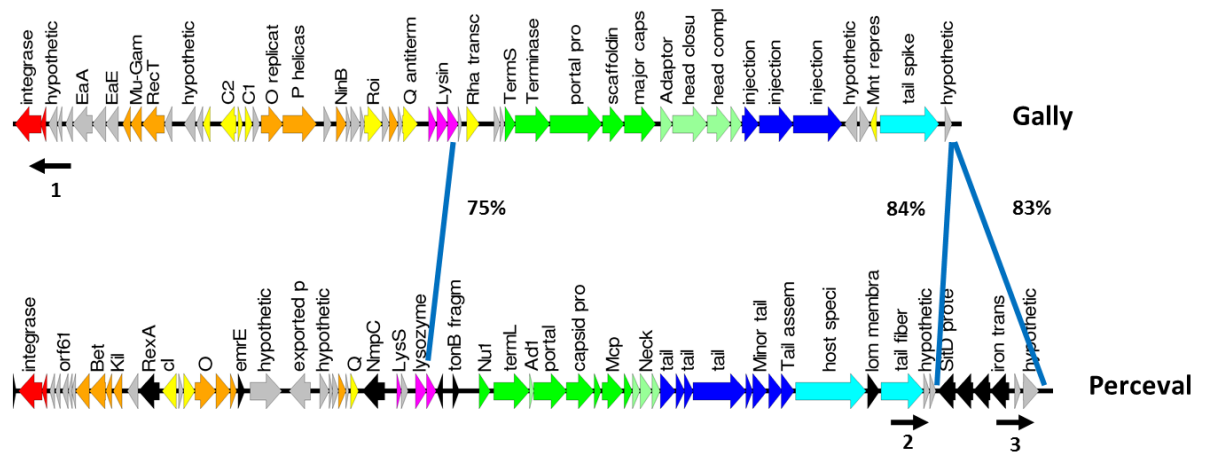
**Figure 17:** Test PCR utilisé pour la mise en évidence de l'activité d'excision d'un prophage. Le prophage est schématisé par la barre rouge et le génome bactérien est en bleu. A l'état prophage, les amorces 1/3 amplifient le site *attL*, et les amorces 2/4 le site *attR*. Après l'excision, les amorces 1/2 et 3/4 permettent respectivement d'amplifier les sites *attP* et *attB*.

### 1.2.2 Production de virions

La quantification de virions dans un surnageant de culture filtré se fait d'ordinaire en dénombrant les plages de lyse formées sur un tapis bactérien d'une souche sensible. Cette technique nécessite néanmoins d'avoir des souches indicatrices pour chacun des prophages étudiés. Or nous ne disposons pas de telles souches, car il n'y a qu'un nombre très limité de souches bactériennes disponibles pour les espèces étudiées (à part *E. coli*), ni des protocoles nécessaires à l'obtention de plages de lyse avec des souches anaérobies. En effet trois des espèces étudiées, *F. prausnitzii*, *R. gnavus* et *R. intestinalis*, sont des bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène, et dont la culture sur boîte est difficile, même dans une chambre anaérobie en parfait état de fonctionnement. Nous avons donc utilisé la PCR quantitative sur l'ADN encapsidé (voir plus loin).

### 1.2.3 Essai d'obtention de plages de lyse pour les prophages d'*E. coli*

Pour les prophages de la souche *E. coli* LF82, en revanche, quelques essais d'obtention de plages de lyse ont été faits sur *E. coli* K-12. MG1655 et la souche isogénique MG1655  $\Delta hdsR$  dépourvue d'activité de restriction. Seuls deux types de plages de lyse de LF82 ont pu être obtenues, et uniquement sur la MG1655  $\Delta hdsR$ . Un test PCR a permis d'identifier les phages ainsi isolés. Il s'agit du phage Perceval, et d'un phage contenant à la fois des gènes de Perceval et de Gally. Cette observation suggère la formation d'un phage hybride, suite à une recombinaison entre les deux phages, comme déjà décrit pour les phages  $\lambda$  et P22, homologues respectifs de Perceval et Gally (Gemski et al 1972). Les deux phages présentent deux petites régions d'homologie (Figure 18), et les tests PCR ont mis en évidence un évènement de recombinaison tel que l'hybride correspondrait au module de structure de Perceval fusionné au module de répllication de Gally (amplicon obtenu à partir des amorces 1 et 2 de la figure 18, mais pas avec les amorces 1et 3).



**Figure 18** : Génomes des prophages Gally et Perceval. Les traits bleus représentent les régions d'homologies détectées entre les deux phages. Les flèches noires désignent les différentes amorces utilisées pour analyser la formation du phage hybride. Il est à noter que la forme prophage des génomes est représentée ici, alors que dans les virions le génome des phages est coupé au site *cos* situé en amont de la petite sous-unité de la terminase.

#### 1.2.4 Quantification des virions par PCR quantitative

Comme évoqué préalablement, devant la difficulté à obtenir des plages de lyse pour tous les prophages, et en particulier ceux des bactéries anaérobies strictes, nous avons décidé de quantifier la production de virion par PCR quantitative (qPCR), en nous inspirant d'un protocole déjà publié (Refardt 2012). Il est à noter que cette méthode a deux inconvénients majeurs : 1/ Elle ne permet pas de déterminer avec certitude si le virion est infectieux et 2/ le seuil de détection est assez haut (voir plus loin).

J'ai donc mis au point un jeu d'amorces spécifiques pour chaque phage et chromosome bactérien (Annexe 3). J'ai également préparé les gammes d'ADN permettant de faire de la quantification absolue par PCR quantitative. La production de virions a été mesurée dans le surnageant de cultures bactériennes pures ayant crû dans un milieu de croissance classique jusqu'à saturation. Le résultat pour chaque phage est présenté dans le Tableau 3.

Il est intéressant de noter que pour *R. gnavus*, alors que les prophages 1 et 2 présentent une activité d'excision, ceux-ci ne produisent aucun virion détectable dans le surnageant de culture. Chez *E. coli*, chaque prophage a pu être détecté dans le surnageant de culture de manière significative, mais à des niveaux très variables les uns des autres, allant de  $3 \cdot 10^9$  génomes/mL pour Gally à  $1 \cdot 10^4$  génomes/mL pour le prophage 4. Pour *F. prausnitzii*, l'activité des deux prophages a été détectée dans le surnageant, mais à un niveau très faible pour Lagaffe.

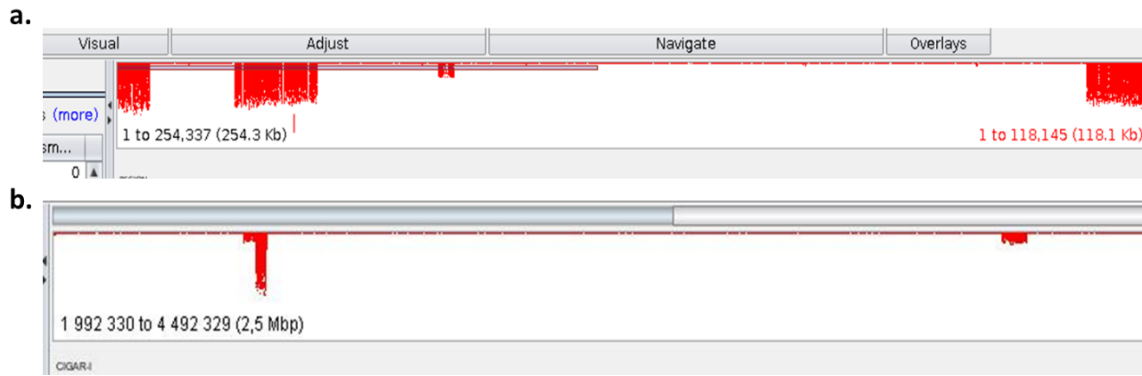
### 1.2.5 Cas des prophages de *R. intestinalis*

Chez *R. intestinalis*, de manière intéressante, deux des trois prophages prédits, le 1 et le 2, ont toujours la même population de virions,  $3.10^7$  génomes/mL et ce, dans tous les échantillons testés. Le prophage Jekyll produit beaucoup de virions, avec  $8.10^8$  génomes/mL mesurés. Les deux prophages en question sont les prophages incomplets, qui présentent des fonctions complémentaires. Par exemple il n'y a que des gènes impliqués dans la réplication et l'intégration du génome dans le prophage 2, tandis que le prophage 1 n'encode que des protéines de formations du virion. Suite à ces observations, j'ai fait l'hypothèse que l'assemblage du génome de *R. intestinalis* présentait des erreurs au moins au niveau du contig où ces deux régions prophagiques sont localisées. Pour tester cette hypothèse, nous avons fait séquencer le surnageant de culture de *R. intestinalis* L1-82, puis nous avons réalisé l'alignement des reads sur le génome de *R. intestinalis*. (Matériels et méthodes du chapitre 5). Nous avons ensuite essayé d'assembler le génome d'un prophage qui contiendrait les prophages 1 et 2. L'assemblage a été effectué après soustraction des reads mappant sur le génome du prophage Jekyll. L'assembleur Newbler v2.6 a été utilisé, avec les paramètres 20 pb d'overlap et 90% d'identité, et a permis d'obtenir un contig de 44 962pb, regroupant trois régions fortement couvertes, présentées Figure 19a. Nous en concluons 1) que le génome de *R. intestinalis* comporte deux prophages, et 2) que la séquence présente dans les banques présente de nombreuses erreurs d'assemblage.

Ce génome a donc été séquencé à nouveau, avec les technologies Pacbio et Illumina (250pb, pair end), puis assemblé et annoté avec l'aide de Valentin Loux, de l'unité Maïage à l'INRA de Jouy en Josas. Les détails de ce séquençage et assemblage sont présentés dans le matériel et méthode du chapitre 5. Le nouveau phage issu de la fusion des prophages 1 et 2 de *R. intestinalis* est nommé par la suite Shimadzu. Les autres résultats du séquençage du surnageant de culture de *R. intestinalis* L1-82 sont également décrits dans le chapitre 5, ainsi que les coordonnées exactes des prophages dans la nouvelle version du génome bactérien.

En Figure 19b, le résultat du mapping des reads du surnageant de culture contre le nouveau génome de *R. intestinalis* en utilisant bowtie2 avec la commande (bowtie2 -q -N 1 -L 32 -x index -U -S), visualisé avec le logiciel Tablet (Milne et al 2013) montre clairement l'existence de deux régions fortement surreprésentées.



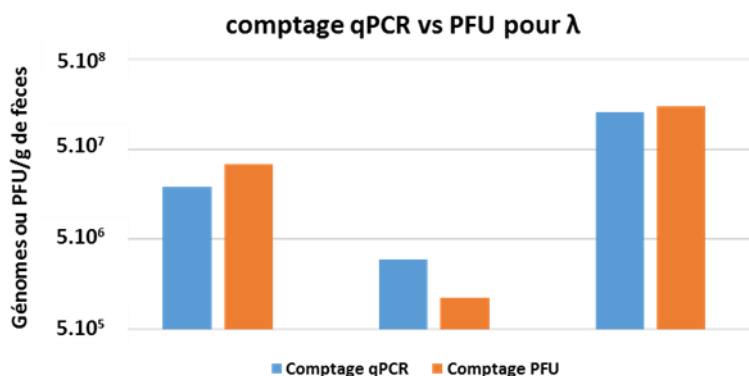


**Figure 19** : Mapping des reads issus du séquençage de l'ADN contenu dans des capsides dans le surnageant de culture de *R. intestinalis* L1-82. a) Mapping des reads sur le contig contenant les régions prophagiques 1 et 2 (contig GG692714.1). b) Mapping des reads sur le nouvel assemblage complet de la souche. Les zones fortement couvertes représentent les régions prophagiques prédites.

## 1.1 Activité phagique dans le tube digestif de souris dans le modèle à 5 souches

La quantification de phages dans les fèces a nécessité la mise au point d'un protocole d'extraction des phages de fèces. Ce dernier a été effectué par Elisabeth Moncaut à mon arrivée en thèse, à partir de travaux précédemment effectués sur le phage  $\lambda$  dans des fèces de souris (De Paepe et al 2016). La resuspension des fèces dans un grand volume (40 fois celui des fèces) de PBS 1x est le moyen le moins compliqué et le plus rapide pour récupérer les phages issus de fèces. Elisabeth Moncaut a également vérifié avec le phage  $\lambda$  que le protocole de concentration des phages au PEG permettait une récupération quantitative de l'ADN.

De mon côté, j'ai adapté le protocole de qPCR aux échantillons fécaux. Les tests sur stock de phage  $\lambda$  ont démontré que la qPCR permettait de comptabiliser autant de phages que par PFU (Figure 20).



**Figure 20:** comparaison des valeurs de titration du phage  $\lambda$  extrait de trois fèces de souris, selon un comptage par la formation de plages de lyse, ou une quantification par PCR quantitative.

Une fois le protocole mis au point, j'ai testé celui-ci sur des fèces congelées de souris colonisées avec les 5 souches précédentes, issues d'expériences de l'équipe ProbiHôte. Pour avoir une bonne amplification PCR dans ces échantillons, les préparations d'ADN doivent être diluées plus fortement que lorsqu'il provient d'un surnageant de culture, ou de souris mono-colonisée avec MG1655 lysogène pour le phage  $\lambda$ , bien que le fonds génétique des souris soit toujours le même, (femelles C3H/HeN). Une dilution au 25<sup>ème</sup> est nécessaire pour obtenir une courbe d'amplification satisfaisante. Le problème qui se pose est que plus l'échantillon est dilué, plus le seuil de détection diminue. Comme mentionné plus haut, seul le phage Gally de la *E. coli* LF82 est détectable dans les fèces des échantillons à cinq souches (Tableau 4).

Bactérie	Population dans les fèces (/g de fèces)	Prophage	Population dans fèces (/g de fèces)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> A2-165	1.10 <sup>5</sup>	Lagaffe	< 5.10 <sup>5</sup>
		Mushu	< 5.10 <sup>5</sup>
<i>Roseburia intestinalis</i> L1-82	1.10 <sup>6</sup>	Jekyll	< 5.10 <sup>5</sup>
		Shimadzu	< 5.10 <sup>5</sup>
<i>E. coli</i> LF82	5.10 <sup>9</sup>	Gally	6,7.10 <sup>7</sup>
		Perceval	< 5.10 <sup>5</sup>
		Prophage 3	< 5.10 <sup>5</sup>
		prophage4	< 5.10 <sup>5</sup>
		Cyrano	< 5.10 <sup>5</sup>
<i>R. gnavus</i> ATCC 29149	5. 10 <sup>8</sup>	Prophage 1	< 5.10 <sup>5</sup>
		Prophage 2	< 5.10 <sup>5</sup>
		Prophage 3	< 5.10 <sup>5</sup>
		Prophage 4	< 5.10 <sup>5</sup>
<i>B. thetaiotaomicron</i> VPI-5482	/	/	/

**Tableau 4 :** Quantités de phage mesurés dans les fèces de souris colonisées avec la flore simplifiée à 5 souches. Sont indiqués les niveaux de population de la bactérie hôte dans cette flore, ainsi que ceux des prophages associés.

Aucun des phages infectant *R. intestinalis* ou *F. prausnitzii* ne sont détectables. Cela s'explique tout simplement à cause des faibles niveaux de colonisation de ces souris par ces deux espèces bactériennes. Étant donné que ces deux espèces bactériennes sont celles dont l'activité des prophages nous intéresse le plus, nous avons abandonné ce modèle à cinq souche, et opté pour l'utilisation d'animaux en dixénie, colonisés avec *E. coli* LF82, et soit *F. prausnitzii* A2-165, soit *R. intestinalis* L1-82. Le niveau de colonisation de *F. prausnitzii* et de *R. intestinalis*, dans ces animaux dixéniques, sont bien plus élevés et permettent d'estimer l'activité des prophages. Ces deux conditions permettent néanmoins d'avoir une espèce mutualiste dont la population est diminuée dans les MICI, et une autre qui au contraire augmente en population en conditions inflammatoires, *E. coli* LF82. Les résultats en dixénie avec *F. prausnitzii* sont présentés dans le chapitre 4, et le ceux avec *R. intestinalis* sont présentés dans le chapitre 5.

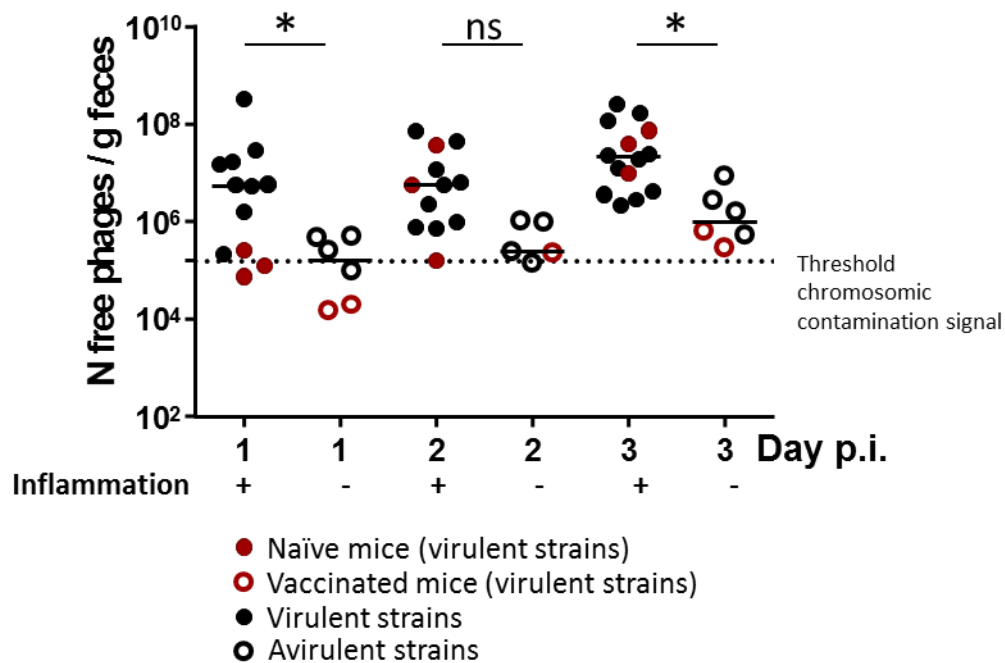
## 2. Activité du prophage SopE $\phi$ de *Salmonella* en lien avec l'inflammation intestinale

La mise au point de protocole de qPCR a pu être valorisée lors d'une collaboration avec l'équipe de Wolf Hardt (Diard et al 2017). Pour ce travail, j'ai quantifié la production du phage SopE $\phi$  par *Salmonella typhimurium* dans l'intestin de souris en situation inflammatoire, ou non (Figure 21). L'article en question est disponible en Annexe 4. Ce travail est issu d'une collaboration intellectuelle entre Marianne De Paepe et Médéric Diard, le premier auteur de l'étude.

Les auteurs se sont intéressés aux phénomènes de transfert du gène de virulence *sopE* par le prophage SopE $\phi$  de *Salmonella typhimurium*, à travers le phénomène de conversion lysogénique. Les transferts de gène de facteurs de virulence sont généralement bien décrits *in vitro*, mais les études sur la propagation de ces gènes *in vivo* sont rares. Le transfert de ce phage a déjà été observé entre souche épidémiques de *Salmonella*. Ce phage est inductible par l'activation du signal SOS.

Dans ce travail, les auteurs étudient la transmission du phage SopE $\phi$  d'une souche de *Salmonella* lysogène à une souche non lysogène dans l'intestin de souris conventionnelles. Lors de la colonisation d'un hôte, *Salmonella* induit une inflammation intestinale afin de faciliter son invasion du tissu épithélial de l'hôte. Les auteurs possèdent un modèle de souris vaccinée *Salmonella* qui ne répondent donc plus par une inflammation à la présence de *Salmonella*. De plus ils possèdent des mutants avirulents de *Salmonella* qui ne déclenchent plus d'inflammation.

Les principaux résultats de ces travaux sont que sans inflammation dans l'intestin, le transfert de gène de la part du phage SopE $\phi$  est très fortement ralenti. Le transfert ralenti s'explique par une induction plus faible de SopE $\phi$  en situation non inflammatoire dans l'intestin de souris. Quel médiateur chimique précis, produit lors de l'inflammation, provoque l'induction du prophage, reste encore à découvrir. Il se pourrait que les radicaux oxydants produits au cours de l'inflammation déclenchent des cassures de l'ADN et donc le système SOS. Cela aboutirait à l'induction de SopE $\phi$ , la concentration de virions augmentant alors dans l'intestin et donc les possibilités d'infection de la souche réceptrices, et de lysogénisation de celle-ci. Cette étude montre pour la première fois un effet très net de l'inflammation intestinale sur l'induction du prophage SopE $\phi$ .

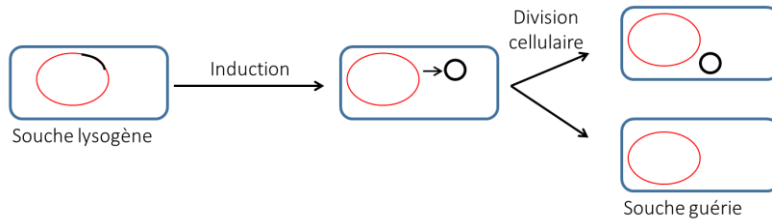


**Figure 21:** Quantification des phages SopEφ dans les fèces de souris dans différentes situations inflammatoires (Diard et al 2017).

### 3. Essai de guérison de prophage sans outils génétiques

Afin de pouvoir évaluer l'impact des prophages sur la stabilité bactérienne en conditions inflammatoires chez la souris, nous aurions aimé comparer la stabilité de souches bactériennes de *F. prausnitzii* ou *R. intestinalis* sans prophages avec celle de souches isogéniques hébergeant encore leurs prophages naturels. Malheureusement, aucun outil génétique n'est disponible à l'heure actuelle pour ces deux espèces, on ne peut donc pas envisager d'éliminer les prophages par cette approche. La suppression des prophages des génomes bactériens (phénomène appelé « guérison ») n'est par conséquent possible que par l'utilisation d'anciennes techniques de microbiologie qui reposent toutes sur le même principe : induire les prophages d'une bactérie en phase exponentielle de croissance, si possible dans 100% des cellules, diluer fortement la culture après induction du prophage pour éviter la réinfection des bactéries guéries, puis étaler la culture sur boîtes, et tester les colonies qui auront poussé pour la présence du ou des prophage(s) dans leurs chromosomes par un

test PCR (Figure 22). Avant de traiter les souches anaérobies, j'ai testé sur *E. coli* LF82 les différents protocoles de guérison possibles et décrits dans la littérature.

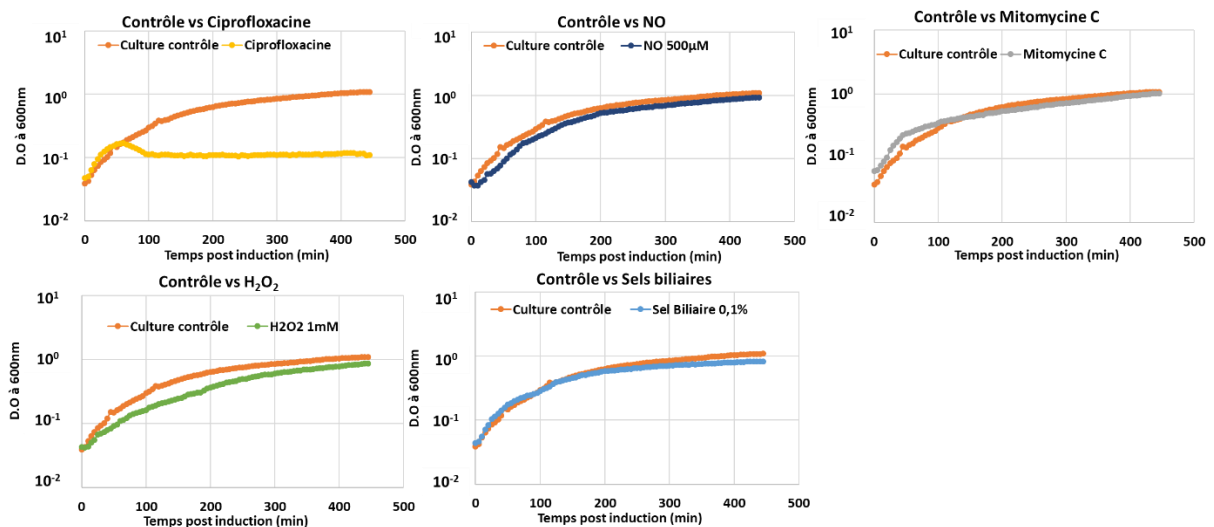


**Figure 22:** principe général de la technique de guérison des souches pour leurs prophages actifs.

### 3.1 Détermination des molécules inductrices des prophages de la souche LF82

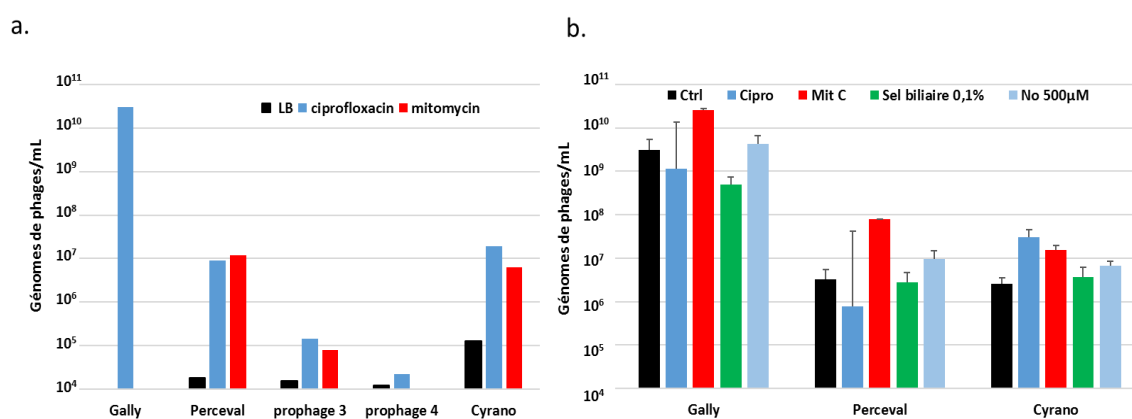
Différents stress connus pour induire des phages ont été testés sur *E. coli* LF82. Une partie des expériences a été réalisée par Romain Rinck, stagiaire de Master 1 dans l'équipe. Cinq inducteurs ont été choisis : la mitomycine C (un bactéricide), la ciprofloxacine (un bactéricide), un mélange de sels biliaries (mélange 1:1 de cholate et de deoxycholate) et deux molécules responsables d'un stress oxydant : un donneur de NO (oxyde d'azote), le NOC-5, et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ces deux molécules sont générées par le système immunitaire lors d'une inflammation, afin d'éliminer les pathogènes présents dans le tissu. Il s'agit donc de stress que la bactérie peut rencontrer lors de la colonisation de l'hôte et de sa localisation éventuelle dans la couche de mucus, à proximité de la barrière épithéliale.

Les traitements ont été réalisés sur une culture de nuit d'*E. coli* LF82 diluée au  $100^{\text{ème}}$  dans du LB, et mise en culture à  $37^{\circ}\text{C}$ , sous agitation à 200 rpm. Dès que la densité optique à 600 nm ( $D.O_{600\text{nm}}$ ) de la culture atteint une valeur comprise entre 0,1 et 0,2, l'inducteur est ajouté, et la cinétique de croissance est suivie dans un spectrophotomètre pour microplaque (Figure 23).



**Figure 23:** cinétiques de croissance d'*E. coli* LF82 en présence de différentes molécules potentiellement inductrices des prophages.

De tous les stress testés, seul l'ajout de ciprofloxacine a créé une cinétique caractéristique d'une courbe dite « d'induction », indicatrice de l'induction d'un ou des prophages dans la majorité des bactéries. Ce type de courbe se caractérise par le fait que la mortalité ne s'observe pas juste après l'ajout de la molécule toxique, mais plusieurs dizaines de minutes plus tard, une fois que le phage a réalisé son cycle lytique. Le NO ralenti légèrement la croissance de la bactérie, ainsi que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indiquant qu'aux doses utilisées, ils sont responsables d'un stress cellulaire. Pourtant, aucune lyse massive n'est ensuite observée (Figure 23). Enfin, la dose de sels biliaries testée est sans effet sur la croissance, il est donc difficile de conclure si la dose utilisée est suffisante. L'effet de ces différentes substances sur la production des phages de la LF82 a été mesuré par qPCR (Figure 24).



**Figure 24:** Quantification de la production de virions par les prophages de la *E. coli* LF82 *in vitro* sous différents stress, avec ou sans inducteur. a) Quantification des virions dans des cultures de 5 ml (ciprofloxacine 0,2µg/mL, mitomycine C 2,5 µg/mL). b) Quantification des virions dans des cultures en microplaque (0,2 ml) (ciprofloxacine 0,2µg/mL, mitomycine C 2,5 µg/mL, Sel biliaire 0,1% ; NOC-5 500µM).

Les données de la Figure 24 sont issues de deux séries d'expériences. Sous agitation et en grand volume de LB (panneau a) et en plaque 96 puits sans agitation (panneau b). Dans les conditions a, Perceval et Cyrano sont induits au moins 10 fois par la mitomycine C et la Ciprofloxacine. Dans les conditions b, Perceval et Gally sont induits par la mitomycine C d'un facteur 10, mais la ciprofloxacine ne présente pas d'effet inducteur, ce qui est inattendu au vu de l'effet de la ciprofloxacine sur la croissance en plaque à 96 puits (Figure 23). Il y a plusieurs différences entre les deux séries d'expériences. Tout d'abord, le volume des cultures induites, et les conditions d'agitation de la culture. Une différence élevée d'oxygénation pourrait expliquer en partie ces résultats. De plus dans la série a, les phages ont été concentrés au PEG, tandis que dans la série b, aucune étape de concentration n'a été effectuée sur les préparations de phage. L'étude de l'impact de ces différences est actuellement en cours.

Des tests similaires ont été effectués sur la souche de *F. prausnitzii* A2-165, qui sont présentés dans le chapitre 4.

En raison des résultats de la figure 23, la ciprofloxacine a été choisie comme inducteur dans ces expériences, car c'est la seule molécule testée qui induit un ou des prophages dans la majorité des bactéries.

### 3.2 Essai de guérison des souches

Le premier protocole testé a été le suivant : une culture de nuit est diluée dans du LB au 100<sup>ème</sup>, et mise à 37°C, 200 rpm. Une fois la D.O à 0,2-0,3, la ciprofloxacine est ajoutée à une concentration finale de 0,2µg/mL et la culture diluée au 10<sup>ème</sup>. L'objectif de la dilution est de diminuer la probabilité de rencontre entre une bactérie guérie et un phage. Juste avant l'ajout de la ciprofloxacine, 10 µL de culture sont prélevés pour estimer le nombre de cellules viables au moment de l'ajout de l'inducteur. Les cellules sont laissées en présence de l'inducteur à différents temps : 30 min, 3h et 6h. Après le temps défini, 1mL de culture est centrifugé 5 min à 11 000rpm à 4°C. Le culot est lavé dans 1mL de LB neuf. Ensuite, la culture est étalée sur boîte (100µL/boîte), non diluée, ou diluée au 10<sup>ème</sup>. L'objectif de l'étalement est de i) estimer le taux de mortalité bactérien consécutif à l'induction, ii) isoler des clones potentiellement guéris du ou des prophage(s) induits. Aux temps 3 et 6h, aucune colonie n'a été obtenue, témoignant de la forte mortalité induite par le traitement. Au temps 30 min, 19 colonies ont été obtenues à la dilution 10<sup>-1</sup> et 327 à pour la culture non diluée. Trente-quatre clones ont été restriés puis la disparition ou non du prophage Gally de chromosome a été testée par PCR. Au total, 1 clone sur les 33 est bien guéri du prophage Gally, il est par la suite nommé ΔGally. Les 34 clones ont été testés pour la disparition des prophages Perceval et Cyrano, mais aucun n'a été guéri de ces deux prophages. Le succès de ce protocole s'explique certainement par la très forte efficacité de la ciprofloxacine pour induire Gally, et le très fort taux de mortalité qui y est associé.

Ce même protocole a été reproduit sur la souche ΔGally, mais cette fois-ci avec l'espoir d'enlever un des phages Cyrano ou Perceval. Cette fois les résultats de l'expérience montrent un nombre bien plus élevé de clones sur les boîtes, indiquant que la majorité de la mortalité liée à la ciprofloxacine est liée à l'induction du prophage Gally.

Temps d'incubation (h)	Nombre de clones à dilution 10 <sup>0</sup>	Nombre de clones à dilution 10 <sup>-1</sup>
0,5	Tapis bactérien	95
3	225	73
6	72	14

Comme indiqué dans le tableau ci-dessus, les étalements montrent une mortalité qui va en s'accroissant avec le temps d'incubation de la souche ΔGally avec la ciprofloxacine. 35 clones issus des boîtes avec 6 heures d'incubation ont été testés pour la présence du prophage Perceval dans leurs chromosomes. Sur les 34 clones testés aucun n'avait perdu ce prophage.

Afin d'augmenter éventuellement l'induction des prophages, le traitement de la souche  $\Delta$ Gally a été répété avec 0,2 $\mu$ g/mL ou 2 $\mu$ g/mL de ciprofloxacine, et les temps d'incubation ont été modifiés, avec des étalements après 40 min, 2h30 et 4h. Les résultats d'étalement sont indiqués ci-dessous.

Ciprofloxacine 0,2 $\mu$ g/mL	Temps d'incubation (h)	Nombre de clones à dilution 10 <sup>0</sup>	Nombre de clones à dilution 10 <sup>-1</sup>
	0,66	412	5
	2,5	138	12
	4	1	1
Ciprofloxacine 2 $\mu$ g/mL	Temps d'incubation (h)	Nombre de clones à dilution 10 <sup>0</sup>	Nombre de clones à dilution 10 <sup>-1</sup>
	0,66	158	12
	2,5	33	2
	4	7	0

Il apparaît une mortalité légèrement plus importante lorsque la ciprofloxacine est à une concentration de 2  $\mu$ g/mL par rapport à la concentration à 0,2  $\mu$ g/mL, mais celle-ci est loin d'être très importante. 32 clones issus de ces expériences, isolés du temps d'incubation 2 h30 avec 2  $\mu$ g/mL de ciprofloxacine, ont été testés pour la présence du prophage Perceval dans leurs chromosomes. Aucun des clones ainsi isolés n'est guéri de Perceval.

Les agents chimiques causant des cassures dans l'ADN sont connus pour être de bons agents pour éliminer un plasmide d'une souche. Aussi, j'ai testé tous les clones des deux expériences précédentes pour la présence du phage plasmidique Cyrano. Sur 66 clones, aucun n'avait perdu le phage plasmidique.

Divers autres protocoles ont été tentés pour guérir LF82 du phage plasmide, sans succès. Ceci est peut-être à rapprocher du fait que ce plasmide porte deux systèmes d'addiction. Cependant, même sur une souche contenant le phage plasmide délété de ces deux systèmes, fournie par Olivier Espeli, aucun dérivé guéri n'a pu être obtenu.

Il est intéressant de remarquer que l'annotation fonctionnelle des gènes de prophages de *R. intestinalis* et *F. prausnitzii* a révélé qu'au moins un prophage dans chaque souche porte dans son génome un système putatif d'addiction toxine/antitoxine, signifiant que les probabilités d'obtenir des bactéries guéries de ces prophages sont faibles. Vu le manque d'efficacité de guérison des prophages de *E. coli* LF82, il a été décidé de ne pas tenter d'éliminer les prophages chez *R. intestinalis* et *F. prausnitzii*.

Ces travaux sur *E. coli* n'ont pas été publiés, néanmoins, ils vont être repris en grande partie pour la thèse de P. Misson, future doctorante de l'équipe que va étudier le rôle de certaines protéines encodées par les prophages de LF82 dans la persistance bactérienne.



## 4. Etude des prophages de *F. prausnitzii*

La totalité des résultats obtenus pendant ma thèse sur les phages tempérés infectant *Faecalibacterium prausnitzii* sont décrits dans l'article "Phages infecting *Faecalibacterium prausnitzii* belong to novel viral genera that help to decipher intestinal viromes" paru en 2018 dans la revue *Microbiome*. Les références données dans le résumé de l'article correspondront aux figures situées dans l'article. Ici, je présente un résumé de cet article.

### 4.1 Etude des prophages de 15 souches de *F. prausnitzii*

Au début de ma thèse, seule la souche A2-165 de *F. prausnitzii* était disponible au laboratoire. Ensuite, en parallèle à mon travail, nos collaborateurs de l'équipe ProbiHôte à l'INRA ont isolé et séquencé entièrement 10 nouveaux isolats humains de *F. prausnitzii* (Benevides et al 2017). Le travail d'analyse des génomes bactériens que j'ai effectué a été élargi par M. De Paepe à toutes les nouvelles souches séquencées, ainsi qu'à quatre autres souches dont le génome est disponible dans les banques de données publiques avec un niveau d'assemblage suffisant pour l'analyse.

#### 4.1.1 Description des prophages de *F. prausnitzii*

Comme décrit précédemment pour les prophages d'*E. coli*, Les prophages ont été prédits en utilisant PHASTER (<http://phaster.ca>) (Arndt et al 2016, Arndt et al 2017). Après amélioration manuelle des prédictions, 23 prophages ont été retenus. Aucune séquence homologue à ces prophages n'a été trouvée dans la banque de donnée virale publique du NCBI. Néanmoins, plusieurs preuves qu'il s'agit bien de phages actifs ont été trouvées (spacer dans des CRISPR, contigs issus du séquençage d'un virome), (Tableau 1). Ces phages constituent 8 nouveaux genres et 18 nouvelles espèces (Figure 1). Il s'agit des premiers phages infectant cette espèce décrits. De manière intéressante, le phage Lagaffe est retrouvé dans deux espèces bactériennes très éloignées génétiquement : *F. prausnitzii* et *Blautia Hansenii* appartiennent à des familles différentes, ce qui suggère le large spectre d'hôte de ce phage.

Un prophage représentatif de chaque genre viral a été annoté en utilisant Phagonaute (<http://genome.jouy.inra.fr/phagonaute>), un outil d'annotation développé dans l'équipe (Delattre et al 2016), en plus de l'annotation automatique effectuée par RAST (Figure 2). Cela a permis d'augmenter jusqu'à cinq fois la prédiction de fonction. Il est à noter qu'un rétroélément de diversification, ou « Diversity Generating Retroelement (DGR) » est présent dans six des huit genres phagiques. Ce système permet de créer une mutagénèse à très haute fréquence sur une séquence courte ADN courte, entre 70 et 150 pb. Cette forte prévalence de DGR dans les génomes de phages semble être un élément caractéristique de la vie dans le tube digestif, comme précédemment suggéré (Minot et al 2012).

#### 4.1.2 *Activité des prophages*

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux prophages de la souche A2-165 de *F. prausnitzii* sur laquelle j'avais commencé mes travaux de thèses. Cette souche héberge deux prophages actifs capables de produire des virions (Table 2 et additional File 6) et détectables dans le surnageant de culture. Plusieurs signaux potentiellement inducteurs du cycle lytique ont été testés, mais aucun des signaux testés n'a induit l'un ou l'autre des deux prophages (Additional File 7). Cela n'est guère étonnant pour le prophage Mushu, qui fait partie de la famille proposée des *Saltoviridae*, plus connue sous le nom de « Mu-like », un groupe de phages connus pour être peu ou pas inductibles. Cette analyse des deux prophages de la souche A2-165 s'est poursuivie *in vivo* dans un modèle de souris gnotobiotique, colonisée avec *E. coli* LF82 et *F. prausnitzii* A2-165. De récents suggèrent que l'environnement intestinal est pro-inducteur comparé à des conditions *in vitro* (De Paepe et al 2016, Diard et al 2017). Pourtant, dans ces conditions, aucune différence significative dans la production de virions de Mushu n'a été observée comparé à la culture *in vitro* (Table 2). Certaines publications suggèrent que des conditions inflammatoires intestinales pourraient favoriser l'induction des prophages de certaines espèces bactériennes clés de la flore intestinale humaine, et donc expliquer les dysbioses intestinales associées aux Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)(Lepage et al 2008, Norman et al 2015). Afin de tester cette hypothèse sur la souche A2-165, les souris colonisées ont été traitées avec du Dextran Sulfate Sodium (DSS) à 2 % dans l'eau de boisson, un système fréquemment utilisé pour simuler des colites inflammatoires aiguës chez les rongeurs, simulant ainsi des conditions proches de celles observées dans le cadre des MICIs dans l'intestin. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les conditions inflammatoires et les conditions témoins pour la production de virions, malgré les preuves d'une inflammation moyenne chez les souris traitées au DSS (Additional File 8 et Tableau 2).

#### 4.1.3 *Recherche de ces phages dans les viromes humain, en lien avec les MICI*

Enfin, afin d'étudier l'activité des différents prophages de *F. prausnitzii* identifiés précédemment dans le tube digestif humain, la présence de ceux-ci a été recherchée dans les séquences métagénomiques virales provenant de selles de 171 personnes, soit des patients atteints de MIC, soit des contrôles sains (Norman et al 2015). La première observation est que dans certains viromes, une très forte abondance de reads correspondant à nos phages ont pu être observés. Le phage Oengus possédant le record avec 22 % des reads de l'échantillon qui lui correspondait. Cependant, même si l'on trouve un nombre significatif de reads correspondant à nos phages, la couverture de ceux-ci le long des génomes n'est pas toujours homogène (Figure 4). Pour certains phages, les reads se concentrent sur des régions particulières du phage, suggérant l'existence de mosaïcisme dans ces familles virales.

Nous nous sommes interrogés sur les différences concernant les phages de *F. prausnitzii* entre patients atteints de MICI et contrôles sains. Pour cela, la prévalence de chaque phage dans les viromes

a été estimée chez les individus sains et chez les patients MICI (Figure 5 a et b). Deux des phages étudiés sont retrouvés plus fréquemment chez les malades, et ce de manière statistiquement significative. Suite à cette observation, la question s'est posée quant à l'abondance de ces phages dans les viromes où ils étaient présents (Figure 5c). Les phages ont tendance à être plus abondants dans les viromes des patients que chez les individus sains. Cette observation est statistiquement significative pour le phage Epona et pour le phage Lugh L2/6. Cette observation est très intéressante, car *F. prausnitzii* est moins abondant chez les patients MICI, ce qui suggère que ces prophages sont plus actifs chez les malades atteints de MICI.

En conclusion, nous avons découvert dans cette étude huit nouvelles familles de phages. Certains de ces phages nouvellement décrits pourraient avoir un rôle dans les dysbioses intestinales observées dans les cadres de MICI. Nos résultats montrent que la détection de séquence prophagiques dans les génomes de souches bactériennes intestinales est une approche complémentaire des approches métagénomiques en permettant d'attribuer un hôte aux virus concernés.

## RESEARCH

## Open Access



# Phages infecting *Faecalibacterium prausnitzii* belong to novel viral genera that help to decipher intestinal viromes

Jeffrey K. Cornuault<sup>1</sup>, Marie-Agnès Petit<sup>1</sup>, Mahendra Mariadassou<sup>2</sup>, Leandro Benevides<sup>1,3</sup>, Elisabeth Moncaut<sup>1</sup>, Philippe Langella<sup>1</sup>, Harry Sokol<sup>1,4,5</sup> and Marianne De Paepe<sup>1\*</sup> **Abstract**

**Background:** Viral metagenomic studies have suggested a role for bacteriophages in intestinal dysbiosis associated with several human diseases. However, interpretation of viral metagenomic studies is limited by the lack of knowledge of phages infecting major human gut commensal bacteria, such as *Faecalibacterium prausnitzii*, a bacterial symbiont repeatedly found depleted in inflammatory bowel disease (IBD) patients. In particular, no complete genomes of phages infecting *F. prausnitzii* are present in viral databases.

**Methods:** We identified 18 prophages in 15 genomes of *F. prausnitzii*, used comparative genomics to define eight phage clades, and annotated the genome of the type phage of each clade. For two of the phages, we studied prophage induction in vitro and in vivo in mice. Finally, we aligned reads from already published viral metagenomic data onto the newly identified phages.

**Results:** We show that each phage clade represents a novel viral genus and that a surprisingly large fraction of them (10 of the 18 phages) codes for a diversity-generating retroelement, which could contribute to their adaptation to the digestive tract environment. We obtained either experimental or in silico evidence of activity for at least one member of each genus. In addition, four of these phages are either significantly more prevalent or more abundant in stools of IBD patients than in those of healthy controls.

**Conclusion:** Since IBD patients generally have less *F. prausnitzii* in their microbiota than healthy controls, the higher prevalence or abundance of some of its phages may indicate that they are activated during disease. This in turn suggests that phages could trigger or aggravate *F. prausnitzii* depletion in patients. Our results show that prophage detection in sequenced strains of the microbiota can usefully complement viral metagenomic studies.

**Keywords:** Bacteriophages, *Faecalibacterium prausnitzii*, Inflammatory bowel disease, Comparative genomics, Prophages

**Background**

*Faecalibacterium prausnitzii* is one of the most abundant bacterial species of the human gastrointestinal tract (GIT) microbiota. This species is an important producer of butyrate, a short-chain fatty acid with a broad range of beneficial properties on human health [1, 2]. *F. prausnitzii* also exerts anti-inflammatory activity through the production of the MAM protein [3] and provides

protection against inflammation in different animal models [3–6]. In humans, a low abundance of this species has been regularly reported in the gut microbiota of inflammatory bowel disease (IBD) patients [6, 7]. Depletion of *F. prausnitzii* in patients has been associated with a higher risk of recurrence of flares [4, 8], possibly in relation with the capacity of this species to modulate T cell responses [6]. Bacteriophages, or phages, the viruses infecting bacteria, might play a role in this depletion [9]. But, although viral metagenomics studies have provided indications that *F. prausnitzii* phages are present in human fecal samples [10], no complete *F.*

\* Correspondence: marianne.depepe@inra.fr

<sup>1</sup>Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy en Josas, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

*prausnitzii* phage has been characterized to date. Phages can be either virulent or temperate: virulent phages perform only lytic cycles, during which new phage particles are produced and the infected bacteria are killed. Temperate phages can similarly replicate through lytic cycles, but they are also able to enter a latent lysogenic state. During lysogeny, the repressed phage, known as a prophage, is generally integrated into the bacterial chromosome, and the expression of most of its genes is repressed. Nevertheless, a few genes continue to be expressed, including the repressor of the lytic cycle and a class of genes known as morons whose expression often modifies the physiology of the host bacterium. In this way, prophages can modify numerous phenotypes of their bacterial host, such as resistance against phage attack, stress resistance, pathogenicity, or ability to form biofilms [11, 12]. In response to a specific signal, active prophages can switch back to lytic multiplication, a process known as induction. Because of this, active prophages can be highly detrimental to their host in some inducing conditions [13].

Therefore, not only virulent phages but also temperate ones have been suspected to play a role in dysbiosis of intestinal microbiota [14, 15]. To examine this possibility, several viral metagenomic studies of the intestinal microbiota have been performed in recent years [10, 16–18]. However, a major limitation of these studies is the difficulty of viral sequence analysis. Indeed, annotation of viral sequences, and in particular the prediction of the bacterial host, is mainly based on alignment to reference viral sequences in databases [19], and limitations in the viral databases render annotation of most viral sequences difficult if not impossible. Limitations are particularly flagrant concerning phages infecting important groups such as *Ruminococcaceae*, previously known as *Clostridium* cluster IV. There is, to our knowledge, no phage infecting members of this family whose complete genome has been deposited in viral databases. Isolating and describing phages infecting *Clostridiaceae* species such as *F. prausnitzii* is thus a prerequisite for investigation of their potential role in dysbiosis. In this study, we characterize for the first time complete *F. prausnitzii* temperate phages and show that they belong to eight new proposed viral genera. In addition, we show that some of them are either more prevalent or more abundant in the fecal samples of IBD patients compared to healthy controls, suggesting these phages might play a role in the disease.

## Results

### Identification of 23 prophages corresponding to novel proposed genera

Fifteen *F. prausnitzii* genomes, among which 10 were recently published [20], were analyzed with the PHASTER interface (<http://phaster.ca>), dedicated to prophage

detection [21, 22]. Expert inspection retained 23 complete prophages out of the 50 predicted regions, whose borders were manually refined, notably by detecting integrases (Additional file 1). Most integrases belonged to one of the two classical families of phage integrase: tyrosine integrase and large serine recombinase (LSR) (Table 1). The integrase of prophage Lagaffe, however, is atypical since it belongs to the IS30 transposase family, found almost exclusively in transposons. Enzymes of this family were recently described in small temperate single-stranded DNA filamentous phages, and mediate site-specific recombination in a chimeric prophage [23], but had not yet been described in large prophages.

The 23 retained prophages were compared pairwise at the nucleotide level, allowing the definition of six phylogenetic clades (Fig. 1), within which gene synteny was well conserved, and two singletons. The clusters/singletons are well separated from each other, mostly with no gene shared between clusters. None of the predicted prophages had significant nucleotide similarity with a viral genome of the NCBI RefSeq genome database on more than 5% of its genome, indicating they all correspond to new viruses. According to current taxonomic metrics whereby phages within a genus share at least 40% of their proteins, and phages of the same species have more than 95% identity on the whole genome [24, 25], the 23 prophages correspond to 18 species and 8 genera (Additional file 2), for which we propose names (Table 1 and Fig. 1). Of note, Taranis and Toutatis belong to related genera since they share 26% of their proteome, with an overall 39% amino acid identity.

Given the ubiquity of *F. prausnitzii* in human gut microbiota, we investigated whether similar phage sequences had been found in other studies. To this end, we compared the prophage genomes against the NCBI nr database. Prophages Lagaffe, Mushu, and ToutatisSL3/3 have homology to four large contigs assembled from reads obtained by sequencing DNA from virus-like particles (VLPs) isolated from human fecal samples [26] (Fig. 1). In addition, ToutatisL2/6 is homologous to a 9-kb contig assembled from reads of the VLPs of a human fecal sample. This contig had been predicted to correspond to a *F. prausnitzii* prophage [10]. This provides further support for the proposition that these prophage regions are of viral nature. We then looked for CRISPR spacers matching the prophages in the 15 *F. prausnitzii* genomes, and found spacers for eight prophages (Table 1), which is indicative of recent infection of these strains by the respective phages [27]. Overall, indications of activity were obtained for at least one prophage of each proposed genus, as summarized in Table 1.

For six of the eight prophage groups, the host range seemed to be restricted to *F. prausnitzii*, since no similar

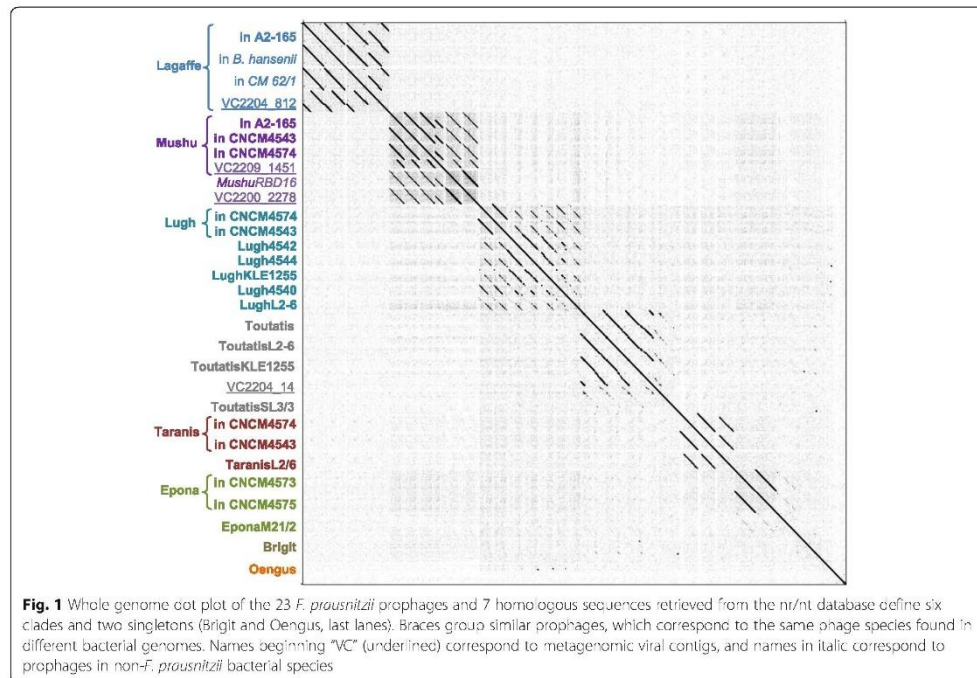


**Table 1** Main characteristics of the eight proposed *F. prausnitzii* phage genera

Proposed genus	Classification (Virfam)	Bacterial hosts	Prophage name	Strains with complete prophage <sup>a</sup>	Common features			Evidence of activity		
					Genome size, kb	RT	Integrase type	Recombinase	CRISPR spacers <sup>b</sup>	Viral contig
*FPagatcovirus*	Myoviridae type 1, cluster 6	<i>F. prausnitzii</i> , <i>B. hansenii</i> , CM62/1	Lagaf/c	A2-165, <i>B. hansenii</i> 20583, CM62/1	48.3	Yes	IS30 TPase	ERF		Yes
*FPmushuvirus*	Myoviridae type 1, cluster 8 "Saitoviridae"	<i>F. prausnitzii</i>	Mushu	A2-165, C_4543, C_4574	36.4	Yes	Mu TPase			Yes
*FPughvirus*	Siphoviridae type 1, cluster 1	<i>Ruminococcaceae</i> bacterium D16 <i>F. prausnitzii</i>	MushuPBD16 Lugh	R. bacterium D16	36.2	Yes	Mu TPase			
			Lugh4544	C_4574, C_4543	34.1		Tyr Int	Sak4	C_4544	
			Lugh4542	C_4544	35.9		Tyr Int	ERF		
			LughKLE1255	C_4542	36.4		Tyr Int	ERF		
			Lugh4540	KLE1255	36.6		Tyr Int	ERF		
			LughL2-6	C_4540	31.1		Tyr Int	Sak4		
			Taramis	L2-6	31.2		Tyr Int			
*FPetansvirus*	Myoviridae type 1, cluster 6	<i>F. prausnitzii</i>	TaramisL2-6	C_4574, C_4543	56.0	Yes	LSR	Sak4	C_4541(2), L2/6	
			Eoona	L2-6	41.9		LSR	Sak4	C_4541	
			EoonaM21-2	C_4573, C_4575	49.5	Yes	LSR		C_4541, C_4575	
			Toutats	M21/2	48.5	Yes	LSR			
			ToutatsL2-6	C_4542	54.7	Yes	LSR		C_4541	
			ToutatsKLE1255	L2-6	53.6	Yes	LSR		C_4541	
			ToutatsS3/3	KLE1255	54.5	Yes	LSR		C_4541, L2/6	Yes
*FPbrigtivirus*	Myoviridae type 1, cluster 7	<i>F. prausnitzii</i>	Brigt	S3/3	50.1		LSR			
			Oengus	C_4644	61.6	Yes	LSR	RecT	C_4541	
*FPoengusvirus*	Siphoviridae type 1, cluster 2	<i>F. prausnitzii</i>	Oengus	C_4542	58.4		Tyr Int			Yes

<sup>a</sup>RT: retror-type reverse transcriptase, TPase: tyrosine recombinase superfamily, LSR: large serine recombinase, CM62/1 unclassified *clostridium* sp. CM62/1

<sup>b</sup>C\_ stands for CNCM



prophage could be detected by BLASTn in other genomes of the NCBI RefSeq database. On the other hand, prophages with 65% overall sequence identity to Mushu prophage were found in the unclassified *Ruminococcaceae* bacterium D16 (Fig. 1 and Additional file 3) and in the unclassified bacterium SS3/4 (Genbank sequence FP929062.1). Even more striking was the detection of a prophage almost identical to Lagaffe (98% nucleotide identity) in the genome of *Blautia hansenii* DSM 20583 (Fig. 1 and Additional file 3), a bacterium only related to *F. prausnitzii* A2-165 at the order level (they share only 29% of their proteins).

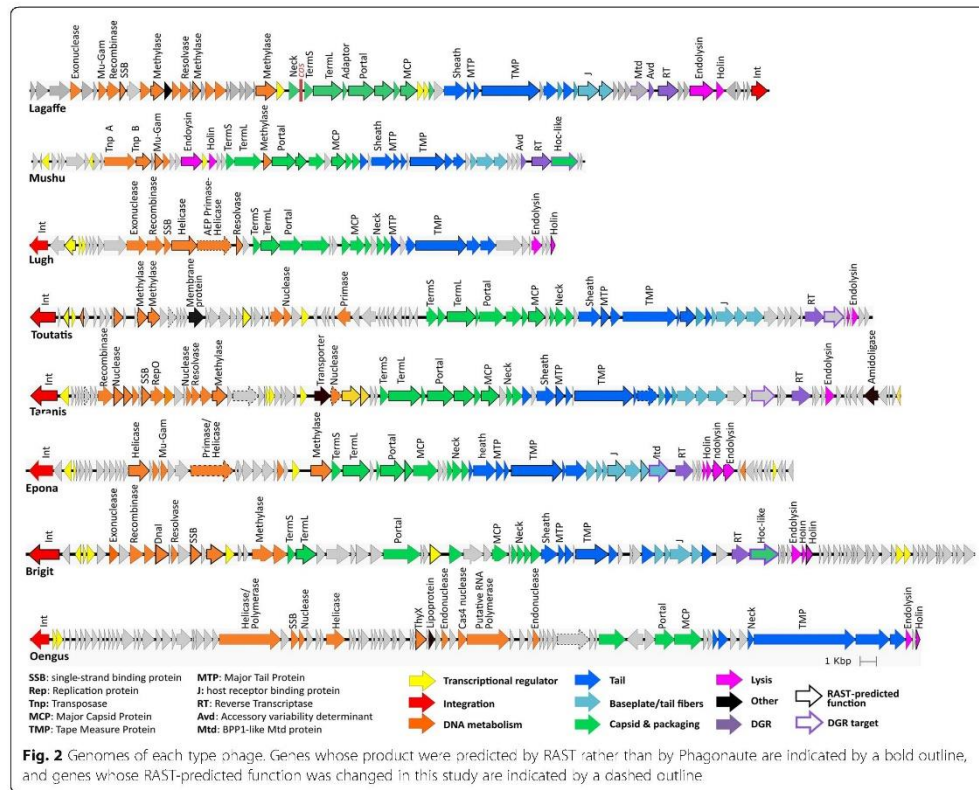
To classify these proposed new phage genera, since they greatly differ from known viruses, we used the Virfam webserver ([biodev.cea.fr/virfam](http://biodev.cea.fr/virfam)). Virfam uses virion protein remote homology and gene synteny to classify phages [28]. All the phages were classified among the Neck type 1, the largest clade of the Caudoviridae order (Additional file 4). Four genera grouped within the cluster 6 of this neck type, which branches deeply in the overall tree and comprises phages that could not be attributed to better-resolved clusters. Phage Mushu belongs to cluster 8, which corresponds to the "Saltoviridae" proposed family, composed of Mu-like transposable phages [29]. Accordingly, Mushu and its relative from

the *Ruminococcaceae* bacterium D16 genome have been assigned to this proposed family [29, 30]. Phages from the proposed "FPlughvirus" genus and phage Oengus group in clusters 1 and 2 respectively, with other unclassified Siphoviridae phages infecting Firmicutes. Surprisingly, Brigit phage groups in cluster 7, which typically comprises phages infecting *Enterobacteriaceae*.

#### Functional annotation of prophage genes reveals a high prevalence of diversity-generating retroelements

Within each proposed genus, we chose one representative prophage, which we subsequently refer to as the "type phage" for the group. Each type phage was annotated by using the Phagonaute webserver ([genome.jouy.inra.fr/phagonaute](http://genome.jouy.inra.fr/phagonaute)), which uses remote homology searches and gene synteny information [28, 31]. We improved the functional predictions as compared to the previous automatic annotation using RAST server by 2.5- to 5-fold (Fig. 2). All phage functional modules were detected in each prophage, providing further indication that these prophages correspond to complete phage genomes.

A remarkable feature of these genomes is the high prevalence of diversity-generating retroelements (DGRs). DGRs generate variability in target genes through a reverse transcriptase (RT)-mediated mechanism that



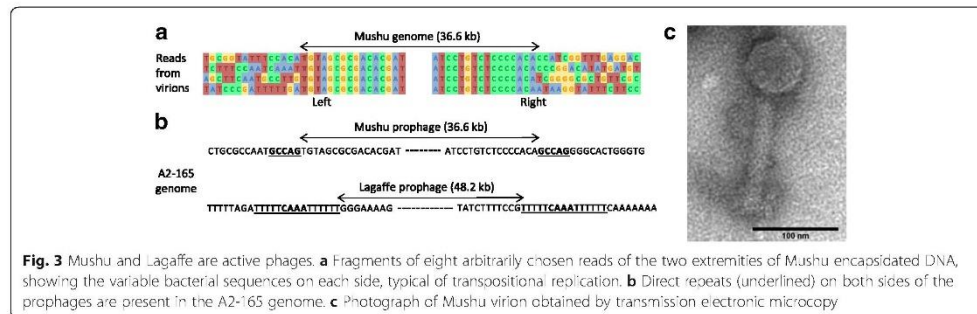
introduces nucleotide substitutions at defined locations in specific genes (reviewed in [32]). In this process, adenine residues are converted to random nucleotides in a unidirectional process from a donor template repeat (TR) to a recipient variable repeat (VR) present in the target gene. TR and VR sequences were identified in each prophage type coding for an RT (Additional file 5). As with other DGRs, TR/VR sequences were between 100 and 135 bp long, they differed almost exclusively at sites corresponding to TR adenines, and the VRs were located at the 3' end of protein-coding genes. We then searched for analogues of Avd, a low-molecular-weight protein required for mutagenic homing in the prototype DGR of the *Bordetella pertussis* phage BPP1 [33]. Homologs of Avd were detected in Mushu and Lagaffe genomes only (Fig. 2). In other phages, DGRs might function with another small protein, as has previously been suggested for other DGRs [34]. In Lagaffe and Epona, the putative target gene encodes a protein belonging to the formylglycine-generating enzyme (FGE) superfamily, which includes the BPP1 tail

protein MTD, implicated in bacterial recognition [35]. Mushu and Brigit DGR target genes code for a Hoc-like capsid decoration protein, which in T4 improves the binding to intestinal mucus [36]. In Toutatis and Taranis, no putative function could be attributed to the DGR target.

### Lagaffe and Mushu produce virions

We next evaluated the activity of Lagaffe and Mushu in laboratory conditions by isolating virions from the supernatant of a culture of strain A2-165 and sequencing the encapsidated DNA. We obtained 19,702 and 30,274 reads mapping to the Lagaffe and Mushu prophages, which correspond respectively to an 8- and 16-fold higher coverage than the rest of A2-165 genome (Additional file 6). This demonstrated that the two prophages produce virions and that there is no other active prophage in the A2-165 strain. Analysis of Mushu reads confirmed that it replicates by transposition: at the extremity of the Mushu genome, reads were flanked by variable host DNA sequences on both sides (Fig. 3a).





This particular configuration is similar to that of *E. coli* Mu phage encapsidated DNA, and results from packaging by a full head mechanism of integrated viral copies spread randomly through the host genome [37]. Analysis of reads also revealed the Mushu and Lagaffe precise integration sites in the A2-165 chromosome (Fig. 3b). Mushu integration site presents the typical 5 bp direct repeat of some Mu-like phages [37]. More surprisingly, Lagaffe is also flanked by direct repeats, whereas a sequence composed of inverted repeats is expected to form the integration site of IS30 transposases [23]. Analysis of Lagaffe reads with the PhageTerm tool [38], dedicated to the detection of the strategy used by phages to package their genome into capsids, identified the *cos* region of Lagaffe, upstream of the terminase gene *termS*.

For both phages, reads spanning the VR region of the DGR are more variable than the rest of the genome, an evidence of DGR activity (Additional file 5C). The level of variability observed in Mushu is however remarkable, since the phage genomes sequenced result in theory from a single cycle of multiplication (they are produced following induction in lysogenic cells), and suggests a very high efficacy of TR-to-VR transfer in this DGR.

Lagaffe virions could also be detected in *Blautia hansenii* DSM 20583 cultures by quantitative PCR (Table 2), which demonstrates the remarkable polyvalent nature of this phage. Indeed, usually, phages are restricted to strains of the same species or sometimes the same genus [39]. Only few cases have been reported of a phage infecting bacteria from different families, similar to Lagaffe [40, 41]. Finally, observation by electron microscopy of A2-165 culture supernatant revealed Mushu virions,

with a head diameter of  $61 \pm 1$  nm and a tail of length of  $134 \pm 2$  nm and width of  $22 \pm 1$  nm (Fig. 3c). Due to its very low concentration in A2-165 culture ( $3 \times 10^5$  ml<sup>-1</sup>, Table 2), intact Lagaffe virions could not be observed.

#### Lagaffe and Mushu prophages are not inducible by DNA damage

To increase virion titers and search for inducing signals, A2-165 *F. prausnitzii* cultures were treated with different concentrations of three potent inducers of phage lytic cycle: mitomycin C, hydrogen peroxide, and bile salts (cholate/deoxycholate [1:1]) [13, 42]. Mitomycin C in particular causes DNA damage, which is a general signal for prophage derepression. However, none of the treatments significantly increased virion concentrations (Additional file 7). For each compound tested, the highest dose tested almost abolished bacterial growth, indicating that they are toxic for *F. prausnitzii* and that the absence of prophage induction is not due to too low concentrations of potent inducers. Lagaffe and Mushu are thus probably not inducible by DNA damage, similar to most Mu-like phages.

#### Mushu virions are produced in the mouse gastro-intestinal tract but are not increased by colitis

We next investigated the production of A2-165 prophages in the mouse gastro-intestinal tract (GIT). Indeed, recent studies have shown increased prophage induction in the murine GIT, as compared to in vitro conditions [43, 44]. In order to obtain a colonization level of *F. prausnitzii* sufficient to detect virions in feces, we used dixenic mice colonized with *F. prausnitzii* A2-165 and *Escherichia coli*. In

**Table 2** Lagaffe and Mushu virion concentration in culture supernatants and in mouse feces

	Virions/ml or virions/g with <i>F. prausnitzii</i> A2165			Virions/ml in <i>B. hansenii</i> cultures
	Cultures	Healthy mouse gut	Inflamed mouse gut	
Lagaffe	$3 + 0.3 \times 10^5$	$< 1 \times 10^6$	$< 1 \times 10^6$	$6 + 3 \times 10^5$
Mushu	$8 + 2 \times 10^6$	$9 + 2 \times 10^6$	$7 + 2 \times 10^6$	

Virions were quantified by qPCR on encapsidated genomes. Intestinal inflammation in mouse was induced by adding DSS to drinking water. Cultures correspond to saturated 24 h cultures grown in LY-BHI

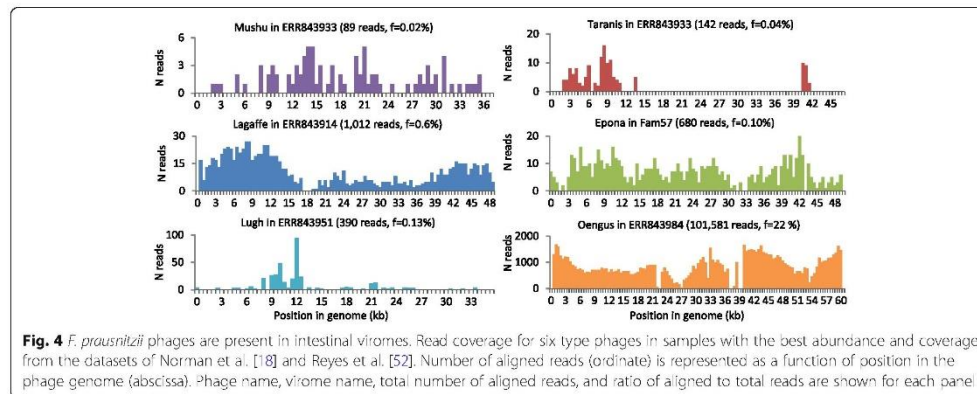
these mouse feces, the Lagaffe virion concentration was too low to be detected, but Mushu virions were present in similar concentrations to those observed in vitro (Table 2 and Additional file 8). Of note, however, the potential binding of virions to bacterial cells and intestinal mucus prevents the direct deduction of prophage induction rates from the concentrations of free virions. We then monitored the effect of moderate inflammation on the prophage induction rate. To mimic moderate inflammatory conditions, dextran sodium sulfate (DSS) was added at 2% to drinking water for 7 days. This treatment resulted in mild inflammation but did not increase virion concentrations in mouse feces (Additional file 8).

#### Some *F. prausnitzii* phages are more abundant in the gut viromes of IBD subjects

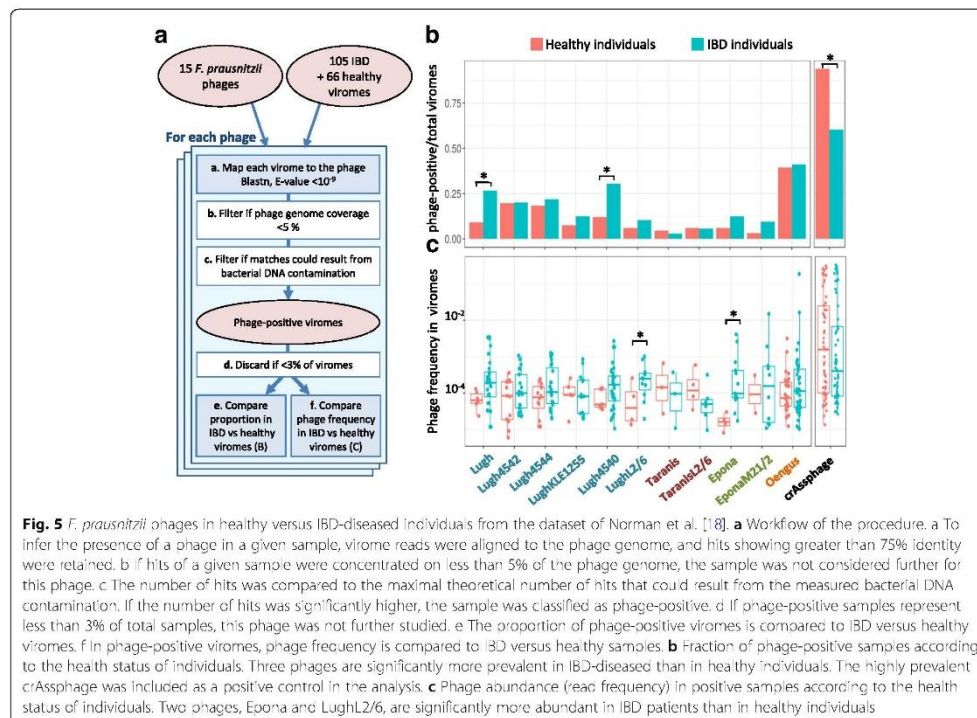
To evaluate the activity of the identified prophages in the human GIT, we investigated the sequences obtained from the viral fraction of 171 fecal samples from a large cohort of 52 IBD patients and 21 healthy controls [18]. Alignment by BLASTn of reads from this dataset to 17 of the identified prophages retrieved a large number of hits (ToutatisL2/6 being very close to Toutatis, 96% identical over 80% of its length; it was not included in this analysis). Altogether, virome reads mapping to at least one of the eight type phages represented 0.02% of all reads in healthy samples and 0.30% in IBD samples (mean of the proportion of reads matching on *F. prausnitzii* type phages over total number of reads). Remarkably, reads mapping to phage Oengus represented 22% of reads in one sample (Fig. 4, sample ERR843984). In that sample, we could assemble the matching reads into a contig covering 93% of Oengus genome with 99% identity. Yet matching read coverage was not always even on the prophages (Fig. 4), suggesting the presence of phages only sharing genome fragments with the phages of

this study. Concerning phages of the “FPlughvirus” proposed genus, this may be due to the high level of genomic mosaicism in this genus, i.e., the alternation of regions of high identity with regions of low identity between phage genomes (Additional file 9). Of note, various genes coding for homologous recombination proteins, involved in phage mosaicism, were found in this genus (Table 1) [45, 46].

We then wished to evaluate whether *F. prausnitzii* phages are significantly more prevalent and/or abundant in fecal samples of healthy individuals as compared to those of IBD patients. To this end, for each phage, we first determined phage-positive viral samples, i.e., the samples that unambiguously contain that phage or related ones. A flowchart of the procedure is represented in Fig. 5a. Since Lagaffe and Mushu relatives infect species other than *F. prausnitzii*, whose link with IBD is not known, they were removed from the analysis. Eleven of the 15 investigated phages were present in more than 3% of samples, and one of them, Oengus, was found in up to 40% of samples (Fig. 5b). Two “FPlughvirus” phages were statistically more prevalent in IBD samples than in healthy controls (Fig. 5, two tailed two-proportion  $z$  test,  $p < 0.05$ ). We then compared the proportion of reads homologous to each phage in phage-positive samples by fitting a logistic regression with status (healthy/IBD) as fixed effect and patient as mixed effect. Overall, all phages except those from the “FPtaranisvirus” proposed genus are more abundant in the IBD samples than in the healthy ones, although the difference reaches significance only for LughL2/6 and Epona (Fig. 5c,  $p$  value  $< 0.05$ ). Since *F. prausnitzii* populations are generally less abundant in IBD patients than in healthy controls [7], the higher occurrence and proportion of some *F. prausnitzii* temperate phages suggest that they are more active in the microbiota of IBD patients and that this activity is related to the depletion of *F. prausnitzii*.







## Discussion

*F. prausnitzii* genomes are particularly rich in prophages: in this study, we found that 85% of them harbor at least one complete prophage, as opposed to only 46% of all completely sequenced bacterial genomes [47]. The 23 identified complete prophages in this study correspond to 18 different phages, which can be grouped into eight new viral genera. Thanks to experimental and in silico investigations, we found evidence of activity for at least one member of each proposed genus. Their novelty and diversity are striking and greatly enrich the viral databases, which are at present highly skewed towards phages infecting *proteobacteria* or other pathogens, which together account for more than 75% of phages in the NCBI viral genome database (as of December 2017). The novelty of the viral proteins coded by *F. prausnitzii* phages should not only improve the analysis of viral metagenomic sequences but might also lead to biotechnology applications, such as genetic engineering of *F. prausnitzii*.

A very high proportion *F. prausnitzii* phages possesses DGRs: these diversification systems are present in 10 out of the 18 phages. By comparison, only 0.05% of the 876

phages present in the Phagobase database (comprising all fully sequenced phage genomes available at the NCBI as of May 2014) possess DGRs. This high prevalence in *F. prausnitzii* phages might explain the previously observed high frequency of DGRs in intestinal viromes [26]. By generating variants of target genes, DGRs presumably confer selective advantages to the phages, such as the ability to infect bacteria with different variants of the surface component used as receptor by the phage, as has been shown in the case of *B. pertussis* phage BPP1. In this phage, the DGR-mediated diversification of the MTD protein generates at low-frequency phage variants able to infect bacteria with receptors different from those of the original host [33]. In phages Lagaffe and Epona, the proteins diversified by the DGR are homologous to BPP1 MTD, so their diversification probably also facilitates phage adaptation to different bacterial receptors. This property would provide a selective advantage to the phage either in the case of a preexisting high bacterial surface receptor diversity or in conditions of continually evolving bacteria in the context of an ongoing arms race between phage and their hosts. In phages Brigit and Mushu, by targeting Hoc-like capsid

decoration proteins, the DGR system could improve the binding of virions to mucus, a strategy that has been suggested to increase the probability for phages to encounter their bacterial host [36]. Whatever the role of these DGRs, they contribute to the generation of microdiversity regions in the genomes of intestinal phages, which notoriously complicates the assembly of reads, and hence the analysis of GIT viral metagenomes [48].

We found that the *F. prausnitzii* temperate phages described here are present in 5 to 40% of the human fecal samples from the study of Norman and colleagues [18]. Despite their relatively low abundance in most samples of this dataset, they can represent up to 22% of total viral reads (Additional file 10). Most importantly, some of them are either more prevalent or more abundant in samples from IBD patients compared to that of healthy controls. This result is striking since IBD patients have generally a lower abundance of *F. prausnitzii* in their microbiota [6, 7]. This suggests that this higher prevalence or abundance is not just the consequence of a higher abundance of their bacterial host but rather that these *F. prausnitzii* prophages are more active in the microbiota of IBD patients as compared to healthy controls. This phage activity could aggravate or even trigger *F. prausnitzii* depletion. Since this depletion is highly suspected to participate in intestinal inflammation, our results suggest for the first time a role of *F. prausnitzii* phages in IBD.

### Conclusion

Here, we describe for the first time complete *F. prausnitzii* temperate phage genomes. These phages belong to the new viral genera, and most of their proteins have only remote homology with previously described viral proteins. The novelty of *F. prausnitzii* phages warrants great enrichment of databases, which should in turn significantly improve annotation of viral gut metagenomic sequences. In addition, we show that some of these *F. prausnitzii* phages are either more prevalent or more abundant in the fecal samples of IBD patients compared to that of healthy controls, suggesting that these phages might play a role in the disease. Future mechanistic exploration of the nature of phage-bacteria interactions is now necessary to elucidate the role of temperate phages in dysbiosis.

### Methods

#### Prophage detection and comparison

*F. prausnitzii* genomes listed in Additional file 1 were analyzed with PHASTER (<http://phaster.ca>). "Intact" and "questionable" regions were then validated by manual inspection. We retained regions with genes in each of the following modules: replication, capsid, lysis, and lysogeny, and no genes specific of integrative plasmids or

insertion sequences. Of note, several prophage regions were on borders of contigs, suggesting that some complete prophages could have been missed because of splitting between two contigs and that some of the retained prophages might lack some genes. Prophage borders were refined by searching for phage integrase and phage-specific genes by BLASTp against the nr NCBI database. In several cases, the ORF corresponding to the integrase had not been detected automatically and was added manually. For type prophages, few other ORFs were also added. In addition, repeats on both sides (attL and attR sites) were searched for. They could be identified only in prophages encoding a tyrosine integrase, which is not surprising since tyrosine integrases generally use longer identical repeat than serine integrases. A multi-fasta file containing all prophage nucleotide sequences is available in the Additional file 11. The type phage genomes were deposited in the NCBI viral database (accession numbers in Additional file 1) and are consultable on the Phagonaute webserver ([genome.jouy.inra.fr/phagonaute](http://genome.jouy.inra.fr/phagonaute)).

Genomic regions homologous to the 18 prophages were searched for in the nr/nt nucleotide collection of the NCBI by BLASTn, with the discontinuous megaBLAST default parameters. Sequences producing alignments covering more than 5% of the query were retained. Whole genome dotplots were realized with Gepard [49], using a length of 11 nt for minimal exact matches. CRISPR spacers were searched for with CRISPRDetect [50], using default parameters.

#### Shared proteins between prophage pairs

For each prophage pair to be compared, all proteins of the first phage were compared to the proteins of the second one (BLASTp,  $E$  value  $< 10^{-3}$ ), and best hits were considered shared proteins. The proportion of shared proteins was then calculated by dividing the number of shared proteins by the total protein number (minimal value of the pair), and the average identity percent of the shared proteins was computed. To select an outgroup phage for each proposed genus, all proteins of the type phage were compared to the viral protein database subset of the NCBI. The most frequent subject phage among the top 10 results for each protein was selected as the outgroup phage.

#### Gene product prediction

Gene function prediction for type prophages was achieved by combining Virfam [28] and Phagonaute [31] web tools. Concerning Virfam, default homology thresholds were used for recombinase and connector proteins. In Phagonaute, the proteins having a HHsearch hit against Pfam ( $P > 95\%$ ) were annotated with the Pfam information. Otherwise, the protein was searched against



all other phage proteins (probability threshold of 95% and two iterations of HHsearch) and annotated using the most prevalent annotation. If no homolog with experimentally validated function was retrieved by the second iteration, the word “putative” was indicated in the Genbank file.

#### Virome read treatments

Reads from 171 viromes extracted from feces of healthy subjects and patients with inflammatory bowel diseases [18] were downloaded from the EBI (fastq files, accession numbers ESR698653-ESR699023). Paired-end reads were treated with trimmomatic [51] to remove low-quality reads and unclip primer sequences present at the 3' ends of reads, using the following command ILLUMINACLIP: TruSeq3-PE.fa:2:30:10 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36. Reads were then dereplicated with fastx\_uniques from the usearch9 suite. Since ~30% of reads were no longer paired after the trimmomatic treatment, only one read from each pair was used for mapping analyses, to remain quantitative and avoid over-representation of some phage sequences compared to others. Average read length was 250 bp. To complement this analysis, we also analyzed the viral contigs generated in the Reyes et al. study [52]. In this study, fecal viruses from 20 Malawian families were extracted at different time points and sequenced by 454 shotgun pyrosequencing. A cross-assembly strategy yielded 17,696 contigs, among which 780 had a size above 10 kb. These contigs were downloaded from ENA (PRJEB 9818) and compared with the prophages by megaBLAST alignments. Four of these contigs (>10 kb) shared 93–97% identity to Epona, and together, the similarity regions covered 73% of Epona, but each of these contigs also contained large segments dissimilar to Epona. All four contigs originated from reads of family 57. These reads were therefore downloaded from ENA (PRJEB 9818, samples ERS795750 to 66), quality treated with trimmomatic, and dereplicated with fastx\_uniques. This generated 694,650 reads, among which 680 mapped on Epona, whereas only 71 mapped to bacterial *F. prausnitzii* DNA (see the mapping method below and Fig. 4).

#### Quantification of *F. prausnitzii* phages in viromes

The proportion of reads homologous to each prophage was determined with BLASTn ( $E$  value  $< 10^{-9}$ , >75% identity). To account for different genome lengths, read counts were normalized by dividing them by genome length and then multiplying the result by the average genome length (50 kb). This allows comparing phage read proportions as if all phages had a genome of length 50 kb. Since temperate phages can also be present in the bacterial DNA as prophages, we verified the level of bacterial DNA contamination of samples. An analysis of reads mapping to 16S rRNA genes with Bowtie2 [46] indicated that the vast

majority of the 171 viromes had a low proportion of bacterial DNA: 166 out of 171 had less than  $10^{-4}$  reads matching to 16S rRNA sequences. Two additional specific controls of *F. prausnitzii* DNA presence were included for the mapping analysis: a 50-kb segment corresponding to the beginning of the *F. prausnitzii* A2-165 Genbank file and a 50-kb segment encoding mainly metabolic genes (coordinates 1,451,689–1,501,688). Samples were classified as phage-positive for a given phage when the proportion of reads homologous to that phage was significantly higher than the proportion of reads homologous to these two bacterial regions (one tailed two-proportion  $z$  test,  $p < 0.05$ ). As a control of the method, we included the highly prevalent crAssphage in the analysis and found that it is more prevalent in healthy controls than in IBD patients (Fig. 5a, two-tailed two-proportion  $z$  test,  $p < 0.01$ ), in agreement with previously published results [17]. Inspection of prophage coverage within each virome (number of reads per 500 bp interval) revealed three situations: (i) the prophage was largely covered (>50% length, see Fig. 4), (ii) coverage was partial (Taranis and Lugh in Fig. 4); and (iii) matches were concentrated into 1–2 contiguous prophage intervals. We excluded these last cases (less than three non-overlapping windows of 500 bp, corresponding to at most 5% of the genome) that correspond to spurious matches from various phages, mapping to a conserved region, such as an anti-repressor or an integrase gene. Additionally, to minimize the impact of these spurious matches, the median and average values of matches among all 500 bp intervals with a non-null amount of matches were computed for each phage/sample pair, and in cases where average was 10-fold higher to median, intervals displaying a number of matches above 10 times the median were considered spurious and replaced by an arbitrary value of 10 times the median. The final abundance matrix and coverage value for each phage/virome pair is reported in Additional file 10.

#### Viral reads assembly for phage Oengus

Given the elevated abundance of Oengus in virome ERR843984, all reads from this virome mapping on Oengus were retrieved ( $n = 193,414$ ) and assembled with SPAdes (version 3.9) [53], using the following options: `-k 21,33,55,77,99,127 -careful -only-assembler`. This generated a 53.7-kb contig 99% identical to Oengus, covering 93% of the prophage, with a mean coverage of 322.

#### Sequencing of the DNA present in virions produced by the A2-165 strain

Five hundred milliliters of A2-165 culture grown overnight in LY-BHI (brain-heart infusion medium supplemented with 0.5% yeast extract [Difco], cellobiose (1 mg/ml [Sigma]), maltose (1 mg/ml [Sigma]), and cysteine (0.5 mg/ml [Sigma])), in an anaerobic chamber filled with

90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 5% H<sub>2</sub>, was centrifuged at 5,200g for 15 min at 4 °C. Supernatant was recovered and centrifuged at 5,200g for 30 min at 4 °C. This step was repeated with 1 h of centrifugation. Polyethylene glycol (PEG 8000) and NaCl (Sigma) were then added to the resulting supernatant to a final concentration of 10% and 1 M respectively. The resulting mixture was kept at 4 °C overnight and then centrifuged at 5200g for 1 h at 4 °C. Supernatant was removed, and the phage pellet was resuspended in 2 ml of SM buffer (100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris pH 7.5). Sample was then treated with 0.25 µg of RNase A (Sigma) and Dnase I (Sigma) at 37 °C for 1 h. Phage DNA was extracted using Promega kit Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-up system. Sequencing was performed with the Ion proton sequencing technology. Alignment of obtained reads was performed using bowtie2 (-N 1 -L 32) and then visualized with Tablet, using default parameters [54]. We obtained 204,837 reads mapping to the A2-165 genome, of which 19,702 and 30,274 reads aligned to the Lagaffe and Mushu prophages respectively.

#### Prophage induction assay and quantitative PCR

Quantification was made as previously described [44]. Briefly, phage particles from mouse feces (see below) or from 10 ml of overnight culture in LY-BHI were recovered by PEG precipitation, as described above. For induction assays, overnight cultures of *F. prausnitzii* A2-165 were diluted in LY-BHI 25-fold. When culture absorbance reached 0.2, potent inducers were added at final concentrations of 1 or 5 µg/ml for mitomycin C (Sigma, Ref: M4287), 0.1 and 0.05% for bile salts (Sigma 48305), and 100 µM and 10 µM for hydrogen peroxide (Sigma H1009). Five hours after induction, phages were recovered from culture supernatants by PEG precipitation as described above. Samples were then treated with 10 U of Turbo DNase (Ambion) for 1 h at 37 °C and incubated at 95 °C for 30 min in 0.2 ml PCR tubes. qPCR on 100-fold diluted samples in water was performed using the Takyon ROX SYBR Mastermix blue dTTP kit (Eurogentec) and the StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystem). Phage and bacterial concentrations were determined using specific primer pairs (Additional file 12). Copy numbers were calculated with a standard curve built with bacterial DNA containing the prophages, whose concentration was estimated with Qubit (Thermo Fisher). The reaction mix was the following: 7.5 µl Takyon mix, 0.9 µl dH<sub>2</sub>O, 0.3 µl of each primer (200 nM final concentration), and 6 µl of DNA diluted in H<sub>2</sub>O. The PCR conditions were the following: 95 °C 15 s, 58 °C 45 s, and 72 °C 30s for 45 cycles, 72 °C 5 min, followed by melting

curves. Results were analyzed using the StepOne Software 2.3.

#### Mouse colonization experiments

Germfree 7- to 8-week-old C3H/HeN mice (female) were obtained from the germfree rodent breeding facility of Anaxem-Micalis (INRA, Jouy-en-Josas, France). Animals were kept in flexible-film isolators (Getinge-La Calhène) in standard cages (two to five mice/cage) with sterile wood shavings as animal bedding. Mice were given free access to autoclaved tap water and to standard diet R03-40 (Scientific Animal food and Engineering, Augy, France), sterilized by gamma irradiation at 45 kGy (IBA Mediris). Isolators were maintained under controlled conditions of light (12 h), temperature (20 to 23 °C), and humidity (45 to 55%). To obtain dioxenic *E. coli*/*F. prausnitzii*-dissociated mice, germfree mice were orally inoculated with a fresh culture of *E. coli* LF82 (10<sup>8</sup> to 10<sup>9</sup> CFU/ml). Forty-eight and 72 h later, 10<sup>9</sup> CFU of *F. prausnitzii* A2-165 in 0.2 ml were administered by intragastric gavage to mice pretreated with sodium bicarbonate (0.2 M, 0.1 ml by intragastric gavage, given 10 min before inoculation of bacteria). To induce colitis, 21 days after *F. prausnitzii* colonization, mice were given drinking water supplemented with 2% (w/v) dextran sulfate sodium (DSS; MP Biomedicals) for 7 days. Body weight, blood in stool, and stool consistency were monitored daily. Phage particles were recovered from one or two frozen fecal pellets unfrozen on ice for 10 min and diluted 40-fold in cold PBS. Re-suspended feces were kept on ice for 5 min with regular agitation prior to centrifugation for 10 min at 5251g at 4 °C. Supernatants were recovered and filtered through a 0.2-µm filter (PALL Corporation Acrodisc PF syringe filter). Samples were supplemented with 10% PEG 8000 (Sigma) and 0.5 M NaCl (Sigma). After incubation overnight at 4 °C, phage particles were harvested by centrifugation (5250g for 1 h at 4 °C with a swinging rotor). Supernatant was carefully removed, and pellets were re-suspended in 100 µl of SM buffer (100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris pH 7.5) for 1 h at 4 °C.

#### Transmission electronic microscopy

Phages were concentrated by ultracentrifugation (20,000g, 1 h, 4 °C), starting from 500 ml of *F. prausnitzii* A2-165 culture. The phage pellet was resuspended in 100 µl of MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Droplets of this preparation were directly placed on Formvar carbon-coated grids for 5 min. The grids were stained with 1% uranyl acetate and then viewed for TEM using a HITACHI HT 7700 (Elexience, France) at 80 kV. Microphotographies were acquired with a charge-coupled device camera AMT.



## Additional files

**Additional file 1:** Accession numbers of the bacterial and type phage genomes and bacterial coordinates of all prophages. (DOCX 22 kb)

**Additional file 2:** Similarity matrices of phage proteins within each proposed genus. For each pair of phages, the percentage of shared proteins as well as their mean amino acid identity is indicated. For each proposed genus, the closest known phage was included in the analysis, and its host is indicated. Numbers in brackets indicate the number of ORF per genome, and most of the variability within a group is due to annotation errors. Numbers in bold indicate highly homologous prophages, which were considered to correspond to the same species. (DOCX 28 kb)

**Additional file 3:** Alignment of Mushu and Lagaffe with close relatives. A) Lagaffe prophages. Remarkably, Lagaffe prophage is present in the genome of *B. hanseii* DSM20583, only distantly related to *F. prausnitzii*. Alignment with a viral contig obtained from metagenomic reads suggests that the packaging site is just before the terminase gene. B) Mushu prophage is present in three *F. prausnitzii* isolates. Its synteny is perfectly conserved with a distantly related prophage in the genome of the *Ruminococcaceae* bacterium D16 (R3D16). (PPTX 466 kb)

**Additional file 4:** Classification of *F. prausnitzii* phage genera by Virfam. Classification of *F. prausnitzii* phage genera by Virfam ([biodev.ceca.fr/virfam/](http://biodev.ceca.fr/virfam/)). Four genera fall into the less resolved cluster, the cluster 6. (PPTX 913 kb)

**Additional file 5:** DGRs in prophages. A) The position of TR and VR regions in phage genomes and the percentage of nucleotide identity between the sequences (% id), as well as the repeat length, are indicated for each type phage. In all cases, the differences are restricted to adenine residues, and the target genes containing the VR are typical of DGR. B) Genetic organization of DGRs of phages Lagaffe and Mushu, and alignment of their template repeat (TR) and variable region (VR). Red bases highlight point mutation between the two regions. Positions are given relative to the beginning of the prophage, except for Lagaffe (beginning of the encapsidated form of the genome). As in other VR/TR repeats, mismatches concern only adenine residues. C) Mapping of sequence reads of encapsidated phage DNA reveals the high variability in the VR region of both phages. Illustrations were obtained using Tablet [54]. Note that in the case of Lagaffe, the sequence corresponds to the complement of the VR sequence in B). (PPTX 194 kb)

**Additional file 6:** Read coverage of Lagaffe and Mushu prophages. Coverage of the bacterial DNA is represented by surrounding regions of the two prophages. Numbers correspond to positions in the A2\_165 genome. Coverage pictures were obtained using Tablet [54]. (PPTX 141 kb)

**Additional file 7:** Lagaffe and Mushu virion concentrations in culture supernatants. Quantification of Mushu and Lagaffe virions in different conditions. Numbers represent means of genomes/ml  $\pm$  s.e.m. of two to five independent experiments. Absorbance of the culture ( $O.D_{600nm}$ ) reflects the toxicity of the compound on bacterial growth. (DOCX 13 kb)

**Additional file 8:** Lagaffe and Mushu virion concentration in the feces of mice. A) *F. prausnitzii* concentration (dark blue and dark red) and Mushu virion concentration (light blue and light red) in the feces of mice, as determined by quantitative PCR. DSS treatment does not modify phage and bacteria population levels compared to untreated mice. B) Variation of mice weight with time. Dots represent the average of five mice; bars represent S.E.M. Mice given DSS in drinking water lost weight, a sign of inflammation. C) Concentration of lipocalin, a marker of intestinal inflammation [55], in mice feces. Concentration was estimated on feces after 7 days of DSS ingestion, using R&D ELISA kit (DY1857) and following manufacturer protocol. The DNA of fecal bacteria was extracted from feces resuspended in 500  $\mu$ l of PBS. Suspension was centrifuged 1 min at 500g. Supernatant containing bacteria was recovered and mixed with 250  $\mu$ l of lysis buffer (200 mM NaCl, 20 mM EDTA, 5% SDS), 250  $\mu$ l of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1; pH 8.0, Sigma Aldrich) and half of a tube of silica beads (100  $\mu$ M MP Bio, lysis matrix B). Bacteria were lysed using Fast-prep MPBio (5.5, 4 times 30 s). Samples were then centrifuged (13,000g, 3 min, 20 °C) and the aqueous phase was recovered. Four hundred microliters of chloroform/isoamyl alcohol(2:1) was added, mixed vigorously and centrifuged (13,000g, 3 min, 20 °C). DNA

was precipitated with two volumes of ethanol and sodium acetate at 0.3 M final. (PPTX 42 kb)

**Additional file 9:** Whole genome dotplot of "FPlughvirus" phages. Whole genome dotplot of the six genomes of the proposed "FPlughvirus" genus reveals mosaicism. Phages share regions of high identity interspaced by regions without homology. The dotplot was realized with Gepard. (PPTX 123 kb)

**Additional file 10:** Number of virome reads homologous to each prophage for all 171 viromes. Number of reads homologous to each prophage (N reads), as determined with BLASTn (*E* value  $< 10^{-9}$ ,  $> 75\%$  identity). For each phage/virome pair, the number of 500 bp interval covered by reads (N int) is also reported. (XLSX 81 kb)

**Additional file 11:** Genome sequences of the 18 *F. prausnitzii* prophages (multifasta format). multifasta file of the 18 *F. prausnitzii* prophages. (FA 976 kb)

**Additional file 12:** Sequences of oligonucleotides used for quantitative PCR. (DOCX 15 kb)

## Acknowledgements

We are very grateful to Chantal Bridonneau for her expertise in anaerobic culture; to Anne Foussier, Fatima Joy, and Aurélie Balvat from the Anaxem facility for their help with the animal handlings; to Christine Longin from the MMA2 facilities (UMR 1313 GAB, INRA) for the TEM observations; to the Migale platform (INRA) for the bio-informatics environment; and to Colin Tinsley for his careful reading of the manuscript.

## Funding

This work was supported by a grant from Association François Aupetit.

## Availability of data and materials

The genomes of bacteria used are freely available on the NCBI website; the accession numbers are given in Additional file 1.

## Authors' contributions

JC and MDP performed the prophage detection. LB provided the *F. prausnitzii* genomes. JC and EM performed the experiments. MAP performed the viral metagenomic analyses. MM performed the statistical analyses. JC, MAP, PL, HS, and MDP analyzed the results. MDP wrote the manuscript with the help of MAP and MM, and all authors revised and approved the manuscript.

## Ethics approval and consent to participate

All animal procedures were carried out according to the European Community Rules of Animal Care and with authorization 1234.2015101315238694 from French services.

## Consent for publication

The manuscript does not contain any individual personal data in any form.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France. <sup>2</sup>MalAGE, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France. <sup>3</sup>Department of General Biology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. <sup>4</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, École normale supérieure, CNRS, INSERM, AP-HP Laboratoire des Biomolécules (LBM), 27 rue de Chaligny, 75012 Paris, France. <sup>5</sup>Department of Gastroenterology, Saint Antoine Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, UPMC, Paris, France.

Received: 24 October 2017 Accepted: 21 March 2018  
Published online: 03 April 2018

## References

- Rios-Covian D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Guzmán M, de Los Rios-Gavilán CG, Salazar N. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front Microbiol.* 2016;7:185.
- Canani RB, Costanzo MD, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol.* 2011;7(12):1519–28.
- Quevrenin E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, Miquel S, Carlier L, Bermudez-Humaran LG, Pigneur B, et al. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut.* 2016;65(3):415–25.
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Cochetier G, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(43):16731–6.
- Miquel S, Martin R, Lashermes A, Gillet M, Meleine M, Gelot A, Eschaliere A, Ardiz D, Bermudez-Humaran LG, Sokol H, et al. Anti-noiceptive effect of *Faecalibacterium prausnitzii* in non-inflammatory IBS-like models. *Sci Rep.* 2016;6:19399.
- Rossi O, van Berkel LA, Chain F, Tanweer Khan M, Taverne N, Sokol H, Duncan SH, Flint HJ, Harnsen HJ, Langella P, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. *Sci Rep.* 2016;6:18507.
- Cao Y, Shen J, Ren ZH. Association between *Faecalibacterium prausnitzii* reduction and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Gastroenterol Res Pract.* 2014;2014:872725.
- Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Lamurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Cochetier G, Marteau P, Dore J. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(8):1183–9.
- Mills S, Shanahan F, Stanton C, Hill C, Coffey A, Ross RP. Movers and shakers: influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota. *Gut Microbes.* 2013;4(1):4–16.
- Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* 2011;21(10):1616–25.
- Bondy-Denomy J, Davidson AR. When a virus is not a parasite: the beneficial effects of prophages on bacterial fitness. *J Microbiol.* 2014;52(3):233–42.
- Brusson H, Ganachaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(3):560–602. table of contents
- Nanda AM, Thormann K, Frunzke J. Impact of spontaneous prophage induction on the fitness of bacterial populations and host-microbe interactions. *J Bacteriol.* 2015;197(3):410–9.
- De Paepe M, Leclerc M, Tinsley CR, Petit MA. Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:39.
- Manrique P, Dills M, Young MJ. The human gut: phage community and its implications for health and disease. *Viruses.* 2017;9(6)
- Kim MS, Park EJ, Roh SW, Bae JW. Diversity and abundance of single-stranded DNA viruses in human feces. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(22):8062–70.
- Manrique P, Bolduc B, Walk ST, van der Oost J, de Vos WM, Young MJ. Healthy human gut phageome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(37):10400–5.
- Norman JM, Handley SA, Baldridge MT, Drot L, Liu CY, Keller BC, Kambal A, Monaco CL, Zhao G, Fleshner P, et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell.* 2015;160(3):447–60.
- Ren J, Ahlgren NA, Lu YY, Fuhrman JA, Sun F. VirFinder: a novel k-mer based tool for identifying viral sequences from assembled metagenomic data. *Microbiome.* 2017;5(1):69.
- Benevides I, Burman S, Martin B, Robert V, Thomas M, Miquel S, Chain F, Sokol H, Bermudez-Humaran LG, Morrison M, et al. New insights into the diversity of the genus *Faecalibacterium*. *Front Microbiol.* 2017;8:1790.
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Web Server issue):W347–52.
- Amdt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W16–21.
- Kiss J, Szabo M, Olasz F. Site-specific recombination by the DDE family member mobile element IS30 transposase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(25):15000–5.
- Lavigne R, Seto D, Mahadevan P, Ackermann HW, Kropinski AM. Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the Podoviridae using BLASTP-based tools. *Res Microbiol.* 2008;159(5):406–14.
- Adriaenssens E, Brisler JR. How to name and classify your phage: an informal guide. *Viruses.* 2017;9(4)
- Minot S, Grunberg S, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. Hypervariable loci in the human gut virome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(10):3962–6.
- Heiler B, Marafini LA, Bikard D. Adapting to new threats: the generation of memory by CRISPR-Cas immune systems. *Mol Microbiol.* 2014;93(1):1–9.
- Lopes A, Tavares P, Petit MA, Guerois R, Zinn-Justin S. Automated classification of tailed bacteriophages according to their neck organization. *BMC Genomics.* 2014;15:1027.
- Hulo C, Masson P, Le Mercier P, Toussaint A. A structured annotation frame for the transposable phages: a new proposed family "Santoviridae" within the Caudovirales. *Virology.* 2015;477:155–63.
- Toussaint A. Transposable Mu-like phages in Firmicutes: new instances of divergence generating retroelements. *Res Microbiol.* 2013;164(4):281–7.
- Delattre F, Souali O, Fogoonee K, Guerois R, Petit MA. Phagonaut: a web-based interface for phage synteny browsing and protein function prediction. *Virology.* 2016;496:42–50.
- Guo H, Arambula D, Ghosh P, Miller JF. Diversity generating retroelements in phage and bacterial genomes. *Microbiol Spectr.* 2014;2(6)
- Liu M, Deora R, Doulatov SR, Gingery M, Eiserling FA, Presion A, Maskell DJ, Simons RW, Cotter PA, Parkhill J, et al. Reverse transcriptase-mediated tropism switching in *Bordetella* bacteriophage. *Science.* 2002;295(5562):2091–4.
- Paul BG, Burstein D, Castelle CJ, Handa S, Arambula D, Czornyj E, Thomas BC, Ghosh P, Miller JF, Banfield JF, et al. Retroelement-guided protein diversification abounds in vast lineages of bacteria and archaea. *Nat Microbiol.* 2017;2:17045.
- Schillinger T, Zingler N. The low incidence of diversity-generating retroelements in sequenced genomes. *Mob Genet Elements.* 2012;6(2):287–91.
- Barr JJ, Auro R, Furlan M, Whiteson KL, Erb ML, Poglieno J, Stotland A, Wolkowicz R, Cutting AS, Doran KS, et al. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(26):10771–6.
- Allet B. Mu insertion duplicates a 5 base pair sequence at the host inserted site. *Cell.* 1979;16(1):123–9.
- Garneau JR, Depardieu F, Fortier LC, Bikard D, Monot M. PhageTerm: a tool for fast and accurate determination of phage termini and packaging mechanism using next-generation sequencing data. *Sci Rep.* 2017;7(1):8292.
- Weitz JS, Poisot T, Meyer JR, Flores CO, Valverde S, Sullivan MB, Hochberg ME. Phage-bacteria infection networks. *Trends Microbiol.* 2013;21(2):82–91.
- de Leeuw M, Baron M, Brenner A, Kushmaro A. Genome analysis of a novel broad host range Proteobacteria phage isolated from a bioreactor treating industrial wastewater. *Genes (Basel).* 2017;8(1)
- Malki K, Kula A, Bruder K, Sible E, Hatzopoulos T, Steidel S, Watkins SC, Putonti C. Bacteriophages isolated from Lake Michigan demonstrate broad host range across several bacterial phyla. *Virology.* 2015;12164.
- Kim S, Ryu K, Biswas D, Ahn J. Survival, prophage induction, and invasive properties of lysogenic *Salmonella typhimurium* exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Arch Microbiol.* 2014;196(9):655–9.
- De Paepe M, Toumier L, Moncaut E, Son O, Langella P, Petit MA. Carriage of lambda latent virus is costly for its bacterial host due to frequent reactivation in Monoxenic mouse intestine. *PLoS Genet.* 2016;12(2):e1005861.
- Diard M, Bakkeren E, Cornuault JK, Moor K, Hausmann A, Sellin ME, Loverdo C, Aertsen A, Ackermann M, De Paepe M, et al. Inflammation boosts bacteriophage transfer between *Salmonella* spp. *Science.* 2017;355(6330):1211–5.
- Bobby IM, Touchon M, Rocha FP. Manipulating or superseding host recombination functions: a dilemma that shapes phage evolvability. *PLoS Genet.* 2013;9(9):e1003825.
- De Paepe M, Hutinet G, Son O, Amarir-Bouhram J, Schbath S, Petit MA. Temperate phages acquire DNA from defective prophages by relaxed homologous recombination: the role of Rad52-like recombinases. *PLoS Genet.* 2014;10(3):e1004181.



47. Touchon M, Bernheim A, Rocha EP. Genetic and life history traits associated with the distribution of prophages in bacteria. *ISME J*. 2016;10(11):2744–54.
48. Martínez-Hernández F, Fornas O, Lluersma Gomez M, Bolduc B, de la Cruz Pena MJ, Martínez JM, Anton J, Gasol JM, Rosselli R, Rodríguez-Valera F, et al. Single-virus genomics reveals hidden cosmopolitan and abundant viruses. *Nat Commun*. 2017;8:15892.
49. Krumsiek J, Arnold B, Rattai T. Gepard: a rapid and sensitive tool for creating dotplots on genome scale. *Bioinformatics*. 2007;23(8):1026–8.
50. Biswas A, Sizals RH, Morales SF, Fineran PC, Brown GM. CRISPRDetect: a flexible algorithm to define CRISPR arrays. *BMC Genomics*. 2016;17:356.
51. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–20.
52. Reyes A, Blanton LV, Cao S, Zhao G, Manary M, Trehan J, Smith M, Wang D, Virgin HW, Bohwer F, et al. Gut DNA viromes of Malawian twins discordant for severe acute malnutrition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(38):11941–6.
53. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455–77.
54. Milne I, Stephen G, Bayer M, Cock PJ, Pritchard L, Cardle I, Shaw PD, Marshall D. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Brief Bioinform*. 2013;14(2):193–202.
55. Chassaing B, Srinivasan G, Delgado MA, Young AN, Gewirtz AT, Vijay-Kumar M. Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS One*. 2012;7(9):e44328.

Submit your next manuscript to BioMed Central  
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



Additional File 1 :

Bacterial genomes				
Phylogroup	strain	Contig accession number	Prophage	
			Name	Predicted position*
<i>F. prausnitzii</i> Phylogroup I	CNCM-4644	NMTZ01000027	Brigit	234,677-296,392
	CNCM-4546	NMTV00000000	-	
	M21/2	ABED02000025	EponaM21/2	172,577-221,041
	CNCM-4573	NMTW01000053	Epona	compl(56,066-105,638)
	SL3/3	FP929046	ToutatisSL3/3	2,692,869-2,742,990
	A2-165	CP022479	Lagaffe Mushu	787,801-836,061* 2,972,083-3,008,557*
<i>F. prausnitzii</i> Phylogroup II B	CNCM-4543	NMTT01000002	Mushu4543	compl(306,388-342,983)
		NMTT01000003	Lugh	183,976-218,050
			Taranis	381,591-435,876
	CNCM-4574	NMTX01000009 NMTX01000025 NMTX01000030	Lugh Taranis Mushu4574	13,037-47,111 compl (68,515-122,519) 70,578-107,173
<i>F. prausnitzii</i> Phylogroup II C	CNCM-4542	NMTS02000001.1	Lugh4542	516,480-552,921
			Oengus	690,827-632,437
			Toutatis	compl(774,105-828,829)
	CNCM-4544	NMTU01000035	Lugh4544	101,198-137,181
	CNCM-4541	NMTR00000000	-	
KLE1255	AECU01000248 AECU01000219/97/98	LughKLE1255	1-35,806	
		ToutatisKLE1255	concat of 3 contigs	
Other <i>F. prausnitzii</i>	CNCM-4575	NMTY01000015	Epona	compl (16,636-66,636)
	L2-6	FP929045.1	TaranisL2-6	30,658-74,593
			LughL2-6 ToutatisL2-6	633,929-665,157 1,623,846-1,677,432
<i>Blautia hansenii</i>	DSM 20583	NZ_GG698588	Lagaffe	179,938-228,023
Unclassified <i>clostridium</i> sp.	M62/1	NZ_GG730315	Lagaffe	16,101-65,583
Unclassified <i>ruminococcaceae</i> bacterium	D16	NZ_KI391947	MushuRBD16	124,001-160,259
Viral contigs and phage or prophage genomes				
Clone 2204 scaffold 812		JQ680370.1		
Clone 2209 scaffold 1451		JQ680376.1		
Clone 2200 scaffold 2278		JQ680365.1		
Clone 2204 scaffold14		JQ680368.1		
FP_Mushu		MG711460		
FP_Lagaffe		MG711461		
FP_Lugh		MG711464		
FP_Taranis		MG711467		
FP_Epona		MG711462		
FP_Toutatis		MG711466		
FP_Brigit		MG711465		
FP_Oengus		MG711463		

\* : positions with \* indicate that they were confirmed by sequencing of encapsidated DNA

Additional File 2:

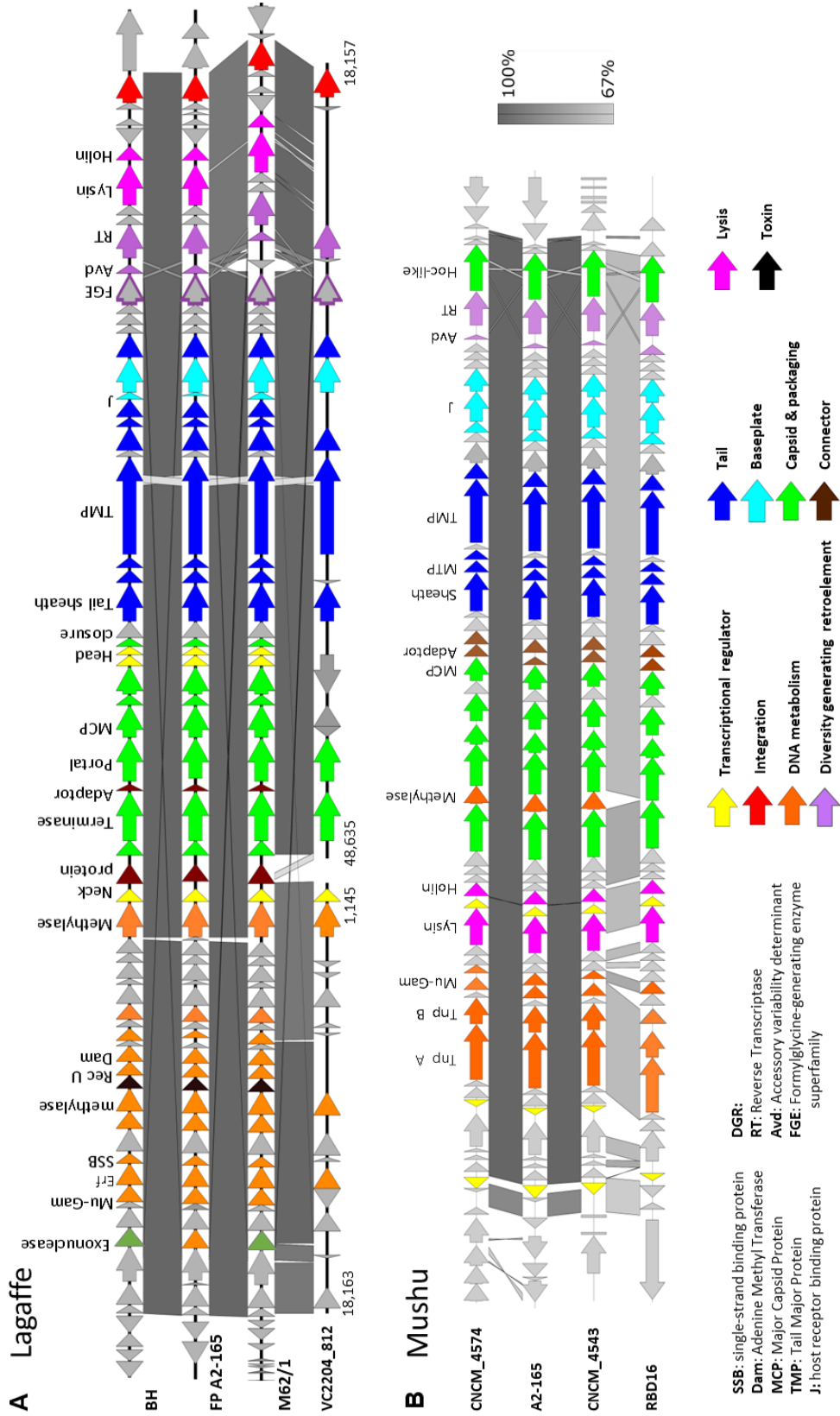
'FPmushuvirus'		Mushu in A2-165 (56)	Mushu in 4543	Mushu in 4574	MushuRBD16
Mushu in 4543 (52)	Shared proteins	<b>98 %</b>			
	Mean identity	<b>97,8 %</b>			
Mushu in 4574 (56)	Shared proteins	<b>96 %</b>	<b>98 %</b>		
	Mean identity	<b>97,1 %</b>	<b>99,9 %</b>		
MushuRBD16 (48)	Shared proteins	88 %	90 %	90 %	
	Mean identity	68,6 %	68,8 %	68,6 %	
Mu (55)	Shared proteins	20%	23%	21%	27%
<i>Escherichia coli</i>	Mean identity	29,1 %	29,8 %	29,8 %	29,3 %

'FPlughvirus'		Lugh in 4574	Lugh in 4543	Lugh4542	Lugh4544	LughKLE-1255	Lugh4540	LughL2/6
Lugh in 4543 (42)	Shared proteins	<b>100%</b>						
	Mean identity	<b>99.6%</b>						
Lugh4542 (43)	Shared proteins	58%	57%					
	Mean identity	60%	60.6%					
Lugh4544 (56)	Shared proteins	47%	45%	0.91				
	Mean identity	61.7%	62.4%	91.4%				
LughKLE12 (54)	Shared proteins	49%	48%	73%	72%			
	Mean identity	57%	67.5%	83%	84.6%			
Lugh4540 (62)	Shared proteins	64%	62%	52%	45%	50%		
	Mean identity	69.8%	70.5%	80.7%	78.5%	75,5%		
LughL2/6 (35)	Shared proteins	46%	46%	63%	43%	43%	40%	
	Mean identity	58.4%	58.4%	61%	51.1%	53,6%	53,3%	
BCJA1c (58)	Shared proteins	35%	31%	11%	11%	12%	33%	20%
<i>Bacillus clarkii</i>	Mean identity	38,7%	40.1%	30,7%	31%	30,6%	41,2%	28,3%

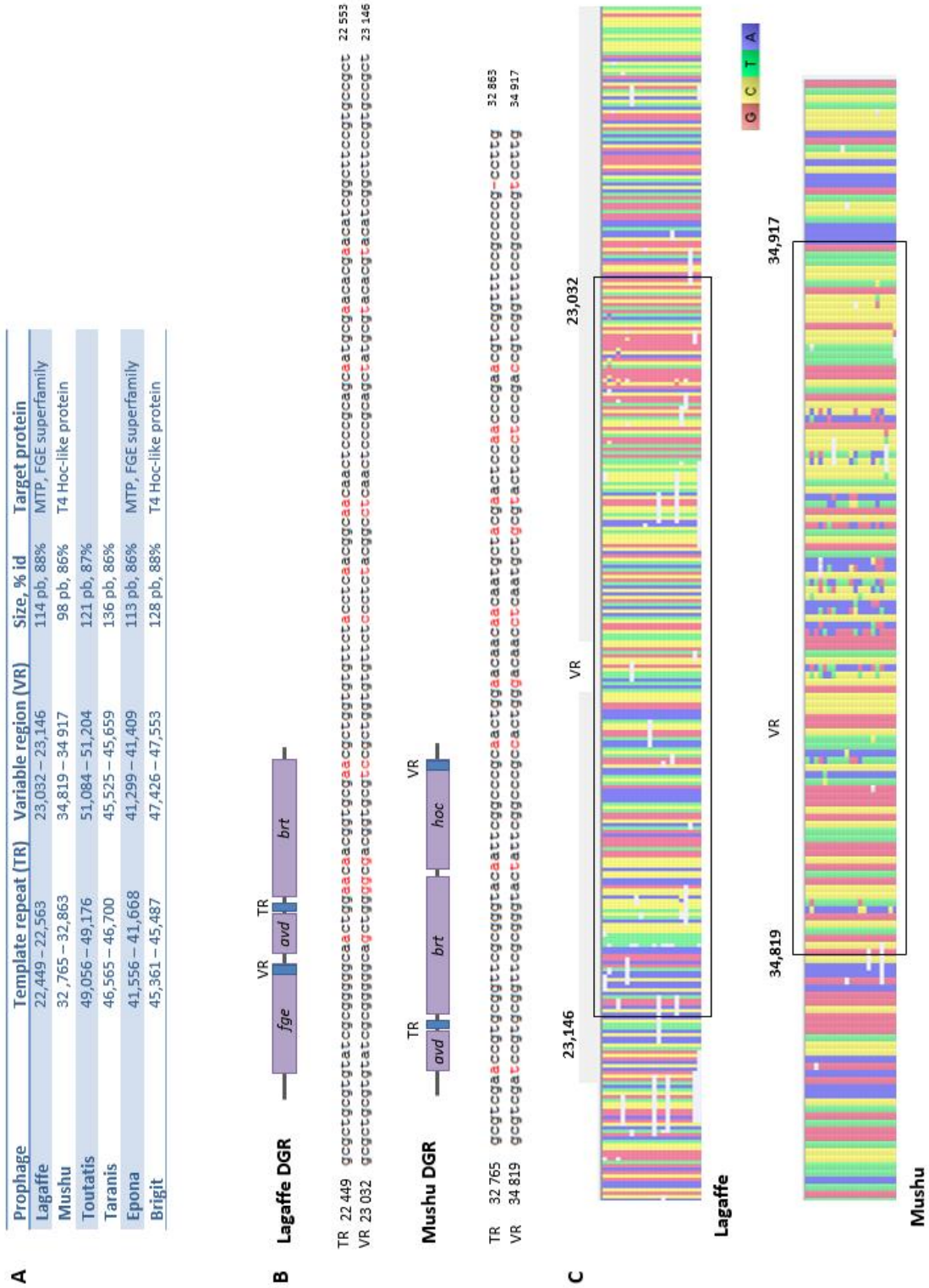
'FPtoutatisvirus'		Toutatis /4542pp3 (89)	L2/6pp3	KLEpp2	SL3/3pp1
ToutatisL2-6 (72)	Shared proteins	88%			
	Mean identity	93,34 %			
ToutatisKLE1255 (89)	Shared proteins	79%	78%		
	Mean identity	92.2 %	89.3 %		
ToutatisSL3/3 (67)	Shared proteins	55%	45%	57%	
	Mean identity	52.2 %	48.5 %	50.9 %	
Lily (74)	Shared proteins	16%	13%	16%	16%
<i>Paenibacillus larvae</i>	Mean identity	34,3%	32,6%	34,2%	35,6%

'FPtaranisvirus'		Taranis in 4574 (89)	Taranis4543	TaranisL26
Taranis in 4543 (65)	Shared proteins	<b>98%</b>		
	Mean identity	<b>99,2 %</b>		
TaranisL2-6 (59)	Shared proteins	80%	73%	
	Mean identity	86,05 %	88,1 %	
Lily (74)	Shared proteins	23%	23%	15%
<i>Paenibacillus larvae</i>	Mean identity	34,6%	35%	34,6%

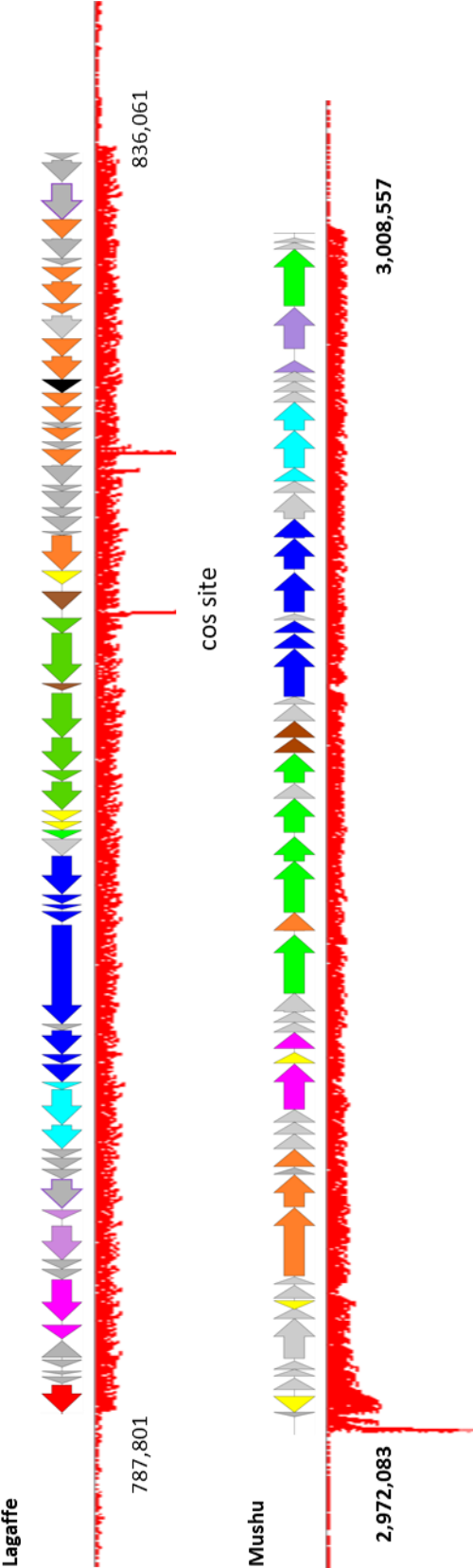
'FPeponavirus'		Epona in 4573 (76)	Epona in 4575	EponaM21-2
Epona in 4575 (75)	Shared proteins	<b>100%</b>		
	Mean identity	<b>99,9 %</b>		
EponaM21-2 (75)	Shared proteins	57%	55%	
	Mean identity	45.2%	45.5%	
X29	Shared proteins	30%	31%	17%
<i>Vibrio cholerae</i>	Mean identity	32%	32.1%	33.5%







Additional File 6:

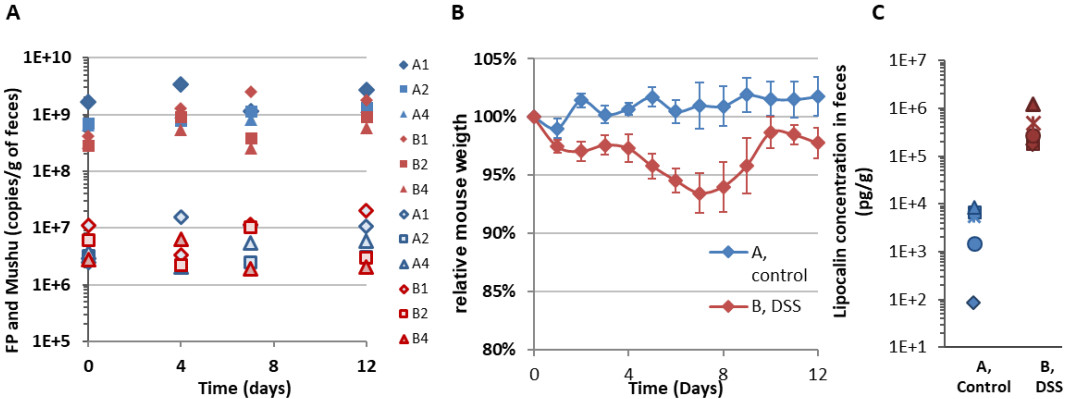


Additional File 7:

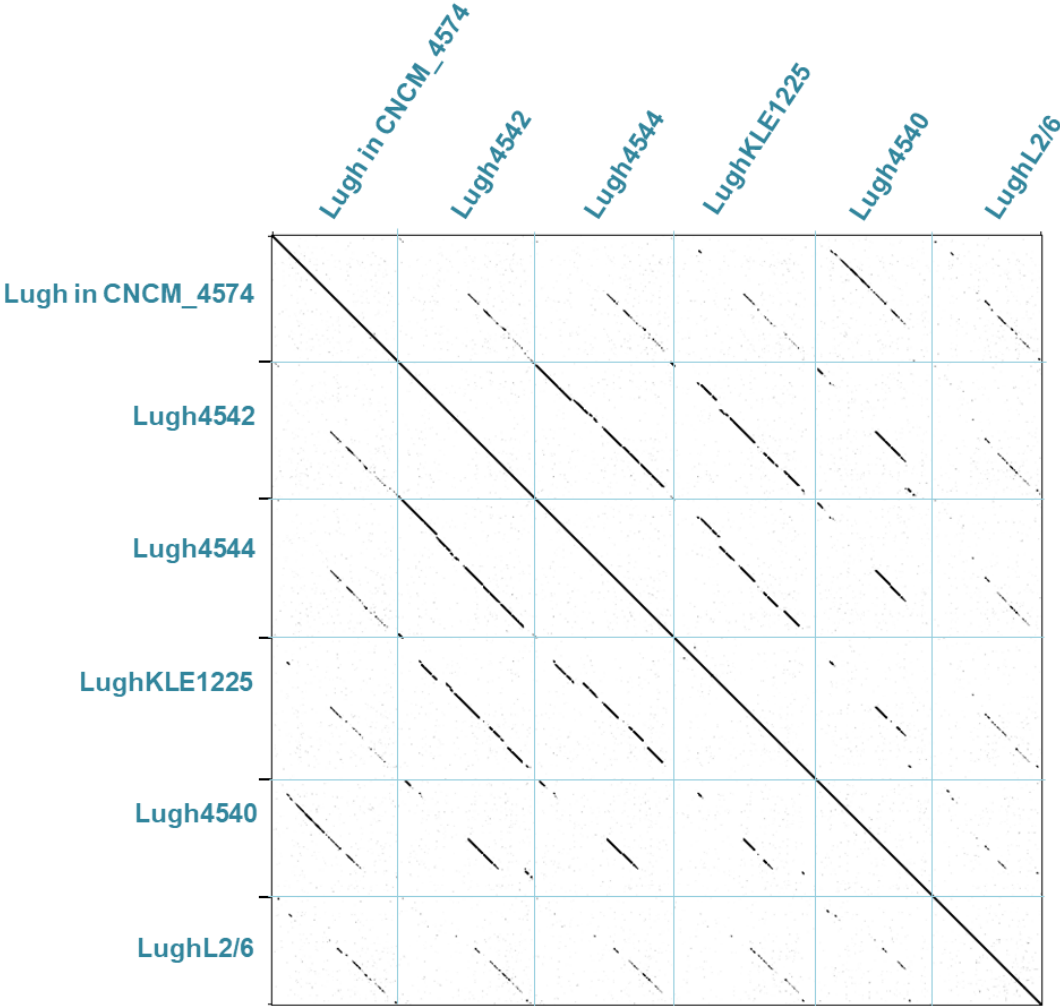
	<b>Control</b>	<b>Vitomycin C 1 µg/mL</b>	<b>Bile salts 0.1%</b>	<b>Bile salts 0.05%</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 µM</b>
<b>Mushu</b>	8.0 x 10 <sup>6</sup> ±2.0 x 10 <sup>6</sup>	8.9 x 10 <sup>6</sup> ±2.3 x 10 <sup>6</sup>	1.0 x 10 <sup>7</sup> ±9 x 10 <sup>6</sup>	2.4 x 10 <sup>6</sup> ±9.3 x 10 <sup>5</sup>	9.4 x 10 <sup>6</sup> ±7.9 x 10 <sup>6</sup>	4.5 x 10 <sup>6</sup> ±1.5 x 10 <sup>6</sup>
<b>Lagaffe</b>	2.9 x 10 <sup>5</sup> ±2.9 x 10 <sup>4</sup>	3.9 x 10 <sup>5</sup> ±4.6 x 10 <sup>4</sup>	5.7.10 <sup>4</sup> ±1.1.10 <sup>4</sup>	1.4 x 10 <sup>5</sup> ±4.2 x 10 <sup>4</sup>	7.2 x 10 <sup>4</sup> ±2.3 x 10 <sup>3</sup>	2.2 x 10 <sup>5</sup> ±2.1 x 10 <sup>4</sup>
<b>Final O.D. at 600nm</b>	1.1±0.1	1.1	0.05	0.55	0.15	1.05



Additional File 8:



Additional File 9:



Additional File 10:

Lien de téléchargement du multi-Fasta [ici](#)

Additional File 11:

Lien de téléchargement du multi-Fasta [ici](#)

Additional File 12:

<b>Primer</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>
FP qPCR F	CGGATCCCAACTGGGTCTAC
FP qPCR R	CGGCAGGCGTTTTTGATCTT
Lagaffe qPCR F	CTGCCGAAACTATGCGAACG
Lagaffe qPCR R	GCGGCGTTTCTTGGACATTT
Mushu qPCR F	AAGTTCCTCATGGGACAGCG
Mushu qPCR R	TTGCCCTTCATCATCCGCTT

## 5. Evolution en souris du prophage Shimadzu de *R. intestinalis* L1-82 vers la virulence

La plus grande partie des résultats obtenus durant mon travail de thèse portent sur l'interaction entre *R. intestinalis* L1-82 et son prophage Shimadzu, car c'est le phage pour lequel on a observé un impact important sur sa souche hôte dans l'environnement intestinal murin.

Comme pour la section précédente, les numéros des figures font référence aux figures du manuscrit décrivant l'ensemble de ces résultats, inséré à la suite de cette partie.

### 5.1 Description des prophages de *R. intestinalis* L1-82

Comme présenté précédemment, *R. intestinalis* L1-82 héberge deux prophages dans son génome. Le prophage Jekyll n'a aucun homologue connu, en revanche, Shimadzu fait partie de la nouvelle sous-famille de phage appelée 'FPlagaffevirus' que nous avons proposée dans l'article précédent (Figure S1a). La concentration de virions pour ces deux prophages a été estimée environ  $5.10^8$  et  $1.10^9$  génome/mL, pour Shimadzu et Jekyll respectivement dans une culture saturée, ce qui fait une quantité impressionnante de virions pour une culture *in vitro* sans induction (Owen et al 2017). Le virion de chaque phage a pu être observé par microscopie électronique (Figure 1b&c). Nous avons testé l'inductibilité par des cassures de l'ADN des deux prophages en ajoutant de la mitomycine C à une culture en phase exponentielle de croissance (Figure S1b). Le profil de la courbe de croissance confirme qu'un des deux phages est inductibles par un signal de cassure de l'ADN. La quantification par qPCR a démontré que c'est le phage Jekyll qui est induit (Figure S1c).

Par la suite, comme pour les phages d'*E. coli* LF82 et de *F. prausnitzii*, nous nous sommes intéressés à l'activité de ces deux prophages dans le tube digestif de souris dixéniques (comme précédemment la souche *E. coli* LF82 est utilisée comme co-localitrice) pendant 33 jours. Le suivi des populations de *R. intestinalis* montre que la bactérie s'établit de manière dominante dans le tube digestif des souris (Figure 2 et S2a&d). De manière surprenante, il est observé systématiquement une chute de population de *R. intestinalis* entre les jours 15 et 25 post-colonisation. L'amplitude de la chute dépend des souris, certaines n'en présentant même pas. Néanmoins, dans une même cage, les chutes de population sont synchrones (Figure 2). Suite à la chute de population, la population de *R. intestinalis* augmente et se stabilise à son niveau initial.

Concernant les phages, la quantité de virions du phage Shimadzu augmente d'un facteur 1000 à 10 000 dans toutes les souris, y compris celles où aucune chute de population de *R. intestinalis* n'est observée et ce de manière synchrone dans chaque cage (Figure 3a). Cette augmentation de population du phage est parfaitement corrélée à la baisse de population de *R. intestinalis* dans les souris,

suggérant que la production phagique se fait aux dépens de l'hôte bactérien (Figure 3b). L'analyse de la dynamique de population révèle que Jekyll est au contraire produit de manière continue et stable dans la souris avec une population aux environs  $5.10^8/g$ , un niveau de population similaire à ce qui est observé *in vitro* (Figure 3a). Afin d'éliminer un éventuel effet d'un gène de virulence d'*E. coli* LF82 sur l'augmentation de population de Shimadzu, les expériences ont été reproduites en utilisant la *E. coli* MG1655. Les résultats des expériences sont les mêmes (Figure S1).

Deux hypothèses peuvent expliquer l'origine de la multiplication de Shimadzu : i) Un signal inducteur est apparu dans l'environnement intestinal ; ii) Une mutation est apparue dans le phage qui lui donne un phénotype virulent, c'est-à-dire que celui-ci n'est plus sensible à l'immunité à la surinfection et peut lyser des bactéries lysogènes. Afin de départager ces différentes hypothèses, et de voir si des mutations étaient présentes dans le génome de Shimadzu au moment du pic de production, l'ADN viral provenant d'un pool de fèces de souris prélevées au jour 21 a été séquencé (cages orange et violette à J21-22), puis analysé pour y rechercher des SNPs. Deux mutations ponctuelles présentes dans plus de 50% des reads ont été détectées. La première est une substitution d'un des derniers acides aminés dans le gène activateur de la lyse. La seconde mutation touche la région intergénique située entre le répresseur et l'activateur du cycle lytique (Figure 4a). Un grand nombre de mutations ont également été observées dans un gène de fibre de queue. Ces mutations correspondent à la région variable associée au système Diversity Generating Retroelements, dit DGR (Figure S3). Trois variants dominants sont observés pour cette région suggérant une sélection positive pour des mutants aux capacités d'infection accrues. L'analyse de la région intergénique a révélé trois séquences répétées, correspondants probablement aux régions opératrices (Figure 4b), suggérant que la mutation observée est dans l'opérateur du module de lysogénie, et pourrait donc être responsable d'un caractère virulent des phages Shimadzu mutés. Cette hypothèse a été confirmée par l'obtention de quelques plages de lyse sur la souche ancestrale de *R. intestinalis* en ajoutant la fraction virale de fèces de souris prélevées à J28. Le séquençage de la région intergénique des phages isolés a révélé qu'ils portaient tous une mutation dans la région opératrice 2 ou 3 (Figure 4c), confirmant le rôle central de ces séquences dans l'immunité à la surinfection et le choix lyse-lysogénie. Le séquençage de la région intergénique des viromes de souris révèle que l'apparition de mutation dans cette région est toujours corrélée à une augmentation de la concentration en virions de Shimadzu (Figure 4d).

L'augmentation de population de *R. intestinalis* après l'effondrement de population est très probablement due à la sélection positive de mutants bactériens résistants à l'infection. Afin de tester cette hypothèse, nous avons isolé un grand nombre de clones bactériens de *R. intestinalis* de fèces de souris à différents jours de l'expérience, et testé leurs résistances à l'infection par le phage virulent Shi-*vir1* isolé *in vitro* (Figure 5a). Cette expérience montre la bien que la population bactérienne devient majoritairement résistante à l'infection par le phage après 21 jours, soit après la période de forte mortalité induite par le phage.



Afin d'appréhender le ou les mécanismes de résistance bactérienne mis en place par *R. intestinalis*, cinq souches *evo*, isolées au jour 19 et 28, ont été séquencées. Toutes comportaient au moins une mutation dans un transporteur de sucre qui pourrait constituer le récepteur de Shimadzu (Tableau 1). Deux indices suggèrent cependant que cette première ligne de défense est débordée par Shimadzu : i) la population de Shimadzu à j21 contenait seulement 25% de séquences wild-type dans la fibre de queue, le reste étant muté dans la région hypervariable de ce gène (avec 3 allèles majoritaires) (Table S3), probablement sélectionnés en réponse à la mutation du récepteur phagique, ii) un des cinq clones *evo* contenait dans le locus CRISPR-Cas II-C un spacer supplémentaire dirigé contre Shimadzu, suggérant la mise en place d'une deuxième ligne de défense.

Un screening de la région CRISPR-Cas II-C sur un plus grand nombre de clones a alors montré que la très grande majorité des bactéries résistantes à Shi-*vir1* présentaient au moins un spacer supplémentaire dans le système CRISPR de type II-C, visant Shimadzu (Figure 5c). Néanmoins la présence d'un spacer contre Shimadzu signifie que la bactérie possède un CRISPR visant son propre génome, ce qui implique un coût de *fitness* très important, le système CRISPR type II-c ayant été décrit comme non permissif à la lysogénie. En fait, un test PCR a révélé que la totalité des clones ayant acquis un spacer contre Shimadzu ne sont plus lysogènes pour ce phage (Figure 5d).

A l'échelle de la population globale, l'estimation de la proportion de la population de *R. intestinalis* ayant perdu le prophage Shimadzu (dite  $\Delta$ shi) par qPCR (Figure 5e) confirme que la majorité des bactéries ne sont plus lysogènes pour le prophage Shimadzu après le pic de multiplication du phage autour du jour 21 de colonisation. La population de  $\Delta$ shi existe dès le début à un faible niveau de population (de l'ordre du pourcent), puis devient progressivement dominante, car ces mutants ont la possibilité d'acquérir des spacers pour résister à l'infection par Shimadzu. Un test PCR d'incorporation de Spacer effectué sur la population globale contenue dans les fèces révèle que l'acquisition des Spacers se fait de façon parallèle à la perte du prophage (Figure 5c).

Pour conclure, nous montrons ici qu'un mutant virulent d'un prophage est fortement sélectionné en souris gnotoxénique, et se multiplie très efficacement dans l'intestin de la souris, au point d'éliminer pratiquement complètement la population de bactéries sensibles à ce phage, créant ainsi une dysbiose temporaire (inversion de la proportion relative *E. coli/R. intestinalis*). Les bactéries résistantes, au début très minoritaires dans la population, étant positivement sélectionnées, celles-ci deviennent très rapidement dominantes après l'apparition du phage virulent : la population est entièrement renouvelée en quelques jours.

Il faut noter cependant qu'il est difficile d'extrapoler cette observation à ce qui se passerait dans une flore intestinale plus complexe, où une plus grande diversité de souches pourrait gêner la multiplication du phage. D'un autre côté, des concurrents pourraient profiter de la baisse de population de *R. intestinalis* pour occuper la niche écologique, et ainsi prolonger la présence de *R. intestinalis* à un niveau bas de population.

Pour conclure, nous avons démontré ici que le phage Shimadzu a un impact majeur sur l'évolution de sa population hôte.

## 5.2 Manuscrit de l'article 3

**Title: Prophages of *Roseburia intestinalis* : the enemy from within.**

**Jeffrey K. Cornuault<sup>1</sup>, Marie-Agnès Petit<sup>1</sup>, Elisabeth Moncaut<sup>1</sup>, Aurélie Mathieu<sup>1</sup>, Valentin Loux<sup>2</sup>, Harry Sokol<sup>1,3,4</sup>, Marianne De Paepe<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France.

<sup>2</sup>MaIAGE, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France.

<sup>3</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, École normale supérieure, CNRS, INSERM, APHP Laboratoire des Biomolécules (LBM), 27 rue de Chaligny, 75012 Paris, France.

<sup>4</sup>Department of Gastroenterology, Saint Antoine Hospital, Assistance Publique –Hopitaux de Paris, UPMC, Paris, France.

### **Abstract**

Despite an overall stability in time of the human gut microbiota at the phylum level, strong temporal variations have been observed in term of species abundance. Environmental factors, like food or antibiotic use, modify the gut microbiota composition, but their overall impacts remain relatively low. Here we studied the variations in species abundance in gnotoxenic mice colonised with *E. coli* LF82 and *Roseburia intestinalis*, a dominant and beneficial member of the human gut microbiota and submitted to a perfectly constant environment.

We observed important variations in time of *R. intestinalis* abundance. We show that these variations are related to the emergence of a virulent mutant of a *R. intestinalis* prophage, that we named Shimadzu. This ex-temperate phage can overcome immunity to superinfection and lyse *R. intestinalis* lysogens, leading to a collapse of its host population. However, *R. intestinalis* population rapidly got back to its initial level, thanks to the acquisition, in a CRISPR-cas system, of new spacers targeting the phage Shimadzu. We show that this acquisition is only possible in bacteria which have loose the prophage before.

We show here that a prophage can rapidly evolve towards virulence in a simplified gut ecosystem, and lyse the large majority of susceptible bacteria, leading to a fast evolution of its host. This demonstrate that a red queen dynamic can occur in the intestine, and that

bacteriophages might play an important role in the temporal variations observed in the human gut microbiota.

## Introduction

The human gut microbiota is one of the most diverse microbial community in the world. In the last decade, its composition has been associated with an important number of human pathologies. Its global composition in term of presence or absence of main bacterial genera is common for 90% of the population (1-3). Abnormal gut microbiota compositions, called dysbioses, are correlated with numerous human diseases (4) (4-7) . Yet the factors explaining gut microbiota composition in health and disease are far from being understood. The combined effect of 69 covariates (food, drug, anthropometric etc) could explain only 16.4% of the variation in microbiota composition on more than 1,000 healthy individuals (Falony 2016). The impact of host genetics seems even lower (ref). In addition, strong variation of the relative abundance of species are observed on short time scale, even in healthy individuals submitted to the same diet (8-12).

Bacteriophages, or phages for short, the viruses that infect bacteria, have been suspected to impact intestinal microbiota composition, but, as yet, there is little proof that they are important determinants of bacterial mortality *in vivo* (13-15). Some studies showed correlations between the increases in specific phages with reductions of particular bacterial taxa (Reyes et al. 2013, Waller et al. 2014), but generally phage killing in the gut environment is limited to a fraction of the susceptible bacteria, and is not sufficient to drive the selection of phage-resistant bacteria (16-18), suggesting that physiology complicates phage multiplication in this environment (19). This hypothesis is comforted by the observation that the phage to bacteria ratio is lower in the gastrointestinal tract than in other environments (20).

The limited killing of bacteria by phages in the gut concerns particularly temperate phages, which, contrary to virulent phages, encode molecular mechanisms enabling them either to reproduce through lytic cycle or to lysogenize the bacteria. Spontaneous production of virions by the lysogenic bacteria can result in the killing of susceptible competitors, providing an advantage to its host. Yet, this advantage is transient and limited by the frequent lysogenization of infected bacteria (24; 21). On several microbial environments, important induction of prophages has been observed, resulting in the death of a significant part of the bacterial population (22; 23). In addition, prophages of strains used in large scale industrial fermentations are potential sources, *via* mutation events, of virulent phages infective for the host strain (24; 25). However, to the best of our knowledge, even though

lysogeny is widespread among intestinal bacteria (26-28), massive killing of bacteria by temperate or ex-temperate phages has never been documented in the gut environment. Only slightly deleterious effects had been attributed with the presence of a prophage (21), may be because of a limited ability of most phages to multiply in this environment. But this can also result from the lack of studies of phage-bacteria interactions with dominant members of the mammal microbiota.

The complexity of the gut microbiota prevents any exhaustive characterization of all the virus-bacteria pairs it hosts through metagenomic studies. In particular, a limitation of this approach for the study of phage-bacteria interactions is the difficulty to predict the bacterial host of the phages detected. Such prediction is mainly based on alignment to reference viral sequences in databases (29), yet, to our knowledge, no phages infecting *lachnospiracea*, the most abundant family of the human gut microbiota (30), have been deposited in public databases. Here we followed the population dynamics of *Roseburia intestinalis* L1-82 and *E. coli* LF82, and their prophages, in gnotoxenic mice. *Roseburia* genus is the major producer of short chain fatty acids in the human gut, including butyrate which have a critical role in the regulation of host immune responses (31). In addition, this genus is depleted in several human diseases (32). *E. coli*, on the contrary, is a sub-dominant member of the human gut microbiota, whose abundance increases in dysbioses associated with several human diseases (33).

We show that a *R. intestinalis* prophage systematically evolves towards virulence in this simplified gut ecosystem, and lyse the large majority of susceptible bacteria, leading to a fast evolution of its host. This demonstrate that a red queen dynamic can occur in the intestine, and that phages might play an important role in the temporal variations observed in the human gut microbiota.

## Material and methods

**Bacterial cultures.** *R. intestinalis* L1-82 (DSM 14610), was grown at 37°C in LYBHI medium (BHI medium (marque) supplemented with 0.5% yeast extract [Difco], cellobiose (0.5 mg/ml [Sigma]), maltose (0.5 mg/ml [Sigma]) and cysteine (0.5 mg/ml [Sigma])) in an anaerobic chamber filled with 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 5% H<sub>2</sub>. *Escherichia coli* LF82, was grown on LB medium (Difco) at 37°C. Plating of *E. coli* was made on LB agar plates (1.5% agar). *R.*

*intestinalis* was plated GHYBHI agar plates (1.5% agar and hemin at x%), supplemented with 2µg/mL of ciprofloxacin to suppress *E. coli* growth when necessary.

**Mitomycin C induction.** Overnight cultures were diluted 50-fold and grown at 37°C until absorbance at 600nm was between 0.3 and 0.6. 135 µL of culture was distributed in a 96-well plate (Cellstar, 96 Well Cell Culture Plate, U-bottom) and 15µL of H<sub>2</sub>O or Mitomycin C (Sigma) was added at the appropriate dilution. Plates were sealed (AMPLIseal™ Greiner Bio-one) in anaerobic condition and incubated at 37°C in a TECAN SUNRISE. Absorbance at 600nm was measured every 15 min for 10 hours.

**Free phage extraction from feces.** Fresh feces or frozen feces thawed on ice for 10 min were diluted 40-fold in cold 1X PBS. Resuspended feces were kept on ice for 5 min with regular agitation prior to centrifugation for 10 min at 5,251 g at 4°C. Supernatants were recovered and filtered through a 0.22 µm filter (PALL Corporation Acrodisc PF syringe filter). For qPCR quantification, virions were precipitated with PEG 8000 (Sigma) at a final concentration of 10% and NaCl (Sigma) at a final concentration of 1M. After overnight incubation at 4°C, phage particles were harvested by centrifugation (5,251 g for 1 hour at 4°C with a swinging rotor). Pellets were resuspended in 100 µL of SM buffer (100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris pH 7.5 (Sigma)).

**Feces DNA extraction.** The DNA of fecal bacteria was extracted according to the following protocol: Bacterial pellets obtained during free phage extraction from feces were resuspended in 500 µL of LB (Difco). The suspension was centrifuged 1 min at 500 g to remove debris. Supernatant was recovered and mixed with 250 µL of lysis buffer (200mM NaCl/20mM EDTA, 5% SDS), 250 µL of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1; [pH 8.0], Sigma Aldrich) and half of a tube of silica beads (100µM MP Bio, Lysing matrix B). Bacteria were lysed using Fast-prep MPBio (5.5, 4\*30s, 5 min of rest between each cycle). Samples were then centrifuged (13,000 g, 3min, 20°C) and the aqueous phase was recovered in a new tube. After addition of 400 µL of chloroform:isoamyl alcohol(24:1), the mix was vortexed vigorously (10s) and centrifuged (13,000 g, 3min, 20°C). DNA was precipitated with 2 volumes of Ethanol and 0.3M of sodium acetate. The pellet, containing DNA and DSS, was resuspended in 100 µL of water and kept at 4°C until further analysis.

**Phages quantification by qPCR.** Samples were treated with 10 U of Turbo DNase (Ambion) for 1 hour at 37°C in Turbo DNase buffer. Samples were then incubated at 95°C for 30 min



in 0.2 ml PCR tubes for enzyme inactivation and phage capsid disruption. qPCR on 100-fold diluted samples was performed using the Takyon ROX SYBR Mastermix blue dTTP kit (Eurogentec) and the StepOnePlus real time PCR system (Applied Biosystem). Phage amounts were determined using specific primer pairs (Table S2). Numbers of copies in standards were calculated using DNA quantification (Qbit ) and the strain genome size. The reaction mix was the following: 7.5 µl Takyon mix, 0.9 µl H<sub>2</sub>O, 0.3 µl of each primer (200 nM final concentration), 6 µl of DNA diluted in H<sub>2</sub>O. The PCR conditions were: (95°C 15s, 58°C 45s, 72°C 30s) 45 cycles, 72°C 5 min, followed by melting curves. Results were analysed using the StepOne Software 2.3. Primers used in this study are listed in Supplementary table 2.

**Animals and experimental design.** Germfree 5-8week-old C3H/HeN mice (female) were obtained from the germfree rodent breeding facilities of Anaxem-Micalis (INRA, Jouy-en-Josas, France). Animals were kept in flexible-film isolators (Getinge-La Calhène, Vendôme, France) in standard cages (3 to 5 mice/cage) with sterile wood shavings as animal bedding. Mice were given free access to autoclaved tap water and to a standard diet, R03-40 (Scientific Animal food and Engineering, Augy, France), sterilized by gamma irradiation at 45 kGy (IBA Mediris, Fleurus, Belgium). Isolators were maintained under controlled conditions of light (0730 to 1930 h), temperature (20 to 22°C), and humidity (45 to 55%). All procedures were carried out according to European Community Rules of Animal Care and with authorization 1234-2015101315238694 from French Veterinary Services.

**Inoculation of germfree mice with *R. intestinalis*.** To obtain gnotobiotic *E. coli*/*R. intestinalis*-diassociated mice, mice were orally inoculated with 100µL of a saturated *E. coli* LF82 culture ( $2.5 \times 10^9$  CFU). 48 hours later, when *E. coli* was established in the GIT,  $10^{10}$  CFU of *R. intestinalis* in 200µL were administered by intragastric gavage of mice pretreated with sodium bicarbonate (0.2 M, 0.1mL by intragastric gavage, 10 min of wait before inoculation of bacteria).

**Isolation of intestinal clones of *R. intestinalis*.** One or two feces were recovered from mice, sealed immediately in screw cap micro tube, transferred to an anaerobic chamber (see bacterial culture) and diluted in 0.5 mL of PBS 1X. 20µL of this bacterial suspension was then drop on GHYBHI plate (brain-heart infusion medium supplemented with 0.5% yeast extract, 1,5% agar , cellobiose (1 mg/ml [Sigma]), maltose (1 mg/ml [Sigma]), cysteine (0.5 mg/ml [Sigma]), Hemin 0,5% and ciprofloxacin at 2 µg/mL) and striated in order to obtain isolated

clones. After 24 to 48h of growth at 37°C, isolated clones were grown 24h at 37°C in liquid medium, frozen with 20% of glycerol and kept at -80°C until analysis.

**Lysis plaque assay.** Faeces filtrate prepared as described above were mixed with 150µL of *R. intestinalis* growth culture at an optical density ( $DO_{600nm}$ ) of 0.2-0.5. An appropriate volume of melted Top BHI agarose (LYBHI supplemented with 0,25% agarose and 0,1% cysteine [Sigma]) at 37°C is added and the final mix is immediately poured on GHYBHI plates. Plate are then incubated overnight at 37°C. All the protocol is performed in an anaerobic chamber, as described before.

**Liquid lysis assay.** Overnight cultures were diluted 50-fold and grown at 37°C until absorbance at 600nm was between 0.1 and 0.2. Culture was then diluted 5-fold and distributed in a 96-well plate (Cellstar, 96 Well Cell Culture Plate, U-bottom) with 5 microlitres of a phage lysate. Plates were sealed (AMPLIseal™ Greiner Bio-one) in anaerobic condition and incubated at 37°C in a TECAN SUNRISE. Absorbance at 600nm was measured every 15 min for 10 hours

**Microscopy numeration.** 10-fold dilutions of freshly passed faeces in PBS were spread on an agarose pad on a microscope slide and imaged at 100x magnification by a microscope (Zeiss Axioskop2Plus; camera: Zeiss axiocam ICc1), in phase contrast. *E. coli* and *R. intestinalis* cells were manually counted (Fig S5). We analysed more than 50 cells on 3 different images for each condition.

**Transmission electronic microscopy (TEM).** For Jekyll virion observation, 100mL of *R. intestinalis* culture supplemented with 1µg/mL of mitomycin C were centrifuged and the supernatant filtered through a 0.2 µm filter. Free phage were precipitated with PEG and NaCl as described above, and the phage pellet was resuspended in 100 µl of MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Virions were purified by ultracentrifugation (20,000g, 2 h, 4 °C) on a 3 layers iodoxanol gradient (concentration of 0, 20% and 45% of iodoxanol), phages are recovered at the interface between the 20% and the 45% layers. Shimadzu virions were extracted from mice faeces resuspended in PBS. After centrifugation 2 min at 10,000g, the supernatant was filtered and then concentrated using an ultrafiltration device Amicon Ultra 2 mL with a cut-off of 100 000 Da (Millipore). For both phages, droplets of phage preparations were directly placed on Formvar carbon-coated grids for 5 min. The grids were stained with 1% uranyl

acetate and then viewed for TEM using a HITACHI HT 7700 (Elexience, France) at 80 kV. Microphotographies were acquired with a charge-coupled device camera AMT.

**Phages sequencing:** Virions were extracted from mouse faeces as described before. For phages from *in vitro* culture, 500 milliliters of L1-82 culture grown overnight in adequate growth medium was centrifuged at 5,200g for 15 min at 4 °C. Supernatant was recovered and centrifuged at 5,200g for 30 min at 4 °C. This step was repeated with 1 h of centrifugation and the sample concentrated with PEG and NaCl as described above. Pellet was resuspended in 2 ml of SM buffer and treated with 0.25 µg of RNase A (Sigma) and Dnase I (Sigma) at 37 °C for 1 h. Phage DNA was extracted using Promega kit Wizard® DNA Clean-up system. Sequencing was performed with the Ion proton sequencing technology (INRA Metagenopolis platform). Alignment of reads was performed using bowtie2 (-N 1 -L 32) and then visualized with Tablet using default parameters (34).

**R. intestinalis L1-82 sequencing and assembly.** Genomic DNA was extracted with a standard Phenol:chloroform protocol preceded by a lysis step with lysozyme and SDS, as previously described (35). Sequencing was realised by the Genotoul GIS, using the PacBio technology. Long reads were quality controlled with NanoPlot v1.8.1 (36). Sequencing produced 202,572 reads of N50 12,694 nucleotides for a total run of 1,214,051,359 bases. This corresponds to a sequencing depth of 270x. Assembly was performed using Canu 1.6 (37) with default parameters except genomeSize=4.5m and pacbio=raw. Two contigs were produced by the assemblers, one corresponding to the chromosome, the other of 21201 nucleotides with a GC% of 0,01%. The second was considered spurious and removed from the analysis. A run of paired-end sequencing of short Illumina reads was conducted to correct the remaining error. Reads were first mapped on the PacBio assembly using BWA (38), then the assembly was corrected using Pilon (39). 290 corrections of the initial assembly were performed, mostly indels correction. A final assembly of 4 493 348 nucleotides was then annotated with Prokka (40). The new version of the genome has been deposited on the NCBI database under access number XXXXXXXXXXXXX

**SNPs detection.** Research of SNPs in Shimadzu's genome was made using reference Shimadzu genome, reads coming from mice viromes sequencing and analysed using the web interface (<https://patricbrc.org>) (41). Mapping was made using BWA-MEM and SNP research with freebayes, default parameters for the PATRIC interface.

## Results

### ***Roseburia intestinalis* L1-82 harbors two active prophages.**

To identify putative active prophages in the L1-82 genome, we isolated putative virions from a supernatant culture, and sequenced the encapsidated DNA. We obtained 2,106,910 and 679,440 reads (of 3 411 936 reads in total), aligning respectively on two regions of the L1-82 genome, which was resequenced and assembled in a single contig for the sake of this work (see methods). These regions correspond to two prophages of 44,972 and 45,625 pb in length, which were named Jekyll and Shimadzu, respectively. Phage genomes were annotated using RAST and Phagonaute, as previously described (42)). All phage functional modules were detected in each prophage region (Fig. 1a), providing further evidence that they correspond to complete phages. Of note, alignment revealed that the left border of the Shimadzu prophage stops before the stop codon of its integrase gene *int*, indicating that the integration site *att* is located within the *int* gene. As a consequence, Shimadzu excision, through site-specific recombination, results in the production of an Integrase with twenty additional amino acids at its C-ter extremity, which might modify the stability of the protein, as described for some mycophages [34]. Another interesting feature is the Diversity Generating Retroelement encoded in Shimadzu, which targets a predicted tail fiber gene (Fig S3a&c). DGRs generate variability in target genes through a reverse transcriptase (RT)-mediated mechanism that introduces nucleotide substitutions at defined locations in specific genes (reviewed in (43)).

Jekyll phage had no significant nucleotide similarity with any viral genome of the NCBI RefSeq genome database on more than 5% of its genome, indicating it corresponds to a new viral clade. Shimadzu, however, presents homology at the nucleotide level, and shares 60% of its proteins, with the *Faecalibacterium prausnitzii* phage Lagaffe (Figure S1a). Taxonomic classification of both phages obtained with Virfam (<http://biodev.cea.fr/virfam>) (44) predicted that Jekyll belong is a *Siphoviridae*, and Shimadzu a *Myoviridae*, as confirmed by virions observation with TEM (Figure 1b and 1c).

Quantification of virion production *in vitro* by quantitative PCR revealed a high activity level of both prophage, with  $3 \cdot 10^8$  and  $8 \cdot 10^8$  virions/mL respectively, for Shimadzu and Jekyll. Jekyll, but not Shimadzu prophage is inducible with mytomicin C (Figure S1c&d)

### ***R. intestinalis* populations exhibit important temporal variations in the mouse GIT**

To characterize prophage activity in the mouse digestive tract, we colonized germfree mice with *E. coli* LF82 and *R. intestinalis* L1-82. Phage and bacterial populations were quantified in faeces for 33 days after initial colonization. The population of *R. intestinalis* become rapidly dominant, reaching  $96 \pm 2.5\%$  of the global bacterial population after 5 days (Fig. 2). However, in most of mice, a significant collapse of *R. intestinalis* population could be observed after 13 to 25 days of colonization (Fig 2 and Fig S2a,c,d.). This observation was intriguing since mice were kept in sterile environments, preventing any contamination by other bacteria or viruses. The population of *E. coli*, on the contrary, remained stable in all mice, hinting at a phenomenon targeting only *R. intestinalis* cells. We thus hypothesized that this mortality could result from the *R. intestinalis* prophages, that would somehow have been reactivated in the mouse gut.

### **An increase in Shimadzu concentration is concomitant with the decrease of *R. intestinalis* concentration**

Between days 5 to 9, the concentration of virions in mouse faeces is comparable to that observed *in vitro*, with  $6.4 \pm 6.8 \times 10^8$  and  $3.6 \pm 6.9 \times 10^8$  genomes/g of faeces for Jekyll and Shimadzu respectively (Fig 3a). Afterward, after 13 to 25 days of colonization depending on cages, Shimadzu virion concentration dramatically increased, reaching a median of  $1.33 \times 10^{12}$  genomes/g of faeces, before decreasing and stabilizing between days 21 and 33 at a concentration of  $4.4 \times 10^{10}$  genomes/g (Fig 3a.). The timing of the Shimadzu virion peak correlates with the time of lowest *R. intestinalis* concentration (Fig 3b.), strongly suggesting that bacterial mortality is due to Shimadzu's multiplication. Jekyll phage population remained stable all along the experiment (Fig 3a.). Similar evolution of *R. intestinalis* and Shimadzu populations were observed in mice colonized with another *E. coli* strain, the laboratory strain *E. coli* MG1655, ruling out potential effects of *E. coli* LF82 virulence genes on Shimadzu activation (Figure S1b).

### **Multiplication of Shimadzu results from mutations in the phage immunity region and in the tail tip gene.**

The sudden multiplication of phage Shimadzu could result from two different phenomena: (i) a mutation in the phage conferring it the ability to overcome the immunity to superinfection, ie, the ability to infect lysogenic cells; or (ii) the appearance in the environment of a signal triggering the induction of Shimadzu prophage. In the first case, one or several mutations should be found in phage genes governing immunity. To decide

between these two hypotheses, we sequenced the genomes of phage isolated from a pool of 8 mice faeces after 21 days of colonization, which corresponds to the time at which the maximum Shimadzu concentration is observed. Only two regions were found to be mutated in more than 50% of total reads (Figure 4a.). The first highly mutated region corresponded to the variable region (VR) of the tail fiber gene targeted with the DGR system encoded by Shimadzu (Table S3. & Fig S3b). Three dominant variants were observed, suggesting positive selection for mutants with improved infection ability.

The second common mutated region was the lysogenic module of the phage. Two mutations were observed in this region in 50% of the reads. The first one was in the intergenic region between a putative repressor and antirepressor genes. This region contains three nearly identical repeats (Fig 4b,c.), which might probably correspond to operator regions. During lysogeny, operator regions are fixed by the repressor, preventing the expression of the genes responsible of the lytic cycle. Mutations in these regions, by diminishing or even abolishing the binding affinity of the repressor, might result in a bypass of immunity to superinfection (45). The second mutation in the immunity region was at the end of the putative repressor gene, which might also modify its ability to maintain lysogeny.

The mutations of the lysogeny module comfort the hypothesis that the phage burst is related to the appearance of virulent mutants in mice. To determine the kinetics of appearance of such mutants, we next sequenced, following PCR amplification, the lysogenic module (containing the repressor, the intergenic region with the 3 operators and the phage activator) in phage supernatants of individual mice faeces at different time points of the experiments. Mutations in the phage putative operators were found only in samples where Shimadzu population was over  $10^9$ /g of faeces (Fig 4d.), definitively associating the burst of Shimadzu phage with the acquisition of mutations in the immunity region.

Finally, the plating of viral supernatants of mouse faeces (day 28) on a lawn of the ancestral L1-82 strain allowed to recover plaques, albeit at low frequency. This poor growth suggests that most evolved Shimadzu phages have lost the capacity to grow on the ancestor strain, at least in the *in vitro* conditions tested, and remains to be investigated further. The immunity region of five such purified phage clones was PCR amplified and sequenced. All five isolates contain one or two mutations in the immunity region (Fig 4c.), confirming the association between mutations in the operator region and the virulent phenotype. These isolated virulent mutants which have been isolated will be thereafter referred to as Shi-*vir*.

Interestingly, the Sanger sequencing chromatogram of the lysogenic module PCR products always revealed a mixed population of sequences at the location of mutations. This suggests that infection by the virulent phages triggers the multiplication of the resident wild-type prophage Shimadzu, in coherence with the detection of mutations in the operator in only 50% of observed reads, the other half corresponding to the ancestral sequence induced by Shi-*vir* infection.

Altogether, these results demonstrate that phage amplification is related to the acquisition of a mutation in the operator region enabling superinfection, leading to the observed collapse of *R. intestinalis* population.

### **Virulent phages drive the selection of resistant bacteria in the mouse gut**

Despite the systematic and very important multiplication of Shi-*vir* in the mouse intestine, in some mice the bacterial population was barely affected, and in all mice, the *R. intestinalis* concentration increased during the last days of the experiment, reaching its initial level. These observations hint at the rapid emergence of bacteria resistant to Shi-*vir* infection in mice.

To investigate this phenomenon, several clones of *R. intestinalis* were isolated at days 16, 19, 25, 28 and 33 in each mouse from two different cages in which *R. intestinalis* populations had collapsed and were grown in the presence or absence of Shi-*vir1*. The proportion of clones resistant to Shi-*vir1* is null at day 16, close to 50% at day 19 and close to 100% after day 25 (Fig 5a). These results demonstrate that *R. intestinalis* mutants resistant to Shi-*vir1* infection rapidly invade the population upon appearance of virulent Shimadzu phages.

To characterize further *R. intestinalis* evolution towards resistance to Shi-*vir*, five evolved strains (*evo1* to *evo5*) isolated at day 19 (*evo1*) or day 28 (remaining 4 clones) were completely sequenced. The *msmE* gene was mutated in all *evo* clones, with five different alleles found, and no other mutation was common to all clones (Table 1). The *Streptococcus mutans* ortholog of *msmE* codes for lipoprotein involved in sugar transport. It is tempting to speculate that MsmE constitutes the Shimadzu receptor, and confirmation of this hypothesis awaits the isolation of a Shi-*vir* mutant with a wild-type tail fiber gene, unsuccessful until now.

Two clues suggest however that this (putative) first line of defense was bypassed by Shimadzu: i) only 25% of the Shimadzu population contained the wild-type tail fiber gene at

day 21 (Table 1), suggesting co-evolution in response to receptor mutations, and ii) one of the five *evo* clones also contained a new spacer at the CRISPR-Cas II-C locus, directed against Shimadzu, suggesting the building up of a second line of defense by *R. intestinalis*. Finally, four of the five *evo* clones were deleted for Shimadzu, as further analysed below.

To estimate the extent and kinetics of spacer acquisition at the CRISPR-Cas II-C locus, *R. intestinalis* clones isolated from mouse faeces were tested by PCR amplification of the proximal portion in the CRISPR IIC locus (Figure 5b). Results revealed a clear pattern of spacer acquisition: almost all totally resistant clones have incorporated at least one spacer in their type CRISPR-cas, whereas none of the susceptible had. Sequencing of newly acquired spacers showed that they were all homologous to Shimadzu genome, definitely confirming infection of *R. intestinalis* by Shi-*vir* in the mouse gut. In addition, sequencing revealed that different spacer sequences were sometimes detected in the same mouse, revealing several independent acquisition events. Interestingly, spacer sequences were all targeting the same phage region, close to its replication origin, as previously observed with P1 phage (49). PCR on total bacterial DNA from mouse faeces clearly revealed that the proportion of bacteria having incorporated an additional spacer increased with time (Fig. 5C). After 33 days of colonisation, we can even observe in some mice that a substantial proportion of bacteria possess two additional spacers, suggesting that escape mutants arised in the phage population, driving the selection of bacteria with a second spacer. This is in agreement with the observation that the Shimadzu population remained high in most mice between 28 and 33 days of colonisation.

### **Anti-Shimadzu spacer acquisition is associated with the loss of Shimadzu prophage**

In a CRISPR-cas type III system, acquisition of a spacer targeting an integrated prophage is strongly counter-selected because of the cost associated with the regular cut of the bacterial genome (50). It's then surprising that acquisition of spacer homologous to Shimadzu could have been selected in the bacterial population. A possible explanation was that spacer acquisition occurred in bacteria that had lost Shimadzu prophage.

To test this hypothesis, the presence or the absence of Shimadzu was searched by PCR amplifying either attB – the site formed by prophage excision - or attP sites. This revealed that Shimadzu prophage is absent from all clones which had incorporated a spacer against it. To ensure that the phage has not just been reintegrated in another location of the bacterial genome or stay in a plasmid-like form, as described for P22 phage, the presence



of Shimadzu virions in the supernatant culture of 10 clones was tested (51). No phage DNA could be detected in culture supernatant (Figure S5). In addition, 5 clones were entirely sequenced, and no sequences homologous to Shimadzu were found.

We next precisely quantified by qPCR the proportion of bacteria cured of the Shimadzu prophage, named  $\Delta$ Shi, in mice faeces (Fig. 5e).  $\Delta$ Shi population remained close to  $10^{-3}$  for the first two weeks of colonization, and then rapidly increased. qPCR results were confirmed by PCR test on 200 individual clones at days 13-16, and 25 clones at day 28 and 33. This fast increase in proportion coincides with the time of Shi-*vir* multiplication, most probably because anti-shimadzu spacer acquisition could occur in the population of  $\Delta$ Shi bacteria. Of note, the three  $\Delta$ Shi bacteria that could be isolated before the burst of phage multiplication do not possess an anti-shimadzu spacer, suggesting that prophage deletion preceded spacer acquisition.

### **Presence of Jekyll and Shimadzu on human gut viromes**

Because *Roseburia* is a major bacterial genus on the human gut microbiota, presence of Shimadzu and Jekyll have been tested in human gut viromes from previous studies (13; 52). Jekyll and Shimadzu have been significantly detected in 27.4% and 21.4% of viromes respectively. The average read frequency per sample is 0.09% for Jekyll and 0.002% for Shimadzu. Higher quantities were sometimes detected, with a sample where Shimadzu represents 1.95% of reads, and another one where Jekyll represented 2.7% (Table S1). Contrary to what had been observed for some *F. prausnitzii* phages (42), the viromes of MICI patients and healthy subjects had no significantly different distributions for these two phages. Jekyll and Shimadzu appear to be encountered in a quarter of human gut viromes generally at low abundance.

## **Discussion**

A concept of “genetic time bomb” emerges from this study, in the sense that lysogenic bacteria live under threat that one their prophages mutate and become virulent.

Bacteria of the human core microbiota harbour a wealth of prophages (26; 28). Here we describe two temperate phages infecting *R. intestinalis*, Jekyll and Shimadzu. These are the first two phages infecting a member of the Lachnospiracea family to be described. Jekyll has no homologue in public databases, meaning that it belongs to a new phage genus. Shimadzu

is a member of the recently proposed 'FPlagaffevirus' genus (42). These prophages exhibit strong activity *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* their populations in culture supernatants is almost as high as phage BTP1 of *Salmonella typhimurium*, which is to date the most abundant phage in growth culture ever described (53). Jekyll and Shimadzu could be found respectively in 27.4% and 21.4% of human fecal samples from Norman *et al.* study (52), indicating they represent quite prevalent phages in the human gut.

The Shimadzu genome presents several interesting features. First, Shimadzu excision results in the production of an integrase with twenty additional amino acids at its C-ter extremity, which could be a signal for degradation for bacterial proteases, as described for some mycophages [34]. Shimadzu lysis-lysogeny might function in the same way: only integration enables to produce a stable form of the integrase protein. Of note, Shimadzu's genome encodes at least four DNA methyltransferases. Such enzymes can be involved in transcriptional regulation, or can be a way to expand the host range of the phage [35]. Furthermore, the presence of a DGR system in the phage Shimadzu increase phage possibilities to expand its host range.

By using a simplified model of gut microbiota, we have followed the coevolution of *R. intestinalis* and its two prophages in the gut for 33 days. We have shown that acquisition of few mutations in Shimadzu result in a transient dysbiosis by killing most of *Roseburia* bacteria. This observation that a prophage, by mutating, could be responsible of a collapse of its host population had been observed regularly in the dairy industry (24; 25; 54; 55), but remains rarely documented in natural environment (56), and, to our knowledge, barely considered when referring to lysogeny in host-associated microbiota.

The SNPs which are responsible for the lifestyle switch of Shimadzu seems to be involved in the regulation of concentration of repressor and antirepressor in the cell. Phenotypic switch of lifestyle for prophages has already been modelled (45). Phenotype change induced by a SNP in Shimadzu was enough to obtain a virulent mutant of the phage. Even if the gut microbiota appears to remain stable over years (57), bacterial population could fluctuate strongly on a short time scale. Most studies have time points several weeks apart (58). Here we have observed a rapid population variation which would have not been seen without a narrow window for measurements.

In the present study, the initial population of sensible bacteria has been replaced by bacteria resistant to Shi-*vir* infection. This observation differs from what has already been observed in experiments with virulent phage infections in the gut microflora of gnotobiotic mice (16-18; 59). In such experiments, despite evidence of phage replication and lysis of bacteria, most or all bacteria recovered in faeces remain sensible to phage infection. It is generally proposed that the complex structure of a mature GIT where bacterial population are not well mixed, as modelled (60; 61), prevents efficient phage-host encounters. Phage may lose their ability to drive rapidly the evolution of their host in this environment because of accessibility problems to the host. Nonetheless they remain major shaping force for the evolution of their host (62; 63). Why was Shimadzu able to drive the selection of resistant bacteria, whereas phages from other studies could not? We can hypothesise that the presence of DGR in Shimadzu's genome enhances its ability to infect in this environment.

Temperate phage mutants turning virulent (or ex-temperate) should be a rare event, as observed with model phages (64; 65). Nonetheless even if mutation frequency is low, the high density of bacteria in the human gut microbiota will make these events more frequent. Indeed, dominant bacteria of the human gut microbiota, represent between 0.1 and 10% of the total bacterial population and will reach a global population around  $10^9$ - $10^{11}$  bacteria of the same species in the GIT. For an average mutation rate of  $2 \times 10^{-10}$  mutation/pb/replication (66), it appears that such mutants should always be present in the human gut microbiota. Therefore, in all viromes temperate phages and their counterpart virulent mutants should co-occur. The lack of evidence for the presence of such mutants, until now, raises the question of the advantage for the virulent lifestyle in the gut environment.

Interestingly, *Roseburia* could resist to Shimadzu, only because a non-negligible part of its population was already cured from the prophage, probably thanks to its high excision rate. Prophages usually encode addiction systems, as toxin-antitoxin like in Jekyll or P1 (67), which may strongly reduce the frequency of bacteria being cured from the prophage.

Here we propose a new evolutionary model for phage-bacteria interaction in the gut (15) called the "genetic time bomb". The model predicts that every active prophage of the gut microbiota will generate a virulent mutant, and depending on the frequency of this mutation event, may lyse the majority of lysogenic hosts, until the arrival of resistant bacterial clones

as proposed in the red queen dynamic. This phenomenon will create transient dysbioses for specific bacterial species. In our set-up, where bacteria are not in competition with additional species for the ecological niche, *R. intestinalis* came back to initial population level. In a more complex microbiota, *R. intestinalis* may not be able to reach again high levels. Because of the importance of *Roseburia* in the balance of the human gut microbiota, due to butyrate production, the population drop could be enough to create a long-term dysbiosis

It is interesting to note that we did not observe emergence of Jekyll virulent mutants. The two prophages do not possess the same lysogenic module, however. For Lambda phage for instance, the emergence of a virulent mutant needs two mutations, reducing the probability of emergence of a virulent phage. The high frequency of emergence of *vir* prophage mutants could be a factor of instability for their host bacteria in the gut microbiota. To conclude, prophages like Shimadzu appear to be essentially negative factors for the survival of their host in the gut on the long term. Environment or genetic events could trigger the induction of virulent derivative of such prophages and lead them to lyse of their host for the benefits of the phage.

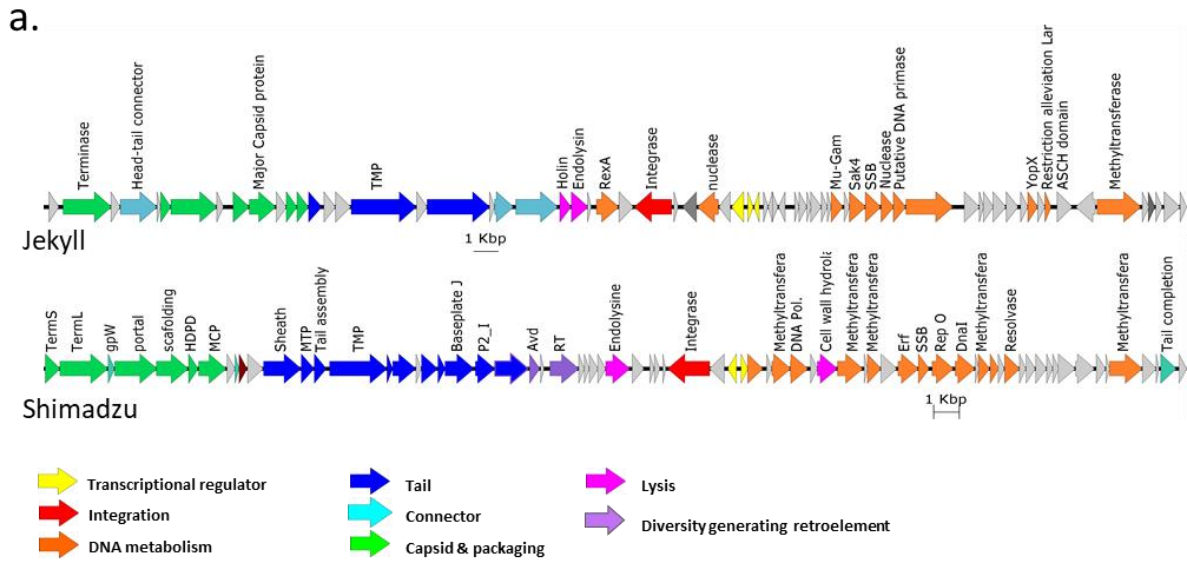
## References

1. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473:174-80
2. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464:59-65
3. Consortium THMP. 2013. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486:207-14
4. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9:577-89
5. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GD, Hirschfield GM, et al. 2016. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 65:330-9
6. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, et al. 2010. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 5:e9085
7. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, et al. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15718-23
8. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, et al. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1:4578-85
9. Thaiss CA, Zeevi D, Levy M, Zilberman-Schapira G, Suez J, et al. 2014. Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell* 159:514-29
10. Flores GE, Caporaso JG, Henley JB, Rideout JR, Domogala D, et al. 2014. Temporal variability is a personalized feature of the human microbiome. *Genome Biol* 15:531
11. Sarker SA, Berger B, Deng Y, Kieser S, Foata F, et al. 2017. Oral application of Escherichia coli bacteriophage: safety tests in healthy and diarrheal children from Bangladesh. *Environ Microbiol* 19:237-50
12. Voigt AY, Costea PI, Kultima JR, Li SS, Zeller G, et al. 2015. Temporal and technical variability of human gut metagenomes. *Genome Biol* 16:73
13. Manrique P, Dills M, Young MJ. 2017. The Human Gut Phage Community and Its Implications for Health and Disease. *Viruses* 9
14. Mills S, Shanahan F, Stanton C, Hill C, Coffey A, Ross RP. 2013. Movers and shakers: influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota. *Gut Microbes* 4:4-16
15. De Paepe M, Leclerc M, Tinsley CR, Petit MA. 2014. Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Front Cell Infect Microbiol* 4:39
16. Reyes A, Wu M, McNulty NP, Rohwer FL, Gordon JI. 2013. Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:20236-41
17. Waller AS, Yamada T, Kristensen DM, Kultima JR, Sunagawa S, et al. 2014. Classification and quantification of bacteriophage taxa in human gut metagenomes. *ISME J* 8:1391-402
18. Maura D, Galtier M, Le Bouguenec C, Debarbieux L. 2012. Virulent bacteriophages can target O104:H4 enteroaggregative Escherichia coli in the mouse intestine. *Antimicrob Agents Chemother*
19. Brussow H. 2013. Bacteriophage-host interaction: from splendid isolation into a messy reality. *Curr Opin Microbiol* 16:500-6
20. Silveira CB, Rohwer FL. 2016. Piggyback-the-Winner in host-associated microbial communities. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2:16010
21. De Paepe M, Tournier L, Moncaut E, Son O, Langella P, Petit MA. 2016. Carriage of lambda Latent Virus Is Costly for Its Bacterial Host due to Frequent Reactivation in Monoxenic Mouse Intestine. *PLoS Genet* 12:e1005861
22. Brum JR, Hurwitz BL, Schofield O, Ducklow HW, Sullivan MB. 2016. Seasonal time bombs: dominant temperate viruses affect Southern Ocean microbial dynamics. *ISME J* 10:437-49

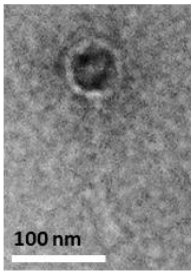
23. Selva L, Viana D, Regev-Yochay G, Trzcinski K, Corpa JM, et al. 2009. Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1234-8
24. Shimizu-Kadota M, Kiwaki M, Sawaki S, Shirasawa Y, Shibahara-Sone H, Sako T. 2000. Insertion of bacteriophage phiFSW into the chromosome of *Lactobacillus casei* strain Shirota (S-1): characterization of the attachment sites and the integrase gene. *Gene* 249:127-34
25. Durmaz E, Miller MJ, Azcarate-Peril MA, Toon SP, Klaenhammer TR. 2008. Genome sequence and characteristics of Lrm1, a prophage from industrial *Lactobacillus rhamnosus* strain M1. *Appl Environ Microbiol* 74:4601-9
26. Touchon M, Bernheim A, Rocha EP. 2016. Genetic and life-history traits associated with the distribution of prophages in bacteria. *ISME J* 10:2744-54
27. Bobay LM, Touchon M, Rocha EP. 2014. Pervasive domestication of defective prophages by bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:12127-32
28. Kim MS, Bae JW. 2018. Lysogeny is prevalent and widely distributed in the murine gut microbiota. *ISME J* 12:1127-41
29. Ren J, Ahlgren NA, Lu YY, Fuhrman JA, Sun F. 2017. VirFinder: a novel k-mer based tool for identifying viral sequences from assembled metagenomic data. *Microbiome* 5:69
30. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, et al. 2016. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* 352:560-4
31. Rios-Covian D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilan CG, Salazar N. 2016. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol* 7:185
32. Tamanai-Shacoori Z, Smida I, Bousarghin L, Loreal O, Meuric V, et al. 2017. Roseburia spp.: a marker of health? *Future Microbiol* 12:157-70
33. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, et al. 2010. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 139:1844-54 e1
34. Milne I, Stephen G, Bayer M, Cock PJ, Pritchard L, et al. 2013. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Brief Bioinform* 14:193-202
35. Fouet A, Sonenshein AL. 1990. A target for carbon source-dependent negative regulation of the citB promoter of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 172:835-44
36. De Coster W, D'Hert S, Schultz DT, Cruts M, Van Broeckhoven C. 2018. NanoPack: visualizing and processing long read sequencing data. *Bioinformatics*
37. Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM. 2017. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Res* 27:722-36
38. Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754-60
39. Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, et al. 2014. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One* 9:e112963
40. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068-9
41. Wattam AR, Davis JJ, Assaf R, Boisvert S, Brettin T, et al. 2017. Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res* 45:D535-D42
42. Cornuault JK, Petit MA, Mariadassou M, Benevides L, Moncaut E, et al. 2018. Phages infecting *Faecalibacterium prausnitzii* belong to novel viral genera that help to decipher intestinal viromes. *Microbiome* 6:65
43. Guo H, Arambula D, Ghosh P, Miller JF. 2014. Diversity-generating Retroelements in Phage and Bacterial Genomes. *Microbiol Spectr* 2
44. Lopes A, Tavares P, Petit MA, Guerois R, Zinn-Justin S. 2014. Automated classification of tailed bacteriophages according to their neck organization. *BMC Genomics* 15:1027
45. Berngruber TW, Weissing FJ, Gandon S. 2010. Inhibition of superinfection and the evolution of viral latency. *J Virol* 84:10200-8

46. van Houte S, Buckling A, Westra ER. 2016. Evolutionary Ecology of Prokaryotic Immune Mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:745-63
47. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, et al. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709-12
48. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, et al. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 13:722-36
49. Yang CD, Chen YH, Huang HY, Huang HD, Tseng CP. 2014. CRP represses the CRISPR/Cas system in *Escherichia coli*: evidence that endogenous CRISPR spacers impede phage P1 replication. *Mol Microbiol* 92:1072-91
50. Edgar R, Qimron U. 2010. The *Escherichia coli* CRISPR system protects from lambda lysogenization, lysogens, and prophage induction. *J Bacteriol* 192:6291-4
51. Cenens W, Makumi A, Govers SK, 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
52. Norman JM, Handley SA, Baldridge MT, Droit L, Liu CY, et al. 2015. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 160:447-60
53. Owen SV, Wenner N, Canals R, Makumi A, Hammarlof DL, et al. 2017. Characterization of the Prophage Repertoire of African *Salmonella Typhimurium* ST313 Reveals High Levels of Spontaneous Induction of Novel Phage BTP1. *Front Microbiol* 8:235
54. Mercanti DJ, Carminati D, Reinheimer JA, Quiberoni A. 2011. Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *Int J Food Microbiol* 144:503-10
55. Maria L. Capra DJM, Jorge A. Reinheimer, Andrea L. Quiberoni. 2010. Characterisation of three temperate phages released from the same *Lactobacillus paracasei* commercial strain *International Journal of Dairy Technology* 63:396-405
56. Koch AL. 2007. Evolution of temperate pathogens: the bacteriophage/bacteria paradigm. *Virology* 4:121
57. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90:859-904
58. Brussow H. 2016. How stable is the human gut microbiota? And why this question matters. *Environ Microbiol* 18:2779-83
59. Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, Brussow H. 2004. In vitro and in vivo bacteriolytic activities of *Escherichia coli* phages: implications for phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2558-69
60. Berngruber TW, Lion S, Gandon S. 2015. Spatial structure, transmission modes and the evolution of viral exploitation strategies. *PLoS Pathog* 11:e1004810
61. Maslov S, Sneppen K. 2015. Well-temperate phage: optimal bet-hedging against local environmental collapses. *Sci Rep* 5:10523
62. Williams HT. 2013. Phage-induced diversification improves host evolvability. *BMC Evol Biol* 13:17
63. Nadeem A, Wahl LM. 2017. Prophage as a genetic reservoir: Promoting diversity and driving innovation in the host community. *Evolution* 71:2080-9
64. Heinrich J, Velleman M, Schuster H. 1995. The tripartite immunity system of phages P1 and P7. *FEMS Microbiol Rev* 17:121-6
65. Bailone A, Devoret R. 1978. Isolation of ultravirulent mutants of phage lambda. *Virology* 84:547-50
66. Drake JW. 1969. Comparative rates of spontaneous mutation. *Nature* 221:1132
67. Lehnher H, Maguin E, Jafri S, Yarmolinsky MB. 1993. Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: doc, which causes cell death on curing of prophage, and phd, which prevents host death when prophage is retained. *J Mol Biol* 233:414-28

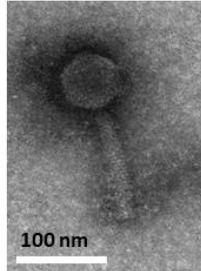
**Figure 1:** *Roseburia intestinalis* L1-82 phages. a) Genomes of Jekyll and Shimadzu. Genes annotation was made using RAST and Phagonaut. b) Transmission electron microscopy image of Jekyll virion. c) Transmission electron microscopy image of Shimadzu virion.



b.

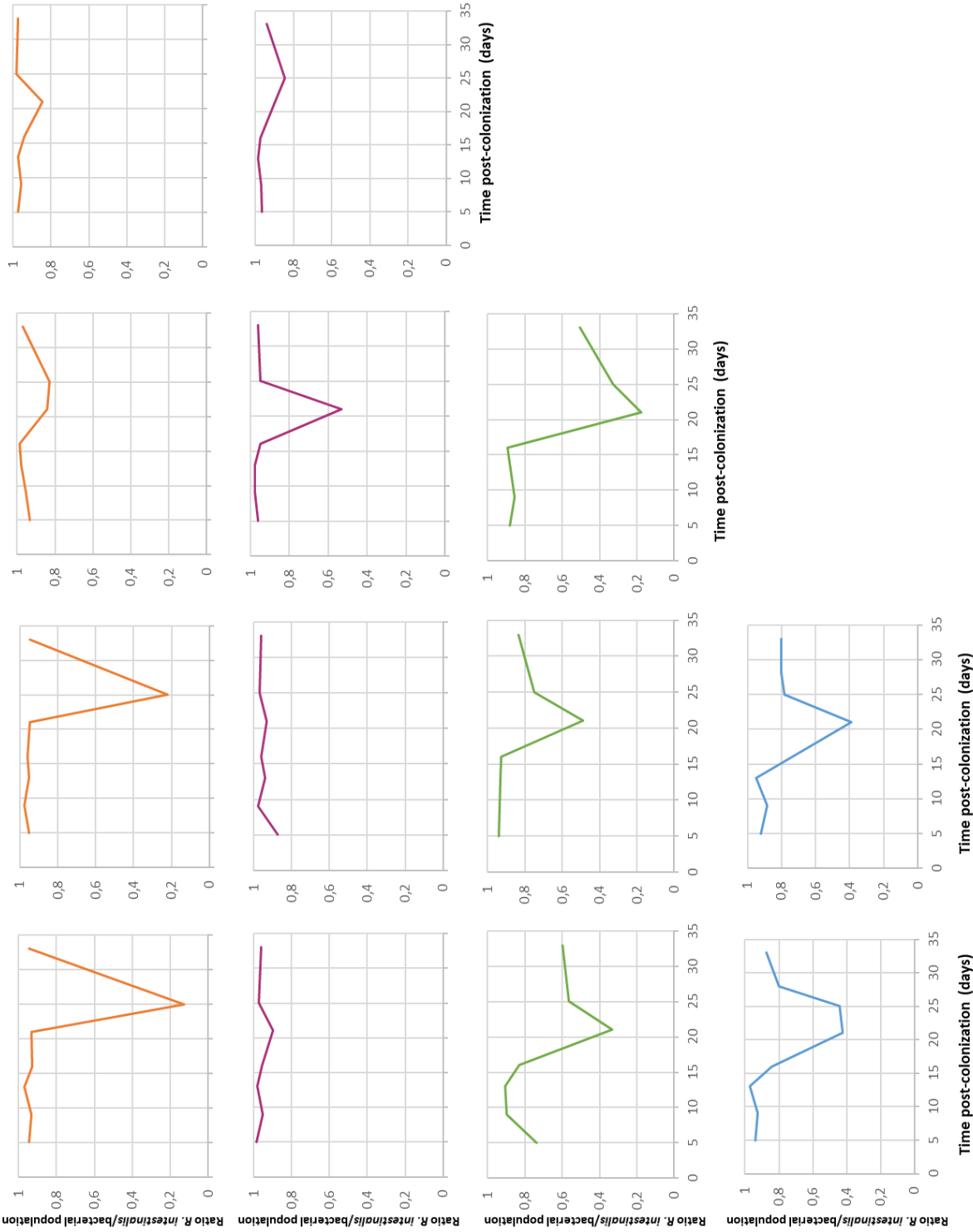


c.

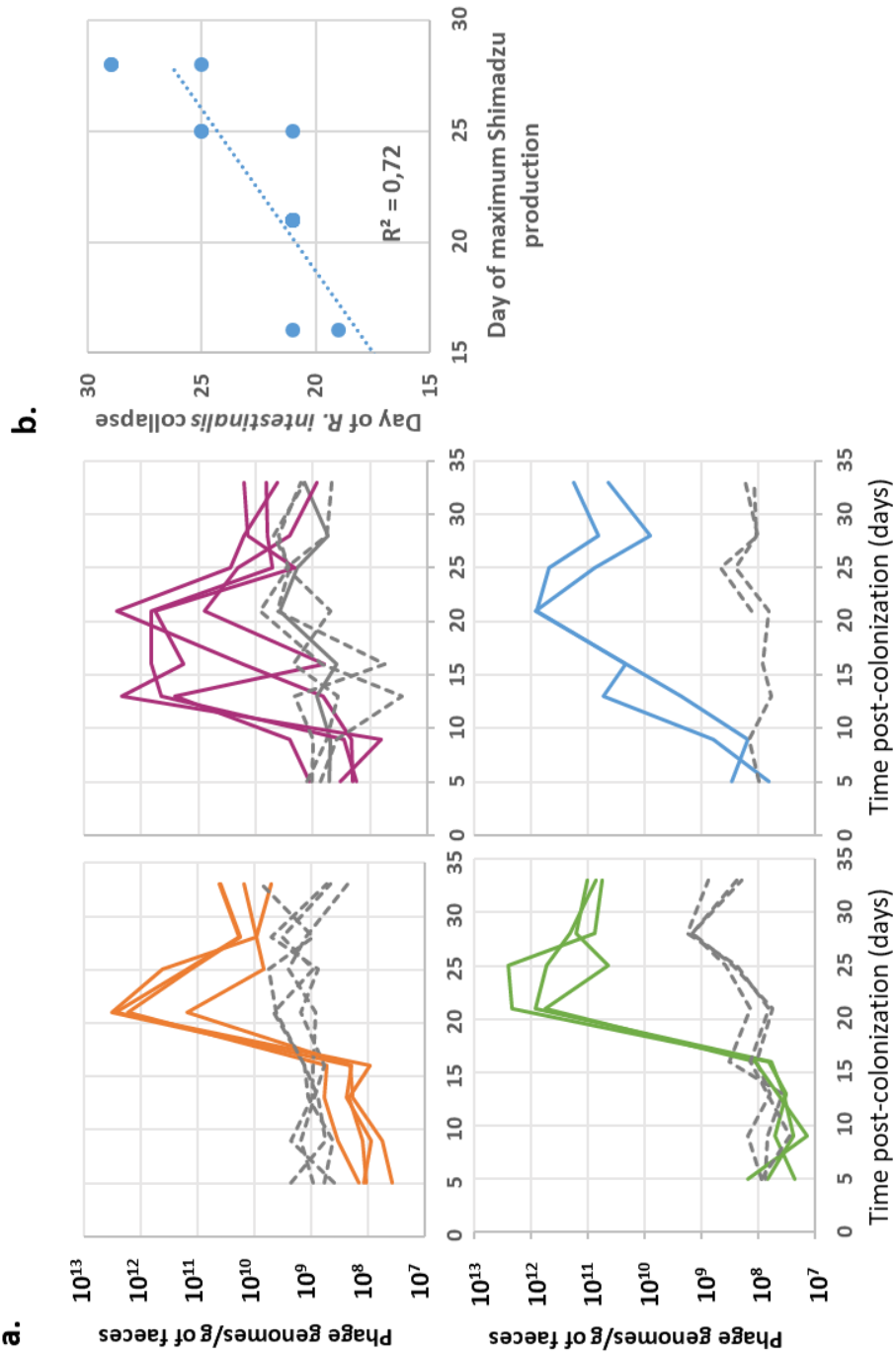




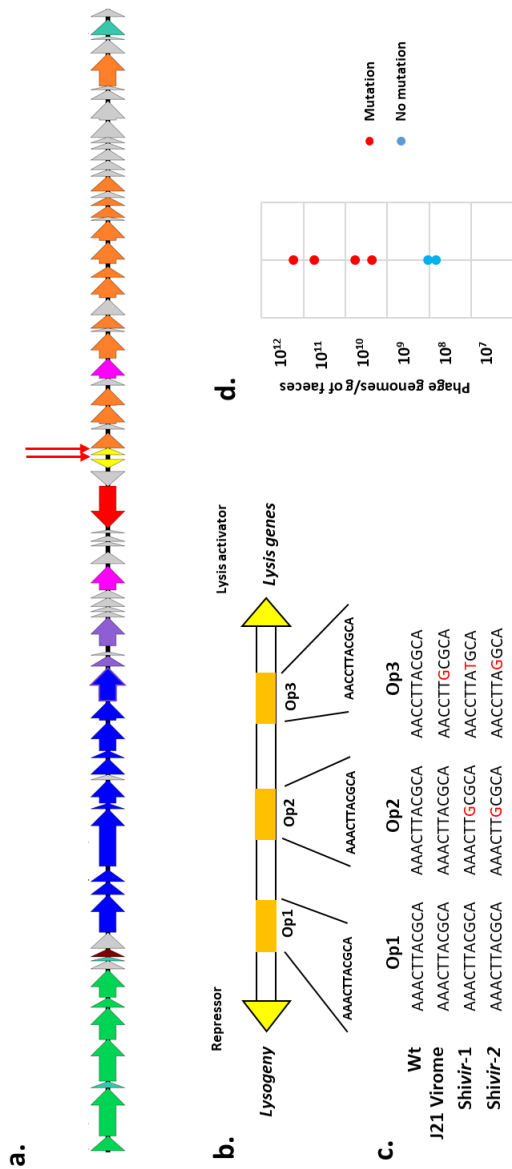
**Figure 2:** Evolution of population of *Roseburia intestinalis* L1-82, measured in gnotobiotic mice faeces. Each panel represent a different mouse, each group color represents mice living in the same cage.



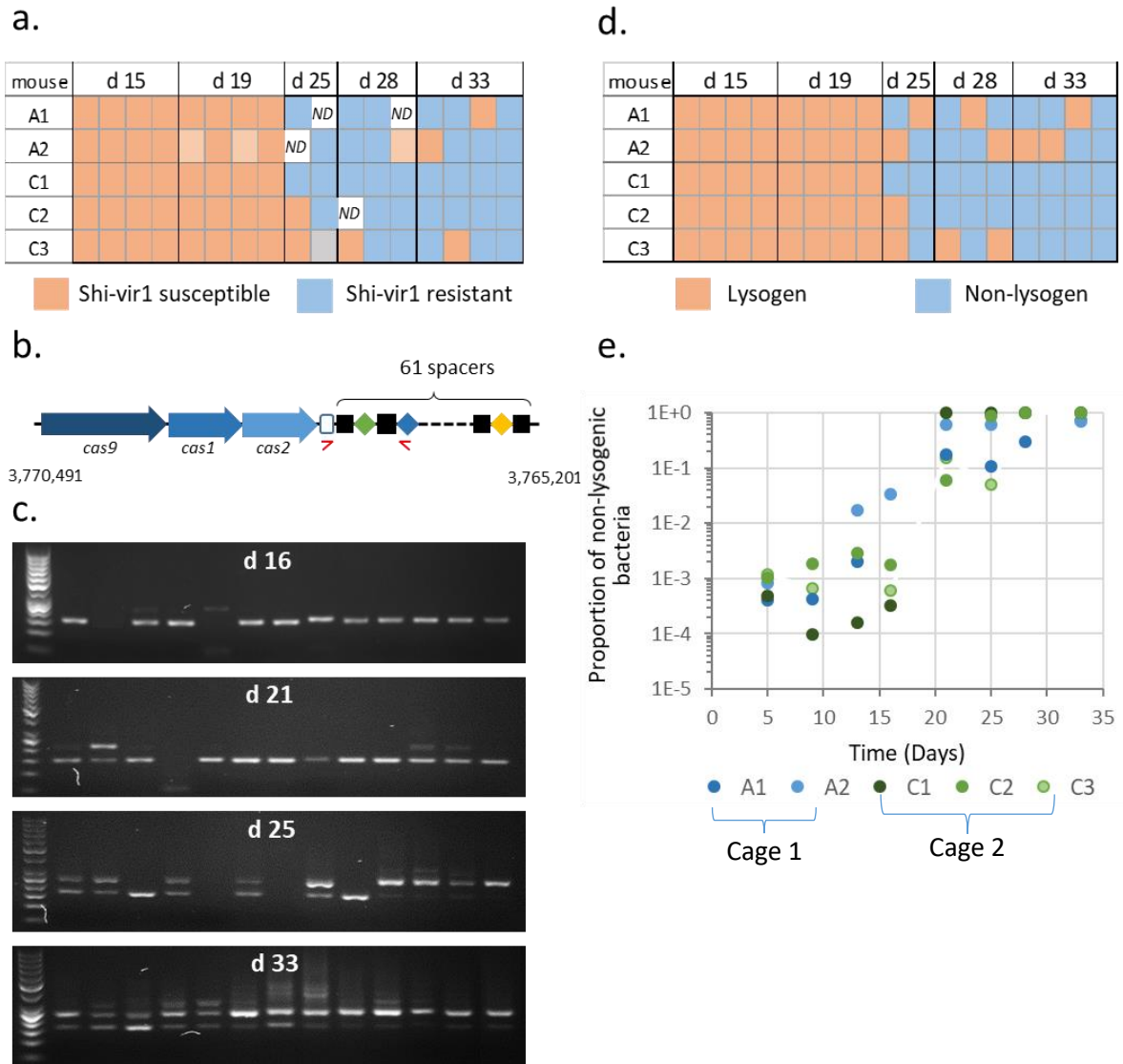
**Figure 3:** Production of Shimadzu is correlated with collapse in *R. intestinalis* population. a) Evolution of *R. intestinalis* L1-82 prophages population in gnotobiotic mice faeces. Each panel represent co-housing mice. Dashed lines represent the population of Jekyll and colored lines represent the population of Shimadzu. b) Correlation between the pic of Shimadzu production and the day of *R. intestinalis* collapsed.



**Figure 4:** Mutations in the lysogenic region of Shimadzu are responsible for its virulent phenotype. a) representation of genes impacted by mutation detected in phages extracted from mice faeces at the maximum of virions production, red arrows design location of mutations. b) genetic organization of the intergenic region between repressor and anti-repressor genes of Shimadzu. Red letters indicate mutations. c) Set of mutations found in different isolated phages or viromes, associated with a virulent phenotype. d) Shimadzu virion population in mice faeces according to the presence or not of mutation(s) in the intergenic region.



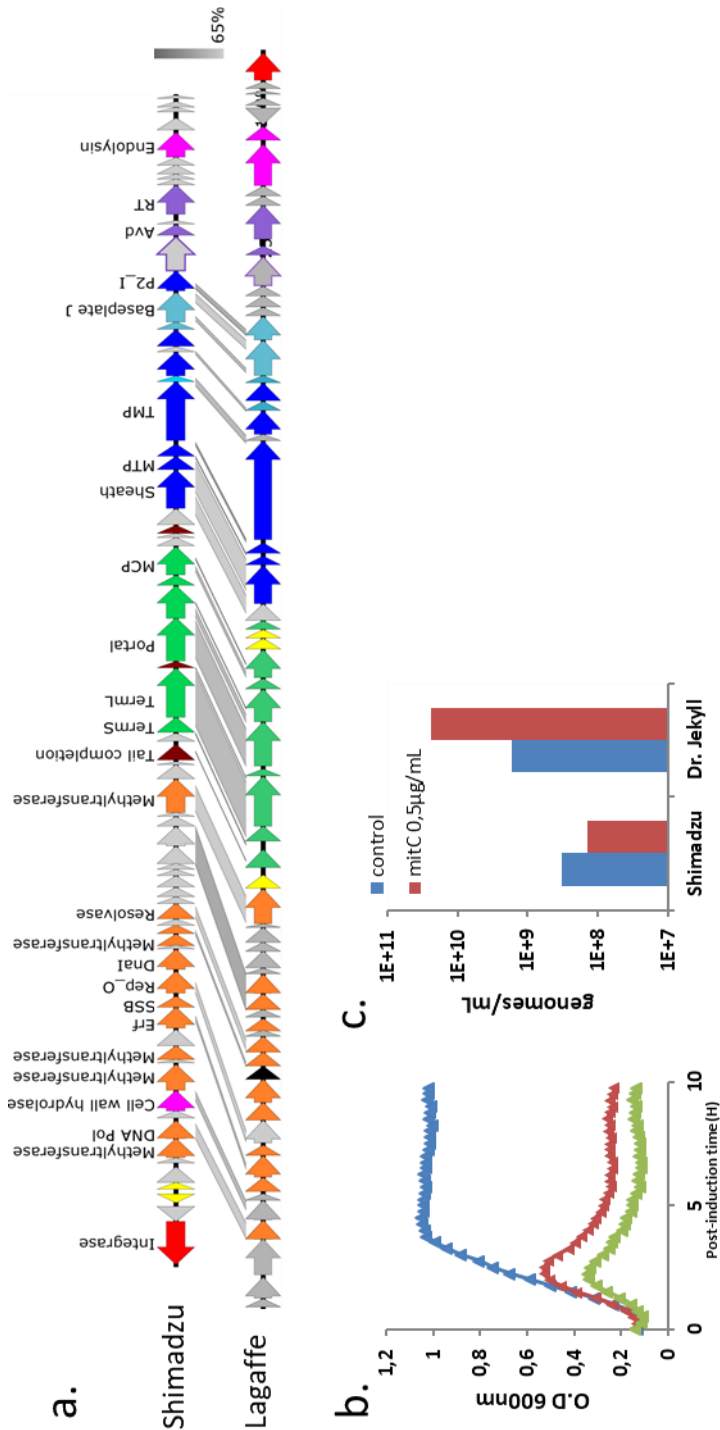
**Figure 5:** Phage killing is selecting resistant bacteria, mostly by *via* spacer acquisitions. a) Resistance of *R. intestinalis* isolates to lysis by *Shivir*. b) Genetic organization of the CRISPR type II system of *R. intestinalis*. Red arrows represent the position of the primers used for the detection of spacer incorporation. c) Visualization of spacer acquisition in the global *R. intestinalis* population. d) Lysogenic status of the *R. intestinalis* isolates tested for their resistance to *Shi-vir* infection. e) Evolution with time of the proportion of *R. intestinalis* cells cured from Shimadzu prophage in mice. Each color represents a different mouse.



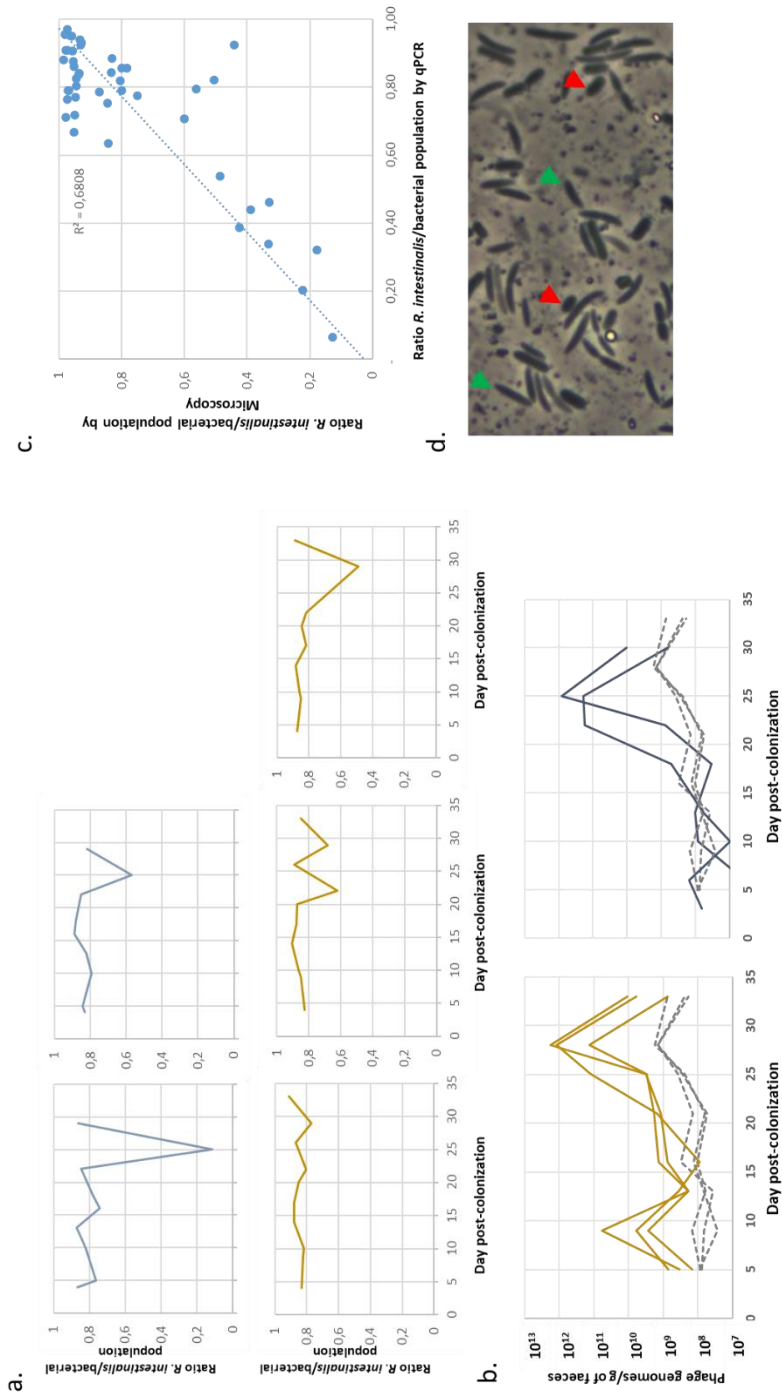
**Table 1:** List of common mutation found after sequencing the whole genome of the five *evo* isolates. Lysogenic state or incorporation of new spacer is also indicated.

	msmE mutation(s)	Additional mutations present in at least two clones	Lysogeny for Shimadzu	presence of new spacer
<i>evo 1</i>	R173C, Q347R, I351T, Y421C,		+	-
<i>evo 2</i>	I351T	Two-component system sensor Stop50->S, +2 AA	-	+
<i>evo 3</i>	A229G, I351T		-	-
<i>evo 4</i>	A229G, I351T, W432G		-	-
<i>evo 5</i>	R174G, I351T		-	-

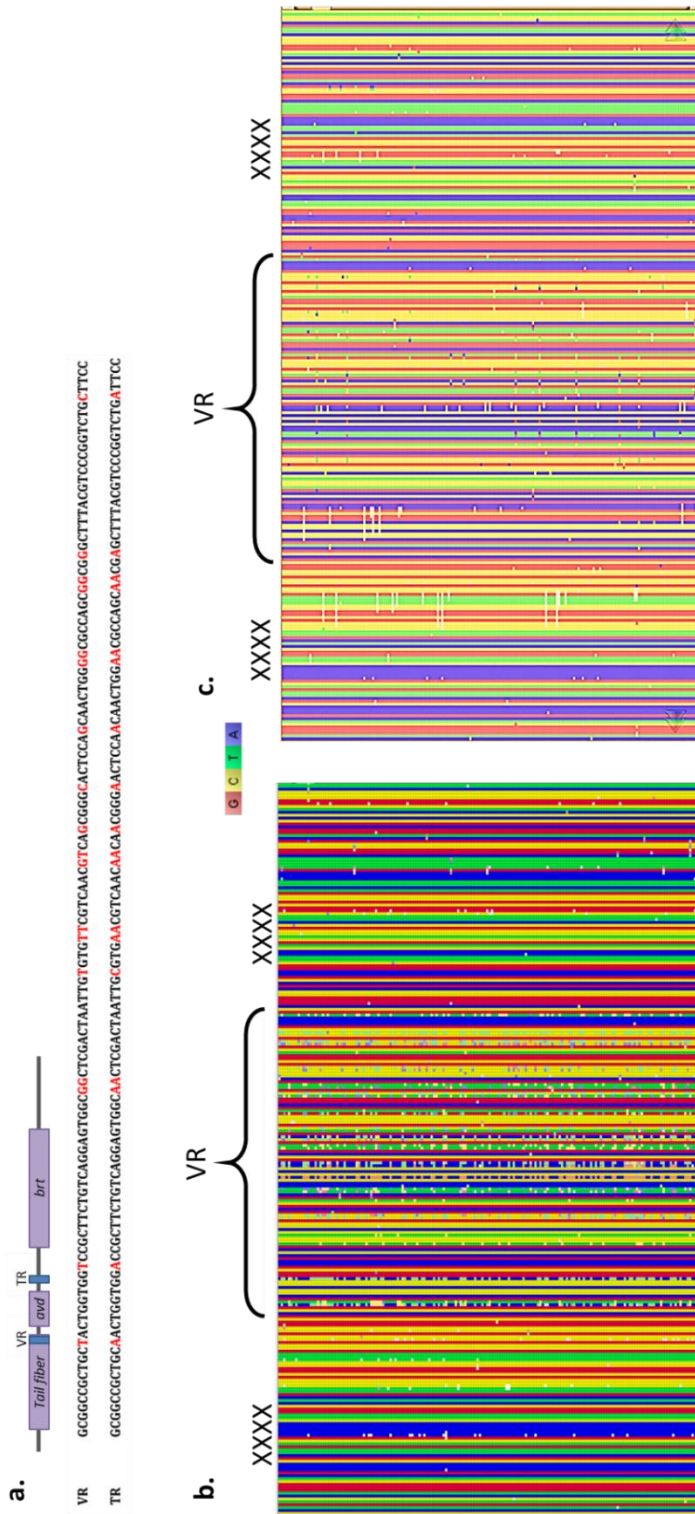
**Figure S1:** a) genome comparison between Shimadzu and Lagaffe, two members of the 'FPLagaffeVirus' genus. Blast was made using BlastN with Easyfig (Sullivan, 2011, Bioinformatics). b) Induction assay on *R. intestinalis* L1-82. Dot represent median (n=3). c) qPCR quantification of Shimadzu and Jekyll virions in supernatant of non-induced and induced growth cultures.



**Figure S2:** Mice experiment with *E. coli* MG1655 shows the same dynamic as observed with the *E. coli* LF82 as a roommate. a) *R. intestinalis* population dynamic measured in faeces of gnotobiotic mice. Each panel represent a different mouse. Colors highlighted mice from the same cage. b) Production of prophages in mice faeces. Each panel represent co-housing mice. Dashed lines represent the population of Jekyll and colored lines represent the population of Shimadzu. c) correlation between *R. intestinalis*/*E. coli* ratio measured by qPCR and *R. intestinalis*/*E. coli* measured by microscopy. d) Illustration of *E. coli* (red arrow) and *R. intestinalis* (green arrow) morphologies as observed by optic microscopy x100).



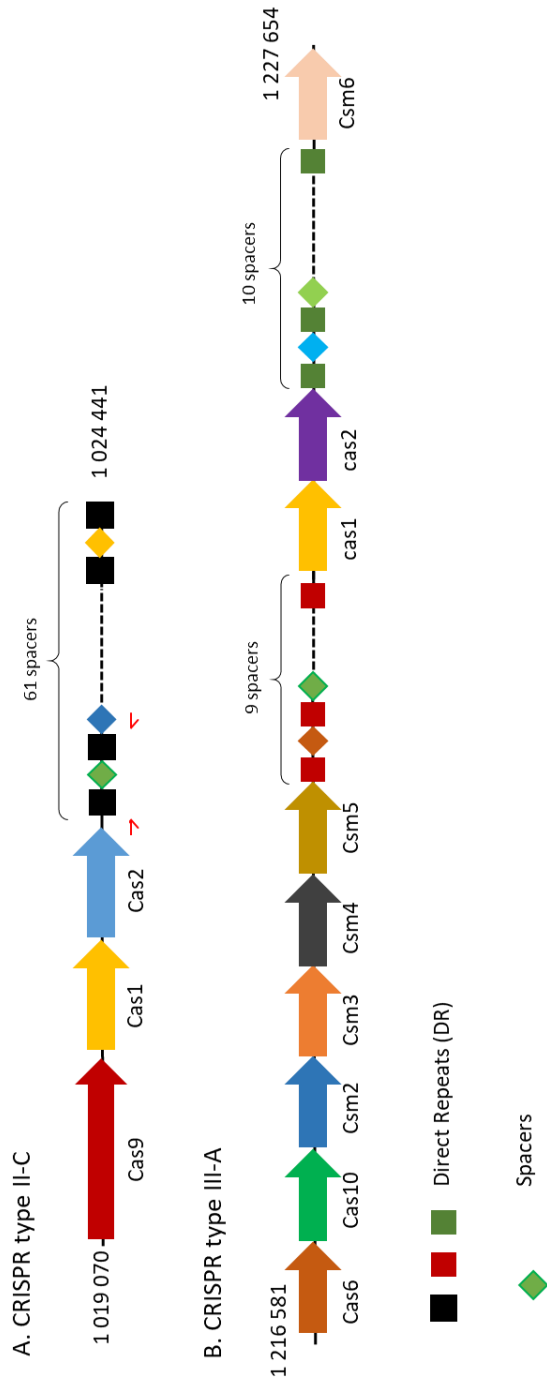
**Figure S3:** DGR in Shimadzu genome. a) genetic organisation of the DGR of Shimadzu, and DNA sequences of the template region and variable region. The red letters design adenine that are susceptibles to be mutated in the VR region. b) Alignment of sequencing reads from phages extracted from mice faeces at Day 21. c) Alignment of reads from the sequencing of *R. intestinalis* growth culture supernatant.



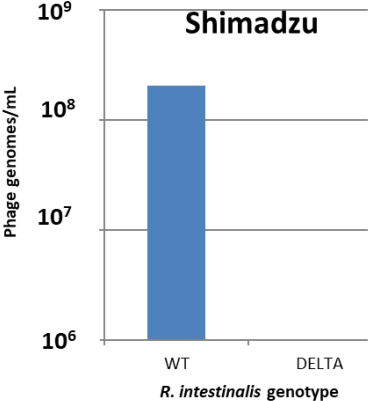


**Figure S4:** Genetic organisation of the CRISPR-cas systems encoded in the genome of *R. intestinalis* L1-82. Classification of the CRISPR has been based on [1]. a) genetic organisation of the CRISPR-cas II-C of *R. intestinalis*. b) genetic organisation of the CRISPR-cas III-A of *R. intestinalis*

1. Makarova, K.S., et al., *An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(11): p. 722-36.



**Figure S5:** Quantification of Shimadzu virions production in growth culture supernatant of *R. intestinalis* and  $\Delta$ shi *R. intestinalis*.



**Supplementary table 1:** presence of Shimadzu and Jekyll have been tested in human gut viromes. Numbers of hit for Jekyll and Shimadzu in Norman *et al.* viromes compared to three genomic fragments as controls for genomic DNA contamination.

virome	IBD	Ntot reads	ORI_ROSEB (50 kb)		MIDDLE_ROSEB (50 kb)		THIRD_ROSEB (50kb)		SHIMADZU (44969 bp)		JEKYLL (45625 bp)	
			interv tot 100		interv tot 100				interv tot 89		interv tot 91	
			N reads	N interv	N reads	N interv	N reads	N interv	N reads	N interv	N reads	N interv
ERR843912	1	205021	45	1	0	0	0	0	0	0	1	1
ERR843913	1	323891	6	4	0	0	0	0	6	5	41	13
ERR843914	1	189625	12	7	1	1	0	0	57	14	12	2
ERR843915	1	622894	70	7	0	0	0	0	3	2	4	3
ERR843916	1	603370	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843917	0	687165	15	6	0	0	1	1	0	0	0	0
ERR843918	1	236603	4	3	0	0	0	0	35	26	2	2
ERR843919	1	433969	77	6	0	0	0	0	2	2	406	8
ERR843920	1	478930	69	4	0	0	0	0	2	2	158	6
ERR843921	1	752543	77	19	4	2	4	3	12	9	252	9
ERR843922	0	494766	0	0	0	0	0	0	8	6	273	13
ERR843923	1	312693	2	1	0	0	0	0	8	8	0	0
ERR843924	1	598936	10	7	1	1	1	1	107	57	183	20
ERR843925	1	276714	4	3	0	0	0	0	3	3	3	2
ERR843926	1	443299	3	2	0	0	0	0	6	6	1	1
ERR843927	1	344299	1	1	0	0	0	0	2	2	1	1
ERR843928	1	420465	8	5	0	0	0	0	4	4	0	0
ERR843929	1	401430	56	14	0	0	0	0	1	1	112	28
ERR843930	1	490731	53	10	0	0	0	0	0	0	30	10
ERR843931	1	385767	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843932	1	439357	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
ERR843933	1	385452	6	6	0	0	0	0	19	2	0	0
ERR843934	0	495176	5	4	0	0	0	0	0	0	3	3
ERR843935	1	788129	171	14	0	0	0	0	200	67	13	1
ERR843936	0	581300	2	1	0	0	0	0	95	56	31	13
ERR843937	0	204394	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843938	0	278244	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
ERR843939	1	266624	14	8	1	1	0	0	0	0	7	2
ERR843940	1	363224	6	5	2	2	0	0	3	1	4	1
ERR843941	1	255626	4	3	0	0	0	0	0	0	1	1
ERR843942	1	475713	69	12	0	0	2	1	0	0	233	24
ERR843943	0	211782	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843944	0	219219	1	1	0	0	0	0	5	5	1	1
ERR843945	1	259486	6	5	0	0	0	0	3	3	7	5
ERR843946	1	287302	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843947	0	451723	99	6	0	0	0	0	2	1	65	11
ERR843948	1	455189	63	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843949	0	540679	3	3	0	0	0	0	0	0	80	7
ERR843950	1	226717	5	4	0	0	0	0	3	1	0	0
ERR843951	1	282862	54	12	3	3	1	1	29	16	76	18
ERR843952	1	446603	0	0	0	0	0	0	4	4	3	3
ERR843953	1	388921	1	1	0	0	0	0	7	4	11	5
ERR843954	1	367450	59	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843955	1	490720	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
ERR843956	1	471296	10	4	0	0	0	0	2	1	1	1
ERR843957	1	601454	15	8	0	0	0	0	33	26	16	2
ERR843958	1	431294	11	8	0	0	0	0	1	1	0	0
ERR843959	1	525120	5	4	1	1	0	0	15	14	12	4
ERR843960	1	422585	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843961	0	512446	2	1	0	0	0	0	0	0	223	14
ERR843962	1	581312	66	22	1	1	2	1	650	81	89	4
ERR843963	0	726116	3	3	0	0	0	0	2	2	177	12
ERR843964	1	651591	37	17	2	2	0	0	110	47	27	7
ERR843965	1	354551	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843966	1	403017	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2
ERR843967	1	300180	4	3	0	0	1	1	0	0	0	0
ERR843968	1	415653	10	7	0	0	0	0	13	1	0	0
ERR843969	1	346026	4	4	0	0	0	0	23	1	0	0
ERR843970	1	563328	29	15	1	1	1	1	25	21	1	1
ERR843971	0	462385	1	1	0	0	0	0	0	0	104	3
ERR843972	1	368992	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843973	1	640799	32	14	2	2	0	0	33	25	2	2
ERR843974	1	329509	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843975	1	416153	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
ERR843976	0	419198	0	0	0	0	0	0	0	0	7	3
ERR843977	0	530780	38	17	0	0	1	1	67	39	0	0
ERR843978	0	388289	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
ERR843979	0	565678	2	2	0	0	0	0	0	0	1	1
ERR843980	0	585203	0	0	0	0	0	0	4	3	3	3
ERR843981	1	724524	12	7	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843982	1	510799	17	8	2	2	1	1	9947	88	4	3
ERR843983	1	563747	19	3	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843984	1	454925	14	11	0	0	0	0	4	4	10	5
ERR843985	0	490751	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843986	0	695453	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR843987	1	486607	1	1	0	0	0	0	0	0	2	2
ERR843988	1	595215	857	20	0	0	0	0	0	0	49	11
ERR843989	1	721605	229	27	0	0	1	1	0	0	2	2
ERR843990	1	570239	124	24	7	3	2	2	1	1	1125	7
ERR843991	1	510061	45	10	0	0	1	1	0	0	2	2
ERR843992	0	433343	0	0	0	0	29	10	0	0	0	0
ERR843993	1	339949	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
ERR843994	1	643329	2	2	0	0	0	0	1	1	2	2
ERR843995	1	546274	352	28	3	1	7	2	67	12	35	9
ERR843996	1	432493	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

ERR843997	1	353885	31	13	1	1	0	0	0	0	21	4
ERR843998	1	208733	8	4	0	0	0	0	0	0	4	4
ERR843999	1	437581	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844000	0	737494	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844001	1	630072	92	20	6	4	7	3	0	0	2	2
ERR844002	1	684502	4	4	0	0	0	0	0	0	1	1
ERR844003	1	536902	235	27	3	3	2	2	0	0	0	0
ERR844004	1	623467	9	4	1	1	0	0	0	0	0	0
ERR844005	1	308144	52	11	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844006	1	570368	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844007	0	457233	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844008	1	682396	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
ERR844009	1	256914	14	7	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844010	0	614923	26	15	3	3	1040	20	4	2	15178	23
ERR844011	1	408256	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844012	1	431171	74	2	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844013	1	414881	50	10	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844014	1	610272	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844015	1	481848	3	3	0	0	4	1	0	0	1	1
ERR844016	0	708006	25	3	1	1	0	0	3	1	0	0
ERR844017	1	489819	1	1	0	0	0	0	1	1	260	26
ERR844018	0	570228	38	7	1	1	11	7	1	1	35	15
ERR844019	0	585349	0	0	0	0	0	0	0	0	6	5
ERR844020	0	473569	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844021	0	474780	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844022	0	512229	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844023	0	497228	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844024	0	337053	19	3	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844025	0	656223	94	14	3	2	1	1	0	0	9	1
ERR844026	0	264846	17	3	0	0	0	0	0	0	1	1
ERR844027	0	976826	14	7	2	2	5	1	78	2	2	1
ERR844028	0	456405	11	6	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844029	0	717029	18	8	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844030	0	677742	30	11	0	0	1	1	0	0	0	0
ERR844031	0	451315	1	1	0	0	0	0	0	0	11	7
ERR844032	0	552400	1	1	0	0	0	0	0	0	13	6
ERR844033	0	498080	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
ERR844034	0	507879	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
ERR844035	0	538759	8	5	0	0	1	1	15	13	1	1
ERR844036	0	891201	69	20	1	1	0	0	5	4	27	7
ERR844037	0	396447	7	3	0	0	1	1	0	0	0	0
ERR844038	0	628993	1	1	0	0	0	0	0	0	33	9
ERR844039	0	376564	7	1	0	0	1	1	0	0	322	3
ERR844040	0	380500	5	1	0	0	0	0	0	0	219	4
ERR844041	0	576934	151	27	1	1	0	0	32	11	0	0
ERR844042	0	511801	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
ERR844043	0	534482	23	11	0	0	0	0	1	1	35	11
ERR844044	0	567577	5	4	1	1	0	0	17	15	4	4
ERR844045	0	522977	2	1	0	0	0	0	3	3	1	1
ERR844046	0	593245	14	10	0	0	2	1	129	57	0	0
ERR844047	0	550142	7	6	0	0	0	0	6	6	1	1
ERR844048	0	584283	9	6	0	0	0	0	4	4	2	2
ERR844049	0	500825	25	13	1	1	0	0	11	8	2	1
ERR844050	0	1060077	10	8	1	1	0	0	1	1	0	0
ERR844051	1	562823	8	5	0	0	0	0	0	0	2	1
ERR844052	1	628570	32	8	0	0	0	0	0	0	1	1
ERR844053	1	673899	6	4	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844054	1	659300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844055	1	691775	540	12	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844056	1	683537	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844057	1	750558	114	13	2	1	0	0	0	0	0	0
ERR844058	1	710576	3	3	0	0	0	0	23	7	990	17
ERR844059	1	533088	4	3	0	0	0	0	0	0	1	1
ERR844060	1	682019	23	11	4	1	0	0	0	0	1	1
ERR844061	1	722032	36	19	0	0	0	0	1	1	199	4
ERR844062	1	725340	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
ERR844063	1	221603	19	10	0	0	0	0	1	1	6	5
ERR844064	0	237776	0	0	0	0	0	0	4	4	3	3
ERR844065	1	682085	164	9	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844066	0	424499	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844067	1	799419	8	7	0	0	0	0	3	2	0	0
ERR844068	0	462516	4	4	0	0	0	0	0	0	5	2
ERR844069	1	363260	196	24	4	4	0	0	4	4	1	1
ERR844070	1	493754	11	8	1	1	1	1	2902	86	214	19
ERR844071	0	302294	13	11	0	0	0	0	5	3	163	18
ERR844072	0	394020	6	5	0	0	0	0	12	12	4	4
ERR844073	1	610563	21	10	0	0	0	0	0	0	38	10
ERR844074	1	324522	21	11	2	2	0	0	89	54	1	1
ERR844075	1	667680	13	8	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844076	0	691544	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844077	1	560551	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844078	1	568367	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ERR844079	0	557800	1	1	0	0	0	0	0	0	2	1
ERR844080	0	401567	151	2	0	0	0	0	0	0	1	1
ERR844081	1	658313	19	7	0	0	0	0	0	0	13	5
ERR844082	1	610359	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0
PM496	0	12361241	712	51	24	12	41	11	769	86	62	11
PM498	0	11679199	1286	43	26	15	22	11	921	77	911	19

**Supplementary Table 2:** List of primers used in this study

R. intestinalis L1-82	Chomosomic control	JC 126: 5'-GAAGATGGACGGCGCAAGAAC	JC 128: 5'-TGCTTGGATGACGAGCTTA	this study
	Shimadzu	JC 130: 5'-GACAGAGGCGACCACTATCG	JC 132: 5'-GGAGACTGAGAGAGTCCCGT	this study
	Jekyll	JC 138 :5'-CCCAAAGATTGGCGAGGACT	JC 140: 5'-GCGGCGACTCTCCATAATCA	this study
	Δshi quantification	JC 237: 5'- GCGCTCCGTGAACATTCTATT	JC 230: -5' AAAGGTTTCAGCTTTTGCGCC	this study
	Shimadzu lysogenic module	JC 250: 5'-GGCGGATCTTTTTGCTCTT	JC 251: 5'-GAGCTCCTCGAGCTTCTCAC	this study

**Supplementary Table 3:** Mutations observed in the DGR associated VR region. a) Allele frequency and sequence of alleles observed in 881 reads extracted from the mice faeces virome at day 21 and completely covering the VR. "Others" designates alleles present as singleton among the 881 reads. Coloured letters indicate amino acid substitutions. The TR line shows the translated sequence of the template repeat (TR), for comparison. b) Allele frequency observed in 384 reads extracted from the virome of an *in vitro* phage production.

a.

	% in reads population	Protein sequence of the VR
TR sequence		RCNWWTASVRSNGNSTNCVNVNNGNSNNWNASNELYVPC-
WT	27,7	RCYWW <b>S</b> ASVRS <b>G</b> STNCV <b>F</b> VN <b>V</b> SG <b>H</b> SSNW <b>G</b> AS <b>G</b> GLYVPVC
allele 2	26,9	RCNWWTASVRSNGNST <b>I</b> CV <b>H</b> VD <b>H</b> SG <b>H</b> SYNW <b>G</b> AS <b>Y</b> EL <b>C</b> VPVC
allele 3	15,1	RCNWWTASV <b>G</b> SGNST <b>V</b> CVNV <b>S</b> ING <b>Y</b> SD <b>S</b> W <b>H</b> AS <b>H</b> ELYVPVC
allele 4	4,9	RC <b>G</b> WWTASVRS <b>G</b> AS <b>T</b> RCV <b>Y</b> VG <b>S</b> YGNS <b>Y</b> WGASNEL <b>C</b> VPVC
Others	25,4	

b.

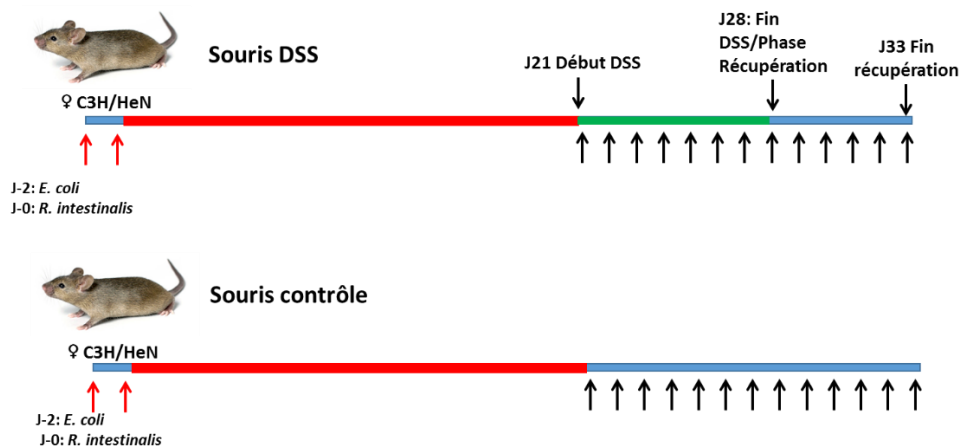
	% in reads population
WT	98
Others	2

## 6. Impact de l'inflammation intestinale sur l'activité des prophages de *R. intestinalis*

### 6.1 Modèle inflammatoire sur des souris colonisées depuis 3 semaines par *R. intestinalis*

Comme présenté dans l'introduction, différentes études suggèrent que l'inflammation intestinale pourrait induire les prophages (Lepage et al 2005), et nous avons montré que c'est bien le cas sur un prophage de Salmonelle en souris (Diard et al 2017). A l'instar de ce qui a été fait avec *F. prausnitzii*, l'effet d'une inflammation sur le taux d'induction des prophages de *R. intestinalis* a été testé dans un modèle murin d'inflammation au DSS.

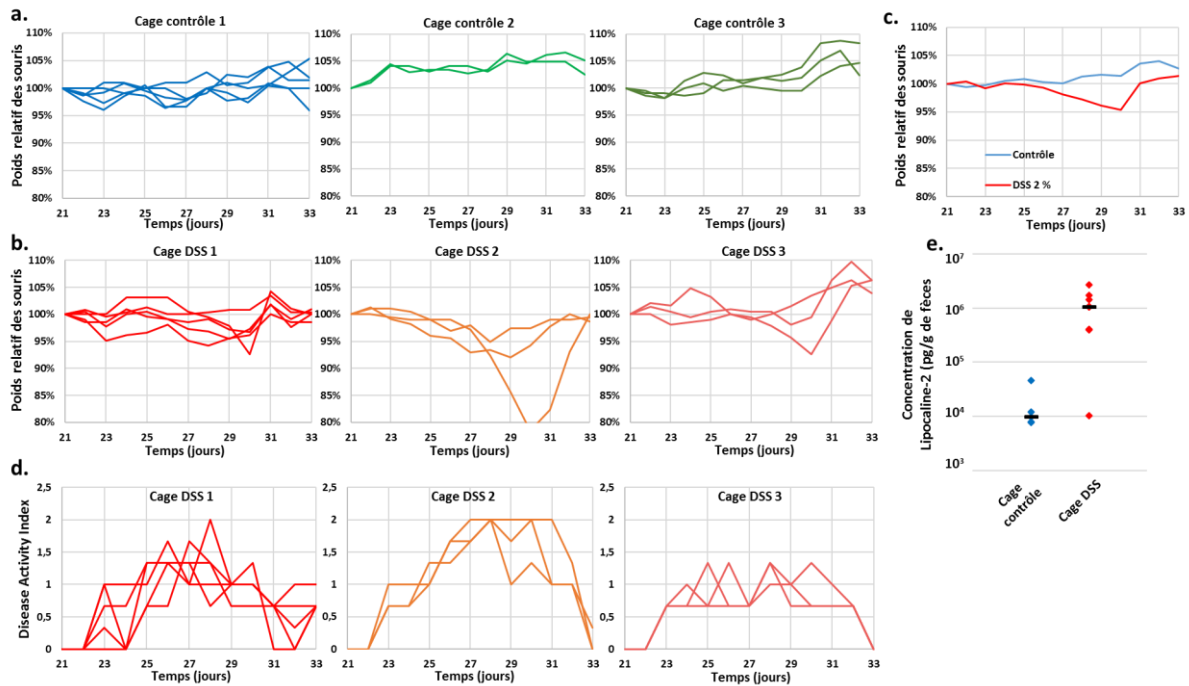
La colonisation des souris est telle que décrite dans le chapitre 5. Au total, 21 souris ont été réparties dans 6 cages, réparties en deux groupes : le groupe contrôle (10 souris) et le groupe traité au DSS (11 souris). Dans le cadre de ces expériences, l'étude des évolutions des populations bactériennes et phagiques s'est focalisée sur la période de temps comprise entre le début du traitement au DSS et cinq jours après la fin du traitement, avec des prélèvements journaliers, et des mesures de population tous les 3 jours (Figure 25).



**Figure 25:** Plan d'expérience pour tester l'effet de l'inflammation intestinale sur l'induction des prophages de *R. intestinalis*. Les flèches noires désignent les jours de mesure des bactéries et des phages (quotidien). Des souris femelles C3H/heN sans germes, âgées de 5 à 8 semaines, sont colonisées avec les bactéries d'intérêts. Une fois celles-ci implantées, la flore évolue de manière autonome pendant trois semaines, au bout desquelles il est estimé que les réponses immunitaires sont stabilisées. A cette date, l'eau de boisson est supplémentée de 2 % de DSS pendant 7 jours afin de créer l'inflammation intestinale. Les cinq jours suivant la période l'administration de DSS sont appelés phase de récupération.

Durant toute la durée de l'expérience, entre le jour 21 et le jour 33, les souris sont pesées quotidiennement, et le degré d'inflammation évalué pour les souris traitées au DSS. L'évaluation

prend en compte la consistance des fèces, la présence de sang dans celles-ci et la perte de poids de la souris (Cooper 1999).



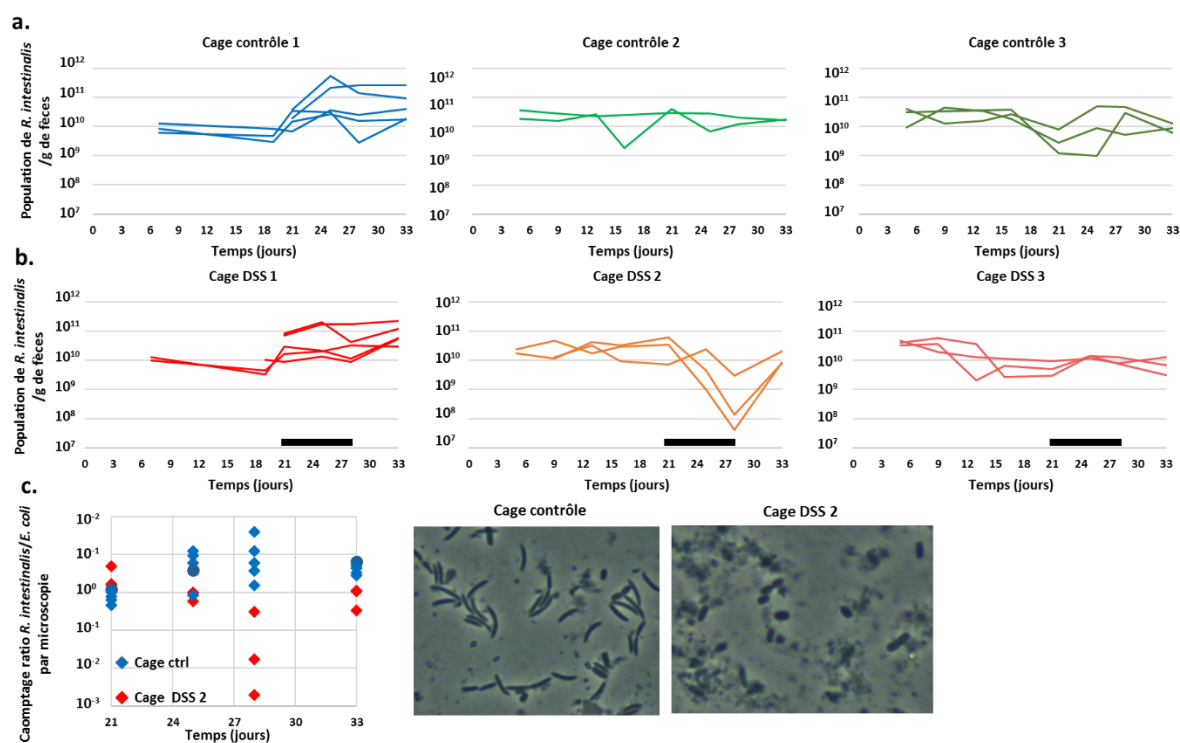
**Figure 26 :** Caractérisation de l'inflammation intestinale déclenchée par addition de DSS dans l'eau de boisson des souris. a) Evolution du poids des souris contrôles relativement au jour 0 de l'expérience. Chaque courbe représente une souris différente. b) Evolution du poids des souris traitées au DSS relativement au jour 0 de l'expérience. c) Comparaison des évolutions de poids des souris contrôles et traitées au DSS, écart statistiquement significatif selon un test de Student aux jours 27 ( $p=0,033$ ), 28 ( $p=0,0006$ ), 29 ( $p=0,0014$ ) et 30 ( $p=0,007$ ). d) Evolution du score D.A.I dans les cages traitées au DSS. e) Comparaison de la quantité de Lipocaline-2 dans les fèces de souris contrôles ( $n=5$ ) ou traitées au DSS ( $n=8$ ) au jour 28 de l'expérience (dernier jour d'administration de DSS).

Comme observé avec les souris dixéniques *E. coli-F. prausnitzii* (chapitre 4), l'inflammation provoquée par le traitement DSS est faible, sur la base du score D.A.I. Cependant, les souris traitées au DSS ont subi en moyenne une légère perte de poids, en comparaison avec les souris contrôles. De plus, certaines souris ont subi une inflammation plus élevée que les autres, comme le montrent les courbes de poids et les Disease Activity Index (D.A.I) comparées aux groupes témoins (Figure 26 a et b). Il semble même, si l'on considère les courbes de perte de poids et de score inflammatoire, que les souris colonisées avec *R. intestinalis* présentent une inflammation moins forte que celle observée avec *F. prausnitzii*. Afin de doser plus finement l'inflammation, la lipocaline-2 a été quantifiée dans les fèces des souris au 7<sup>ème</sup> jour du traitement DSS (j28). Cette protéine membranaire, transporteuse de fer, n'est exprimée que dans les cellules immunitaires. La détection de cette protéine dans les fèces témoigne de la présence de cellules immunitaires éliminées de la barrière épithéliale intestinale vers le lumen, élément marqueur d'une inflammation. Les niveaux observés de lipocaline montrent l'existence d'une inflammation à bas bruit chez les souris traitées au DSS (Figure 26e).

Par la suite nous avons quantifié les populations bactériennes et phagiques par qPCR. Le DSS étant une substance inhibitrice de la réaction de polymérisation de l'ADN, une étape de traitement au



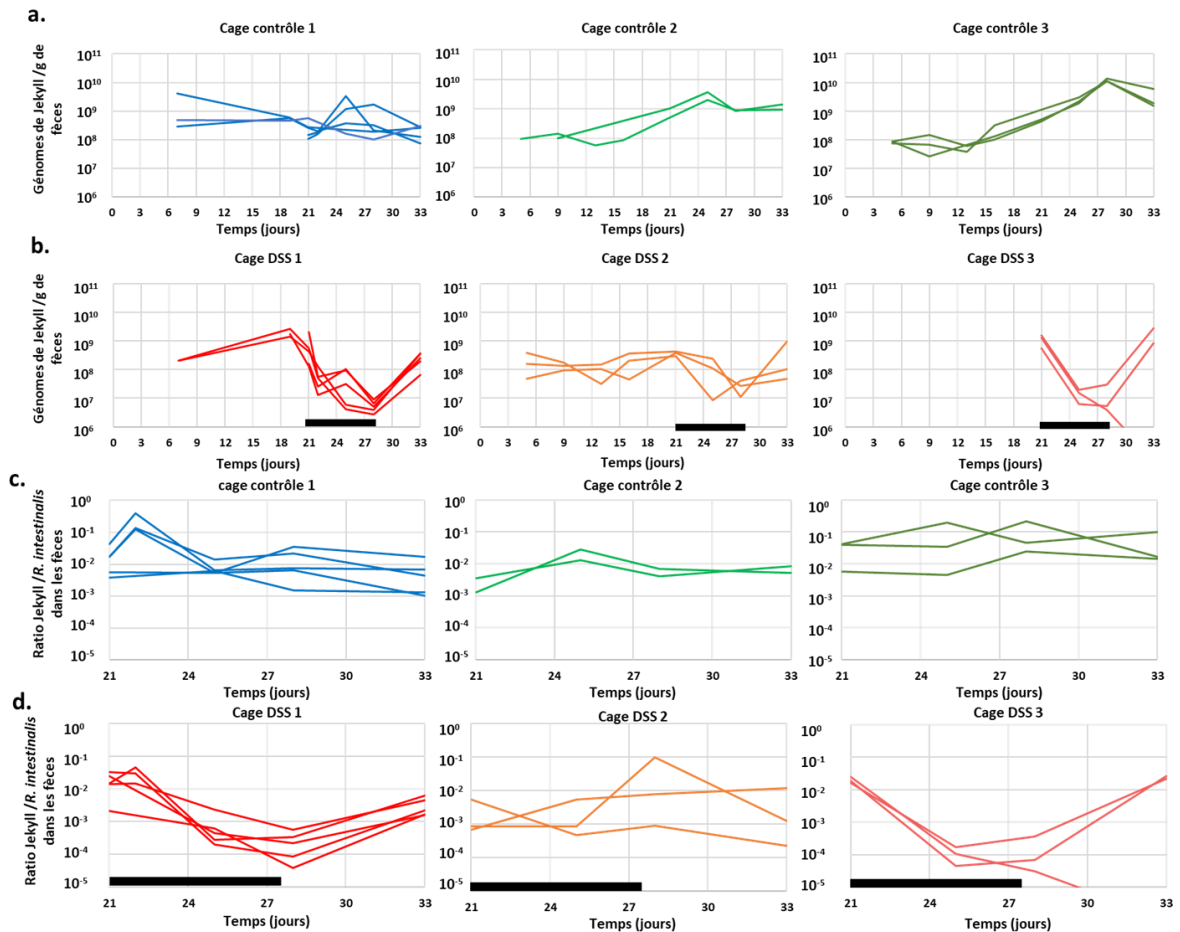
KCl, comme présenté dans le matériel et méthode du chapitre 4, a permis d'éliminer simplement et rapidement le DSS des échantillons (Philipson et al 1960). Les cages contrôles 2 et 3 correspondent aux données présentées Figure 2 du chapitre 5, lignes 4 et 3, respectivement. Par souci de cohérence avec les données des cages DSS qui n'ont pu être toutes normalisées, les concentrations absolues en *R. intestinalis* sont montrées, plutôt que les ratios *R. intestinalis/E. coli*.



**Figure 27:** Evolution de la population intestinale de *R. intestinalis* dans les fèces. a) Population de *R. intestinalis* dans les cages contrôles. b) Population de *R. intestinalis* dans les cages traitées au DSS. Les barres noires symbolisent la période de traitement au DSS. c) Comparaison du ratio *R. intestinalis/E. coli* déterminé par comptage des bactéries par microscopie optique (x 100). Chaque image correspond à une prise de vue de resuspension de fèces au jour 28.

Sur les trois cages traitées au DSS, dans la cage DSS 2, les souris présentent une inflammation plus sévère que dans les deux autres cages, et une chute de population de *R.intestinalis* synchrone avec l'état inflammatoire des souris (Figure 26b et Figure 27a et b). La chute de population n'est pas observée dans les deux autres cages. Les mesures effectuées par qPCR à différents jours clés de l'expérience ont été vérifiées par une estimation par microscopie du ratio *R. intestinalis/E. coli* dans des fèces de souris resuspendue, (Figure 27 b et c). *R. intestinalis* est un long bacille incurvé, *E. coli* un bacille court et épais. L'absence de *R. intestinalis* sur l'image de droite (cage DSS) contraste très fortement avec l'image de gauche de la cage contrôle. Dans les deux autres cages, aucun écart significatif de la population de *R. intestinalis* n'est observé. Ces résultats montrent que l'inflammation déclenchée par le DSS est très variable d'une cage à l'autre, ce qui pose des problèmes sur la reproductibilité des observations. Dans la cage DSS 2, l'inflammation est liée à une diminution du ratio *R. intestinalis/E. coli*, de façon similaire à ce qui est observé chez les patients atteints MICI et caractérise la dysbiose.

De manière inattendue, pendant le traitement au DSS, le phage Jekyll présente une forte baisse de population dans les cages DSS 1 et 3, d'un facteur 10 à 100 (Figure 28 a et b), comparé aux cages contrôles. La population remonte ensuite au jour 33, lorsque le traitement au DSS est terminé.



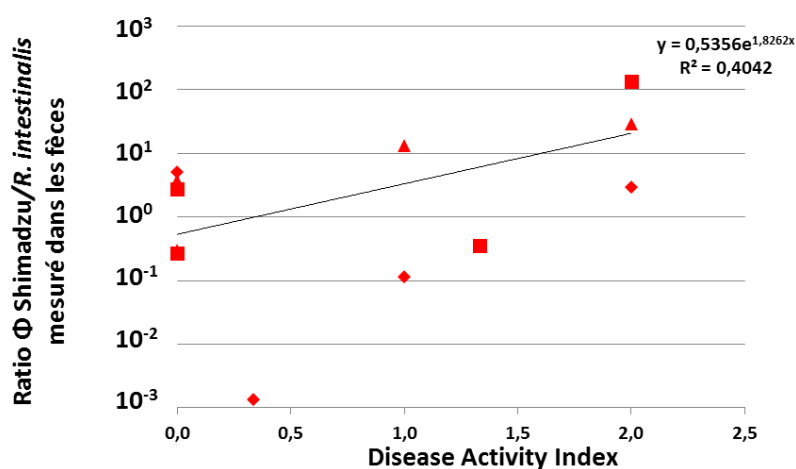
**Figure 28 :** Evolution de la population du phage Jekyll dans les différentes cages de l'expérience. a) Evolution de population du phage Jekyll dans les cages contrôles. b) Evolution de population du phage Jekyll dans les cages traitées au DSS. c) Evolution du ratio  $\phi$ /bactérie pour le phage Jekyll, dans les cages contrôles. d) Evolution du ratio  $\phi$ /bactérie pour le phage Jekyll, dans les cages traitées au DSS, durant la période de traitement au DSS, et la phase de récupération des souris. Les barres noires représentent la période de traitement au DSS pour ces souris.

Pour déterminer l'origine de ce phénomène, nous avons effectué une nouvelle quantification de la population de Jekyll dans les souris de la cage contrôle 1 et cage DSS 1 entre j21 et j24 au jour 22, soit un jour après le début du traitement DSS (Figure 28 a et b). A cette date, l'inflammation n'a pas encore été déclenchée (Fig. 26), mais le DSS est déjà présent dans l'environnement intestinal. Par conséquent, quantifier les phages ce jour-là permet d'évaluer d'éventuels effets directs du DSS sur les virions, avant que l'inflammation ne se déclenche chez la souris. Dans la cage traitée au DSS, une baisse de population d'un facteur 10 est observée dans la population de Jekyll au jour 22. Cette observation suggère que le DSS serait néfaste à la population des virions de Jekyll. De manière fort

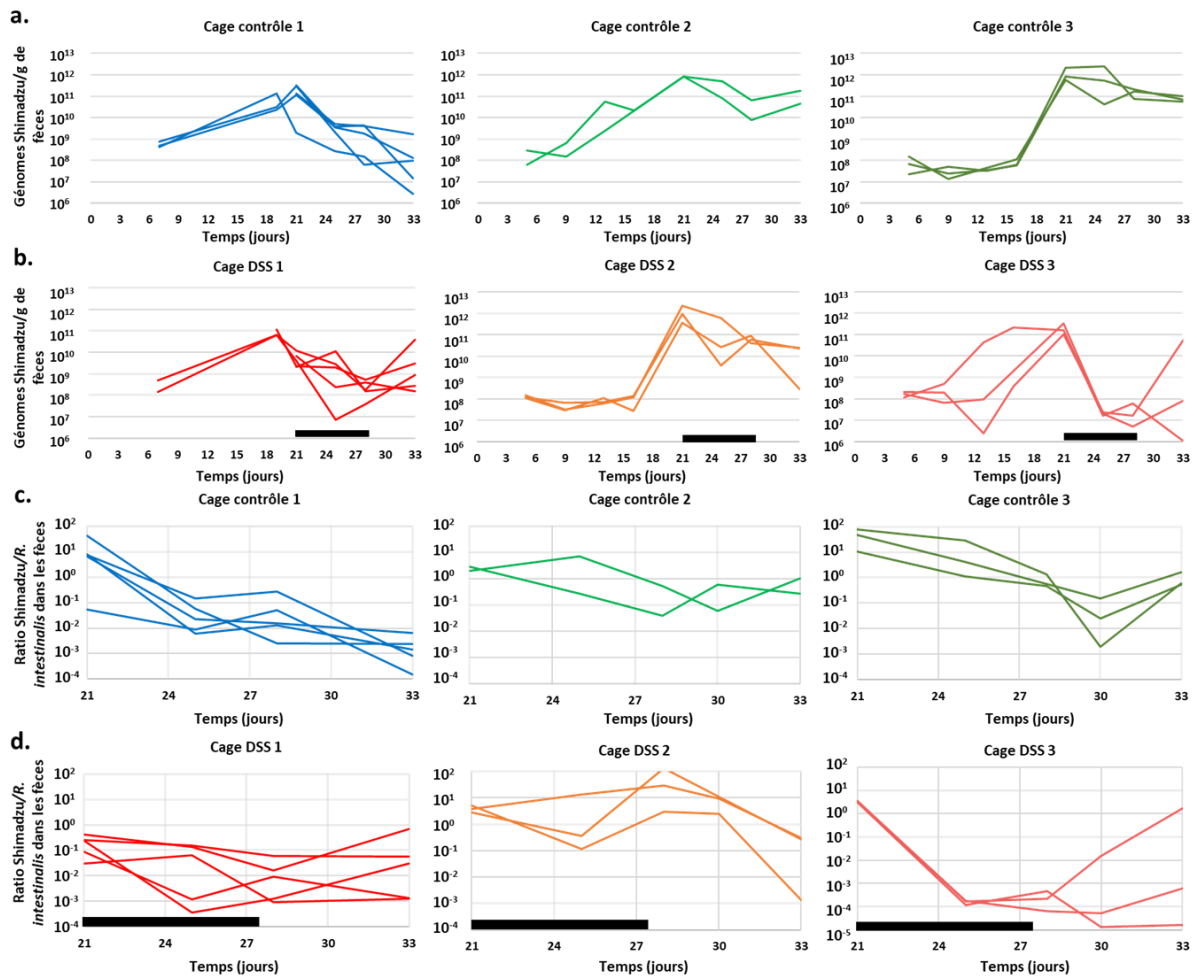
intéressante, dans la cage DSS 2, qui est la seule où une inflammation forte a eu lieu, la population du phage Jekyll reste stable. Sachant l'effet négatif du DSS sur le phage Jekyll, cela suggère que la production de phage est en réalité augmentée, mais que la perte liée au DSS compense cette augmentation. Il est donc possible que l'inflammation induise Jekyll, mais un modèle inflammatoire sans DSS serait nécessaire pour valider cette hypothèse.

Concernant le phage Shimadzu, le chapitre 5 a montré que contrairement à Jekyll celui-ci se multiplie déjà en l'absence de tout traitement DSS, et que la population phagique est le plus souvent à son pic au moment où le DSS est appliqué (jour 21). Il est donc à peu près impossible d'évaluer si le DSS inhibe ce phage en se plaçant au jour 22 comme décrit pour Jekyll, et il faudrait une sur-induction massive pour arriver encore à détecter un éventuel effet de l'inflammation sur l'induction de ce phage. Les résultats obtenus sont néanmoins présentés et décrits ci-dessous.

Les évolutions de populations de Shimadzu sont très différentes d'une cage à l'autre. Dans la cage DSS 2 la population du phage Shimadzu est au plus haut dans les jours les plus forts de l'inflammation (J25-28). Dans cette cage on observe une très bonne corrélation entre le ratio Shimadzu/*R. intestinalis* et le degré d'inflammation des souris (Score D.A.I) (Figure 29). L'hypothèse pour expliquer cette observation serait qu'une population de *R. intestinalis* fortement diminuée par la multiplication du phage ne permettrait pas de protéger les souris de l'inflammation.



**Figure 29** : Corrélation entre le ratio Shimadzu/ *R. intestinalis* dans les souris de la cage DSS 2 au cours de l'expérience, et l'intensité d'inflammation de ces souris.



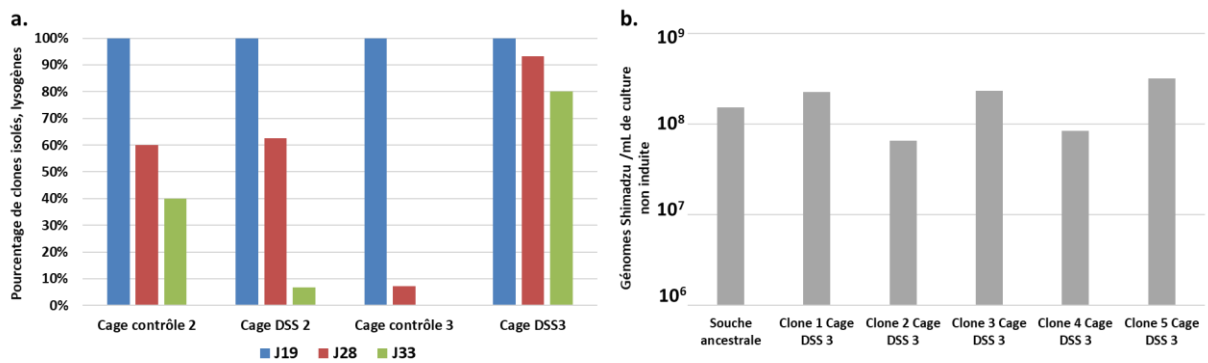
**Figure 30** : Evolution de la population du phage Shimadzu dans les différentes cages de l'expérience. a) Evolution de population du phage Shimadzu dans les cages contrôles. b) Evolution de population du phage Shimadzu dans les cages traitées au DSS. c) Evolution du ratio  $\phi$ /bactérie pour le phage Shimadzu dans les cages contrôles. d) Evolution du ratio  $\phi$ /bactérie pour le phage Shimadzu, dans les cages traitées au DSS, durant la période de traitement au DSS, et la phase de récupération des souris. Les barres noires représentent la période de traitement au DSS pour ces souris.

Dans les cages DSS 1 et 3, l'inflammation est moins prononcée et la population de *R. intestinalis* n'est pas altérée (Figure 27b). L'évolution du phage Shimadzu est significativement différente entre les cages DSS 1 et 3 (Figure 30). Dans la cage DSS 1, il n'y a aucune différence observable entre les conditions contrôle ou DSS, hormis au jour 33 de l'expérience où la cage traitée au DSS présente une population de phage Shimadzu plus élevée que dans les cages contrôles. Dans la cage DSS 3, la concentration en phage Shimadzu diminue significativement, jusqu'à atteindre un niveau de population aux limites du seuil de détection de la qPCR (i.e  $\sim 10^6$  phages /g).

Cette faible concentration pourrait provenir, comme décrit au chapitre 5, de doubles mutants  $\Delta$ shi résistants à l'infection envahissant la population bactérienne en enrayant totalement la capacité de Shimadzu à se multiplier. Néanmoins les tests PCR effectués sur des clones bactériens isolés des jours 19, 28 et 33 de cette cage montrent que la très grande majorité des bactéries sont restées lysogènes (Figure 31a). Alternativement, un mutant portant un prophage ayant perdu sa capacité

d'induction pourrait avoir envahi la population, en raison de l'avantage sélectif conféré par cette mutation : si le prophage s'induit spontanément dans une fraction significative des bactéries, alors cela constitue un coût, et une bactérie sans prophage inducible est avantagée. Néanmoins, les clones issus de cette cage possèdent une capacité de production de virions *in vitro* comparable à celle de la souche ancestrale, ainsi que de souches isolées de souris hébergées dans une autre cage (Figure 31b).

Une dernière hypothèse serait que ces souris les bactéries soient totalement résistantes au phage Shimadzu, par un moyen indépendant du CRISPR II-C décrit dans le chapitre 5, permettant entièrement d'enrayer la multiplication du phage mutant virulent. Certains de ces clones ont été séquencés afin de trouver l'éventuelle mutation responsable de la résistance. L'analyse des clones est détaillée plus loin. Enfin, le DSS pourrait également empêcher l'infection de la bactérie, si bien que les prophages s'induisent mais ne se multiplient pas dans l'intestin de la souris.



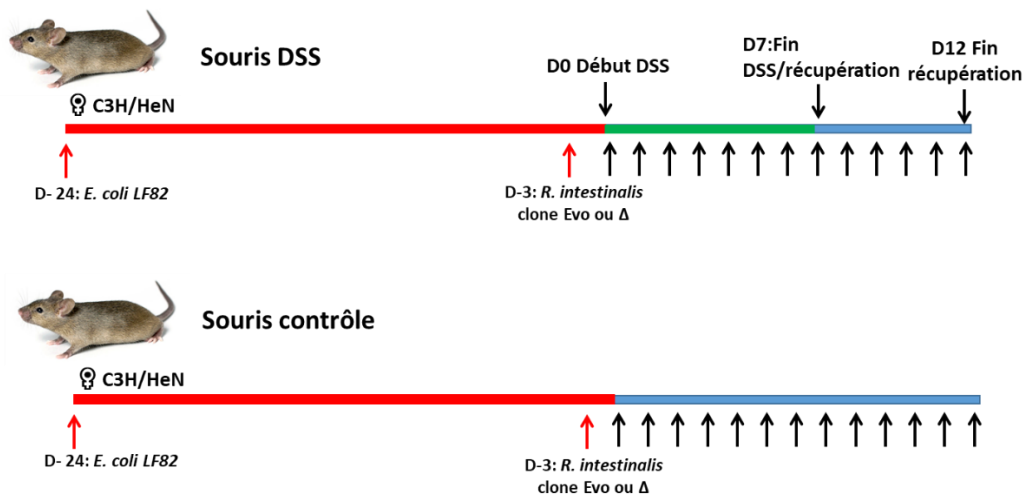
**Figure 31:** Caractérisation du phénotype des clones de *R. intestinalis* isolés de la cage DSS 3. a) Evolution du pourcentage de clones lysogènes, selon la date d'isolement du clone dans l'expérience, et la cage d'origine. b) Comparaison de la production de virions de Shimadzu entre la souche ancestrale et des clones isolés à J28 de la cage DSS 3.

En conclusion, les observations effectuées sur les souris traitées au DSS ne permettent pas de répondre à notre question initiale, *i.e.* le lien potentiel entre inflammation intestinale et induction des prophages. En effet, au moment du traitement au DSS, un phage virulent est probablement déjà systématiquement présent dans les souris, et la population bactérienne est hétérogène concernant le statut de lysogénie, ce qui rajoute un biais important aux expériences.

## 6.2 Modèle inflammatoire sur des souris colonisées depuis deux jours avec *R. intestinalis*

Afin de tester l'effet d'une inflammation sur des populations bactériennes où le phage Shimadzu n'est pas encore fortement induit, le protocole de colonisation des souris a été modifié (Figure 32). La colonisation bactérienne de trois semaines, préalable au traitement DSS et nécessaire à la maturation de l'épithélium intestinal, a été réalisée avec *E. coli* seulement, plutôt qu'avec les deux espèces *R. intestinalis* et *E. coli*. La présence d'une seule souche bactérienne semble en effet suffire à enclencher les réponses de l'hôte (Hoffmann et al 2016). Au 19<sup>ème</sup> jour de colonisation par *E. coli*, les souris ont été colonisées avec *R. intestinalis*. Deux jours après la confirmation de la colonisation par *R. intestinalis*, le DSS est ajouté à l'eau de boisson des souris. Le cours délai de colonisation de *R. intestinalis* devrait empêcher l'apparition d'un mutant virulent de Shimadzu et la multiplication concomitante des  $\Delta$ shi, et par conséquent un biais dans nos expériences, avec une partie de la population bactérienne déjà protégée contre l'induction d'un de ses prophages.

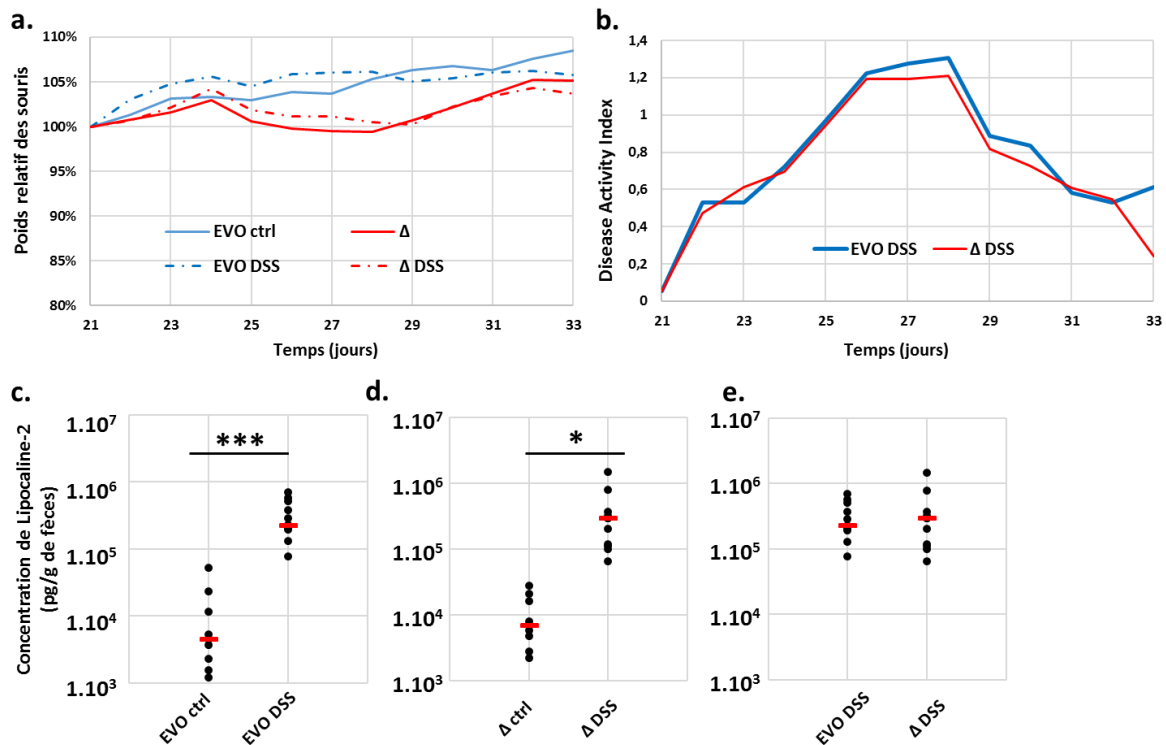
Par ailleurs, nous avons eu la chance d'avoir isolé des clones guéris du prophage Shimadzu dans les expériences décrites au chapitre 5. Nous avons donc comparé l'évolution en souris de deux souches de *R. intestinalis* : une souche lysogène et une souche guérie du prophage, afin de comparer la stabilité des deux souches. Afin que les deux souches utilisées soient le plus proche possible, nous avons colonisé les souris avec la souche *evo1* de la cage contrôle 2 isolée au jour 28 dans les expériences précédentes. Cette souche porte toujours le prophage Shimadzu. Le clone guéri de Shimadzu provient d'une souris de la cage contrôle 3 au jour 28 de l'expérience également, il est appelé ici  $\Delta$ 1 (et appelé *evo3* dans le chapitre 5).



**Figure 32** : Plan d'expérience pour tester l'effet de l'inflammation intestinale sur l'induction des prophages de *R. intestinalis*. Les flèches noires désignent les jours de mesures des bactéries et des phages (quotidien). Des souris ♀ C3H/heN sans germes, âgées de 5 à 8 semaines, sont colonisées

avec *E. coli* LF82. 18 jours après, celles-ci sont colonisées avec soit la souche *evo1*, soit la souche *evo3* de *R. intestinalis*. Trois jours après, l'ajout du DSS dans l'eau de boisson a lieu.

Les résultats de l'expérience sont présentés ci-dessous (Figure 33). Contrairement aux expériences précédentes, les populations de *R. intestinalis* n'ont pas été estimées par qPCR, mais par comptage du ratio *R. intestinalis/E. coli* par microscopie optique. Des analyses, présentées au chapitre 5, prouvent que les deux techniques donnent des résultats similaires pour évaluer la population de *R. intestinalis* dans les fèces. Nous avons également vérifié par comptage des CFU qu'*E. coli*, qui sert ici de référentiel, a bien une population stable dans le temps. Cette observation est conforme avec les expériences précédentes (chapitre 5).



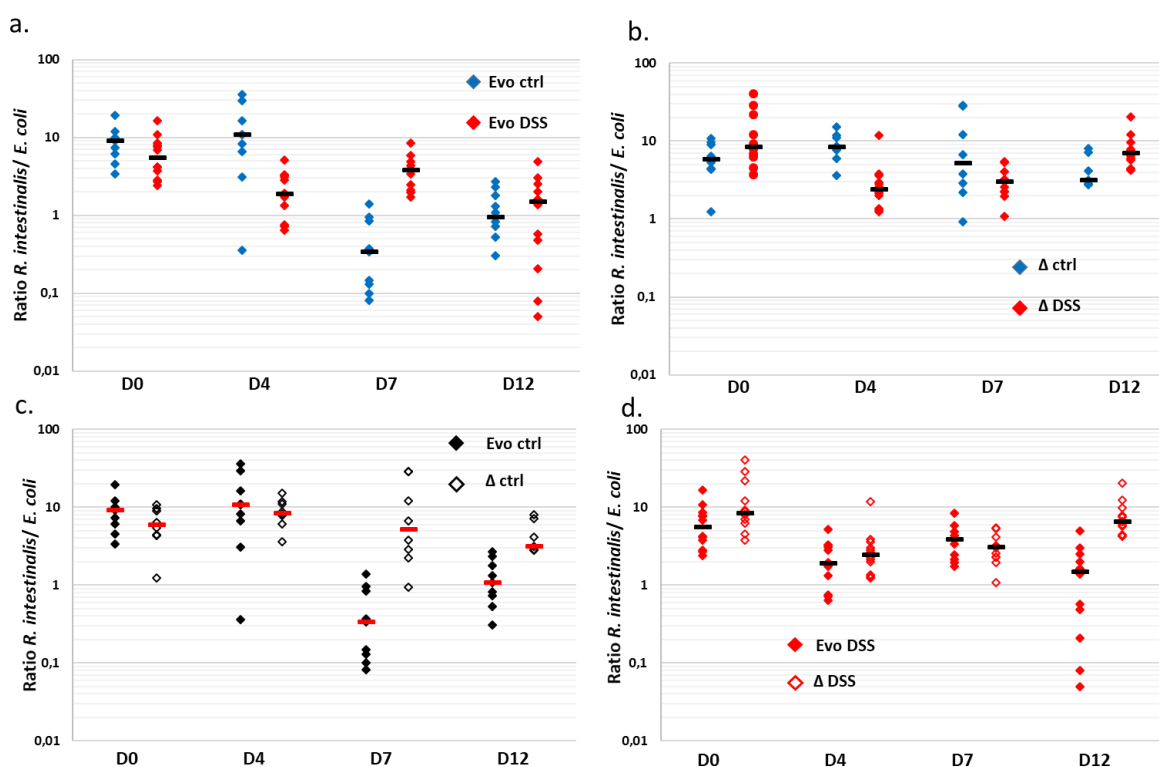
**Figure 33 :** Caractérisation de l'inflammation des souris traitées au DSS après une colonisation courte par *R. intestinalis* (souche *evo 1* ou  $\Delta 1$ ). a) Moyenne de la courbe de poids des souris selon la souche bactérienne ayant colonisé la souris, et le statut inflammatoire (n=12). b) Evolution du score D.A.I pour les souris traitées au DSS selon la souche ayant colonisé la souris. c,d,e) Quantification et comparaison de la concentration de lipocaline-2 dans les fèces de souris, selon le traitement au DSS, ou la souche bactérienne ayant colonisé la souris (test de student, \* = p > 0.05, \*\*\* = p > 0.001, 9 ≤ n ≤ 12).

Comme décrit précédemment, une inflammation très faible est observée chez les souris traitées au DSS : faible perte de poids, et un faible score inflammatoire D.A.I. (Figure 33b). De manière très claire, il n'y a pas de différence observable dans le niveau d'inflammation entre les souris colonisées par la souche *evo 1* et les souris colonisées par la souche  $\Delta 1$ . Cette observation peut être faite tant sur les courbes de poids, les scores D.A.I, et la quantification de lipocaline-2 dans les fèces des souris au jour 7 du traitement DSS. La quantification de lipocaline-2 confirme l'existence d'une inflammation modérée chez les souris.



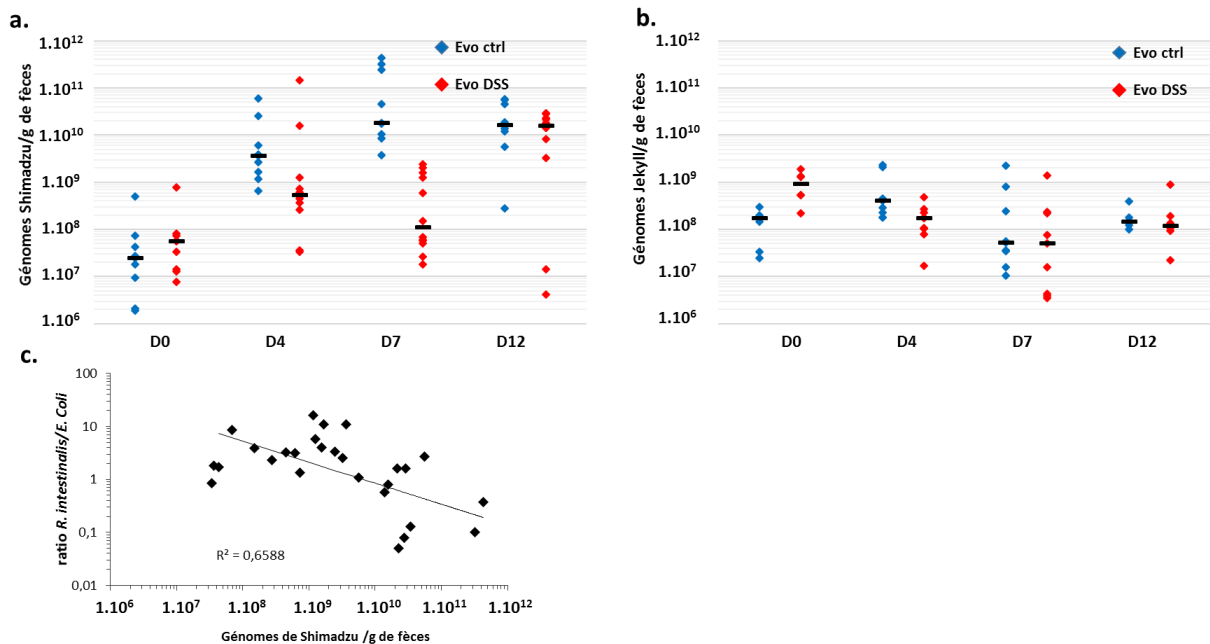
Dans les cages contrôles colonisées avec la souche *evo 1*, une chute progressive de la population de *R. intestinalis* est observée, avec un maximum au jour D7 (Figure 34a). Cette chute de population est corrélée avec un accroissement progressif de la population du phage Shimadzu, le maximum étant atteint à D7 (Figure 35 a et c). L'absence de déclin de *R. intestinalis* dans les cages colonisées par la souche *evo3* attribue clairement la chute de population de *R. intestinalis* à la prédation par le phage Shimadzu, comme ce qui a été observé dans le chapitre 5. L'apparition d'un mutant virulent semble donc beaucoup plus rapide que ce que nous avons escompté (après 10 jours de colonisation contre 15-20 jours précédemment). Le séquençage complet d' *evo 1* (voir plus bas) a révélé que celle-ci était un double lysogène, portant une copie sauvage et une copie mutée dans sa région régulatrice. Cela expliquerait l'évolution plus rapide de populations de phages et de bactéries dans ces souris par rapport aux expériences décrites au chapitre 5.

Une observation très intéressante peut néanmoins être tirée de ces expériences. Le DSS semble jouer un rôle protecteur de *R. intestinalis* contre la prédation par Shimadzu : la comparaison des souris colonisées avec *evo1* avec et sans DSS à D7 (Figure 34a) montre un effondrement de *R. intestinalis* en absence de DSS, mais non en sa présence, tandis que la souche délétée de Shimadzu se maintient à des niveaux élevés avec ou sans DSS, à D7 (Figure 34b). La quantification de Shimadzu montre une nette diminution à D4 et D7, confirmant que le DSS est défavorable à l'induction et/ou la propagation de *Shivir* (Figure 35). Dès la fin du traitement DSS (D12), la population de Shimadzu remonte fortement. Comme observé précédemment, la population de Jekyll est diminuée à D4 en présence DSS dans l'environnement intestinal (Figure 35b). Le DSS gêne donc l'induction et/ou la propagation des phages Shimadzu et Jekyll dans l'intestin.





**Figure 34 :** Evolution de la population de *R. intestinalis* dans les différentes conditions expérimentales testées. a) Evolution de la population de *R.intestinalis* chez les souris *evo 1* avec (DSS) et sans (ctrl) DSS. b) Evolution de la population de *R.intestinalis* chez les souris  $\Delta 1$  avec (DSS) et sans (ctrl) DSS. c) Evolution de la population de *R.intestinalis* chez les souris *evo 1* et  $\Delta 1$  sans DSS (ctrl). d) Evolution de la population de *R.intestinalis* chez les souris *evo 1* et  $\Delta 1$  avec DSS.



**Figure 35 :** Evolution des populations de phages de *R. intestinalis* dans les expériences de colonisation courte avec la souche *evo1*. a) Evolution de la population de Shimadzu dans les fèces des souris contrôles et DSS. b) Evolution de la population de Jekyll dans les fèces des souris contrôles et DSS. c) corrélation entre baisse de la population de *R. intestinalis* et quantité de phage Shimadzu dans ces mêmes fèces.

L'ensemble de ces observations ne permet malheureusement pas de conclure sur un rôle des prophages dans la stabilité de *R. intestinalis* en condition inflammatoire. Néanmoins, nous avons pu mettre en évidence ici que le DSS est un modèle inflammatoire à éviter pour étudier les interactions entre phages et bactéries dans l'environnement intestinal. Cet effet délétère du DSS pour l'interaction phage-bactérie pourrait avoir comme origine le fait que celui-ci dégrade la couche de mucus intestinal. Celui-ci dissout une grande partie du mucus en moins de vingt-quatre heures (Johansson et al 2010). Or, ce mucus constitue le lieu de colonisation de *R. intestinalis*, et c'est probablement celui où l'on rencontre la majorité de la population de phages de *R. intestinalis*.

Au vu des résultats des expériences de colonisation courte, notamment de l'effet protecteur du DSS, on peut proposer une nouvelle interprétation des résultats observés dans la cage DSS 3 de l'expérience longue durée présentée au paragraphe précédent. La population du phage Shimadzu dans la cage DSS 3 pourrait avoir chuté après le jour 21 parce que le DSS a « protégé » la bactérie hôte en modifiant radicalement l'environnement dans lequel l'infection a lieu d'ordinaire, le mucus intestinal, comme ce qui a été observé dans les expériences de colonisation courte entre les jours 4 et 7. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'il n'est pas observé de sélection positive de bactéries guéries du prophage Shimadzu et résistantes à l'infection par le mutant *Shi-vir*, contrairement à ce qui est

observé dans la cage DSS 2 (Figure 31a). Cela constitue une preuve indirecte qu'il n'y a pas eu de prédation prolongée de *R. intestinalis* par le mutant Shi-*vir*.

Le choix de raccourcir l'exposition des souris à *R. intestinalis* avant traitement au DSS n'a pas permis de s'affranchir d'une « épidémie » à Shi-*vir*, et il est intrigant d'observer l'apparition d'un phage mutant Shi-*vir* si tôt après la colonisation de *R. intestinalis*, comparé aux expériences montrées dans le chapitre 5. Comme décrit dans ce qui suit, cette apparition prématurée pourrait venir du fait que la souche *evo1* utilisée dans ces souris est double lysogène, avec un phage présentant déjà quelques mutations dans la région de régulation de la lysogénie, permettant éventuellement l'acquisition plus rapide du phénotype virulent.

Il faut enfin souligner que la présence de *R. intestinalis* dans les fèces est toujours fortement anti-corrélée avec la quantité de lipocaline-2 détectée. Cela conforte le statut de *R. intestinalis* comme bactérie ayant de fortes capacités anti-inflammatoires. Celle-ci pourrait donc servir de probiotique dans le traitement de maladies inflammatoires intestinales. Le fait d'avoir obtenu un clone guéri du phage Shimadzu et même résistant à celui-ci fait de ce clone un probiotique de choix, puisqu'il aura plus de chances de rester stable dans la flore intestinale de l'hôte. Nous sommes donc en train de déposer un brevet pour l'utilisation de ce clone de *R. intestinalis* dans le traitement de pathologies intestinales inflammatoires.

### 6.3 Séquençage d'isolats de *R. intestinalis*

Comme décrit dans le chapitre 5, nous avons isolé des clones de *R. intestinalis* venant des fèces de souris collectés lors de nos expériences, à différents stades de la colonisation. Dix de ceux-ci ont été séquencés : deux clones lysogènes isolés de souris différentes au jour 28 de la colonisation, appelés *evo1* (qui a servi pour les expériences d'inflammation au DSS chez les souris, lors des colonisations courtes avec *R. intestinalis*) et *EVO2* ; cinq clones guéris du prophage Shimadzu, appelés  $\Delta 1$  (appelée *evo3* dans le chapitre 5),  $\Delta 2$  (*evo2*),  $\Delta 3$ ,  $\Delta 4$  (*evo4*) et  $\Delta J19$  (*evo5*), tous été isolés de souris différentes au jour 28 de la colonisation, à l'exception de  $\Delta J19$  isolé au jour 19. Enfin, 3 clones issus de l'expérience décrite au chapitre 6, paragraphe 1, issus de la cage DSS 3, isolés de la même souris au jour 28, appelés Ind1, Ind2, Ind3. Ces trois clones sont lysogènes pour Shimadzu. Une partie des résultats du séquençage a été présentée au chapitre 5 (nomenclature *evo1* à 5).

Les clones ont été séquencés par la compagnie GATC avec la technologie Illumina. Pour l'analyse des clones, le programme d'analyse des variants du site <https://www.patricbrc.org/> a été utilisé. L'analyse a été effectuée avec les programmes BWA-MEM pour l'alignement des reads et Freebayes pour la recherche de SNPs. Sur ce site, les paramètres de BWA-MEM et Freebayes ne sont pas modifiables, néanmoins, il permet une prise en main simple et rapide pour analyser les séquences. La recherche de SNPs ne permettant pas de détecter les INDELS dépassant quelques paires de bases. Les délétions et réarrangements chromosomiques ont été recherchés manuellement, en visualisant les

projections des reads sur le génome de référence au moyen de Tablet (Milne et al 2013). Enfin, la détection de l'incorporation de nouveaux spacers dans les régions CRISPR-Cas passait encore à travers les mailles de ces deux niveaux d'analyse. Cependant, une analyse effectuée par GATC sur un draft du génome de *R. intestinalis* a permis de fournir cette information.

Le Tableau 5 présente le nombre de mutations détectées par ces différents niveaux d'analyse.

Nom clone (cage origine)	#mutations détectées	#mutations non synonyme	Remarque supplémentaire
EVO1 (Contrôle 2)	53	44	Di-lysogène pour Shimadzu
EVO2 (Cage DSS 2)	118	95	
$\Delta$ 1 (Contrôle 3)	40	33	
$\Delta$ 2 (Contrôle 2)	38	31	Spacer anti-Shimadzu
$\Delta$ 3 (Cage DSS 3)	192	139	
$\Delta$ 4 (Contrôle 3)	54	41	
$\Delta$ J19 (Contrôle 1)	39	33	
Ind1 (Cage DSS3)	42	35	
Ind2 (Cage DSS3)	41	34	
Ind3 (Cage DSS3)	39	32	

**Tableau 5** : liste des isolats de *R. intestinalis* séquencés. Sont indiqués les cages d'origine, et le nombre total de mutations et mutations non synonymes détectées par l'analyse de variant, la présence de duplication de Shimadzu, et de spacers CRISPR supplémentaires.

Pour rappel, les trois clones Ind sont issus de la même souris, de la cage DSS 3 où il est proposé que le DSS a protégé de l'épidémie à Shi-*vir* (voir plus haut). A cause de cette origine commune, les mutations observées dans ces clones seront traitées à part des autres. En effet, un effet de fondation peut générer de nombreuses mutations communes, ayant pour origine le premier clone bactérien ayant colonisé la souris.

Les mutations communes à plusieurs des 10 souches séquencées sont analysées au Tableau 6. Aucune mutation commune à tous les clones séquencés n'a pu être observée. Ceci suggère que *R. intestinalis* n'a pas besoin de mutation génétique particulière pour s'adapter à l'environnement intestinal de la souris, et que la régulation génétique suffit à l'adaptation de la bactérie à son environnement.

	Mutants $\Delta$ shi (5 clones)	Mutants EVO (2 clones)	Mutants Ind (3 clones)
Mutations identiques dans tous les isolats de la série.	Two-component system sensor histidine kinase : (TA -> TCA)  MsmE : I351T	MsmE : (Y421C ; I341T)	∅
Gènes mutés (avec différentes mutations) communs à la série issus de souris et/ou cages différentes	MsmE : <b><math>\Delta</math>1</b> (A229G); <b><math>\Delta</math>3</b> (A229G;Y425C;Y421C); <b><math>\Delta</math>4</b> (A229G; W432G); <b><math>\Delta</math>J19</b> (R174G)	MsmE : <b>evo1</b> (Q347R; R173C) ; <b>EVO2</b> (Y425C; S246G)  Gène FIG01020059 (putative ABC transporteur) : <b>evo1</b> (Frameshift, stop prématuré : 642 acides aminés - > 379) ; <b>EVO2</b> (Frameshift, stop prématuré 642 acides aminés - > 126)	N.D
Gènes mutés avec mutants issus de la même souris			-hypothetical protein x3 -non coding region x3 -D-mannonate oxidoreductase -Beta-phosphoglucomutase -Alpha-1,4-N-acetylgalactosamine transferase PglH -Molybdopterin dehydrogenase, FAD-binding subunit -Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain -SPOIID HOMOLOG -DUF 1745 -Oxaloacetate decarboxylase beta chain - Choloylglycine hydrolase -Sirohydrochlorin cobaltochelatase CbiK -Sensor histidine kinase -Aldose 1-epimerase -Replicative DNA helicase (DnaB)
Mutation unique à 1 clone d'une série, intéressante au regard des autres mutations.		<b>evo1</b> : 3 mutations dans la région régulatrice de Shimadzu (Op1 et Op3)	<b>Ind2</b> :MsmE (I351T ; A229G)

**Tableau 6** : tableau récapitulatif des mutations observées dans les différents mutants, en fonction de leur phénotype.

Les trois souches Ind présentent dix-neuf mutations communes (Tableau 6). Aucune des mutations observées ne semble expliquer par elle-même la disparition abrupte de la population de Shimadzu dans les souris. Comme décrit plus haut, l'hypothèse la plus probable est que le DSS a eu un effet protecteur.

Tous les clones (EVO et  $\Delta$ shi) ayant été exposés à Shi-*vir* possèdent une mutation commune dans le gène *msmE*, (I341T). De plus, le clone EVO2 possède une mutation dans le gène *scrR*, répresseur putatif de l'opéron *msm*. Enfin, si deux des trois clones Ind ne présentent pas de mutation dans ce gène, le troisième clone (Ind2) présente la mutation commune dans le gène *msmE* (I341T), ainsi qu'une seconde (Tableau 6). MsmE est une lipoprotéine impliquée dans le transport de sucre chez *Streptococcus mutans* (Sutcliffe et al 1993). Une prédiction de structure effectuée avec Phyre2, confirme la présence d'un domaine transmembranaire dans ce transporteur (Kelley et al 2015). Cette protéine est donc bien située pour servir de récepteur au phage.

A ce jour, un nombre très restreint de phages infectant une espèce à Gram + possèdent une protéine membranaire comme récepteur (Geller et al 1993, Sao-Jose et al 2004), la majorité reconnaissant plutôt des éléments de la surface cellulaire (polysaccharide, etc..). Dans la cage DSS3, la prédation par le phage Shi-*vir* a très peu duré, probablement à cause du traitement DSS. Cette protection a eu pour conséquence de ne pas favoriser la séquence d'événements aboutissant à l'émergence des mutants  $\Delta$ shi portant un spacer anti-Shimadzu, comme vu précédemment (Figure 31 a). Il est probable que cette absence de sélection naturelle a limité la première étape de cette séquence, la propagation des mutants *msmE* dans la cage DSS3. Ces éléments nous poussent donc à faire l'hypothèse que le gène *msmE* serait le récepteur du phage Shimadzu. Le faible nombre de mutations dans l'allèle *msmE* de  $\Delta$ 2, résistante grâce au CRISPR, comparé à d'autres souches, renforce cette idée, car celle-ci n'a pas eu besoin de faire évoluer davantage *msmE*, vu la résistance à l'infection accordée par le CRISPR. Enfin, un grand nombre d'allèles ont observées pour la région VR de Shimadzu suite au séquençage des phages extrait de souris, (Chapitre n°5). Le gène touché encode une protéine de fibre de queue. Cette protéine est généralement impliquée dans la reconnaissance du récepteur. Il est tentant d'imaginer ici une course à l'armement entre les bactéries ayant le gène du récepteur muté pour échapper à l'infection du phage Shimadzu, et les phages faisant varier leurs protéines de reconnaissance du récepteur afin de supprimer résistance bactérienne à l'infection.

Parmi les autres mutations communes à plusieurs clones, il faut enfin signaler que les deux clones EVO ont une mutation dans un gène qui coderait un ABC transporteur, et que les cinq clones  $\Delta$  ont une mutation de changement de cadre de lecture dans la kinase d'un système à deux composants (Tableau 6).

# Conclusion

Les phages jouent un rôle important dans l'équilibre de nombreux écosystèmes microbiens, mais ce rôle reste encore très peu documenté dans l'environnement intestinal humain. La communauté phagique de cet environnement est particulière, il s'agit en effet d'un des rares environnements où les phages tempérés sont aussi abondants que les phages virulents. Plusieurs modèles d'interaction phage-bactérie ont déjà été proposés et le modèle du *molecular time bomb* apparaît comme étant l'un des plus attrayants pour décrire les interactions phage bactérie dans le tube digestif, dans le cadre des dysbioses (De Paepe et al 2014b, Mills et al 2013). Néanmoins, à l'heure actuelle, l'impact des phages tempérés sur la stabilité de leur bactérie intestinale hôte reste encore pleinement à démontrer et plusieurs questions demeurent. Des travaux précédents au sein de de l'équipe suggèrent que la lysogénie constitue un facteur négatif pour la survie des bactéries intestinales (De Paepe et al 2016). Cette observation est-elle généralisable à d'autres couples phages-bactéries ? Les prophages sont-ils en général des facteurs négatifs pour la survie de leur hôte dans l'environnement intestinal ? Nos travaux suggèrent que l'inflammation intestinale influence l'activité des prophages ; le stress inflammatoire, en augmentant le nombre de cassure ADN dans les chromosomes bactériens déclencherait la réponses SOS et aboutirait à l'induction des prophages chez Salmonelle (Diard et al 2017). Ces observations posent donc la question de l'induction des phages d'espèces bactériennes dominantes et importantes pour l'équilibre de la flore intestinale en situation inflammatoire.

Pour tenter de trouver une réponse à ces questions, nous avons choisi d'étudier l'induction des prophages de bactéries intestinales dominantes de la flore humaine dans un modèle de souris gnotobiotiques, avec ou sans inflammation intestinale. Le projet prévoyait initialement d'étudier une flore simplifiée avec cinq souches bactériennes, mais les expériences préliminaires ont révélé que les phages qui nous intéressent ne sont pas détectables dans ce modèle car leurs hôtes bactériens ont des niveaux de populations trop bas. Par conséquent, nous avons limité notre étude à des souris colonisées par deux souches, *E. coli* LF82 et soit *R. intestinalis*, soit *F. prausnitzii*. L'étude de l'activité des prophages s'est faite à la fois dans des conditions intestinales standards, pour étudier l'impact à long terme des prophages de ces espèces sur leurs hôtes, et dans des conditions d'inflammation intestinale induite par l'addition de DSS dans l'eau de boisson des souris. Malheureusement le DSS a un effet direct négatif sur les phages, ce qui ne permet pas de conclure quant au rôle de l'inflammation intestinale dans l'induction des prophages. Cette question reste donc ouverte, et une perspective directe de mon travail est de trouver le modèle animal inflammatoire approprié pour y répondre. Idéalement, il faudrait un modèle mimant l'inflammation intestinale observée chez les patients atteints de MICI, mais ne faisant pas intervenir de DSS.

## La validité du modèle DSS

Au cours de ce travail de thèse, le DSS a été utilisé comme inducteur chimique d'une colite chez la souris. Le traitement au DSS est probablement la méthode de choix chez les rongeurs, car simple d'application et reproductible. Les différents résultats obtenus pour la flore simplifiée *R. intestinalis*/*E.coli* suggèrent que le modèle inflammatoire en DSS est le moins pertinent pour étudier les interactions phages-bactéries dans le tube digestif. Tout d'abord, le DSS semble avoir un effet déstabilisant sur la stabilité du virion de Jekyll, ou la production de celui-ci. Ensuite, cet agent chimique agit en dissolvant le mucus intestinal, qui est le lieu de résidence de bactéries comme *R. intestinalis*. *R. intestinalis* est une bactérie colonisant le mucus, la perturbation de cet environnement de la bactérie pourrait altérer fortement les interactions entre Shimadzu et *R. intestinalis*. Cela expliquerait en partie pourquoi le DSS semble protéger *R. intestinalis* de la propagation du phage mutant Shi-*vir* dans les expériences où *R. intestinalis* est inoculé à la souris quelques jours seulement avant l'addition de DSS dans l'eau de boisson des souris. Il ressort de ces travaux de thèse que le modèle DSS demeure probablement utilisable pour étudier des interactions phage-bactérie en situation inflammatoire mais requiert à l'évidence d'effectuer des contrôles au préalable. Il convient de vérifier que le DSS n'affecte pas la stabilité et/ou la production des particules virales et qu'il ne perturbe pas les interactions entre le phage et sa bactérie hôte dans l'environnement intestinal.

## Les prophages : des facteurs négatifs de la survie bactérienne dans l'environnement intestinal ?

Nos analyses des souris colonisées avec la souche de *F. prausnitzii*, n'ont pas permis d'observer un effet négatif des prophages de cette souche sur sa stabilité. La souche de *F. prausnitzii* héberge deux prophages, Mushu et Lagaffe, mais seule la population de Mushu peut-être mesurée dans les fèces de souris, la population du phage Lagaffe étant en dessous du seuil de détection. La production du phage Mushu dans l'environnement intestinal s'avère comparable à celle observée *in vitro*, contrairement à ce qui a été observé chez *E. coli* avec le phage  $\lambda$ , où l'induction du prophage est augmentée dans l'environnement intestinal (De Paepe et al 2016). Cependant, il faut garder à l'esprit que les concentrations de phages libres ne reflètent pas les taux d'inductions, et il reste donc possible que les prophages de *F. prausnitzii* soient plus induits dans le tube digestif de souris qu'*in vitro*. Il faut aussi noter que malgré toutes les précautions prises, il reste toujours un peu d'oxygène dans l'environnement de croissance de *F. prausnitzii in vitro*, ce qui fait que ces bactéries y sont soumises à un niveau basal de stress oxydant qui peut participer à l'induction des prophages, et donc conduire à surestimer les taux de virions produits.

Les analyses effectuées sur les souris colonisées par *R. intestinalis* illustrent le rôle plus important que peut avoir un prophage sur la population bactérienne hôte. Si la production du phage Jekyll est stable durant les 33 jours qu'a duré l'expérience, avec une concentration de virions comparable à celle observée *in vitro*, le prophage Shimadzu est quant à lui le parfait exemple d'un

phage tempéré délétère pour la stabilité de son hôte dans l'environnement intestinal. Cet effet n'est pas, contrairement à notre hypothèse initiale, dû à une augmentation de l'induction du prophage dans l'intestin. C'est l'émergence d'un mutant virulent de Shimadzu (*Shi-vir*), capable de surpasser l'immunité à la surinfection, qui conduit à une lyse massive de la population de *R. intestinalis*. Dans un deuxième temps, l'émergence de bactéries résistantes *via* l'incorporation d'un spacer dirigé contre Shimadzu dans son système CRISPR-cas permet la restauration du niveau initial de population bactérienne.

Nous pouvons faire l'hypothèse que ces événements sont possibles car il n'y a pas ici de compétiteur de niche pour *R. intestinalis*. Dans le cas d'une flore plus complexe, il est possible qu'une autre espèce résistante au phage, aurait occupé la niche libérée par la lyse bactérienne, rendant plus difficile *pour R. intestinalis* de retrouver sa population initiale, et créant ainsi une dysbiose plus durable. Cependant, inversement, il est aussi possible que dans un environnement plus complexe, un mutant virulent de Shimadzu ne serait pas apparu. Une perspective directe de mon travail serait donc d'étudier la co-évolution de *R. intestinalis* et Shimadzu dans un écosystème plus complexe pour trancher entre ces diverses possibilités.

La mutation d'un phage tempéré qui devient virulent et génère une très forte mortalité bactérienne a déjà été observée dans certains environnements, comme par exemple dans les fermenteurs utilisés par l'industrie laitière (Maria L. Capra 2010, Mercanti et al 2011, Shimizu-Kadota et al 2000). Il était jusqu'à présent considéré que ce type de phénomène ne se produisait que dans les fermenteurs industriels du fait de leurs volumes très importants et des longs temps de propagation, deux facteurs qui augmentent considérablement la probabilité d'apparition d'une mutation. Il s'agit ici de la première observation de ce type dans un environnement intestinal, abritant de bien plus petites quantités de bactéries que les fermenteurs industriels (un tube digestif de souris contient environ 1 gramme de contenu intestinal, soit une biomasse d'environ  $10^{10}$  bactéries dans notre système). Le prophage Shimadzu apparaît donc comme délétère pour son hôte bactérien dans l'environnement intestinal sur le long terme, suggérant que ce phénomène doit se passer régulièrement dans un tube digestif. Il faut noter cependant que ceci ne peut être généralisé à l'ensemble des prophages car sur les 4 couples phage-bactérie étudiés pendant ma thèse, nous ne sommes parvenus à cette observation que pour un seul d'entre eux. Actuellement, nous ne pouvons pas proposer de raisons expliquant pourquoi l'apparition de mutants survient dans certains prophages et pas dans d'autres.

L'observation de l'émergence du mutant virulent *Shi-vir* permet de proposer un nouveau modèle d'interactions phage-bactérie dans le tube digestif, que je propose de nommer *genetic time bomb*. Ce modèle est intermédiaire entre le *molecular time bomb* et le modèle du *kill the winner*. Il prédit que l'évolution d'un prophage actif vers la virulence est un phénomène suffisamment fréquent dans l'environnement intestinal pour impacter les populations bactériennes. La fréquence d'apparition du mutant en question dépend de la fréquence de mutation du prophage, et du nombre



de base à muter pour obtenir le phénotype désiré, ce qui varie selon les phages (Bailone & Devoret 1978). La notion de bombe à retardement vient du fait que la mutation en question arrivera inexorablement, au bout d'un certain nombre de divisions cellulaires. La génération d'un mutant virulent va ensuite soumettre la bactérie à une prédation par le phage devenu virulent, comme dans le modèle *kill the winner*. Plus une population bactérienne est importante, plus la probabilité d'émergence du mutant virulent est forte. De plus, cette fréquence est augmentée par l'induction spontanée du prophage, un phage possédant lors du cycle lytique un taux de mutation en général 100 fois plus élevé que celui de son hôte bactérien. En considérant les fortes populations bactériennes et phagiques qui peuplent l'intestin, en particulier en ce qui concerne les espèces dominantes, ce phénomène pourrait survenir très régulièrement et ainsi expliquer une part de la forte variabilité intra individuelle dans la composition microbiote intestinal.

Par ailleurs, cette observation a des implications concernant l'utilisation de bactéries comme probiotique. A la lumière de nos observations sur l'impact potentiel de certains prophages dans l'environnement intestinal, il apparaît nécessaire de le prendre en considération dans le choix des bactéries probiotiques. Afin de préserver au mieux la viabilité de ces dernières dans l'intestin, l'utilisation de souches guéries de leurs prophages, avec des capacités de résistance à l'infection améliorées, est à envisager. A la suite de ces travaux sur *R. intestinalis*, nous avons décidé avec H. Sokol, de l'équipe probihôte, de breveter l'utilisation de la souche de *R. intestinalis*  $\Delta$ shi pourvue d'un spacer anti-Shimadzu pour traiter des pathologies inflammatoires intestinales. En effet, les probiotiques classiques sont sans effets sur ces maladies, actuellement sans traitement satisfaisant, et le développement de probiotiques dits de « nouvelle génération » pour traiter les MICI, est en plein essor.

### **L'inflammation intestinale induit-elle les prophages d'espèces bactériennes clés comme *R. intestinalis* et *F. prausnitzii* ?**

Dans l'introduction, nous avons émis l'hypothèse que les espèces clés du microbiote intestinal voyaient leurs prophages induits par des stress inflammatoires. Cette hypothèse s'appuyait sur des données bibliographiques qui montraient qu'il y a plus de particules virales chez les patients souffrants de MICI et que la diversité phagique est accrue dans les viromes de ces patients MICI (Norman et al 2015). Ce modèle proposait ainsi un rôle des phages tempérés dans les MICI. Pour les deux microbiotes intestinaux simplifiés que nous avons testés dans le cadre d'inflammations déclenchées au DSS, aucun résultat reproductible n'est venu appuyer cette hypothèse, mais, comme expliqué précédemment, cela pourrait être due à un effet antagoniste direct du DSS sur la multiplication des phages

Néanmoins, grâce aux nouvelles souches de *F. prausnitzii* séquencées par nos collaborateurs, nous avons pu découvrir un grand nombre de prophages jusqu'ici inconnus, que nous avons

recherchés dans des viromes fécaux d'individus sains et de patients atteints de MICI (Norman et al 2015). Les phages de *F. prausnitzii* ont ainsi été détectés dans un grand nombre de viromes. Pour certains de ces phages, il a pu être établi qu'ils étaient statistiquement plus souvent présents chez les patients atteints de MICI (deux phages du type Lugh). De plus, dans les viromes de patients souffrants de MICI, des reads correspondant aux phages Epona et LughL2/6 sont statistiquement plus abondant que dans les viromes de patients sains. Cette étude globale montre une tendance de fond, à savoir qu'il y aurait une plus forte concentration de phages de *F. prausnitzii* dans le virome de patients atteints de MICI. Or, il se trouve que les dysbioses intestinales caractéristiques des MICI se traduisent justement par des populations de *F. prausnitzii* plus faibles qu'elles ne le sont chez les patients sains. Ces observations suggèrent une élévation du ratio phage/bactérie chez les patients MICI. Ce travail renforce les suspicions que les phages tempérés jouent bien un rôle dans le déclenchement et/ou le maintien des dysbioses intestinales liées aux MICI.

### **Adaptation des phages à l'environnement intestinal**

Dans ce travail, il a été montré que la mortalité bactérienne associée à la multiplication du phage mutant Shi-*vir* a permis la sélection de bactéries résistantes qui ont ainsi émergé au sein de la population bactérienne. Il est intéressant de noter que cette observation n'est pas systématique dans des études comparables à la nôtre (Chibani-Chennoufi et al 2004, Maura et al 2012, Reyes et al 2013). Dans celles-ci, malgré la preuve que les phages utilisés lysaient la bactérie hôte et se multipliaient dans l'environnement intestinal, la majorité des clones bactériens ensuite isolés restait sensibles à l'infection par les phages utilisés, montrant que dans ces études les phages utilisés ne se sont pas multipliés suffisamment pour créer une pression de sélection positive des clones résistants. Il a été envisagé que la structure particulière de l'environnement intestinal permettait de protéger un grand nombre de bactéries de l'infection par le phage. Dans notre étude, la très forte concentration de *R. intestinalis* dans l'environnement intestinal a peut-être permis la multiplication du phage au-delà d'un seuil critique. Cette plus grande capacité de multiplication du phage Shimadzu dans l'environnement intestinal peut également provenir de la présence d'un DGR dans son génome. Ce mécanisme, qui permet de créer à haute fréquence des mutants pour une protéine particulière du virion.

Nous avons pu prédire l'existence d'un très grand nombre de prophages chez les Clostridiales. Ce fort taux de lysogénie chez les Firmicutes intestinaux est en accord avec les résultats d'une autre étude effectuée sur le microbiote de souris conventionnelles (Kim 2018). L'analyse des prophages que nous avons identifiés a révélé la très grande prévalence du mécanisme DGR au sein de leurs génomes en comparaison des phages isolés dans d'autres environnements et disponibles dans les banques de données. Une étude portant sur des viromes humains a pareillement noté une forte prévalence de DGR dans les contigs analysés (Minot et al 2012). Or ces systèmes sont très rares si l'on considère l'ensemble des phages entièrement séquencés. Le système DGR semble donc se retrouver

préférentiellement dans les génomes de phages tempérés associés à des bactéries de l'environnement intestinal. Ces observations suggèrent clairement une sélection positive des phages ayant ce mécanisme dans l'environnement intestinal, montrant ainsi une adaptation spécifique des phages à l'environnement intestinal et/ou aux bactéries colonisant l'intestin.

Différentes familles de protéines peuvent être visées par le DGR. Dans ce travail, nous avons pu définir la fonction de deux gènes modifiés par le DGR, l'un d'eux code une protéine appartenant à la famille de protéine Hoc et l'autre code une protéine de fibre de queue de phage.

La protéine Hoc est une protéine de décoration de la capsid virale dont il a récemment été démontré qu'elle permettait l'adhésion du phage au mucus intestinal (Barr et al 2013). Les auteurs ont proposé un modèle nommé *bacteriophage adhering to mucus* (BAM). Dans ce modèle, étant donné qu'une grande partie des bactéries intestinales colonisent la partie supérieure du mucus, les phages étant capables d'y adhérer via la protéine Hoc auraient plus de chances de rencontrer leurs hôtes. Pour le phage Mushu, nous avons pu montrer grâce au séquençage du surnageant de culture de la souche de *F. prausnitzii* A2-165 que le DGR était extrêmement actif sur la protéine Hoc du phage. Cette observation suggère que le phage tire probablement un avantage évolutif à pouvoir former autant de variants de sa protéine Hoc.

Le cas de la fibre de queue renvoie directement aux premières études décrivant le mécanisme de DGR. Dans ce cas-ci la création de variants de fibre de queue accroît les capacités du phage à s'adapter à des mutations de son hôte ou à élargir son spectre d'hôte (Guo et al 2008). Dans mon travail, le séquençage de plusieurs isolats de *R. intestinalis* isolés de souris a permis d'observer un même gène muté dans un grand nombre de clones. Il s'agit du gène *msmE*, et l'hypothèse est faite que le transporteur membranaire codé par ce gène serait le récepteur du phage Shimadzu. Les clones présentent tous des patterns de mutations différents dans le gène. Dans le même temps, on note une très forte variabilité des reads relatifs à la région variable du DGR après séquençage des phages issus des fèces des mêmes souris. Ceci suggère une sélection positive de phages ayant modifié leurs protéines de fibres et témoignerait potentiellement d'une course à l'armement entre la bactérie et le phage. Le phage Shimadzu, fait qui plus est, partie de la même famille que le phage Lagaffe infectant *F. prausnitzii*. Nous avons montré au cours de ces travaux de thèse que ce prophage était polyvalent en étant capable d'infecter deux espèces bactériennes éloignées, à savoir *F. prausnitzii* et *Blautia hansenii*. Le DGR, qui permet de générer un nombre élevé de nouveaux variants du phage et qui permettrait au phage Shimadzu de s'adapter plus rapidement aux mutations de son hôte, pourrait également générer des mutants de Lagaffe capables d'infecter de nouvelles espèces bactériennes. Une étude récente a démontré qu'un phage de *E. coli*, infectant la souche LF82, avait besoin d'infecter une souche intermédiaire avant de pouvoir générer des virions capables d'infecter la souche MG1655 (De Sordi et al 2017). Cette observation soutient l'idée que ce phage opère des changements d'hôte par petits bonds évolutifs. La présence du DGR dans le génome d'un phage pourrait lui permettre d'augmenter la taille de ces bonds évolutifs en limitant l'infection d'hôtes intermédiaires.

Quelle que soit la raison de la forte multiplication de Shimadzu, nos résultats illustrent qu'il est essentiel de réaliser des études avec des bactéries appartenant aux clades dominants dans le microbiote intestinal pour évaluer l'impact des phages sur les dysbioses.

### **Exploration de la *dark matter* virale de l'intestin**

Avec les approches omiques, l'un des obstacles majeurs pour la compréhension des interactions phage-bactérie dans l'intestin réside dans la difficulté à déterminer l'hôte bactérien correspondant aux séquences virales obtenues par séquençage. Un autre obstacle est le biais des banques de données de référence vis à vis des génomes phagiques. 75% des phages présents dans la banque de données du NCBI sont des phages de Proteobacteries ou de pathogènes humains, ce qui n'est absolument pas représentatif des populations bactériennes intestinales. Même si ce n'était pas son objectif premier, ce travail de thèse a permis de décrire l'existence d'un nombre important de phages résidant dans l'environnement intestinal et ainsi d'enrichir les banques de données publiques. Des phages de *F. prausnitzii* et *R. intestinalis*, ont été retrouvés dans 10 à 40% des viromes intestinaux humains testés. En considérant qu'une part non négligeable du virome intestinal est constituée de phages tempérés, la recherche de prophages dans les génomes de bactéries intestinales est un moyen efficace pour remonter à l'hôte. Cette approche, néanmoins limitée par la qualité de l'assemblage des génomes bactériens (Kim 2018), est parfaitement complémentaire des approches métagénomiques et permet d'améliorer l'utilisation des données de séquençage.

### **Conclusion générale**

Ce travail avait pour objectif d'étudier l'impact des phages tempérés sur le microbiote intestinal humain. A travers l'ensemble des expériences et résultats, nous avons pu renforcer l'idée que les phages sont des acteurs importants de la composition du microbiote intestinal, que ce soit en contrôlant les populations bactériennes, ou en accélérant l'évolution des bactéries qu'ils infectent. Par ces actions, les phages contribueraient à façonner le microbiote intestinal de l'hôte, participant alors à la santé de l'organisme hébergeant le microbiote en question.

# Références bibliographiques

- Ackermann HWD, M.S. 1987. Virus of Prokaryotes. *CRC PRESS*. 1
- Adriaenssens EM, Edwards R, Nash JH, Mahadevan P, Seto D, et al. 2015. Integration of genomic and proteomic analyses in the classification of the Siphoviridae family. *Virology* 477: 144-54
- Akerlund T, Nordstrom K, Bernander R. 1995. Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177: 6791-7
- Alam M, Midtvedt T, Uribe A. 1994. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand J Gastroenterol* 29: 445-51
- Albenberg L, Esipova TV, Judge CP, Bittinger K, Chen J, et al. 2014. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology* 147: 1055-63 e8
- Allen HK, Looft T, Bayles DO, Humphrey S, Levine UY, et al. 2011. Antibiotics in feed induce prophages in swine fecal microbiomes. *MBio* 2
- Alves de Matos APL, P.; Timoteo, A.; Roxo-Rosa, M. . 2013. Comparison of induction of B45 *Helicobacter pylori* prophage by acid and UV radiation. *Microscopy and microanalysis* 19: 27-28
- Aminov RI, Walker AW, Duncan SH, Harmsen HJ, Welling GW, Flint HJ. 2006. Molecular diversity, cultivation, and improved detection by fluorescent in situ hybridization of a dominant group of human gut bacteria related to *Roseburia* spp. or *Eubacterium rectale*. *Appl Environ Microbiol* 72: 6371-6
- Ananthakrishnan AN. 2015. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12: 205-17
- Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, et al. 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 44: W16-21
- Arndt D, Marcu A, Liang Y, Wishart DS. 2017. PHAST, PHASTER and PHATEST: Tools for finding prophage in bacterial genomes. *Brief Bioinform*
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473: 174-80
- Asadulghani M, Ogura Y, Ooka T, Itoh T, Sawaguchi A, et al. 2009. The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. *PLoS Pathog* 5: e1000408
- Avery OT, C.M. Macleod, and M. McCarty. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal serotypes: inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. . *The Journal of Experimental Medicine* 79: 137-57
- Avlund M, Krishna S, Semsey S, Dodd IB, Sneppen K. 2010. Minimal gene regulatory circuits for a lysis-lysogeny choice in the presence of noise. *PLoS One* 5: e15037
- Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, et al. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15718-23
- Baek K, Svenningsen S, Eisen H, Sneppen K, Brown S. 2003. Single-cell analysis of lambda immunity regulation. *J Mol Biol* 334: 363-72
- Baess I. 1971. Report on a pseudolysogenic mycobacterium and a review of the literature concerning pseudolysogeny. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* 79: 428-34
- Bai L, Wang J, Hurley D, Yu Z, Wang L, et al. 2017. A novel disrupted *mcr-1* gene and a lysogenized phage P1-like sequence detected from a large conjugative plasmid, cultured from a human atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) recovered in China. *J Antimicrob Chemother* 72: 1531-33
- Bailone A, Devoret R. 1978. Isolation of ultravirulent mutants of phage lambda. *Virology* 84: 547-50

- Baluch JS, R. 1978. Correlation between UV dose requirement for lambda bacteriophage induction and lambda repressor concentration. *J Virol* 26: 595-602
- Banks DJ, Lei B, Musser JM. 2003. Prophage induction and expression of prophage-encoded virulence factors in group A Streptococcus serotype M3 strain MGAS315. *Infect Immun* 71: 7079-86
- Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantscheff P, et al. 2007. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 117: 1566-74
- Barondess JJ, Beckwith J. 1995. bor gene of phage lambda, involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. *J Bacteriol* 177: 1247-53
- Barr JJ. 2017. A bacteriophages journey through the human body. *Immunological Reviews* 279: 106-22
- Barr JJ, Auro R, Furlan M, Whiteson KL, Erb ML, et al. 2013. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 10771-6
- Barr JJ, Auro R, Sam-Soon N, Kassegne S, Peters G, et al. 2015. Subdiffusive motion of bacteriophage in mucosal surfaces increases the frequency of bacterial encounters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 13675-80
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, et al. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709-12
- Belfort MW, D. 1974. The roles of the lambda c3 gene and the Escherichia coli catabolite gene activation system in the establishment of lysogeny by bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 779-82
- Benevides L, Burman S, Martin R, Robert V, Thomas M, et al. 2017. New Insights into the Diversity of the Genus Faecalibacterium. *Front Microbiol* 8: 1790
- Bensing BA, Siboo IR, Sullam PM. 2001. Proteins PblA and PblB of Streptococcus mitis, which promote binding to human platelets, are encoded within a lysogenic bacteriophage. *Infect Immun* 69: 6186-92
- Berkowitz L, Schultz BM, Salazar GA, Pardo-Roa C, Sebastian VP, et al. 2018. Impact of Cigarette Smoking on the Gastrointestinal Tract Inflammation: Opposing Effects in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Front Immunol* 9: 74
- Bertani GW, J. J. 1953. Host controlled variation in bacterial viruses. *J Bacteriol* 65: 113-21
- Bibiloni R, Mangold M, Madsen KL, Fedorak RN, Tannock GW. 2006. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *J Med Microbiol* 55: 1141-9
- Billard-Pomares T, Fouteau S, Jacquet ME, Roche D, Barbe V, et al. 2014. Characterization of a P1-like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum beta-lactamase from an Escherichia coli strain. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 6550-7
- Bille E, Meyer J, Jamet A, Euphrasie D, Barnier JP, et al. 2017. A virulence-associated filamentous bacteriophage of Neisseria meningitidis increases host-cell colonisation. *PLoS Pathog* 13: e1006495
- Bobay LM, Rocha EP, Touchon M. 2013. The adaptation of temperate bacteriophages to their host genomes. *Mol Biol Evol* 30: 737-51
- Bobay LM, Touchon M, Rocha EP. 2014. Pervasive domestication of defective prophages by bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 12127-32
- Bohannon BJML, R. E. 1997. Effect of resource enrichment on a chemostat community of bacteria and bacteriophage. *Ecology society of america* 78: 2303-15
- Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, Henderson N, Jay M, et al. 2016. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med* 8: 343ra82
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151: 2551-61
- Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. 2013. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature* 493: 429-32

- Bondy-Denomy JD, A. R. 2014. When a virus is not a parasite: the beneficial effects of prophages on bacterial fitness. *J Microbiol* 52: 235-42
- Bonemann G, Pietrosiuk A, Mogk A. 2010. Tubules and donuts: a type VI secretion story. *Mol Microbiol* 76: 815-21
- Bossi L, Fuentes JA, Mora G, Figueroa-Bossi N. 2003. Prophage contribution to bacterial population dynamics. *J Bacteriol* 185: 6467-71
- Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. 1999. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* 67: 4499-509
- Bouvier TDG, P. A. 2007. Key role of selective viral-induced mortality in determining marine bacterial community composition. *Environ Microbiol* 9: 287-97
- Boyd EF. 2012. Bacteriophage-encoded bacterial virulence factors and phage-pathogenicity island interactions. *Adv Virus Res* 82: 91-118
- Boyer F, Fichant G, Berthod J, Vandenbrouck Y, Attree I. 2009. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics* 10: 104
- Breitbart M, Haynes M, Kelley S, Angly F, Edwards RA, et al. 2008. Viral diversity and dynamics in an infant gut. *Res Microbiol* 159: 367-73
- Breitbart MR, F. 2005. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol* 13: 278-84
- Breton J, Tennoune N, Lucas N, Francois M, Legrand R, et al. 2016. Gut Commensal *E. coli* Proteins Activate Host Satiety Pathways following Nutrient-Induced Bacterial Growth. *Cell Metab* 23: 324-34
- Brockhurst MA, Morgan AD, Fenton A, Buckling A. 2007. Experimental coevolution with bacteria and phage. The *Pseudomonas fluorescens*–Phi2 model system. *Infect Genet Evol* 7: 547-52
- Brockhurst MA, Rainey PB, Buckling A. 2004. The effect of spatial heterogeneity and parasites on the evolution of host diversity. *Proc Biol Sci* 271: 107-11
- Broecker F, Klumpp J, Schuppler M, Russo G, Biedermann L, et al. 2016. Long-term changes of bacterial and viral compositions in the intestine of a recovered *Clostridium difficile* patient after fecal microbiota transplantation. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2: a000448
- Broecker F, Kube M, Klumpp J, Schuppler M, Biedermann L, et al. 2013. Analysis of the intestinal microbiome of a recovered *Clostridium difficile* patient after fecal transplantation. *Digestion* 88: 243-51
- Broecker F, Russo G, Klumpp J, Moelling K. 2017. Stable core virome despite variable microbiome after fecal transfer. *Gut Microbes* 8: 214-20
- Broussard GW, Oldfield LM, Villanueva VM, Lunt BL, Shine EE, Hatfull GF. 2013. Integration-dependent bacteriophage immunity provides insights into the evolution of genetic switches. *Mol Cell* 49: 237-48
- Brown SP, Le Chat L, De Paepe M, Taddei F. 2006. Ecology of microbial invasions: amplification allows virus carriers to invade more rapidly when rare. *Curr Biol* 16: 2048-52
- Brum JR, Hurwitz BL, Schofield O, Ducklow HW, Sullivan MB. 2016. Seasonal time bombs: dominant temperate viruses affect Southern Ocean microbial dynamics. *ISME J* 10: 437-49
- Brussow H. 2013. Bacteriophage-host interaction: from splendid isolation into a messy reality. *Curr Opin Microbiol* 16: 500-6
- Brussow H. 2016. How stable is the human gut microbiota? And why this question matters. *Environ Microbiol* 18: 2779-83
- Brussow H, Canchaya C, Hardt WD. 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 560-602, table of contents
- Buckling A, Wei Y, Massey RC, Brockhurst MA, Hochberg ME. 2006. Antagonistic coevolution with parasites increases the cost of host deleterious mutations. *Proc Biol Sci* 273: 45-9
- Buckling AR, P. B. 2002. Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proc Biol Sci* 269: 931-6

- Bushman F. 2002. Lateral DNA transfer: mechanisms and consequences. *Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Lab. press*
- Canchaya C, Fournous G, Brussow H. 2004. The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Mol Microbiol* 53: 9-18
- Carrolo M, Frias MJ, Pinto FR, Melo-Cristino J, Ramirez M. 2010. Prophage spontaneous activation promotes DNA release enhancing biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* 5: e15678
- Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CH, et al. 2009. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* 206: 2179-89
- Casjens S. 2003. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol Microbiol* 49: 277-300
- Casjens SH, R.W. 2005. Bacteriophages and the bacterial genome. *Bacterial Chromosome*: 39-53
- Castro-Mejia JL, Muhammed MK, Kot W, Neve H, Franz CM, et al. 2015. Optimizing protocols for extraction of bacteriophages prior to metagenomic analyses of phage communities in the human gut. *Microbiome* 3: 64
- Cato EP, Carolyn, W., Salmon, and W. E. C. Moore 1974. *Fusobacterium prausnitzii* (Hauduroy et al.) Moore and Holdeman: Emended Description and Designation of Neotype Strain *International Journal of Systematic Bacteriology* 24: 225-29
- Cenens W, Makumi A, Govers SK, 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
- Cenens W, Mebrhatu MT, Makumi A, Ceyssens PJ, Lavigne R, et al. 2013. Expression of a novel P22 ORFan gene reveals the phage carrier state in *Salmonella typhimurium*. *PLoS Genet* 9: e1003269
- Chang JY, Shin SM, Chun J, Lee JH, Seo JK. 2011. Pyrosequencing-based molecular monitoring of the intestinal bacterial colonization in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 53: 512-9
- Chehoud C, Dryga A, Hwang Y, Nagy-Szakal D, Hollister EB, et al. 2016. Transfer of Viral Communities between Human Individuals during Fecal Microbiota Transplantation. *MBio* 7: e00322
- Chen T, Kim CY, Kaur A, Lamothe L, Shaikh M, et al. 2017. Dietary fibre-based SCFA mixtures promote both protection and repair of intestinal epithelial barrier function in a Caco-2 cell model. *Food Funct* 8: 1166-73
- Cherbuy C, Honvo-Houeto E, Bruneau A, Bridonneau C, Mayeur C, et al. 2010. Microbiota matures colonic epithelium through a coordinated induction of cell cycle-related proteins in gnotobiotic rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G348-57
- Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, Brussow H. 2004. In vitro and in vivo bacteriolytic activities of *Escherichia coli* phages: implications for phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2558-69
- Choi J, Kotay SM, Goel R. 2010. Various physico-chemical stress factors cause prophage induction in *Nitrosospira multiformis* 25196--an ammonia oxidizing bacteria. *Water Res* 44: 4550-8
- Chopin A, Bolotin A, Sorokin A, Ehrlich SD, Chopin M. 2001. Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucleic Acids Res* 29: 644-51
- Chopin MC, Chopin A, Bidnenko E. 2005. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr Opin Microbiol* 8: 473-9
- Christie GEC, R. 1990. Interactions between satellite bacteriophage P4 and its helpers. *Annu Rev Genet* 24: 465-90
- Chu H, Khosravi A, Kusumawardhani IP, Kwon AH, Vasconcelos AC, et al. 2016. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science* 352: 1116-20



- Chu ND, Clarke SA, Timberlake S, Polz MF, Grossman AD, Alm EJ. 2017. A Mobile Element in *mutS* Drives Hypermutation in a Marine *Vibrio*. *MBio* 8
- Chung IY, Bae HW, Jang HJ, Kim BO, Cho YH. 2014a. Superinfection exclusion reveals heteroimmunity between *Pseudomonas aeruginosa* temperate phages. *J Microbiol* 52: 515-20
- Chung IY, Jang HJ, Bae HW, Cho YH. 2014b. A phage protein that inhibits the bacterial ATPase required for type IV pilus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 11503-8
- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, et al. 2012. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488: 178-84
- Claesson MJ, O'Sullivan O, Wang Q, Nikkila J, Marchesi JR, et al. 2009. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS One* 4: e6669
- Clokier MR, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. 2011. Phages in nature. *Bacteriophage* 1: 31-45
- Cobian Guemes AG, Youle M, Cantu VA, Felts B, Nulton J, Rohwer F. 2016. Viruses as Winners in the Game of Life. *Annu Rev Virol* 3: 197-214
- Coetzee HL, De Klerk HC, Coetzee JN, Smit JA. 1968. Bacteriophage-tail-like particles associated with intra-species killing of *Proteus vulgaris*. *J Gen Virol* 2: 29-36
- Cooper HSM, S. N.; Shah, R. S.; Sedergran, D. J.; 1999. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory investigation* 69: 238-49
- Cordonnier C, Le Bihan G, Emond-Rheault JG, Garrivier A, Harel J, Jubelin G. 2016. Vitamin B12 Uptake by the Gut Commensal Bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron* Limits the Production of Shiga Toxin by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Toxins (Basel)* 8
- Court D, Green L, Echols H. 1975. Positive and negative regulation by the *cII* and *cIII* gene products of bacteriophage lambda. *Virology* 63: 484-91
- Cowlishaw JM, M. 1975. Coevolution of a virus-alga system. *Appl Microbiol* 29: 234-9
- Crost EH, Ajandouz EH, Villard C, Geraert PA, Puigserver A, Fons M. 2011. Ruminococcin C, a new anti-*Clostridium perfringens* bacteriocin produced in the gut by the commensal bacterium *Ruminococcus gnavus* E1. *Biochimie* 93: 1487-94
- 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: 553-4
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, et al. 2004. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127: 412-21
- Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, et al. 1998. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115: 1405-13
- Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640-5
- Davies EV, Winstanley C, Fothergill JL, James CE. 2016. The role of temperate bacteriophages in bacterial infection. *FEMS Microbiol Lett* 363: fnw015
- Davies J, Davies D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 417-33
- Dawkins RK, J.R. 1979. Arms races between and within species. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 205: 489-511
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, et al. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14691-6
- De Paepe M, Hutinet G, Son O, Amarir-Bouhram J, Schbath S, Petit MA. 2014a. Temperate phages acquire DNA from defective prophages by relaxed homologous recombination: the role of Rad52-like recombinases. *PLoS Genet* 10: e1004181
- De Paepe M, Leclerc M, Tinsley CR, Petit MA. 2014b. Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Front Cell Infect Microbiol* 4: 39

- De Paepe M, Tournier L, Moncaut E, Son O, Langella P, Petit MA. 2016. Carriage of lambda Latent Virus Is Costly for Its Bacterial Host due to Frequent Reactivation in Monoxenic Mouse Intestine. *PLoS Genet* 12: e1005861
- De Sordi L, Khanna V, Debarbieux L. 2017. The Gut Microbiota Facilitates Drifts in the Genetic Diversity and Infectivity of Bacterial Viruses. *Cell Host Microbe* 22: 801-08 e3
- Delattre H, Souiai O, Fagoonee K, Guerois R, Petit MA. 2016. Phagonaute: A web-based interface for phage synteny browsing and protein function prediction. *Virology* 496: 42-50
- Dennehy JJ. 2012. What Can Phages Tell Us about Host-Pathogen Coevolution? *Int J Evol Biol* 2012: 396165
- Depardieu FD, J. P.; Bernheim, A.; Sherlock, A.; Molina, H.; Duclos, B.; Bikard, D. 2016. A Eukaryotic-like Serine/Threonine Kinase Protects Staphylococci against Phages. *Cell Host Microbe* 20: 471-81
- Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. 2008. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol* 6: e280
- Dethlefsen L, Relman DA. 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1: 4554-61
- Diard M, Bakkeren E, Cornuault JK, Moor K, Hausmann A, et al. 2017. Inflammation boosts bacteriophage transfer between Salmonella spp. *Science* 355: 1211-15
- Dodd IB, Shearwin KE, Egan JB. 2005. Revisited gene regulation in bacteriophage lambda. *Curr Opin Genet Dev* 15: 145-52
- Dodd IB, Shearwin KE, Perkins AJ, Burr T, Hochschild A, Egan JB. 2004. Cooperativity in long-range gene regulation by the lambda CI repressor. *Genes Dev* 18: 344-54
- Donaldson GP, Ladinsky MS, Yu KB, Sanders JG, Yoo BB, et al. 2018. Gut microbiota utilize immunoglobulin A for mucosal colonization. *Science* 360: 795-800
- Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* 14: 20-32
- Doron S, Melamed S, Ofir G, Leavitt A, Lopatina A, et al. 2018. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science* 359
- Doulatov S, Hodes A, Dai L, Mandhana N, Liu M, et al. 2004. Tropism switching in Bordetella bacteriophage defines a family of diversity-generating retroelements. *Nature* 431: 476-81
- Drake JW. 1991. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7160-4
- Dri AMM, P. L. 1994. Control of the LexA regulon by pH: evidence for a reversible inactivation of the LexA repressor during the growth cycle of Escherichia coli. *Mol Microbiol* 12: 621-9
- Duerkop BA, Clements CV, Rollins D, Rodrigues JL, Hooper LV. 2012. A composite bacteriophage alters colonization by an intestinal commensal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 17621-6
- Duncan SH, Aminov RI, Scott KP, Louis P, Stanton TB, Flint HJ. 2006. Proposal of Roseburia faecis sp. nov., Roseburia hominis sp. nov. and Roseburia inulinivorans sp. nov., based on isolates from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2437-41
- Duncan SH, Hold GL, Barcenilla A, Stewart CS, Flint HJ. 2002a. Roseburia intestinalis sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1615-20
- Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJ, Stewart CS, Flint HJ. 2002b. Growth requirements and fermentation products of Fusobacterium prausnitzii, and a proposal to reclassify it as Faecalibacterium prausnitzii gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 2141-6
- Duncan SH, Louis P, Thomson JM, Flint HJ. 2009. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* 11: 2112-22
- Dusko Ehrlich S, Meta HITc. 2010. [Metagenomics of the intestinal microbiota: potential applications]. *Gastroenterol Clin Biol* 34 Suppl 1: S23-8

- Dutilh BE, Cassman N, McNair K, Sanchez SE, Silva GG, et al. 2014. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat Commun* 5: 4498
- Dydecka A, Bloch S, Rizvi A, Perez S, Nejman-Falenczyk B, et al. 2017. Bad Phages in Good Bacteria: Role of the Mysterious orf63 of lambda and Shiga Toxin-Converting Phi24B Bacteriophages. *Front Microbiol* 8: 1618
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, et al. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308: 1635-8
- Edwards RA, McNair K, Faust K, Raes J, Dutilh BE. 2016. Computational approaches to predict bacteriophage-host relationships. *FEMS Microbiol Rev* 40: 258-72
- Eggers CHS, D. S. 1999. Molecular evidence for a new bacteriophage of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* 181: 7308-13
- Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, et al. 2009. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* 323: 133-8
- Enault F, Briet A, Bouteille L, Roux S, Sullivan MB, Petit MA. 2017. Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J* 11: 237-47
- Enck P, Zimmermann K, Rusch K, Schwiertz A, Klosterhalfen S, Frick JS. 2009. The effects of ageing on the colonic bacterial microflora in adults. *Z Gastroenterol* 47: 653-8
- Engelhardt T, Kallmeyer J, Cypionka H, Engelen B. 2014. High virus-to-cell ratios indicate ongoing production of viruses in deep subsurface sediments. *ISME J* 8: 1503-9
- Erez Z, Steinberger-Levy I, Shamir M, Doron S, Stokar-Avihail A, et al. 2017. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature* 541: 488-93
- Falgenhauer L, Yao Y, Fritzenwanker M, Schmiedel J, Imirzalioglu C, Chakraborty T. 2014. Complete Genome Sequence of Phage-Like Plasmid pECO89, Encoding CTX-M-15. *Genome Announc* 2
- Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, et al. 2016. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* 352: 560-4
- Fang Y, Mercer RG, McMullen LM, Ganzle MG. 2017. Induction of Shiga Toxin-Encoding Prophage by Abiotic Environmental Stress in Food. *Appl Environ Microbiol* 83
- Feiner R, Argov T, Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, Herskovits AA. 2015. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nat Rev Microbiol* 13: 641-50
- Finegold S, Sutter, VL., Mathisen, GE. 1983. Human Intestinal Microflora in Health and Disease, Chapter 1: Normal Indigenous Intestinal Flora. *Academic Press*: 3
- Fischetti VA. 2007. In vivo acquisition of prophage in *Streptococcus pyogenes*. *Trends Microbiol* 15: 297-300
- Flint HJ. 2012. Microbiology: Antibiotics and adiposity. *Nature* 488: 601-2
- Flores CO, Meyer JR, Valverde S, Farr L, Weitz JS. 2011. Statistical structure of host-phage interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E288-97
- Flores CO, Valverde S, Weitz JS. 2013. Multi-scale structure and geographic drivers of cross-infection within marine bacteria and phages. *ISME J* 7: 520-32
- Folkmanis A, Maltzman W, Mellon P, Skalka A, Echols H. 1977. The essential role of the cro gene in lytic development by bacteriophage lambda. *Virology* 81: 352-62
- Ford ME, Sarkis GJ, Belanger AE, Hendrix RW, Hatfull GF. 1998. Genome structure of mycobacteriophage D29: implications for phage evolution. *J Mol Biol* 279: 143-64
- Fothergill JL, Mowat E, Walshaw MJ, Ledson MJ, James CE, Winstanley C. 2011. Effect of antibiotic treatment on bacteriophage production by a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 426-8
- Friedman DIC, D. L. 1995. Transcription antitermination: the lambda paradigm updated. *Mol Microbiol* 18: 191-200
- Fuhrman JA. 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399: 541-8

- Galiez C, Siebert M, Enault F, Vincent J, Soding J. 2017. WisH: who is the host? Predicting prokaryotic hosts from metagenomic phage contigs. *Bioinformatics* 33: 3113-14
- Gama JA, Reis AM, Domingues I, Mendes-Soares H, Matos AM, Dionisio F. 2013. Temperate bacterial viruses as double-edged swords in bacterial warfare. *PLoS One* 8: e59043
- Gandon S, Buckling A, Decaestecker E, Day T. 2008. Host-parasite coevolution and patterns of adaptation across time and space. *J Evol Biol* 21: 1861-6
- Garcia-Gutierrez E, Mayer MJ, Cotter PD, Narbad A. 2018. Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut Microbes*: 1-57
- Gebhart D, Williams SR, Bishop-Lilly KA, Govoni GR, Willner KM, et al. 2012. Novel high-molecular-weight, R-type bacteriocins of *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 194: 6240-7
- Geller BL, Ivey RG, Trempy JE, Hettlinger-Smith B. 1993. Cloning of a chromosomal gene required for phage infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. *J Bacteriol* 175: 5510-9
- Gemski P, Jr., Baron LS, Yamamoto N. 1972. Formation of hybrids between coliphage lambda and *Salmonella* phage P22 with a *Salmonella typhimurium* hybrid sensitive to these phages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 3110-4
- Gibson P, Rosella O. 1995. Interleukin 8 secretion by colonic crypt cells in vitro: response to injury suppressed by butyrate and enhanced in inflammatory bowel disease. *Gut* 37: 536-43
- Gilcrease EB, Casjens SR. 2018. The genome sequence of *Escherichia coli* tailed phage D6 and the diversity of Enterobacteriales circular plasmid prophages. *Virology* 515: 203-14
- Godeke J, Paul K, Lassak J, Thormann KM. 2011. Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *ISME J* 5: 613-26
- Goerke C, Koller J, Wolz C. 2006. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 171-7
- Goerlich O, Quillardet P, Hofnung M. 1989. Induction of the SOS response by hydrogen peroxide in various *Escherichia coli* mutants with altered protection against oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 171: 6141-7
- Goldberg GW, Jiang W, Bikard D, Marraffini LA. 2014. Conditional tolerance of temperate phages via transcription-dependent CRISPR-Cas targeting. *Nature* 514: 633-7
- Goldberg GW, McMillan EA, Varble A, Modell JW, Samai P, et al. 2018. Incomplete prophage tolerance by type III-A CRISPR-Cas systems reduces the fitness of lysogenic hosts. *Nat Commun* 9: 61
- Goldfarb T, Sberro H, Weinstock E, Cohen O, Doron S, et al. 2015. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO J* 34: 169-83
- Golomidova A, Kulikov E, Isaeva A, Manykin A, Letarov A. 2007. The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions. *Appl Environ Microbiol* 73: 5975-81
- Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, et al. 2014. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159: 789-99
- Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, Doolittle WF, Veldhuyzen van Zanten SJ. 2006. Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* 44: 4136-41
- Gordon HA, Bruckner-Kardoss E. 1961. Effect of normal microbial flora on intestinal surface area. *Am J Physiol* 201: 175-8
- Guo H, Tse LV, Barbalat R, Sivaamnuaiaphorn S, Xu M, et al. 2008. Diversity-generating retroelement homing regenerates target sequences for repeated rounds of codon rewriting and protein diversification. *Mol Cell* 31: 813-23
- Gustafsson BE, Midtvedt T, Strandberg K. 1970. Effects of microbial contamination on the cecum enlargement of germfree rats. *Scand J Gastroenterol* 5: 309-14
- Haaber J, Leisner JJ, Cohn MT, Catalan-Moreno A, Nielsen JB, et al. 2016. Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. *Nat Commun* 7: 13333
- Hall AR, Scanlan PD, Buckling A. 2011a. Bacteria-phage coevolution and the emergence of generalist pathogens. *Am Nat* 177: 44-53

- Hall AR, Scanlan PD, Morgan AD, Buckling A. 2011b. Host-parasite coevolutionary arms races give way to fluctuating selection. *Ecol Lett* 14: 635-42
- Hamilton WD. 1964a. The genetical evolution of social behaviour. I. *J Theor Biol* 7: 1-16
- Hamilton WD. 1964b. The genetical evolution of social behaviour. II. *J Theor Biol* 7: 17-52
- Hatzioanou D, Mayer MJ, Duncan SH, Flint HJ, Narbad A. 2013. A representative of the dominant human colonic Firmicutes, *Roseburia faecis* M72/1, forms a novel bacteriocin-like substance. *Anaerobe* 23: 5-8
- Heinrich J, Velleman M, Schuster H. 1995. The tripartite immunity system of phages P1 and P7. *FEMS Microbiol Rev* 17: 121-6
- Hendrix RWL, J. G., Hatfull, G. F.; Casjens, S. 1983. Lambda II. *Cold spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Lab. press*
- Hennes KPS, M. 1995. Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake. *Appl Environ Microbiol* 61: 333-40
- Herman C, Thevenet D, D'Ari R, Bouloc P. 1997. The HflB protease of *Escherichia coli* degrades its inhibitor lambda cIII. *J Bacteriol* 179: 358-63
- Hershey ADC, M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 36: 39-56
- Hobbs ZA, S. T. 2016. Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'Lytic or lysogenic'. *FEMS Microbiol Lett* 363
- Hoffmann TW, Pham HP, Bridonneau C, Aubry C, Lamas B, et al. 2016. Microorganisms linked to inflammatory bowel disease-associated dysbiosis differentially impact host physiology in gnotobiotic mice. *ISME J* 10: 460-77
- Hong PY, Croix JA, Greenberg E, Gaskins HR, Mackie RI. 2011. Pyrosequencing-based analysis of the mucosal microbiota in healthy individuals reveals ubiquitous bacterial groups and micro-heterogeneity. *PLoS One* 6: e25042
- Hooper LV, Xu J, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI. 1999. A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9833-8
- Hopkins MJ, Macfarlane GT, Furrie E, Fite A, Macfarlane S. 2005. Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses. *FEMS Microbiol Ecol* 54: 77-85
- Howard-Varona C, Hargreaves KR, Solonenko NE, Markillie LM, White RA, 3rd, et al. 2018. Multiple mechanisms drive phage infection efficiency in nearly identical hosts. *ISME J*
- Howe MM, Bade EG. 1975. Molecular biology of bacteriophage mu. *Science* 190: 624-32
- Hoyles L, McCartney AL, Neve H, Gibson GR, Sanderson JD, et al. 2014. Characterization of virus-like particles associated with the human faecal and caecal microbiota. *Res Microbiol* 165: 803-12
- Hutinet G, Besle A, Son O, McGovern S, Guerois R, et al. 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
- Jacob F, Monod J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3: 318-56
- Jaomanjaka FC, Olivier.; Blanche-Barbat, Mélanie.; Petrel, Melina.; Ballestra, Patricia.; Le marrec, Claire. . 2016. Characterization of a new virulent phage infecting the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology* 54: 167-77
- Jeffery IB, Lynch DB, O'Toole PW. 2016. Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *ISME J* 10: 170-82
- Jiang SCP, J.H. 1994. Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment. *Marine Ecology Progress Series* 104: 163-72
- Jiang SCP, J.H. 1996. The abundance of lysogenic bacteria in marine microbial communities as determined by prophage induction. *Marine Ecology Progress Series* 142: 27-38

- Johansson ME, Gustafsson JK, Sjöberg KE, Petersson J, Holm L, et al. 2010. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS One* 5: e12238
- Joo J, Gunny M, Cases M, Hudson P, Albert R, Harvill E. 2006. Bacteriophage-mediated competition in *Bordetella* bacteria. *Proc Biol Sci* 273: 1843-8
- Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, et al. 2011. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 60: 631-7
- Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. 2014. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ Microbiol* 16: 2891-904
- Kahmann R, Rudt F, Koch C, Mertens G. 1985. G inversion in bacteriophage Mu DNA is stimulated by a site within the invertase gene and a host factor. *Cell* 41: 771-80
- Kaiser AD. 1957. Mutations in a temperate bacteriophage affecting its ability to lysogenize *Escherichia coli*. *Virology* 3: 42-61
- Kamada N, Seo SU, Chen GY, Nunez G. 2013. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 13: 321-35
- Kao CS, L. 1988. The lit gene product which blocks bacteriophage T4 late gene expression is a membrane protein encoded by a cryptic DNA element, e14. *J Bacteriol* 170: 2056-62
- Kauffman KM, Hussain FA, Yang J, Arevalo P, Brown JM, et al. 2018. A major lineage of non-tailed dsDNA viruses as unrecognized killers of marine bacteria. *Nature* 554: 118-22
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10: 845-58
- Khan KJ, Ullman TA, Ford AC, Abreu MT, Abadir A, et al. 2011. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 106: 661-73
- Kim MS, Bae JW. 2016. Spatial disturbances in altered mucosal and luminal gut viromes of diet-induced obese mice. *Environ Microbiol* 18: 1498-510
- Kim MSB, J. W. 2018. Lysogeny is prevalent and widely distributed in the murine gut microbiota. *ISME J* 12: 1127-41
- Kim Y, Kim SH, Whang KY, Kim YJ, Oh S. 2008. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells. *J Microbiol Biotechnol* 18: 1278-85
- Knowles B, Silveira CB, Bailey BA, Barott K, Cantu VA, et al. 2016. Lytic to temperate switching of viral communities. *Nature* 531: 466-70
- Kobiler O, Koby S, Teff D, Court D, Oppenheim AB. 2002. The phage lambda CII transcriptional activator carries a C-terminal domain signaling for rapid proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14964-9
- Kobiler O, Rokney A, Friedman N, Court DL, Stavans J, Oppenheim AB. 2005. Quantitative kinetic analysis of the bacteriophage lambda genetic network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4470-5
- Kobiler O, Rokney A, Oppenheim AB. 2007. Phage lambda CIII: a protease inhibitor regulating the lysis-lysogeny decision. *PLoS One* 2: e363
- Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, et al. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1: 4578-85
- Koskella BB, M. A. 2014. Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* 38: 916-31
- Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO. 2007. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* 56: 669-75
- Krupovic M, Forterre P. 2011. Microviridae goes temperate: microvirus-related proviruses reside in the genomes of Bacteroidetes. *PLoS One* 6: e19893
- Kuo CHO, H. 2010. The extinction dynamics of bacterial pseudogenes. *PLoS Genet* 6
- Kutter EM, Kuhl SJ, Abedon ST. 2015. Re-establishing a place for phage therapy in western medicine. *Future Microbiol* 10: 685-8

- Labonte JM, Swan BK, Poulos B, Luo H, Koren S, et al. 2015. Single-cell genomics-based analysis of virus-host interactions in marine surface bacterioplankton. *ISME J* 9: 2386-99
- Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* 8: 317-27
- Lambert JE, Myslicki JP, Bomhof MR, Belke DD, Shearer J, Reimer RA. 2015. Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. *Appl Physiol Nutr Metab* 40: 749-52
- Lang AS, Beatty JT. 2007. Importance of widespread gene transfer agent genes in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* 15: 54-62
- Lang AS, Zhaxybayeva O, Beatty JT. 2012. Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nat Rev Microbiol* 10: 472-82
- Lapaquette P, Glasser AL, Huett A, Xavier RJ, Darfeuille-Michaud A. 2010. Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* 12: 99-113
- Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, et al. 2010. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 5: e9085
- Latino L, Midoux C, Hauck Y, Vergnaud G, Pourcel C. 2016. Pseudolysogeny and sequential mutations build multiresistance to virulent bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 162: 748-63
- Laursen MF, Laursen RP, Larnkjaer A, Molgaard C, Michaelsen KF, et al. 2017. Faecalibacterium Gut Colonization Is Accelerated by Presence of Older Siblings. *mSphere* 2
- Lavigne R, Darius P, Summer EJ, Seto D, Mahadevan P, et al. 2009. Classification of Myoviridae bacteriophages using protein sequence similarity. *BMC Microbiol* 9: 224
- Lavigne R, Seto D, Mahadevan P, Ackermann HW, Kropinski AM. 2008. Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the Podoviridae using BLASTP-based tools. *Res Microbiol* 159: 406-14
- Lawley TD, Walker AW. 2013. Intestinal colonization resistance. *Immunology* 138: 1-11
- Lee YK, Puong KY, Ouwehand AC, Salminen S. 2003. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J Med Microbiol* 52: 925-30
- Lehman IRP, E. A. 1960. On the structure of the glucosylated hydroxymethylcytosine nucleotides of coliphages T2, T4, and T6. *J Biol Chem* 235: 3254-9
- Lehnherr H, Maguin E, Jafri S, Yarmolinsky MB. 1993. Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: doc, which causes cell death on curing of prophage, and phd, which prevents host death when prophage is retained. *J Mol Biol* 233: 414-28
- Lemaitre JP, Duroux A, Pimpie R, Duez JM, Milat ML. 2015. Listeria phage and phage tail induction triggered by components of bacterial growth media (phosphate, LiCl, nalidixic acid, and acriflavine). *Appl Environ Microbiol* 81: 2117-24
- Lenski RL, BR. 1985. Constraints on the coevolution of bacteria and virulent phage – a model, some experiments, and predictions for natural communities. *Am Nat* 125: 585-602
- Lepage P, Colombet J, Marteau P, Sime-Ngando T, Dore J, Leclerc M. 2008. Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* 57: 424-5
- Lepage P, Seksik P, Sutren M, de la Cochetiere MF, Jian R, et al. 2005. Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* 11: 473-80
- Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. 2008. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 6: 776-88
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022-3
- Licznarska K, Dydecka A, Bloch S, Topka G, Nejman-Falenczyk B, et al. 2016. The Role of the Exo-Xis Region in Oxidative Stress-Mediated Induction of Shiga Toxin-Converting Prophages. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 8453135
- Lieb M. 1953. The establishment of lysogenicity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 65: 642-51
- Lim ES, Zhou Y, Zhao G, Bauer IK, Droit L, et al. 2015. Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nat Med* 21: 1228-34

- Lindahl G, Sironi G, Bialy H, Calendar R. 1970. Bacteriophage lambda; abortive infection of bacteria lysogenic for phage P2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66: 587-94
- Liu M, Deora R, Doulatov SR, Gingery M, Eiserling FA, et al. 2002. Reverse transcriptase-mediated tropism switching in Bordetella bacteriophage. *Science* 295: 2091-4
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, et al. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16: 161-8
- Lobocka MB, Rose DJ, Plunkett G, 3rd, Rusin M, Samojedny A, et al. 2004. Genome of bacteriophage P1. *J Bacteriol* 186: 7032-68
- Loessner MJ, Inman RB, Lauer P, Calendar R. 2000. Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of *Listeria monocytogenes*: implications for phage evolution. *Mol Microbiol* 35: 324-40
- Lokta A. 1920. Analytical note on certain rhythmic relations in organic systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 6: 410
- Lopes A, Amarir-Bouhram J, Faure G, Petit MA, Guerois R. 2010. Detection of novel recombinases in bacteriophage genomes unveils Rad52, Rad51 and Gp2.5 remote homologs. *Nucleic Acids Res* 38: 3952-62
- Lopes A, Tavares P, Petit MA, Guerois R, Zinn-Justin S. 2014. Automated classification of tailed bacteriophages according to their neck organization. *BMC Genomics* 15: 1027
- Los M, Wegrzyn G, Neubauer P. 2003. A role for bacteriophage T4 rI gene function in the control of phage development during pseudolysogeny and in slowly growing host cells. *Res Microbiol* 154: 547-52
- Los MW, G. 2012. Pseudolysogeny. *Advances in Virus Research* 82: 339-48
- Lu MJ, Henning U. 1994. Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. *Trends Microbiol* 2: 137-9
- Lucchini S, Desiere F, Brussow H. 1999a. Comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* phage species supports a modular evolution theory. *J Virol* 73: 8647-56
- Lucchini S, Desiere F, Brussow H. 1999b. Similarly organized lysogeny modules in temperate Siphoviridae from low GC content gram-positive bacteria. *Virology* 263: 427-35
- Lugli GA, Milani C, Turrone F, Tremblay D, Ferrario C, et al. 2016. Prophages of the genus *Bifidobacterium* as modulating agents of the infant gut microbiota. *Environ Microbiol* 18: 2196-213
- Lunde M, Aastveit AH, Blatny JM, Nes IF. 2005. Effects of diverse environmental conditions on {phi}LC3 prophage stability in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 71: 721-7
- Luria SED, Delbrück M. 1943. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* 28: 491-511
- Lwoff A. 1953. Lysogeny. *Bacteriol Rev* 17: 269-337
- Ly M, Jones MB, Abeles SR, Santiago-Rodriguez TM, Gao J, et al. 2016. Transmission of viruses via our microbiomes. *Microbiome* 4: 64
- Macfarlane GTG, G. R. 1997. Carbohydrate fermentation, energy transduction and gas metabolism in the human large intestine. *Gastrointestinal Microbiology*: 269-318
- Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijs I, et al. 2014. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 63: 1275-83
- Mahony J, McGrath S, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2008. Identification and characterization of lactococcal-prophage-carried superinfection exclusion genes. *Appl Environ Microbiol* 74: 6206-15
- Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, et al. 2009. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5859-64



- Maiques E, Ubeda C, Campoy S, Salvador N, Lasa I, et al. 2006. beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 188: 2726-9
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, et al. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 13: 722-36
- Malki K, Kula A, Bruder K, Sible E, Hatzopoulos T, et al. 2015. Bacteriophages isolated from Lake Michigan demonstrate broad host-range across several bacterial phyla. *Virology* 12: 164
- Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, et al. 2006. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55: 205-11
- Manrique P, Bolduc B, Walk ST, van der Oost J, de Vos WM, Young MJ. 2016. Healthy human gut phageome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 10400-5
- Manrique P, Dills M, Young MJ. 2017. The Human Gut Phage Community and Its Implications for Health and Disease. *Viruses* 9
- Marbouty M, Baudry L, Cournac A, Koszul R. 2017. Scaffolding bacterial genomes and probing host-virus interactions in gut microbiome by proximity ligation (chromosome capture) assay. *Sci Adv* 3: e1602105
- Marbouty M, Koszul R. 2017. Generation and Analysis of Chromosomal Contact Maps of Bacteria. *Methods Mol Biol* 1624: 75-84
- Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GD, Hirschfield GM, et al. 2016. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 65: 330-9
- Maria L, Capra DJM, Jorge A, Reinheimer, Andrea L, Quiberoni. 2010. Characterisation of three temperate phages released from the same *Lactobacillus paracasei* commercial strain *International Journal of Dairy Technology* 63: 396-405
- Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes V, Sokol H, et al. 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 9: 123
- Marr MT, Datwyler SA, Meares CF, Roberts JW. 2001. Restructuring of an RNA polymerase holoenzyme elongation complex by lambdaoid phage Q proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8972-8
- Marraffini LA. 2015. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature* 526: 55-61
- Marston MF, Pierciey FJ, Jr., Shepard A, Gearin G, Qi J, et al. 2012. Rapid diversification of coevolving marine *Synechococcus* and a virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 4544-9
- Marteau P, Pochart P, Dore J, Bera-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. 2001. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 67: 4939-42
- Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, et al. 2004. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 127: 80-93
- Martin R, Chain F, Miquel S, Lu J, Gratadoux JJ, et al. 2014. The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm Bowel Dis* 20: 417-30
- Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, Gonzalez-Huix F, Lopez-Oliu C, et al. 2009. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 15: 872-82
- Martinez-Rubio R, Quiles-Puchalt N, Marti M, Humphrey S, Ram G, et al. 2017. Phage-inducible islands in the Gram-positive cocci. *ISME J* 11: 1029-42
- Martinsohn JT, Radman M, Petit MA. 2008. The lambda red proteins promote efficient recombination between diverged sequences: implications for bacteriophage genome mosaicism. *PLoS Genet* 4: e1000065
- Martiny JBR, L.; Marston, M.F.; Middelboe, M. 2014. Antagonistic coevolution of marine planktonic viruses and their hosts. *Ann Rev Mar Sci* 6: 393-414
- Matos RC, Lapaque N, Rigottier-Gois L, Debarbieux L, Meylheuc T, et al. 2013. *Enterococcus faecalis* prophage dynamics and contributions to pathogenic traits. *PLoS Genet* 9: e1003539

- Maura D, Debarbieux L. 2012. On the interactions between virulent bacteriophages and bacteria in the gut. *Bacteriophage* 2: 229-33
- Maura D, Galtier M, Le Bouguenec C, Debarbieux L. 2012. Virulent bacteriophages can target O104:H4 enteroaggregative Escherichia coli in the mouse intestine. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 6235-42
- Mavrich TNH, G. F. 2017. Bacteriophage evolution differs by host, lifestyle and genome. *Nat Microbiol* 2: 17112
- Mayer EA, Tillisch K, Gupta A. 2015. Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest* 125: 926-38
- Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489: 231-41
- McMacken R, Mantei N, Butler B, Joyner A, Echols H. 1970. Effect of mutations in the c2 and c3 genes of bacteriophage lambda on macromolecular synthesis in infected cells. *J Mol Biol* 49: 639-55
- Meessen-Pinard M, Sekulovic O, Fortier LC. 2012. Evidence of in vivo prophage induction during Clostridium difficile infection. *Appl Environ Microbiol* 78: 7662-70
- Menouni R, Champ S, Espinosa L, Boudvillain M, Ansaldi M. 2013. Transcription termination controls prophage maintenance in Escherichia coli genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 14414-9
- Mercanti DJ, Carminati D, Reinheimer JA, Quiberoni A. 2011. Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *Int J Food Microbiol* 144: 503-10
- Meyer JR, Dobias DT, Weitz JS, Barrick JE, Quick RT, Lenski RE. 2012. Repeatability and contingency in the evolution of a key innovation in phage lambda. *Science* 335: 428-32
- Michel-Briand Y, Baysse C. 2002. The pyocins of Pseudomonas aeruginosa. *Biochimie* 84: 499-510
- Middelboe M, Hagstrom A, Blackburn N, Sinn B, Fischer U, et al. 2001. Effects of Bacteriophages on the Population Dynamics of Four Strains of Pelagic Marine Bacteria. *Microb Ecol* 42: 395-406
- Middelboe MH, K.; Riemann, L.; Nybroe, O.; Haaber, J. 2009. Bacteriophages drive strain diversification in a marine Flavobacterium: implications for phage resistance and physiological properties. *Environ Microbiol* 11: 1971-82
- Mikkonen M, Dupont L, Alatossava T, Ritzenthaler P. 1996. Defective site-specific integration elements are present in the genome of virulent bacteriophage LL-H of Lactobacillus delbrueckii. *Appl Environ Microbiol* 62: 1847-51
- Mills S, Shanahan F, Stanton C, Hill C, Coffey A, Ross RP. 2013. Movers and shakers: influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota. *Gut Microbes* 4: 4-16
- Milne I, Stephen G, Bayer M, Cock PJ, Pritchard L, et al. 2013. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Brief Bioinform* 14: 193-202
- Minot S, Bryson A, Chehoud C, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. 2013. Rapid evolution of the human gut virome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 12450-5
- Minot S, Grunberg S, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. 2012. Hypervariable loci in the human gut virome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3962-6
- Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, et al. 2011. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res* 21: 1616-25
- Miquel S, Peyretailade E, Claret L, de Vallee A, Dossat C, et al. 2010. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli strain LF82. *PLoS One* 5
- Mirolid S, Rabsch W, Rohde M, Stender S, Tschape H, et al. 1999. Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic Salmonella typhimurium strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9845-50
- Mirzaei MKM, C. F. 2017. Menage a trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. *Nat Rev Microbiol* 15: 397-408
- Mitchell J, Siboo IR, Takamatsu D, Chambers HF, Sullam PM. 2007. Mechanism of cell surface expression of the Streptococcus mitis platelet binding proteins PblA and PblB. *Mol Microbiol* 64: 844-57

- Mizoguchi K, Morita M, Fischer CR, Yoichi M, Tanji Y, Unno H. 2003. Coevolution of bacteriophage PP01 and Escherichia coli O157:H7 in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 69: 170-6
- Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. 2013. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* 499: 219-22
- Moebus KN, H. 1981. Bacteriophage sensitivity patterns among bacteria isolated from marine waters. *HELGOLÄNDER MEERESUNTERSUCHUNGEN* 34: 375-85
- Molineux IJ. 1991. Host-parasite interactions: recent developments in the genetics of abortive phage infections. *New Biol* 3: 230-6
- Mondot S, Lepage P, Seksik P, Allez M, Treton X, et al. 2016. Structural robustness of the gut mucosal microbiota is associated with Crohn's disease remission after surgery. *Gut* 65: 954-62
- Morowitz MJ, Deneff VJ, Costello EK, Thomas BC, Poroyko V, et al. 2011. Strain-resolved community genomic analysis of gut microbial colonization in a premature infant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 1128-33
- Mountzouris KC, McCartney AL, Gibson GR. 2002. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *Br J Nutr* 87: 405-20
- Muller MG, Ing JY, Cheng MK, Flitter BA, Moe GR. 2013. Identification of a phage-encoded Ig-binding protein from invasive Neisseria meningitidis. *J Immunol* 191: 3287-96
- Nanda AM, Heyer A, Kramer C, Grunberger A, Kohlheyer D, Frunzke J. 2014. Analysis of SOS-induced spontaneous prophage induction in Corynebacterium glutamicum at the single-cell level. *J Bacteriol* 196: 180-8
- Nanda AM, Thormann K, Frunzke J. 2015. Impact of spontaneous prophage induction on the fitness of bacterial populations and host-microbe interactions. *J Bacteriol* 197: 410-9
- Neely MN, Friedman DI. 1998. Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release. *Mol Microbiol* 28: 1255-67
- Ni J, Wu GD, Albenberg L, Tomov VT. 2017. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14: 573-84
- Nicaise P, Gleizes A, Forestier F, Quero AM, Labarre C. 1993. Influence of intestinal bacterial flora on cytokine (IL-1, IL-6 and TNF-alpha) production by mouse peritoneal macrophages. *Eur Cytokine Netw* 4: 133-8
- Nickels BE, Dove SL, Murakami KS, Darst SA, Hochschild A. 2002. Protein-protein and protein-DNA interactions of sigma70 region 4 involved in transcription activation by lambdacl. *J Mol Biol* 324: 17-34
- Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, Droit L, Liu CY, et al. 2015. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 160: 447-60
- Obuchowski M, Shotland Y, Koby S, Giladi H, Gabig M, et al. 1997. Stability of CII is a key element in the cold stress response of bacteriophage lambda infection. *J Bacteriol* 179: 5987-91
- Ofir G, Melamed S, Sberro H, Mukamel Z, Silverman S, et al. 2018. DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nat Microbiol* 3: 90-98
- Ofir GS, R. 2018. Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights. *Cell* 172: 1260-70
- Ogilvie LA, Bowler LD, Caplin J, Dedi C, Diston D, et al. 2013. Genome signature-based dissection of human gut metagenomes to extract subliminal viral sequences. *Nat Commun* 4: 2420
- Ogilvie LA, Jones BV. 2015. The human gut virome: a multifaceted majority. *Front Microbiol* 6: 918
- Oliveira PH, Touchon M, Rocha EP. 2014. The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts. *Nucleic Acids Res* 42: 10618-31
- Oppenheim AB, Kobilier O, Stavans J, Court DL, Adhya S. 2005. Switches in bacteriophage lambda development. *Annu Rev Genet* 39: 409-29
- Otsuji N, Sekiguchi M, Iijima T, Takagi Y. 1959. Induction of phage formation in the lysogenic Escherichia coli K-12 by mitomycin C. *Nature* 184(Suppl 14): 1079-80

- Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, et al. 2004. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53: 685-93
- Owen SV, Wenner N, Canals R, Makumi A, Hammarlof DL, et al. 2017. Characterization of the Prophage Repertoire of African Salmonella Typhimurium ST313 Reveals High Levels of Spontaneous Induction of Novel Phage BTP1. *Front Microbiol* 8: 235
- Paez-Espino D, Eloie-Fadrosh EA, Pavlopoulos GA, Thomas AD, Huntemann M, et al. 2016. Uncovering Earth's virome. *Nature* 536: 425-30
- Pal C, Macia MD, Oliver A, Schachar I, Buckling A. 2007. Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates. *Nature* 450: 1079-81
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 5: e177
- Parsons RJ, Breitbart M, Lomas MW, Carlson CA. 2012. Ocean time-series reveals recurring seasonal patterns of viroplankton dynamics in the northwestern Sargasso Sea. *ISME J* 6: 273-84
- Patterson AM, Mulder IE, Travis AJ, Lan A, Cerf-Bensussan N, et al. 2017. Human Gut Symbiont Roseburia hominis Promotes and Regulates Innate Immunity. *Front Immunol* 8: 1166
- Paul JH. 2008. Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? *ISME J* 2: 579-89
- Pavlova SI, Tao L. 2000. Induction of vaginal Lactobacillus phages by the cigarette smoke chemical benzo[a]pyrene diol epoxide. *Mutat Res* 466: 57-62
- Pawluk A, Bondy-Denomy J, Cheung VH, Maxwell KL, Davidson AR. 2014. A new group of phage anti-CRISPR genes inhibits the type I-E CRISPR-Cas system of Pseudomonas aeruginosa. *MBio* 5: e00896
- Pawluk A, Davidson AR, Maxwell KL. 2018. Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function. *Nat Rev Microbiol* 16: 12-17
- Pawluk A, Staals RH, Taylor C, Watson BN, Saha S, et al. 2016. Inactivation of CRISPR-Cas systems by anti-CRISPR proteins in diverse bacterial species. *Nat Microbiol* 1: 16085
- Paynter MB, HR. 1969. Dynamics of coliphage infections. *Fermentation Advances*: 323-36
- Pedersen K, Zavialov AV, Pavlov MY, Elf J, Gerdes K, Ehrenberg M. 2003. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* 112: 131-40
- Penades JR, Chen J, Quiles-Puchalt N, Carpena N, Novick RP. 2015. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Curr Opin Microbiol* 23: 171-8
- Penades JR, Christie GE. 2015. The Phage-Inducible Chromosomal Islands: A Family of Highly Evolved Molecular Parasites. *Annu Rev Virol* 2: 181-201
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, et al. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118: 511-21
- Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J. 2009. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr* 139: 1619-25
- Perna NT, Mayhew GF, Posfai G, Elliott S, Donnenberg MS, et al. 1998. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Infect Immun* 66: 3810-7
- Perna NT, Plunkett G, 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, et al. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Nature* 409: 529-33
- Pfeifer E, Hunnefeld M, Popa O, Polen T, Kohlheyer D, et al. 2016. Silencing of cryptic prophages in Corynebacterium glutamicum. *Nucleic Acids Res* 44: 10117-31
- Philipson L, Albertsson PA, Frick G. 1960. The purification and concentration of viruses by aqueous polymerphase systems. *Virology* 11: 553-71
- Pleska M, Lang M, Refardt D, Levin BR, Guet CC. 2018. Phage-host population dynamics promotes prophage acquisition in bacteria with innate immunity. *Nat Ecol Evol* 2: 359-66
- Poisot T LMHM. 2013. The structure of natural microbial enemy-victim networks. *Ecol Process* 2: 1-9

- Poullain V, Gandon S, Brockhurst MA, Buckling A, Hochberg ME. 2008. The evolution of specificity in evolving and coevolving antagonistic interactions between a bacteria and its phage. *Evolution* 62: 1-11
- Qimron U, Marintcheva B, Tabor S, Richardson CC. 2006. Genomewide screens for Escherichia coli genes affecting growth of T7 bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 19039-44
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59-65
- Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, et al. 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490: 55-60
- Quevrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, et al. 2016a. Identification of an anti-inflammatory protein from Faecalibacterium prausnitzii, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 65: 415-25
- Quevrain E, Maubert MA, Sokol H, Devreese B, Seksik P. 2016b. The presence of the anti-inflammatory protein MAM, from Faecalibacterium prausnitzii, in the intestinal ecosystem. *Gut* 65: 882
- Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, Nir-Paz R, Herskovits AA. 2012. Prophage excision activates Listeria competence genes that promote phagosomal escape and virulence. *Cell* 150: 792-802
- Rakitina DV, Manolov AI, Kanygina AV, Garushyants SK, Baikova JP, et al. 2017. Genome analysis of E. coli isolated from Crohn's disease patients. *BMC Genomics* 18: 544
- Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, Gagic D, Russel M. 2011. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues Mol Biol* 13: 51-76
- Rauch BJ, Silvis MR, Hultquist JF, Waters CS, McGregor MJ, et al. 2017. Inhibition of CRISPR-Cas9 with Bacteriophage Proteins. *Cell* 168: 150-58 e10
- Ravin NV. 2011. N15: the linear phage-plasmid. *Plasmid* 65: 102-9
- Reese AT, Cho EH, Klitzman B, Nichols SP, Wisniewski NA, et al. 2018. Antibiotic-induced changes in the microbiota disrupt redox dynamics in the gut. *Elife* 7
- Reeves AE, Koenigsknecht MJ, Bergin IL, Young VB. 2012. Suppression of Clostridium difficile in the gastrointestinal tracts of germfree mice inoculated with a murine isolate from the family Lachnospiraceae. *Infect Immun* 80: 3786-94
- Refardt D. 2011. Within-host competition determines reproductive success of temperate bacteriophages. *ISME J* 5: 1451-60
- Refardt D. 2012. Real-time quantitative PCR to discriminate and quantify lambdoid bacteriophages of Escherichia coli K-12. *Bacteriophage* 2: 98-104
- Resta SC. 2009. Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling. *J Physiol* 587: 4169-74
- Revet B, von Wilcken-Bergmann B, Bessert H, Barker A, Muller-Hill B. 1999. Four dimers of lambda repressor bound to two suitably spaced pairs of lambda operators form octamers and DNA loops over large distances. *Curr Biol* 9: 151-4
- Reyes A, Blanton LV, Cao S, Zhao G, Manary M, et al. 2015. Gut DNA viromes of Malawian twins discordant for severe acute malnutrition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 11941-6
- Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Heath AC, et al. 2010. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 466: 334-8
- Reyes A, Wu M, McNulty NP, Rohwer FL, Gordon JI. 2013. Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 20236-41
- Rice SA, Tan CH, Mikkelsen PJ, Kung V, Woo J, et al. 2009. The biofilm life cycle and virulence of Pseudomonas aeruginosa are dependent on a filamentous prophage. *ISME J* 3: 271-82
- Rigottier-Gois L. 2013. Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *ISME J* 7: 1256-61
- Ripp SM, R. V. 1997. The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiology* 143: 2065-70
- Ripp SM, R. V. 1998. Dynamics of the pseudolysogenic response in slowly growing cells of Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology* 144 ( Pt 8): 2225-32

- Roberts JW, Roberts CW, Craig NL, Phizicky EM. 1979. Activity of the Escherichia coli recA-gene product. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 43 Pt 2: 917-20
- Robles-Sikisaka R, Ly M, Boehm T, Naidu M, Salzman J, Pride DT. 2013. Association between living environment and human oral viral ecology. *ISME J* 7: 1710-24
- Rodriguez-Brito B, Li L, Wegley L, Furlan M, Angly F, et al. 2010. Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments. *ISME J* 4: 739-51
- Rohwer F. 2003. Global phage diversity. *Cell* 113: 141
- Rolhion N, Carvalho FA, Darfeuille-Michaud A. 2007. OmpC and the sigma(E) regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated Escherichia coli strain LF82. *Mol Microbiol* 63: 1684-700
- Rooks MG, Garrett WS. 2016. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol* 16: 341-52
- Rosner JL. 1972. Formation, induction, and curing of bacteriophage P1 lysogens. *Virology* 48: 679-89
- Ross A, Ward S, Hyman P. 2016. More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. *Front Microbiol* 7: 1352
- Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, Kurilshikov A, Korem T, et al. 2018. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 555: 210-15
- Roux S, Enault F, Hurwitz BL, Sullivan MB. 2015. VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data. *PeerJ* 3: e985
- Rozanov DV, D'Ari R, Sineoky SP. 1998. RecA-independent pathways of lambdaoid prophage induction in Escherichia coli. *J Bacteriol* 180: 6306-15
- Ruska H. 1940. Die Sichtbarmachung der bakteriophagen Lyse im Uebermikroskop. *Naturewissenschaften* 28: 45-46
- Salmond GP, Fineran PC. 2015. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol* 13: 777-86
- Samuel AD, Pitta TP, Ryu WS, Danese PN, Leung EC, Berg HC. 1999. Flagellar determinants of bacterial sensitivity to chi-phage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9863-6
- Sandvik EL, Fazen CH, Henry TC, Mok WW, Brynildsen MP. 2015. Non-Monotonic Survival of Staphylococcus aureus with Respect to Ciprofloxacin Concentration Arises from Prophage-Dependent Killing of Persisters. *Pharmaceuticals (Basel)* 8: 778-92
- Sanjuan R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. 2010. Viral mutation rates. *J Virol* 84: 9733-48
- Santiago-Rodriguez TM, Ly M, Daigneault MC, Brown IH, McDonald JA, et al. 2015. Chemostat culture systems support diverse bacteriophage communities from human feces. *Microbiome* 3: 58
- Sao-Jose C, Baptista C, Santos MA. 2004. Bacillus subtilis operon encoding a membrane receptor for bacteriophage SPP1. *J Bacteriol* 186: 8337-46
- Sartor RB. 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134: 577-94
- Sasaki M, Sitaraman SV, Babbitt BA, Gerner-Smidt P, Ribot EM, et al. 2007. Invasive Escherichia coli are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest* 87: 1042-54
- Sauer B. 1987. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* 7: 2087-96
- Savage DC, Siegel JE, Snellen JE, Whitt DD. 1981. Transit time of epithelial cells in the small intestines of germfree mice and ex-germfree mice associated with indigenous microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 42: 996-1001
- Scanlan PD, Hall AR, Blackshields G, Friman VP, Davis MR, Jr., et al. 2015. Coevolution with bacteriophages drives genome-wide host evolution and constrains the acquisition of abiotic-beneficial mutations. *Mol Biol Evol* 32: 1425-35
- Schillinger TZ, N. 2012. The low incidence of diversity-generating retroelements in sequenced genomes. *Mob Genet Elements* 2: 287-91

- Schrag SJ, Mittler, J. E.,. 1996. Host-Parasite Coexistence: The Role of Spatial Refuges in Stabilizing Bacteria-Phage Interactions. *The American Naturalist* 148: 348-77
- Schuch R, Fischetti VA. 2006. Detailed genomic analysis of the Wbeta and gamma phages infecting *Bacillus anthracis*: implications for evolution of environmental fitness and antibiotic resistance. *J Bacteriol* 188: 3037-51
- Schuldiner S, Agmon V, Brandsma J, Cohen A, Friedman E, Padan E. 1986. Induction of SOS functions by alkaline intracellular pH in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 168: 936-9
- Scott J, Nguyen SV, King CJ, Hendrickson C, McShan WM. 2012. Phage-Like Streptococcus pyogenes Chromosomal Islands (SpyCI) and Mutator Phenotypes: Control by Growth State and Rescue by a SpyCI-Encoded Promoter. *Front Microbiol* 3: 317
- Scott J, Thompson-Mayberry P, Lahmamsi S, King CJ, McShan WM. 2008. Phage-associated mutator phenotype in group A streptococcus. *J Bacteriol* 190: 6290-301
- Seed KD, Yen M, Shapiro BJ, Hilaire IJ, Charles RC, et al. 2014. Evolutionary consequences of inpatient phage predation on microbial populations. *Elife* 3: e03497
- Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, et al. 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 47: 397-403
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90: 859-904
- Seksik P, Sokol H, Lepage P, Vasquez N, Manichanh C, et al. 2006. Review article: the role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 24 Suppl 3: 11-8
- Selva L, Viana D, Regev-Yochay G, Trzcinski K, Corpa JM, et al. 2009. Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1234-8
- Sevrin G, Massier S, Chassaing B, Agus A, Delmas J, et al. 2018. Adaptation of adherent-invasive *E. coli* to gut environment: Impact on flagellum expression and bacterial colonization ability. *Gut Microbes*: 1-17
- Shao Q, Trinh JT, McIntosh CS, Christenson B, Balazsi G, Zeng L. 2017. Lysis-lysogeny coexistence: prophage integration during lytic development. *Microbiologyopen* 6
- Sharma R, Schumacher U, Ronaasen V, Coates M. 1995. Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut* 36: 209-14
- Sharon I, Morowitz MJ, Thomas BC, Costello EK, Relman DA, Banfield JF. 2013. Time series community genomics analysis reveals rapid shifts in bacterial species, strains, and phage during infant gut colonization. *Genome Res* 23: 111-20
- Sharp PM. 1986. Molecular evolution of bacteriophages: evidence of selection against the recognition sites of host restriction enzymes. *Mol Biol Evol* 3: 75-83
- Shimizu-Kadota M, Kiwaki M, Sawaki S, Shirasawa Y, Shibahara-Sone H, Sako T. 2000. Insertion of bacteriophage phiFSW into the chromosome of *Lactobacillus casei* strain Shirota (S-1): characterization of the attachment sites and the integrase gene. *Gene* 249: 127-34
- Shin J, Ko KS. 2015. Effect of plasmids harbouring blaCTX-M on the virulence and fitness of *Escherichia coli* ST131 isolates. *Int J Antimicrob Agents* 46: 214-8
- Shkoporov A, Khokhlova EV, Fitzgerald CB, Stockdale SR, Draper LA, et al. 2018. ΦCrAss001, a member of the most abundant bacteriophage family in the human gut, infects *Bacteroides*. *bioRxiv*
- Siringan P, Connerton PL, Cummings NJ, Connerton IF. 2014. Alternative bacteriophage life cycles: the carrier state of *Campylobacter jejuni*. *Open Biol* 4: 130200
- Six EWK, C. A. 1973. Bacteriophage P4: a satellite virus depending on a helper such as prophage P2. *Virology* 51: 327-44
- Slominska M, Neubauer P, Wegrzyn G. 1999. Regulation of bacteriophage lambda development by guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate. *Virology* 262: 431-41
- Smith GP. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315-7

- Snyder L. 1995. Phage-exclusion enzymes: a bonanza of biochemical and cell biology reagents? *Mol Microbiol* 15: 415-20
- Sokol H, Lay C, Seksik P, Tannock GW. 2008. Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed? *Inflamm Bowel Dis* 14: 858-67
- Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, et al. 2009. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 15: 1183-9
- Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, Lay C, Lepage P, et al. 2006. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 12: 106-11
- Soret R, Chevalier J, De Coppet P, Poupeau G, Derkinderen P, et al. 2010. Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology* 138: 1772-82
- St-Pierre FE, D. 2008. Determination of cell fate selection during phage lambda infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20705-10
- Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. 2002. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15451-5
- Stern A, Keren L, Wurtzel O, Amitai G, Sorek R. 2010. Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity? *Trends Genet* 26: 335-40
- 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: 1985-94
- Stern AS, R. 2011. The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes. *Bioessays* 33: 43-51
- Stewart FM, Levin BR. 1984. The population biology of bacterial viruses: why be temperate. *Theor Popul Biol* 26: 93-117
- Stokholm J, Blaser MJ, Thorsen J, Rasmussen MA, Waage J, et al. 2018. Maturation of the gut microbiome and risk of asthma in childhood. *Nat Commun* 9: 141
- Strauch E, Kaspar H, Schaudinn C, Dersch P, Madela K, et al. 2001. Characterization of enterocolicin, a phage tail-like bacteriocin, and its effect on pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *Appl Environ Microbiol* 67: 5634-42
- Studier FWM, B. A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113-30
- Sutcliffe IC, Tao L, Ferretti JJ, Russell RR. 1993. MsmE, a lipoprotein involved in sugar transport in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 175: 1853-5
- Suttle CAC, F. 1992. Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater. *Appl Environ Microbiol* 58: 3721-9
- Tamanai-Shacoori Z, Smida I, Bousarghin L, Loreal O, Meuric V, et al. 2017. *Roseburia* spp.: a marker of health? *Future Microbiol* 12: 157-70
- Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, et al. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol* 11: 2574-84
- Thaddeus B. Stantonr DCS. 1984. Motility as a Factor in Bowel Colonization by *Roseburia cecicola*, an Obligately Anaerobic Bacterium from the Mouse Caecum. *Microbiology* 130: 173-83
- Thomas R, Berdjeb L, Sime-Ngando T, Jacquet S. 2011. Viral abundance, production, decay rates and life strategies (lysogeny versus lysis) in Lake Bourget (France). *Environ Microbiol* 13: 616-30
- Thompson NE, Pattee PA. 1981. Genetic transformation in *Staphylococcus aureus*: demonstration of a competence-conferring factor of bacteriophage origin in bacteriophage 80 alpha lysates. *J Bacteriol* 148: 294-300
- Tock MRD, D. T. 2005. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr Opin Microbiol* 8: 466-72
- Touchon M, Bernheim A, Rocha EP. 2016. Genetic and life-history traits associated with the distribution of prophages in bacteria. *ISME J* 10: 2744-54
- Tschop MH, Hugenholtz P, Karp CL. 2009. Getting to the core of the gut microbiome. *Nat Biotechnol* 27: 344-6



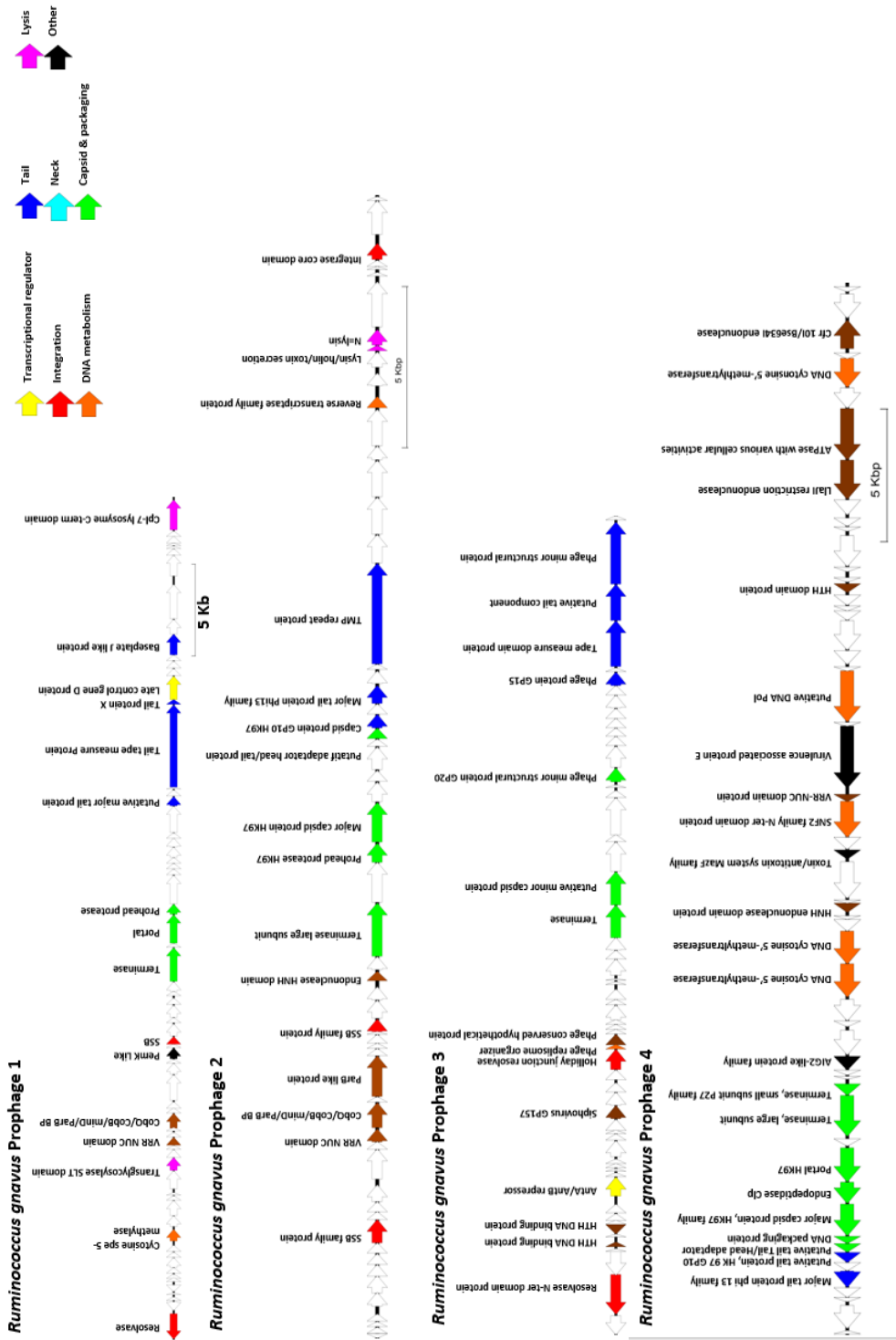
- Tu GF, Reid GE, Zhang JG, Moritz RL, Simpson RJ. 1995. C-terminal extension of truncated recombinant proteins in *Escherichia coli* with a 10Sa RNA decapeptide. *J Biol Chem* 270: 9322-6
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, et al. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457: 480-4
- Twort FW. 1915. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*: 1241-43
- Tyler JS, Mills MJ, Friedman DI. 2004. The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. *J Bacteriol* 186: 7670-9
- Van den Abbeele P, Belzer C, Goossens M, Kleerebezem M, De Vos WM, et al. 2013. Butyrate-producing *Clostridium* cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME J* 7: 949-61
- Van den Abbeele P, Van de Wiele T, Verstraete W, Possemiers S. 2011. The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept. *FEMS Microbiol Rev* 35: 681-704
- van der Woude MW. 2011. Phase variation: how to create and coordinate population diversity. *Curr Opin Microbiol* 14: 205-11
- van Houte S, Buckling A, Westra ER. 2016a. Evolutionary Ecology of Prokaryotic Immune Mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 80: 745-63
- van Houte S, Ekroth AK, Broniewski JM, Chabas H, Ashby B, et al. 2016b. The diversity-generating benefits of a prokaryotic adaptive immune system. *Nature* 532: 385-8
- Van Valen L. 1973. A new evolutionary law. *Evol. Theory*: 1-30
- Vandeputte D, Kathagen G, D'Hoe K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, et al. 2017. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature* 551: 507-11
- Vanhoutte T, Huys G, Brandt E, Swings J. 2004. Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS Microbiol Ecol* 48: 437-46
- Varela E, Manichanh C, Gallart M, Torrejon A, Borrueal N, et al. 2013. Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 38: 151-61
- Vercoe RB, Chang JT, Dy RL, Taylor C, Gristwood T, et al. 2013. Cytotoxic chromosomal targeting by CRISPR/Cas systems can reshape bacterial genomes and expel or remodel pathogenicity islands. *PLoS Genet* 9: e1003454
- Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. 2012. Classification of inflammatory bowel disease: the old and the new. *Curr Opin Gastroenterol* 28: 321-6
- Vermeiren J, Van den Abbeele P, Laukens D, Vignsnaes LK, De Vos M, et al. 2012. Decreased colonization of fecal *Clostridium coccoides*/*Eubacterium rectale* species from ulcerative colitis patients in an in vitro dynamic gut model with mucin environment. *FEMS Microbiol Ecol* 79: 685-96
- Vica Pacheco S, Garcia Gonzalez O, Paniagua Contreras GL. 1997. The *lom* gene of bacteriophage lambda is involved in *Escherichia coli* K12 adhesion to human buccal epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 156: 129-32
- Villarroel J, Kleinheinz KA, Jurtz VI, Zschach H, Lund O, et al. 2016. HostPhinder: A Phage Host Prediction Tool. *Viruses* 8
- Volterra V. 1927. Variations and fluctuations of the numbers of individuals in coexisting animal populations. *Mem. R. Comitato talassogr. ital.* 131
- Vostrov AA, Vostrukhina OA, Svarchevsky AN, Rybchin VN. 1996. Proteins responsible for lysogenic conversion caused by coliphages N15 and phi80 are highly homologous. *J Bacteriol* 178: 1484-6
- Waldor MK, Mekalanos JJ. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272: 1910-4
- Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, Parkes GC, Hudspith BN, et al. 2011. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences

- between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol* 11: 7
- Wang SL, Wang ZR, Yang CQ. 2012. Meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active inflammatory bowel disease. *Exp Ther Med* 4: 1051-56
- Wang X, Kim Y, Ma Q, Hong SH, Pokusaeva K, et al. 2010. Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nat Commun* 1: 147
- Webb JS, Thompson LS, James S, Charlton T, Tolker-Nielsen T, et al. 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 185: 4585-92
- Wei Y, Kirby A, Levin BR. 2011. The population and evolutionary dynamics of *Vibrio cholerae* and its bacteriophage: conditions for maintaining phage-limited communities. *Am Nat* 178: 715-25
- Wei Y, Ocampo P, Levin BR. 2010. An experimental study of the population and evolutionary dynamics of *Vibrio cholerae* O1 and the bacteriophage JSF4. *Proc Biol Sci* 277: 3247-54
- Weinbauer MG. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* 28: 127-81
- Weinbauer MG, Hornak K, Jezbera J, Nedoma J, Dolan JR, Simek K. 2007. Synergistic and antagonistic effects of viral lysis and protistan grazing on bacterial biomass, production and diversity. *Environ Microbiol* 9: 777-88
- Weiss M, Denou E, Bruttin A, Serra-Moreno R, Dillmann ML, Brussow H. 2009. In vivo replication of T4 and T7 bacteriophages in germ-free mice colonized with *Escherichia coli*. *Virology* 393: 16-23
- Weissman JL, Holmes R, Barrangou R, Moineau S, Fagan WF, et al. 2018. Immune loss as a driver of coexistence during host-phage coevolution. *ISME J* 12: 585-97
- Weitz JSP, T.; Meyer, J.R.; Flores, C.O.; Valverde, S.; Sullivan, M.B.; Hochberg, M.E. 2013. Phage–bacteria infection networks. *Trends Microbiol* 21: 82-91
- Wiggins BAA, M. 1985. Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 49: 19-23
- Williamson KCK, Drissi CL, Buckingham JM, Thompson CP & Helton RR. 2013. Estimates of viral abundance in soils are strongly influenced by extraction and enumeration methods. *Biol Fertil Soils* 49: 857-69
- Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, et al. 2010. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 139: 1844-54 e1
- Wilson GGM, N. E. 1991. Restriction and modification systems. *Annu Rev Genet* 25: 585-627
- Woolhouse ME, Webster JP, Domingo E, Charlesworth B, Levin BR. 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat Genet* 32: 569-77
- Wu CH, Liu IJ, Lu RM, Wu HC. 2016. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. *J Biomed Sci* 23: 8
- Wu L, Gingery M, Abebe M, Arambula D, Czornyj E, et al. 2018. Diversity-generating retroelements: natural variation, classification and evolution inferred from a large-scale genomic survey. *Nucleic Acids Res* 46: 11-24
- Xu Z, Xie J, Yang L, Chen D, Peters BM, Shirliff ME. 2018. Complete Sequence of pCY-CTX, a Plasmid Carrying a Phage-Like Region and an ISEcp1-Mediated Tn2 Element from *Enterobacter cloacae*. *Microb Drug Resist* 24: 307-13
- Yang L, Li W, Jiang GZ, Zhang WH, Ding HZ, et al. 2017. Characterization of a P1-like bacteriophage carrying CTX-M-27 in *Salmonella* spp. resistant to third generation cephalosporins isolated from pork in China. *Sci Rep* 7: 40710
- Yassour M, Vatanen T, Siljander H, Hamalainen AM, Harkonen T, et al. 2016. Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Sci Transl Med* 8: 343ra81
- Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, et al. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486: 222-7
- Ye Y. 2014. Identification of diversity-generating retroelements in human microbiomes. *Int J Mol Sci* 15: 14234-46

- Yoon SH, Han MJ, Jeong H, Lee CH, Xia XX, et al. 2012. Comparative multi-omics systems analysis of *Escherichia coli* strains B and K-12. *Genome Biol* 13: R37
- Zeng Z, Liu X, Yao J, Guo Y, Li B, et al. 2016. Cold adaptation regulated by cryptic prophage excision in *Shewanella oneidensis*. *ISME J* 10: 2787-800
- Zhang H, Fouts DE, DePew J, Stevens RH. 2013. Genetic modifications to temperate *Enterococcus faecalis* phage Ef11 that abolish the establishment of lysogeny and sensitivity to repressor, and increase host range and productivity of lytic infection. *Microbiology* 159: 1023-35
- Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DW. 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis* 181: 664-70
- Zinder NDL, J. 1952. Genetic exchange in *Salmonella*. *J Bacteriol* 64: 679-99
- Zink R, Loessner MJ, Scherer S. 1995. Characterization of cryptic prophages (monocins) in *Listeria* and sequence analysis of a holin/endolysin gene. *Microbiology* 141 ( Pt 10): 2577-84
- Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM. 2002. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* 68: 3401-7



## 2. Prophages de *R. gnavus*



### 3. Liste des primers utilisés dans ce travail

Primers pour mise en évidence l'excision des prophages			
	Nom phage	Primer Forward	Primer reverse
<i>E. coli</i> LF82	Gally	LF-ph1-c1: 5'-CACACCCAGGCAGAATATC	LF-ph1-c2: 5'-CCGCCAACATTCCATGAAC
	Perceval	JC 1: 5'-ATGCGCAGAGGGTATAGAC	JC 2: 5'-TGACCGACCGATAACAATG
	Prophage 3	JC 106: 5'-CACAGTTAAGCGAGTTTGC	JC 108: 5'-CAAGCAATGTTCTGGTATTGATAGG
	Prophage 4	LF-ph4-c1: 5'-GCACAATCCGATCGAGAG	LF-ph4-c2: 5'-GAATGACGCGCATTCCTG
	Cyrano	Plasmidique	
<i>F. prausnitzii</i> A2-165	Lagaffe	JC 256 :5'-GGCCTTGACAGTGTCAATG	JC 257: 5'-TCCTGCCCGTAGAATTTCCG
	Mushu	N.D	N.D
<i>R. intestinalis</i> L1-82	Shimadzu	JC 57: 5'-CGGTTGGTGTTCCTGTATATG	JC 219: 5'-GTCTATTGTTCCGAGCAATTC
	Jekyll	JC 58: 5'-AAAGAAAGCCGACATTGTTG	JC 59: 5'-CCGGTTATTGTAATGATTATTTCTC
<i>R. gnavus</i> ATCC29149	Prophage 1	JC 32: 5'-ACTGAAGTGCATAACTATGG	JC 35: 5'-GACTTGATTGATCGTGATAC
	Prophage 2	JC 40: 5'-TGATACGCCGGAAGATAC	JC 41: 5'-GCACCTTGCAATATCAC
	Prophage 3	N.D	N.D
	Prophage 4	N.D	N.D

Primers pour qPCR			
	Nom phage	Primer Forward	Primer reverse
<i>E. coli</i> LF82	Témoins chromosomique	JC 122: 5'-TCGCCACCTTTGACTGTACC	JC 124: 5'-GTCCAGCCGGTAAAACAGA
	Gally	JC 78: 5'-GCCTTGCATCTTCTCCA	JC 79: 5'-TCTGAGCAACGCTGTAGGG
	Perceval	JC 194: 5'-GTTGGACCTGCCAGCCATTA	JC 195: 5'-TGTGGTGTGCTTCGTGACAA
	Prophage 3	JC 196: 5'-CGCCCTGATCGTCATCTGT	JC 197: 5'-TCGGATTGTAACCTCGCAGA
	Prophage 4	JC 100: 5'-TTGTCCAGCGTTGTTTACCT	JC 101: 5'-CGGCACTGGATACACTGAAC
	Cyrano	JC 96: 5'-TGACAAGTCGCACTATTACTCAGAA	JC 97: 5'-CTCGCAGCTGTCCATAGCC
<i>F. prausnitzii</i> A2-165	Témoins chromosomique	JC 192: 5'-CGGATCCCAACTGGGTCTAC	JC 193: 5'-CGGCAGCGTTTTTGATCTT
	Lagaffe	JC 175: 5'-CTGCCGAAACTATGCGAACG	JC 176: 5'-GCGCGCTTCTTGACATTT
	Mushu	JC 177: 5'-AAGTTCCTCATGGGACAGCG	JC 178: 5'-TTGCCCTTCATCATCCGCTT
<i>R. intestinalis</i> L1-82	Témoins chromosomique	JC 126: 5'-GAAGATGGACGCGCAAGAAC	JC 128: 5'-TGCTTGGATGACGACGCTTA
	Shimadzu	JC 130: 5'-GACAGAGGCGACCACTATCG	JC 132: 5'-GGAGACTGAGAGAGTCCCGT
	Jekyll	JC 138 :5'-CCCAAAGATTGGCGAGGACT	JC 140: 5'-GCGGCGACTCTCCATAATCA
<i>R. gnavus</i> ATCC29149	Témoins chromosomique	JC 153: 5'-TGCCGGATTCGGTGGATATG	JC 154: 5'-GTCTGCCAAGTCCAGTTCT
	Prophage 1	JC 157: 5'-CAACTTCTGCAAGCCGACAC	JC 158: 5'-TGTCTTCGCCAGATCATCG
	Prophage 2	JC 161: 5'-AGACAGTAGAGAACGCCGGA	JC 162: 5'-GCTTAAGTCGATACCGCCCA
	Prophage 3	JC 165: 5'-TGCAAGACGTTTCAAAGCTGG	JC 166: 5'-TCAACCCATCTTTCAGGGC
	Prophage 4	JC 169: 5'-ACAGGTATGCAGCATCGGAG	JC 170: 5'-TATCTTCTCCCGGATGCCA



## 4. Article 2

### RESEARCH

#### REPORT

#### INFECTION

# Inflammation boosts bacteriophage transfer between *Salmonella* spp.

Médéric Diard,<sup>1\*</sup> Erik Bakkeren,<sup>1</sup> Jeffrey K. Cornuault,<sup>2</sup> Kathrin Moor,<sup>1,†</sup> Annika Hausmann,<sup>1,†</sup> Mikael E. Sellin,<sup>1,†,‡</sup> Claude Loverdo,<sup>3</sup> Abram Aertsen,<sup>4</sup> Martin Ackermann,<sup>5</sup> Marianne De Paep,<sup>2</sup> Emma Slack,<sup>1</sup> Wolf-Dietrich Hardt<sup>1\*</sup>

Bacteriophage transfer (lysogenic conversion) promotes bacterial virulence evolution. There is limited understanding of the factors that determine lysogenic conversion dynamics within infected hosts. A murine *Salmonella* Typhimurium (S.Tm) diarrhea model was used to study the transfer of SopE $\Phi$ , a prophage from S.Tm SL1344, to S.Tm ATCC14028S. Gut inflammation and enteric disease triggered >55% lysogenic conversion of ATCC14028S within 3 days. Without inflammation, SopE $\Phi$  transfer was reduced by up to 10<sup>5</sup>-fold. This was because inflammation (e.g., reactive oxygen species, reactive nitrogen species, hypochlorite) triggers the bacterial SOS response, boosts expression of the phage antirepressor Tum, and thereby promotes free phage production and subsequent transfer. Mucosal vaccination prevented a dense intestinal S.Tm population from inducing inflammation and consequently abolished SopE $\Phi$  transfer. Vaccination may be a general strategy for blocking pathogen evolution that requires disease-driven transfer of temperate bacteriophages.

**B**acteriophages (phages) often encode virulence factors and are important drivers of bacterial pathogen evolution (1, 2). This also holds true for pathogenic enterobacteriaceae, such as *Salmonella enterica* Typhimurium (S.Tm). S.Tm genomes typically harbor several prophages (3). Phage transfer (lysogenic conversion) is a key driver of genomic diversification between closely related enterobacteriaceae and is thought to allow rapid adaptation to new host species, notably by reassorting the virulence factor repertoire (4). Phage transfer has been studied extensively in vitro. This has established its molecular basis and delivered numerous tools for molecular biology. In hosts infected by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, or *Streptococcus pyogenes*, the reactivation or transfer of phages has also been observed (3–8). However, we have limited information about the factors controlling phage-transfer dynamics in vivo.

To address this knowledge gap, we characterized SopE $\Phi$  transfer between two well-established S.Tm strains (SL1344 and ATCC14028S) commonly used in virulence studies in mice (fig. S1, A and B). SopE $\Phi$  belongs to the P2 family of temperate phages (9, 10). Its tail-fiber region carries a gene

encoding SopE, a virulence factor enhancing S.Tm's host cell invasion and exacerbating enteropathy (11, 12). Lysogenic conversion by *sopE*-encoding phages has been observed during epidemic strain evolution (13), and a SopE $\Phi$  lysogen of ATCC14028S elicits stronger enteropathy in the bovine gut than does the isogenic parental strain (14). On the basis of these observations, it has been speculated that phage-mediated *sopE* transfer may promote expansion of epidemic *Salmonella* strains (1, 13). However, so far, nothing is known about the pace of SopE $\Phi$  transfer in vivo and the factors that could influence its dynamics.

To study SopE $\Phi$ -transfer dynamics in vivo, we used SL1344 as the phage donor. In SL1344, the SopE $\Phi$  prophage is inserted at the 3' end of the *ssrA* gene (10). Specifically, we used a variant of this strain, in which SopE $\Phi$  carried a kanamycin resistance cassette (*aphT*; SL1344 (SopE $\Phi$ <sup>aphT</sup>); Fig. 1A, fig. S1A, and table S1). This allows quantification of lysogenic conversion by selective plating. S.Tm ATCC14028S (14028S) was chosen as recipient because it does not carry any bacteriophages at the integration site (*attB*) targeted by the SopE $\Phi$  integrase (Fig. 1A and fig. S1A). Moreover, 14028S colonizes the gut lumen of mice as efficiently as does SL1344.

In vivo phage-transfer experiments were initiated by orogastric infection of mice first with 200 colony-forming units (CFU) of the donor [SL1344 (SopE $\Phi$ <sup>aphT</sup>); kan<sup>R</sup>; amp<sup>R</sup>; table S1] and immediately thereafter with 200 CFU of the recipient (14028S; *marT::cat*; cm<sup>R</sup>; amp<sup>R</sup>; table S1) (15). Washing, dilution, and sequential inoculation ensured that phage transfer could only occur in vivo. Donors and recipients colonized the gut lumen with comparable efficiencies [mean competitive index CI<sub>donor vs recipient</sub> day 1 postinfection

(p.i.) = -0.10 ± 0.13; not significantly different from 0 (*t* test, *P* = 0.475)] (Fig. 1B), and all mice developed pronounced intestinal inflammation (Fig. 1C). Phage transfer [i.e., recipient lysogens; denoted as 14028S (SopE $\Phi$ <sup>aphT</sup>); Fig. 1A] was detected as early as 24 hours p.i. and verified by multiplex polymerase chain reaction (PCR) (Fig. 1B, fig. S1B, and table S2). Recipient lysogen frequencies continued to rise, and 14028S (SopE $\Phi$ <sup>aphT</sup>) outnumbered the parental recipient in half of the animals by day 3 p.i. (Fig. 1B). Equivalent results were obtained in a second mouse strain (129 SvEv; *Nramp1*<sup>+</sup>), which could be infected for longer periods (fig. S1, C and D). Here, 14028S (SopE $\Phi$ <sup>aphT</sup>) could completely replace the recipient population by day 15 p.i. (fig. S1C). Thus, phage transfer proceeds independently of the mouse line used.

Competitive infection experiments verified that recipient lysogens arose from frequent lysogenic conversion events and not from increased fitness of the lysogens. To address if 14028S (SopE $\Phi$ <sup>aphT</sup>) might outcompete the ancestral recipient strain 14028S, we “locked” the prophage in the recipient lysogen. Deleting *attR* [14028S (SopE $\Phi$ <sup>aphTΔattR</sup>); fig. S1A] prohibited prophage excision and de novo phage transfer. Both strains remained equally represented through days 1 to 3 p.i. (Fig. 1D). Thus, the presence of SopE $\Phi$  did not provide a detectable benefit to lysogens.

To address whether there is any potential cost associated with SopE $\Phi$  excision, we performed competitions between 14028S SopE $\Phi$ <sup>aphT</sup> (excisable prophage) and 14028S (SopE $\Phi$ <sup>aphTΔattR</sup>) (locked prophage; resistant to superinfection by SopE $\Phi$ <sup>aphT</sup>). The final CI at day 3 p.i. did not significantly deviate from 0, excluding significant effects of excision on the overall fitness of the lysogen population (Fig. 1E). Finally, bar-coded recipient strain mixtures confirmed high numbers of independent phage-transfer events (fig. S2, A and B). These observations highlight the efficiency of phage-mediated horizontal gene transfer in the intestinal microenvironment and permitted us to further identify factors affecting phage-transfer dynamics in vivo.

On the basis of established in vitro data, we reasoned that prophage activation (lytic induction) might be of key importance. In vitro, most prophages are activated by the stress-induced SOS response of the host bacterium (16), and this can increase phage release and transfer to new recipient bacteria. Much less is known about prophage activation in vivo. Previous work had shown that S.Tm induces antimicrobial peptide secretion and recruits granulocytes into the gut lumen, which kills a substantial fraction of the S.Tm cells (17, 18). Thus, we hypothesized that damage inflicted by the mucosal innate immune defenses may stimulate S.Tm's SOS response and thereby trigger lytic induction and subsequent transfer of SopE $\Phi$ . This led to three testable predictions: (i) Disrupting the signaling from SOS response to SopE $\Phi$ 's lytic control should diminish phage transfer; (ii) S.Tm mutants failing to elicit gut inflammation should show reduced rates of phage transfer; and (iii) interventions preventing enteropathy should prevent phage transfer.

<sup>1</sup>Institute of Microbiology, ETH Zurich, Switzerland. <sup>2</sup>Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy en Josas, France. <sup>3</sup>Laboratoire Jean Perrin (UMR 8237), CNRS-UPMC, 75005 Paris, France. <sup>4</sup>Department of Microbial and Molecular Systems, KU Leuven, Belgium. <sup>5</sup>Department of Environmental Systems Science, ETH Zurich, and Department of Environmental Microbiology, Eawag, Switzerland.

\*Corresponding author. Email: mederic.diard@micro.biol.ethz.ch (M.D.); wolf-dietrich.hardt@micro.biol.ethz.ch (W.-D.H.)

†These authors contributed equally to this work.  
‡Present address: Science for Life Laboratory, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Sweden.

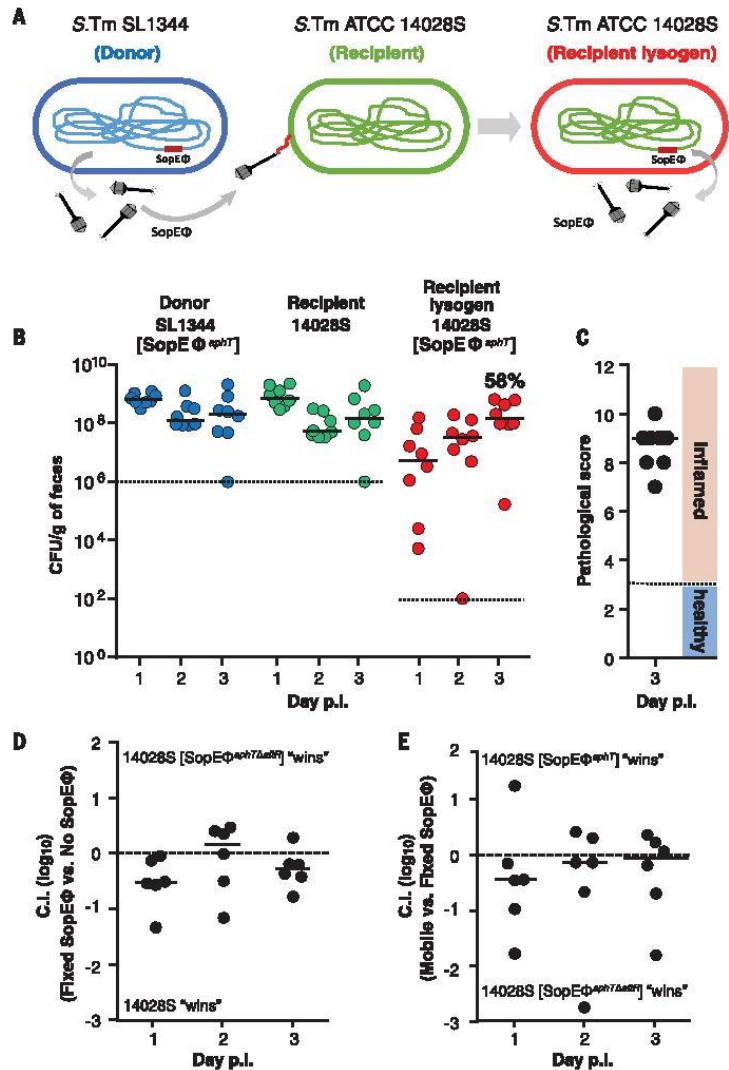
To test our first hypothesis, we used a transcriptional reporter and a SopE $\Phi$  derivative that is “blind” for the bacterial SOS response. The SopE $\Phi$ -encoded *tum* gene was chosen to design the transcriptional reporter. This gene encodes the Tum antirepressor that links the bacterial SOS response to the lytic induction of the prophage (fig. S3A) (19–21). Indeed, mitomycin C, a well-known inducer of DNA damage, the SOS response, and prophage lytic cycles, enhanced not only phage transfer (fig. S3, B and C) but also *gfp* (green fluorescent protein) expression by the *tum*-reporter plasmid in vitro (p*Ptum*GFP; fig. S3, D to F). Moreover, in vitro phage transfer was increased in the presence of sublethal concentrations of SOS-inducing stressors elicited by inflammatory immune defenses (i.e., reactive nitrogen species, reactive oxygen species, or hypochlorite; fig. S3, B and C).

To assess the relevance of *tum* induction for phage transfer in vivo, we constructed a SopE $\Phi$  variant that carries a *tum* deletion [SL1344 (SopE $\Phi^{aphT\Delta tum}$ ); fig. S1A and table S1]. In in vivo phage-transfer experiments using SL1344 (SopE $\Phi^{aphT\Delta tum}$ ) as the donor and 14028S as recipient, both strains colonized the gut; the infection triggered pronounced gut inflammation, but no phage transfer was detectable in any of the mice tested (Fig. 2, A and B; for *tum* complementation, see fig. S4). Thus, Tum controls SopE $\Phi$  transfer in vivo.

To test the impact of inflammation on phage-transfer dynamics, we constructed isogenic, avirulent variants of the donor and the recipient strains by disrupting the type III secretion systems 1 and 2 (T1 and T2) [ $\Delta$ *invG*  $\Delta$ *ssrD*; SL1344<sup>vir</sup> (SopE $\Phi^{aphT}$ ); 14028S<sup>vir</sup>; table S1]. Such T1/T2 double mutants cannot trigger inflammation but normally colonize the mouse gut lumen for at least 3 days (22). In sequential infections as described above, both strains efficiently colonized the intestinal lumen (Fig. 3A; open blue and open green symbols). However, in contrast to virulent strains, the mice did not develop gut inflammation (median pathological score of 1 versus 9, Fig. 3B; compare open and closed symbols) and yielded significantly fewer recipient lysogens [14028S<sup>vir</sup> (SopE $\Phi^{aphT}$ );  $\approx 10^3$  per gram of feces versus up to  $10^9$  per gram of feces; Fig. 3A, compare open and closed red symbols].

Further experiments established that *tum* is also expressed in the inflamed gut (Fig. 3, C and D). GFP-positive bacteria were only detected if mice were infected with S.Tm strains eliciting gut inflammation [i.e., SL1344 (SopE $\Phi^{aphT}$ ) and 14028S carrying p*Ptum*GFP; Fig. 3, C and D]. No GFP was detected in mice infected with avirulent S.Tm mutants that fail to elicit disease [i.e.,  $\Delta$ *invG*  $\Delta$ *ssrD* derivatives of SL1344 (SopE $\Phi^{aphT}$ ) and 14028S carrying p*Ptum*GFP;  $>10^3$  bacteria examined]. These observations provide evidence that SopE $\Phi$ 's lytic cycle is induced in response to intestinal inflammation.

To substantiate this finding, we tested if reestablishing gut inflammation would rescue phage transfer by replacing either the donor or the recipient with the original virulent strain. Indeed, the sequential infection with either the avirulent



**Fig. 1. In vivo, the bacteriophage SopE $\Phi$  is efficiently transferred between two S.Tm strains.** (A) Phage-transfer experiment. SopE $\Phi^{aphT}$  is released from the donor strain SL1344 and infects the recipient 14028S to yield the recipient lysogen 14028S (SopE $\Phi^{aphT}$ ) (“lysogenic conversion”). (B) S.Tm populations, as determined by plating of feces from mice that were sequentially infected with the donor [SL1344 (SopE $\Phi^{aphT}$ ); *kan*<sup>R</sup>; *amp*<sup>R</sup>; table S1] and the recipient (14028S; *marT::cat*; *cm*<sup>R</sup>; *amp*<sup>R</sup>; table S1). Dotted lines: detection limits of the selective plating procedure. Fifty-eight percent of 14028S bacteria were lysogens by day 3 p.i. (median value) ( $n = 8$ ; three independent experiments). (C) Gut inflammation at day 3 p.i., determined by scoring tissue sections as described in (15). (D) Control experiment 1: Competitive infection with a 1:1 mixture of 14028S (SopE $\Phi^{aphT\Delta attB}$ ) (*kan*<sup>R</sup>; *amp*<sup>R</sup>) and 14028S (*marT::cat*; *cm*<sup>R</sup>; *amp*<sup>R</sup>; table S1) indicated that the phage did not confer a growth advantage ( $n = 6$ ; two independent experiments). (E) Control experiment 2: Competitive infection with a 1:1 mixture of 14028S (SopE $\Phi^{aphT\Delta attB}$ ) and 14028S (SopE $\Phi^{aphT}$ ) (*marT::cat*; *cm*<sup>R</sup>; *kan*<sup>R</sup>; *amp*<sup>R</sup>) indicated that prophage excision conferred no detectable fitness cost to the recipient lysogen ( $n = 6$ ; two independent experiments). (D and E) dashed lines: C.I. = 0, both strains are equally represented (15). No significant deviation of the mean from 0 at day 3 p.i. ( $t$  test,  $P > 0.05$ ). In all experiments, strains were inoculated by sequential gavage with 200 CFU each.



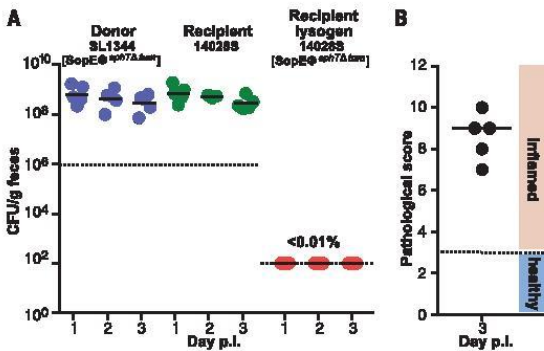
donor [SL1344<sup>avir</sup> (SopE $\Phi^{phtT}$ )] plus the virulent recipient (14028S) or vice versa not only elicited pronounced gut inflammation as previously shown in (23) but also promoted phage transfer (up to 10<sup>9</sup> per gram of recipient lysogens [14028S (SopE $\Phi^{phtT}$ ) or 14028S<sup>avir</sup> (SopE $\Phi^{phtT}$ ); fig. S5, A and B]. These data verified that intestinal inflammation was required for efficient phage transfer.

We also asked if a particular arm of the host's inflammatory response would be the main stimulus of phage transfer. However, mice with a NO synthase- and NADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase-deficient immune system (reduced reactive oxygen species, nitrogen species, and hypochlorite) and myeloperoxidase-deficient mice (no hypochlorite production) displayed intense intestinal inflammation and the same high levels of phage trans-

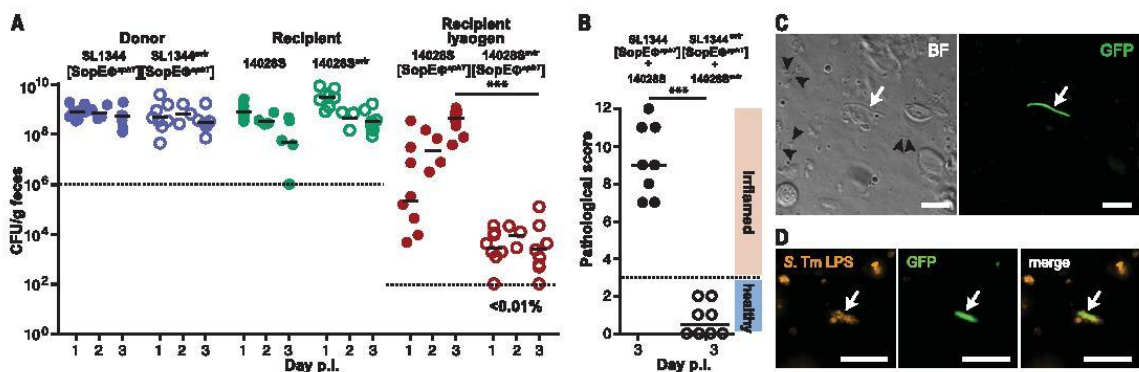
fer as wild-type control mice (fig. S6). In combination with the *in vitro* data demonstrating that these are sufficient (fig. S3, B and C), this suggests that phage transfer is boosted *in vivo* by SOS-inducing compounds, including, but not restricted to, reactive oxygen species, nitrogen species, and hypochlorite.

Finally, we tested whether interventions preventing inflammatory disease would reduce SopE $\Phi$  transfer *in vivo*. For this, we used an inactivated oral vaccination protocol that induces high titers of *S.Tm* O-antigen-specific immunoglobulin A (IgA) (24). This vaccine protects efficiently from tissue invasion and intestinal inflammation, without affecting the total luminal loads of *S.Tm* in the antibiotic pretreated intestine (24). This protocol should therefore provide an ideal assay system to examine whether vaccination can limit inflammation-dependent phage transfer.

Vaccinated mice or mock-vaccinated "naïve" controls were sequentially infected with the donor [SL1344 (SopE $\Phi^{phtT}$ ); table S1] and the recipient (14028S *marT::cat*; table S1). Both strains efficiently colonized the intestinal lumen of naïve and of vaccinated mice (Fig. 4A; closed and open, blue and green symbols). In sharp contrast to the naïve controls, the vaccinated mice were not only protected from disease for up to 3 days (Fig. 4B) but also yielded much lower numbers of recipient lysogens [14028S (SopE $\Phi^{phtT}$ ); Fig. 4A, compare closed and open red symbols]. In half of the mice, recipient lysogens remained below the detection limit throughout the entire experiment. There was a correlation between vaccinated mice developing some degree of mucosal inflammation by day 3 p.i. and the presence of recipient lysogens (Fig. 4, A and B; marked in gray). These data verified that gut inflammation controls phage-transfer

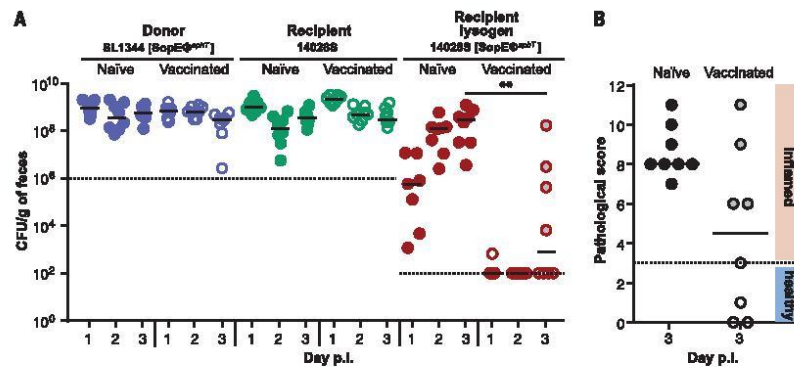


**Fig. 2. Tum controls phage transfer *in vivo*.** (A) *S.Tm* populations, as determined by plating of feces from mice that were sequentially infected with the donor [SL1344 (SopE $\Phi^{phtT}$ ); kan<sup>R</sup>; amp<sup>R</sup>; table S1] and the recipient (14028S; *marT::cat*; cm<sup>R</sup>; amp<sup>R</sup>; table S1; 200 CFU each, by gavage). Less than 0.01% of 14028S bacteria were lysogens by day 3 p.i. (median value) ( $n = 5$  mice from two independent experiments). Dotted lines: detection limits of the selective plating procedure. (B) Gut inflammation at day 3 p.i., as determined by scoring tissue sections (15).



**Fig. 3. Reduced phage transfer in the absence of intestinal inflammation.** (A) *S.Tm* populations, as determined by plating of feces from mice that were sequentially infected with the avirulent donor [open blue symbols; SL1344<sup>avir</sup> (SopE $\Phi^{phtT}$ ); kan<sup>R</sup>; amp<sup>R</sup>; table S1] and the avirulent recipient (open green symbols; 14028S<sup>avir</sup>; *marT::cat*; cm<sup>R</sup>; amp<sup>R</sup>) ( $n = 8$  mice; three independent experiments) or (as control) with the virulent donor [closed blue symbols; SL1344 (SopE $\Phi^{phtT}$ ); kan<sup>R</sup>; amp<sup>R</sup>; table S1] and the virulent recipient (closed green symbols; 14028S; *marT::cat*; cm<sup>R</sup>; amp<sup>R</sup>; table S1; 200 CFU each, by gavage) ( $n = 8$  mice; three independent experiments). Red symbols: fecal loads of recipient lysogens [open symbols; 14028S<sup>avir</sup> (SopE $\Phi^{phtT}$ ); closed symbols; 14028S (SopE $\Phi^{phtT}$ )]. Less than 0.01% of

14028S<sup>avir</sup> bacteria were lysogens by day 3 p.i. (median value). Dotted lines: detection limits of the selective plating procedure. (B) Gut inflammation at day 3 p.i. (15). (A and B) \*\*\*Mann Whitney U-test,  $P < 0.001$ . (C and D) The *Ptum* controlled *gfp* expression in the gut contents from mice infected for 24 hours with SL1344 (SopE $\Phi^{phtT}$ ) p*Ptum::gfp* (200 CFU by gavage) was analyzed by light microscopy. (C) Left panel: bright field (BF); right panel: GFP; white arrow indicates a filamenting GFP-positive bacterium, black arrowheads indicate *Salmonella*-shaped bacteria negative for GFP. (D) Left panel: anti-*S.Tm* LPS antibody staining; middle panel: GFP; right panel: overlay. Arrow indicates the GFP-positive bacterium counterstained with antibodies against lipopolysaccharide (LPS). Scale bars, 10  $\mu$ m.



**Fig. 4. Vaccination prevents gut inflammation and phage transfer.** For vaccination, mice were treated 4 weeks before infection with gavages of peracetic acid-killed *S.Tm*, whereas naïve mice received phosphate-buffered saline (material and methods). **(A)** *S.Tm* populations, as determined by plating of feces from naïve (closed symbols;  $n = 8$ , three independent experiments) and vaccinated (open symbols;  $n = 8$ , three independent experiments) mice that were sequentially infected with the donor [SL1344 (SopE4<sup>phT</sup>); kan<sup>R</sup>;

amp<sup>R</sup>; table S1] and the recipient (14028S; *marT::cat*; cm<sup>R</sup>; amp<sup>R</sup>; table S1, 200 CFU each, by gavage). Note that some mice did not defecate at each sampling point. Dotted lines: detection limits of the selective plating procedure. **(B)** Gut inflammation at day 3 p.i. Open symbols highlighted with light gray: four vaccinated mice that featured detectable densities of recipient lysogens and mucosal inflammation (detected on tissue sections as described (15)). \*\*Mann Whitney test,  $P < 0.01$ .

kinetics and showed that vaccination not only prevented inflammatory disease but also reduced phage-mediated horizontal gene transfer. This was further supported by the increased densities of free phage particles in the lumen of the inflamed (but not the uninfamed) mouse gut (fig. S7).

Our results show that an important mechanism of microbial evolution—horizontal gene transfer by temperate phages—is promoted by gut inflammation (i.e., disease symptoms elicited by enteropathogenic bacteria). This is attributable to phage regulators, which link the bacterial SOS response that is elicited by gut inflammation to lytic induction and phage transfer. The process operates in addition to inflammation-associated bacterial blooms known to drive contact-dependent plasmid transfer (fig. S8). The direct requirement for inflammation implies that vaccination could reduce phage transfer and thereby can be used to slow down pathogen evolution.

From the pathogen's perspective, the elicitation of gut inflammation has two different effects. *S.Tm* growth is favored by the environmental conditions provided by the inflamed gut (22, 25). However, as inflammation produces many stressors (17, 26), it also stimulates the microbial SOS response, induces the lytic cycle, and boosts horizontal gene transfer and reassortment of virulence factors, but also raises the risk of death by lysis. From the perspective of the phage, the link between lytic induction and the environmental cues of the inflamed gut may represent an adaptation by amplifying phage copy numbers and increasing chances to reach novel bacterial hosts. It is also tempting to speculate that the disease-accelerated phage transfer may explain why enteropathogenic bacteria such as *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae* (27), or Shiga-toxin-producing *E. coli* strains (28) harbor so many prophages (7). It would be interesting to determine if such

disease-driven spread of temperate phages might also affect the microbiota, e.g., by accelerating the emergence of strains with increased virulence in patients suffering from inflammatory bowel diseases or AIDS (29, 30).

In conclusion, phage transfer is a dynamic process occurring in vivo with variable frequencies. The host's immune response was identified as a key factor that can drastically affect its pace. Notably, the innate (proinflammatory) and the adaptive IgA response of the infected host have opposing effects. Whereas gut inflammation (elicited by the innate response of the naïve host) boosts phage transfer, IgA-mediated mucosal adaptive immunity slows it down. This highlights an unexpected advantage of vaccination over antibiotic therapy, which is known to stimulate phage transfer and generalized transduction (31). This important beneficial aspect should receive particular attention in future vaccination trials and might open the door to managing pathogen evolution, e.g., in farm animal reservoirs of zoonotic enteropathogens.

#### REFERENCES AND NOTES

1. H. Brüssow, C. Canchaya, W. D. Hardt, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 560–602 (2004).
2. E. V. Davies, C. Winstanley, J. L. Fothergill, C. E. James, *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, fnw015 (2016).
3. C. Goerke et al., *J. Infect. Dis.* **189**, 724–734 (2004).
4. D. W. Acheson et al., *Infect. Immun.* **66**, 4496–4498 (1998).
5. E. V. Davies et al., *ISME J.* **10**, 2553–2555 (2016).
6. T. B. Broudy, V. A. Fischetti, *Infect. Immun.* **71**, 3782–3786 (2003).
7. M. De Paeppe et al., *PLOS Genet.* **12**, e1005861 (2016).
8. J. S. Tyler et al., *PLOS Pathog.* **9**, e1003236 (2013).
9. S. Miroid et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 9845–9850 (1999).
10. C. Pelludat, S. Miroid, W. D. Hardt, *J. Bacteriol.* **185**, 5182–5191 (2003).
11. W. D. Hardt, L. M. Chen, K. E. Schuebel, X. R. Bustelo, J. E. Galán, *Cell* **93**, 815–826 (1998).
12. M. W. Wood, R. Rosqvist, P. B. Mullan, M. H. Edwards, E. E. Galov, *Mol. Microbiol.* **22**, 327–338 (1996).

13. L. Petrovska et al., *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 617–624 (2016).
14. S. Zhang et al., *FEMS Microbiol. Lett.* **217**, 243–247 (2002).
15. Materials and methods are available as supplementary materials.
16. A. B. Oppenheim, O. Kobiler, J. Stavans, D. L. Court, S. Adhya, *Annu. Rev. Genet.* **39**, 409–429 (2005).
17. L. Maier et al., *PLOS Pathog.* **10**, e1004557 (2014).
18. T. Miki, O. Holst, W. D. Hardt, *J. Biol. Chem.* **287**, 34844–34855 (2012).
19. A. M. Brumby, I. Lamont, I. B. Dodd, J. B. Egan, *Virology* **219**, 105–114 (1996).
20. K. E. Shearwin, A. M. Brumby, J. B. Egan, *J. Biol. Chem.* **273**, 5708–5715 (1998).
21. K. Bunney, J. Liu, J. Roth, *J. Bacteriol.* **184**, 6235–6249 (2002).
22. B. Stecher et al., *PLOS Biol.* **5**, e244 (2007).
23. M. Dard et al., *Nature* **494**, 353–356 (2013).
24. K. Moor et al., *Front. Immunol.* **7**, 34 (2016).
25. S. E. Winter et al., *Nature* **467**, 426–429 (2010).
26. B. A. Duerkop, S. Vaisnava, L. V. Hooper, *Immunity* **31**, 368–376 (2009).
27. M. K. Waldor, J. J. Mekalanos, *Science* **272**, 1910–1914 (1996).
28. H. Schmidt, *Res. Microbiol.* **152**, 687–695 (2001).
29. J. M. Norman et al., *Cell* **160**, 447–460 (2015).
30. C. L. Monaco et al., *Cell Host Microbe* **19**, 311–322 (2016).
31. B. L. Bearson, B. W. Brunelle, *Int. J. Antimicrob. Agents* **46**, 201–204 (2015).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Hardt lab members and A. Buckling for helpful discussions and to the RCHCI and EPIC team for excellent support of our animal work. This work has been funded by grants from the Swiss National Foundation (SNF, 310030\_53074; Snergia CRSII\_154414/1) and the Novartis Foundation program to W.-D.H., the Swedish Research Council (2012-262; 2015-06635) to M.E.S., the SNF Ambizione fellowship PZ00P3\_136742 and a SNF Marie Heim-Vögtlin stipend to E.S., and an ETH Excellence Scholarship and Opportunity Program stipend to E.B. The data presented in this study are in the main text and in the supplementary materials.

#### SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencemag.org/content/355/6330/1211/suppl/DC1  
Materials and Methods  
Figs. S1 to S8  
Tables S1 and S2  
References (32–45)  
8 April 2016; resubmitted 19 December 2016  
Accepted 22 February 2017  
10.1126/science.aaf8451

## Materials and Methods

### S.Tm strains and plasmids used in this study.

All strains are listed in Table S1. Donor and Recipient strains were derived respectively from SL1344 (32) and ATCC 14028S (33).

The pM975 (34) plasmid conferred resistance to ampicillin to all strains used in this study. Targeted deletions were performed using the lambda Red-recombinase method as described in (35) with primers indicated in Table S2 ("Del" primers were used for generation of recombinogenic fragments and "Ver" primers or Right\_up/ attBF for PCR verification of the *tum* deletion or of the SopE $\Phi$  *attR* deletion, respectively (Fig. S1)).

Deletions of *tum* and SopE $\Phi$  *attR* as well as barcodes were transferred after constructions in the appropriate genetic background by P22 HT105/1 *int-201* mediated transductions as described in (36).

The p*Ptum*GFP plasmid was constructed by cloning the promoter region of *tum* upstream of the promoter-less *gfp* of pM965 (37), thereby replacing the *PrpsM* promoter of pM965. The restriction sites *Bam*HI and *Xba*I were used to cut open pM965, excise *PrpsM* and to ligate a PCR amplicon of *Ptum* (primers *Ptum*SopEphi\_up/*Ptum*SopEphi\_dw). A promoter-less plasmid derivative of pM965 (pNoPGFP) was constructed by treating the *Bam*HI / *Xba*I digested plasmid with Klenow fragment before re-ligation without insert.

The *ptum* plasmid was constructed by cloning a copy of *tum*, including upstream promoter regions, into pM965, replacing *PrpsM::gfp*. The *tum* allele was amplified (primers *Tum\_XbaI\_up*/*Tum\_EcoRV\_dw*, Table S2) and cloned into pM965 digested with *Bam*HI and *Xba*I. The empty vector control (p $\emptyset$ ) was created through blunt-end digestion of pM965 with *Ale*I and *Eco*RV followed by re-ligation.

When specified, antibiotics were added in liquid cultures or agar plates (chloramphenicol 6  $\mu$ g/ml, kanamycin 50  $\mu$ g/ml, ampicillin 100  $\mu$ g/ml) (AppliChem).

### Infection experiments.

All mice were kept under specified pathogen free barrier conditions in individually ventilated cages at the RCHCI facility of ETH Zürich. The experiments were reviewed and approved by the responsible legal body (Tierversuchskommission, Kantonales Veterinäramt Zürich, license 222/2013). 8 to 12 weeks old 129 SvEv mice (naturally *nramp*<sup>-</sup>, thus surviving long term *S.Tm* infection (38)) or sensitive C57BL/6 mice were pretreated with 20 mg ampicillin *per os* 24 hours before inoculation to alleviate the colonization resistance (39). For generation of bone marrow chimeras CD45.1 C57BL/6 mice were lethally irradiated and reconstituted with bone marrow of CD45.2 C57BL/6 wild-type or *cybb*<sup>-</sup>/*nos2*<sup>-</sup> mice as described in (40). After 6-8 weeks, the animals were infected. The reconstitution efficiency was determined by flow cytometric analysis of CD45.1/CD45.2 expression on peripheral blood leucocytes 2 weeks after reconstitution.

Bacteria were grown under slight aeration in LB supplemented with the appropriate antibiotic(s) for 12 hours at 37°C and cultured to late-log phase for 4h in the same medium without antibiotic (these conditions induce expression of T1). Approximately 200 bacteria from a given strain were prepared by diluting the subculture 10<sup>5</sup>-fold after one washing step in PBS, and were inoculated by gavage. Population sizes of *Salmonella*



spp. were monitored by plating serial dilutions of the inoculum or of fresh feces (suspended by bead-beating; 1 min at 25 hz in a Tissuelyser (Qiagen)) on MacConkey agar plates (Difco) supplemented with appropriate antibiotics. The competitive index (C.I.) was calculated as the  $\log_{10}$  of the ratio of competitors' population sizes at a particular time point divided by the initial ratio in the inoculum. The degree of intestinal inflammation (i.e. pathological score) was determined by microscopic observation of H&E stained sections of the cecum embedded in OCT resin (Sakura) as described in (39).

#### Fluorescence microscopy.

Live confocal fluorescence microscopy was employed to analyze *Ptun::gfp* expression by the indicated strains. *S.Tm* cultures grown for 12 hours in LB +/- Mitomycin C (0.25  $\mu\text{g/ml}$ ), or fresh cecal contents from infected mice, were serially diluted in PBS. Samples of suitable density were transferred to glass slides and imaged on a Zeiss Axiovert 200m microscope equipped with a 100X oil objective, a spinning disc confocal unit (Visitron), and dual Evolve512 EMCCD cameras (Photometrics). *S.Tm* LPS was immunodetected using rabbit-anti-*S.Tm* LPS O-antigen group B (Difco) and Cy3-coupled goat-anti-rabbit-IgG (Jackson Laboratories). Images were adjusted for brightness and contrast post-capture with the Visiview software (Visitron). GFP channel images presented side-by-side were generated using identical laser settings, exposure times, and post-capture processing. Bright field images were corrected for illumination unevenness by subtraction of an empty sample image.

#### Oral Vaccination.

An inactivated oral *S.Tm* vaccine ("PA-STm") was generated as described in (24). Briefly, late stationary-phase *S.Tm* cultured aerobically in LB were washed and resuspended to  $10^9$  CFU/ml in PBS. Then, peracetic acid (433241, Sigma-Aldrich) was added to 0.4% v/v and the suspension was incubated for 1 hour at room temperature. The inactivated bacteria were extensively washed with sterile PBS to remove any traces of the acid and finally resuspended at a density of  $10^{11}$  particles per ml in sterile PBS. Each vaccine batch was tested by enrichment culture for complete inactivation and the vaccines was stored at 4°C for up to three weeks before use. Mice received 100  $\mu\text{l}$  of vaccine per os, once per week for three weeks.

#### In vitro phage transfer experiments.

Donors (SL1344 [*SopE $\Phi^{aphT}$* ]; kan<sup>R</sup>; amp<sup>R</sup>) and Recipients (14028S *marT::cat*, Cm<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup>) were cultivated overnight at 37°C with the appropriate antibiotics, sub-cultured (1/20 dilution) in LB without antibiotics for 4 hours, and washed with PBS. Cells were diluted and inoculated sequentially as 10  $\mu\text{l}$  volumes ( $10^5$  CFU each) into 180  $\mu\text{l}$  LB (100  $\mu\text{g/ml}$  ampicillin) supplemented with either 0.25  $\mu\text{g/ml}$  mitomycin C (Sigma), 0.35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 % hydrogen peroxide solution; Merck Millipore), 3 mM NaClO (10 % sodium hypochlorite solution; Sigma), 0.5 mM SPER/NO (spermine-nitric oxide complex; Sigma), or 3% cholic acid sodium salt (Calbiochem Merck Millipore). Cells were incubated for 24 hours at 37°C with 1000 rpm mixing (Eppendorf ThermoMixer), diluted and plated on selective MacConkey agar plates.

#### Barcode-based quantitative population dynamics analysis.

Mice were infected with SL1344 [SopE $\Phi^{aphT}$ ] and a mixture of 14028S carrying one of seven barcodes as Recipients (Fig. S2B, right side). Cassettes containing the barcodes are modified versions of the cassettes designed by Grant and colleagues (41) where the kanamycin resistance gene was replaced by a chloramphenicol resistance gene as described in (35). Primer pairs *aphT\_to\_cat\_up/aphT\_to\_cat\_dw* and *WITScat\_ver\_up/WITScat\_ver\_dw* were respectively used to generate the recombinogenic fragment and for construct verification (Table S2). The relative proportion of the barcoded strains was determined by qPCR. Genomic DNA from enrichment cultures was isolated with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Cat. NO. 51306). qPCR analysis using FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) was performed using primers and temperature profiles as described previously (41) (Table S2).

#### Phage extraction from feces.

One or two frozen fecal pellets were thawed on ice for 10 min and diluted 40-fold in cold 1X PBS (40 $\mu$ l per mg of feces). Re-suspended feces were kept on ice for 5 min with regular agitation prior to centrifugation for 10 min at 5,251 g at 4°C. Supernatants were recovered and filtered through a 0.2  $\mu$ m filter (PALL Corporation Acrodisc PF syringe filter Prod. No. 4187). Samples were supplemented with PEG 8000 (Sigma) to a final concentration of 10% and NaCl (Sigma) to a final concentration of 1M. After incubation overnight at 4°C, phage particles were harvested by centrifugation (5251 g for 1 hour at 4°C with a swinging rotor). The supernatant was carefully removed and pellets were re-suspended in 100  $\mu$ l of SM buffer (100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris pH 7.5 (Sigma)) for 1 hour at 4°C.

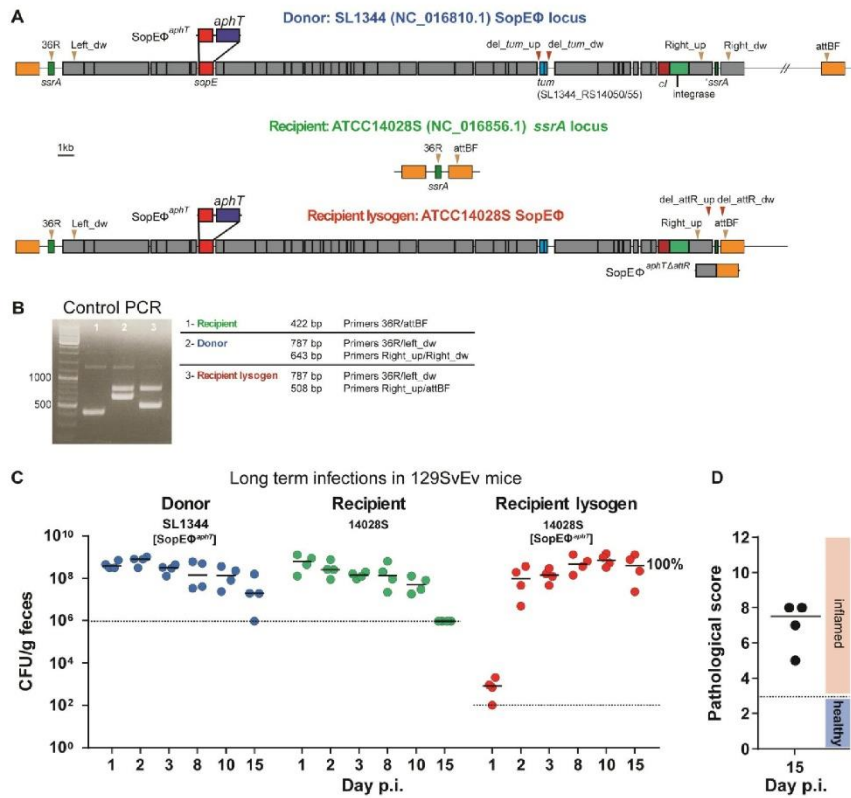
#### Phage-quantification by qPCR.

Samples were treated with 10 U of Turbo DNase (Ambion) for 1 hour at 37 °C in Turbo DNase buffer. Samples were then incubated at 95°C for 30 min in 0.2 ml PCR tubes for enzyme inactivation and phage capsid disruption. qPCR on 50-fold diluted samples was performed using the Takyon ROX SYBR Mastermix blue dTTP kit (Eurogentec) and the StepOnePlus real time PCR system (Applied Biosystem). Phage amounts were determined using the specific primers pair *2772\_4\_up/2772\_118\_dw* (Table S2). Bacterial DNA contamination was assessed similarly using the primers *qPCR\_prgH\_up/qPCR\_prgH\_dw* (Table S2). Standard curves for phage and bacterial DNA quantification were made from serial dilutions of purified chromosomal DNA of the lysogen SL1344 [SopE $\Phi^{aphT}$ ] strain. Numbers of copies in standards were calculated using DNA quantification (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) and the strain genome size.

The reaction mix was the following: 7.5  $\mu$ l Takyon mix, 0.9  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, 0.3  $\mu$ l of each primer (200 nM final concentration), 6  $\mu$ l of DNA diluted in dH<sub>2</sub>O. The PCR conditions were: (95°C 15s, 58°C 45s, 72°C 30s) 45 cycles, 72°C 5 min, followed by melting curves. Results were analysed using the StepOne Software 2.3.

#### Statistical analysis.

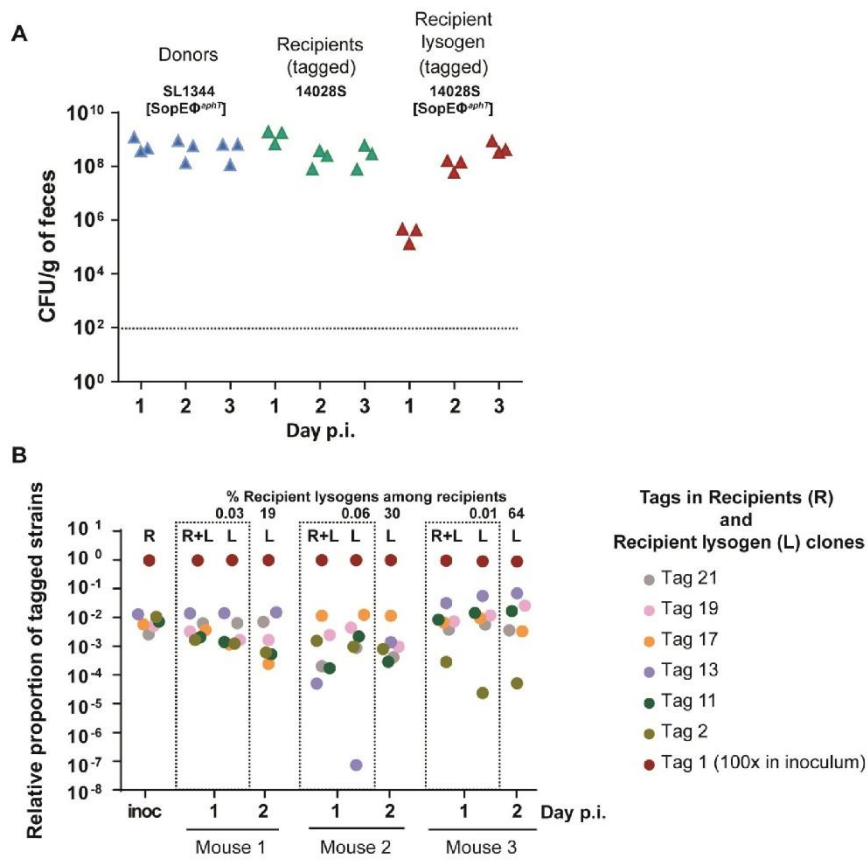
Statistical tests were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (<http://www.graphpad.com>).



**Fig. S1. Genetic maps, multiplex control PCR and long term *in vivo* phage transfer.**

**A**, Maps of the SopE $\Phi$  prophage in the *ssrA* locus of SL1344 (i.e., Donor), of its derivative SopE $\Phi^{aphT}$ , of the "empty" *ssrA* locus in 14028S (i.e., Recipient) and of the SopE $\Phi^{aphT}$  prophage in the *ssrA* locus of 14028S (i.e., Recipient lysogen). Yellow and red arrowheads respectively mark the position of primers used for verification and for the construction of prophage-variants. **B**, Multiplex PCR assay for verifying the insertion of SopE $\Phi^{aphT}$  in *S.Tm* SL1344 and in Recipient lysogens (for primer binding sites and sequences, see **panel A** and **Table S2**). **C**, *S.Tm* populations as determined by plating of feces from 129 SvEv mice ( $n=4$ ) that were sequentially infected with the Donor (SL1344 [SopE $\Phi^{aphT}$ ];  $kan^R$ ,  $amp^R$ , **Table S1**) and the Recipient (14028S;  $marT::cat$ ,  $cm^R$ ,  $amp^R$ , **Table S1**; 200 CFU each, by gavage). 100% of 14028S bacteria were lysogens by day 15 p.i. (median value). Stippled lines: detection limits of the selective plating procedure. **D**, Gut inflammation at day 15 p.i. (**15, 39**).

5



**Fig. S2. Phage-transfer experiment with mixtures of barcoded Recipients.**

In the case of frequent phage transfers, one would expect equivalent relative abundances of the DNA barcodes (lodged in a pseudogene of the 14028S chromosome; **Table S1**) in the Recipient (i.e. the inoculum) and in the Recipient lysogen population (from feces). **A**, Three streptomycin pretreated C57BL/6 mice were sequentially infected with Donors (about  $5 \times 10^2$  CFU; SL1344 [SopEΦ<sup>spht</sup>]) and a 100:1:1:1:1:1:1 mix of seven isogenic, barcoded Recipients (about  $5 \times 10^2$  CFU in total; 14028S; **Table S2**). Population sizes of Donors, Recipients and Recipient lysogens as detected by plating in the feces of the infected mice (n=3). **B**, The relative abundance of the barcoding-tags was determined by qPCR (**Table S2**) using chromosomal template DNA extracted from enrichment cultures of fecal content. The relative abundances of the seven barcodes was similar between the Recipients (= inoculum), the mix of Recipients plus Recipient lysogens (R+L; enrichment in chloramphenicol media; day 1 p.i.) and the Recipient lysogen populations (L; enrichment in media with chloramphenicol and kanamycin; day 1 and 2 p.i.). The

number of lysogenic conversion events can be estimated based on the Poisson probability of observing loss of barcodes from the Recipient population. We can estimate a lower bound for the number of lysogenic conversion events based on the Poisson probability of observing loss of a single barcode across all of our experimental tests.  $N$  is the number of bacterial clones which carry one particular barcode and seed the lysogen population,  $n$  is the number of barcodes lost (set to 1),  $m$  is the total number of barcodes analysed at the relevant dilution ( $3*6=18$ ; barcode 1 is considered to be the diluting strain, 3 mice) and:  
 $e^{-N} = n/m$

As we did not observe a single barcode loss across all of our experimental tests, we can only estimate the lower bound for lysogenic conversion, based on the hypothetical situation of observing a single barcode loss event ( $n=1$ ). This yields:

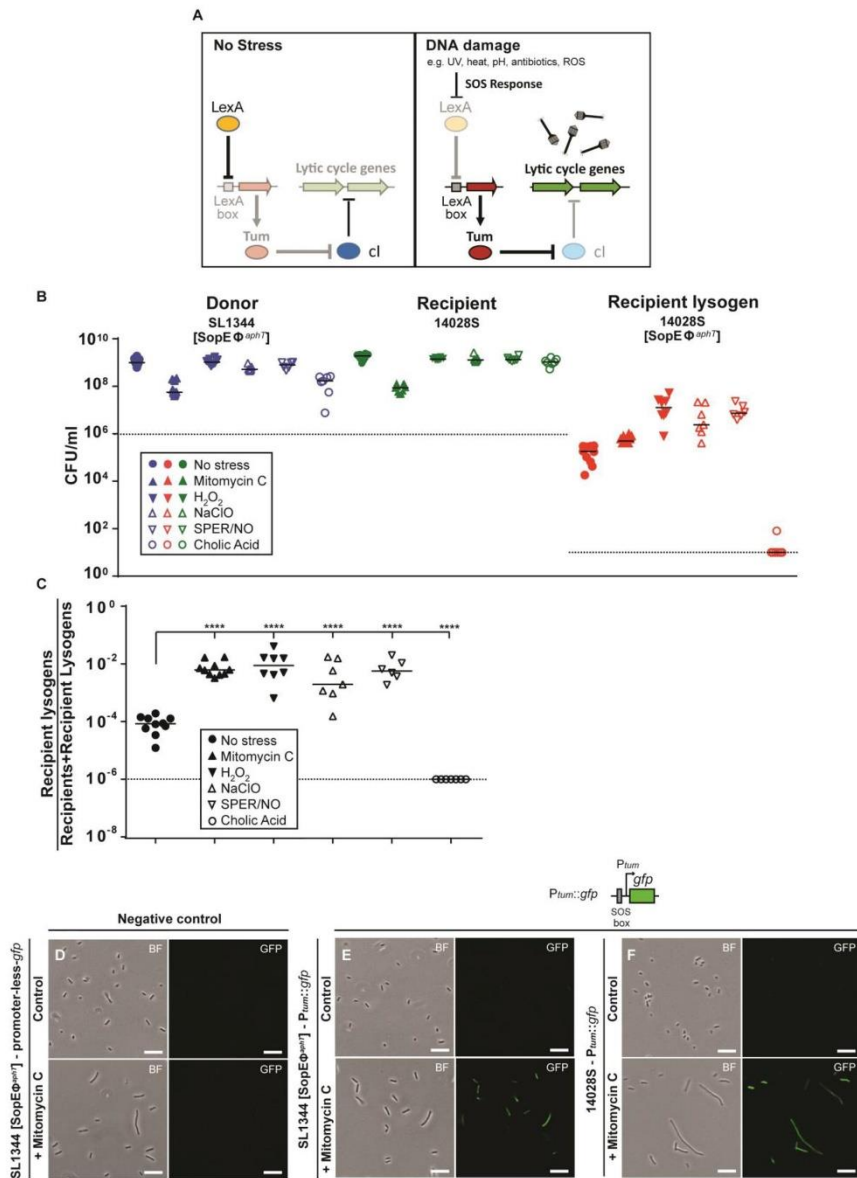
$$-N = \ln(1/18)$$

$$N=2.890$$

Thus, on average at least 2.89 individuals of each barcoded Recipient must receive the prophage to see only one barcode loss. As each relevant barcode makes up 1% of the total population, this means there must be at least 289 lysogenic conversion events. It is important to note that this number is just an estimated lower bound of events. The even representation of barcodes at day 2 p.i. indicates that the real number of lysogenic conversion events might be much higher than 300.

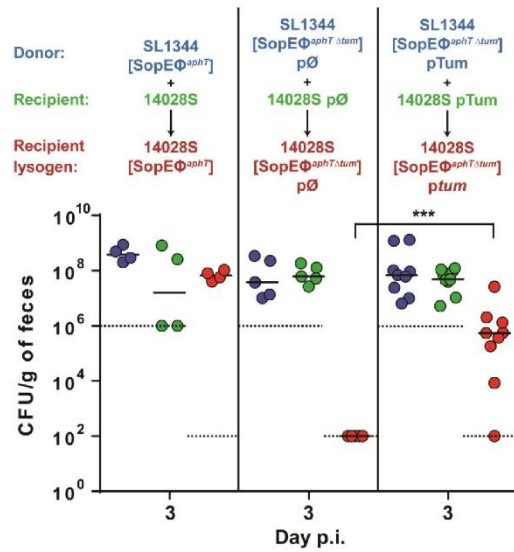
This supports that phage transfer occurs at high frequency and refutes that few Recipient lysogens could grow up and dominate the output pool.





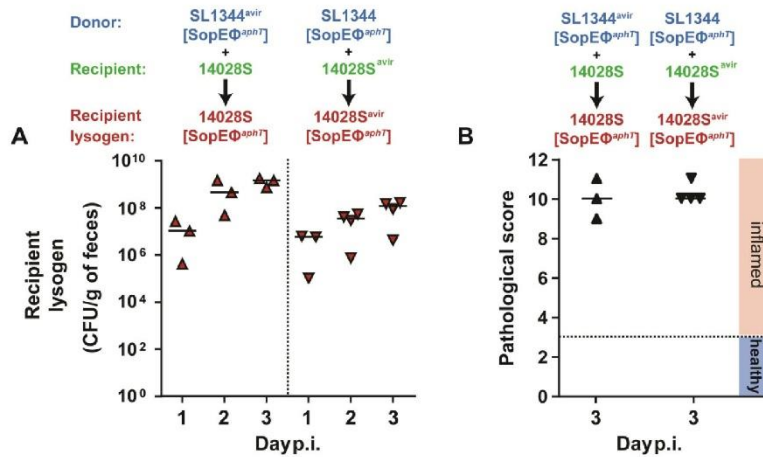
**Fig. S3. *In vitro* verification of SOS-mediated prophage induction.**

**A**, Regulation of lytic cycle induction as established *in vitro*. DNA damage triggers release of LexA dimers from a SOS box presents in the promoter region of *tum*, derepressing its expression. In return, Tum sequesters cI, the repressor of SopEΦ's lytic cycle. The *tum* gene in SopEΦ is homologous to the *tum*-genes from related temperate bacteriophages (19-21, 42). We analyzed the effect of sub-lethal doses of stressors known to elicit the bacterial SOS response. This included mitomycin C and several antimicrobial compounds of the host's innate immune defense, i.e. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as an example of reactive oxygen species that are elicited by neutrophilic granulocytes, hypochlorite and reactive nitrogen species as produced by activated macrophages. A bile acid (cholic acid) served as a negative control. **B, C** *In vitro* SopEΦ<sup>aphT</sup>-transfer experiments testing the effect of 0.25 μg/ml Mitomycin C (n=10), 0.35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=8), 3 mM NaClO (n=8), 0.5 mM SPER/NO (Spermine-Nitric oxide complex; releases NO)(n=6) or 3% cholic acid (n=7) and regular LB (No stress treatment, n=10 independent measurements). Donor, Recipient and Recipient lysogen populations (**B**) and the proportion of Recipient lysogens among all Recipients (**C**) were determined by plating of LB broth that had been inoculated with the Donor (SL1344 [SopEΦ<sup>aphT</sup>]; kan<sup>R</sup>, amp<sup>R</sup>; **Table S1**) and the Recipient (14028S; *marT::cat*; cm<sup>R</sup>, amp<sup>R</sup>; **Table S1**; 10<sup>5</sup> CFU each) and incubated for 24 hours in the presence or absence of stressors (three independent experiments). Mitomycin C, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaClO and SPER/NO significantly increased the yield of Recipient lysogens. Cholic acid did not yield appreciable phage transfer. It remains unclear if cholic acid may even impair phage attachment, viability of new lysogens or stability of virions. \*\*\*\* One-way Anova with Bonferroni's multiple comparisons test yielding p<0.0001. **D, E, F** Mitomycin C induces *in vitro* expression of GFP under the control of the *tum* promoter. LB cultures were inoculated with 200 CFU of SL1344 [SopEΦ<sup>aphT</sup>] carrying either a promoter-less *gfp* control plasmid (pNoPGFP, **Table S1**) (**D**) or pPtumGFP (**Table S1**) (**E**) in the presence or absence of 0.25 μg/ml Mitomycin C and analyzed by light microscopy. Left panels: bright field (BF); right panels: GFP fluorescence; scale bars = 10 μm. **F**, The *tum* promoter is activated by the SOS response independent of other SopEΦ encoded genes. To obtain further evidence of the direct SOS-mediated control of *tum* expression, the Recipient strain (14028S; *marT::cat*) carrying pPtumGFP was grown *in vitro* in the presence or absence of 0.25 μg/ml Mitomycin C and analyzed by light microscopy. Left panels: bright field (BF); right panels: GFP fluorescence; bar = 10 μm. The Ptum::*gfp* construction is depicted above panel **F**.



**Fig. S4. In trans complementation of  $SopE\Phi^{aphT\Delta tum}$ .**

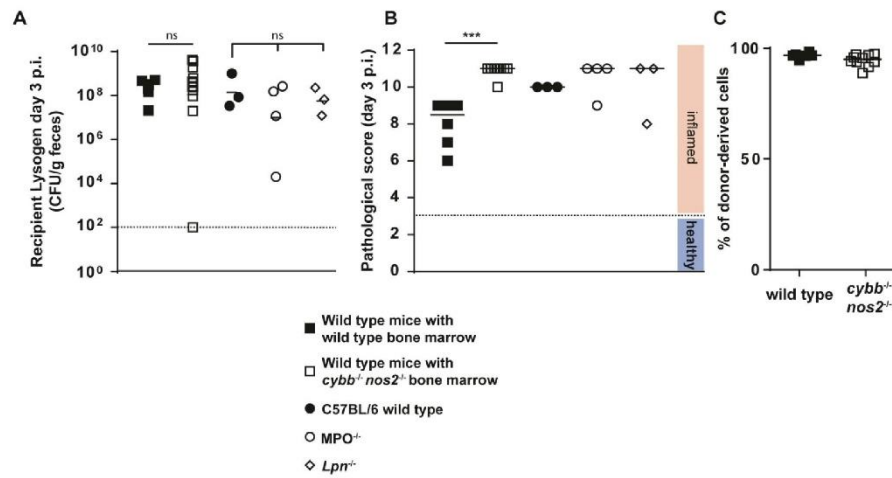
For complementation, we used a plasmid encoding the *tum* locus of  $SopE\Phi$  (*ptum*; including its native promoter) or the empty plasmid as a control ( $p\emptyset$ ; **Table S1**). Sequential infections of C57BL/6 mice were performed with the indicated Donor and Recipient strains, as described (**15**). At day 3 p.i., we quantified fecal populations of Donor, Recipient and Recipient lysogen populations. The results show that the deletion of *tum* from  $SopE\Phi^{aphT}$  can be complemented *in trans* (at least in part). This confirmed the role of *Tum* as an essential regulator of the phage-transfer. Dotted lines: detection limits of the selective plating procedure. \*\*\* Mann Whitney U-test  $p < 0.001$ . (n=4, 5 or 9 mice were used for the respective conditions; three independent experiments by condition).



**Fig. S5. Co-infection with virulent strains restores SopE $\Phi^{aphI}$  phage transfer dynamics.**

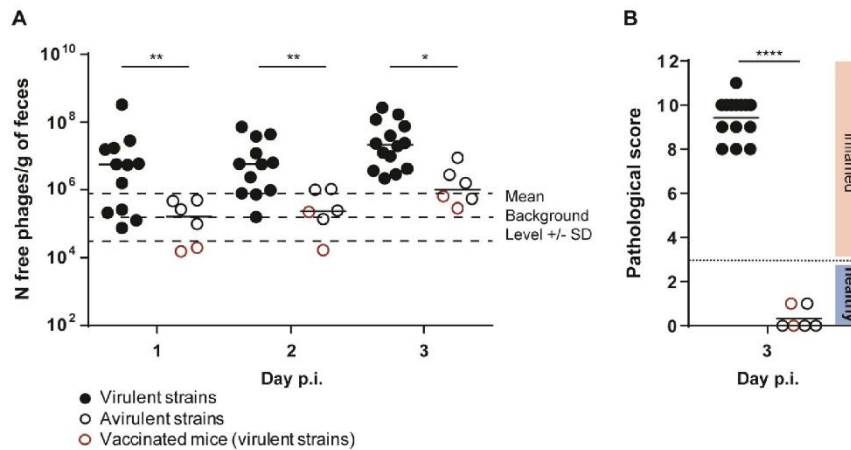
**A**, Recipient lysogen populations (triangles: 14028S [SopE $\Phi^{aphI}$ ]; inverted triangles: 14028S<sup>avir</sup> [SopE $\Phi^{aphI}$ ]) as determined by plating of feces from mice that were sequentially infected by gavage with either the avirulent Donor (SL1344<sup>avir</sup> [SopE $\Phi^{aphI}$ ]; 200 CFU, kan<sup>R</sup>, amp<sup>R</sup>; **Table S1**) and the virulent Recipient (14028S; 200 CFU, *marT::cat*; cm<sup>R</sup>, amp<sup>R</sup>; n=3 mice) or with the virulent Donor (SL1344 [SopE $\Phi^{aphI}$ ]; 200 CFU, kan<sup>R</sup>, amp<sup>R</sup>; **Table S1**) and the avirulent Recipient (14028S<sup>avir</sup>; 2000 CFU, *marT::cat*; cm<sup>R</sup>, amp<sup>R</sup>; **Table S1**; n=4 mice). The data is derived from two independent experiments. Note that the fitness of the avirulent Recipient was reduced in the inflamed intestine, in the presence of the virulent Donor. This had to be compensated by adding 10-fold more avirulent Recipients than virulent Donors in the inoculum to reach a 1:1 Donor:Recipient ratio at 24 hours p.i. and to restore fully efficient lysogenic conversion.

**B**, Gut inflammation at day 3 p.i. was determined as described (**15, 39**).



**Fig. S6. Phage-transfer in mice lacking one or more stimuli of the bacterial SOS response.**

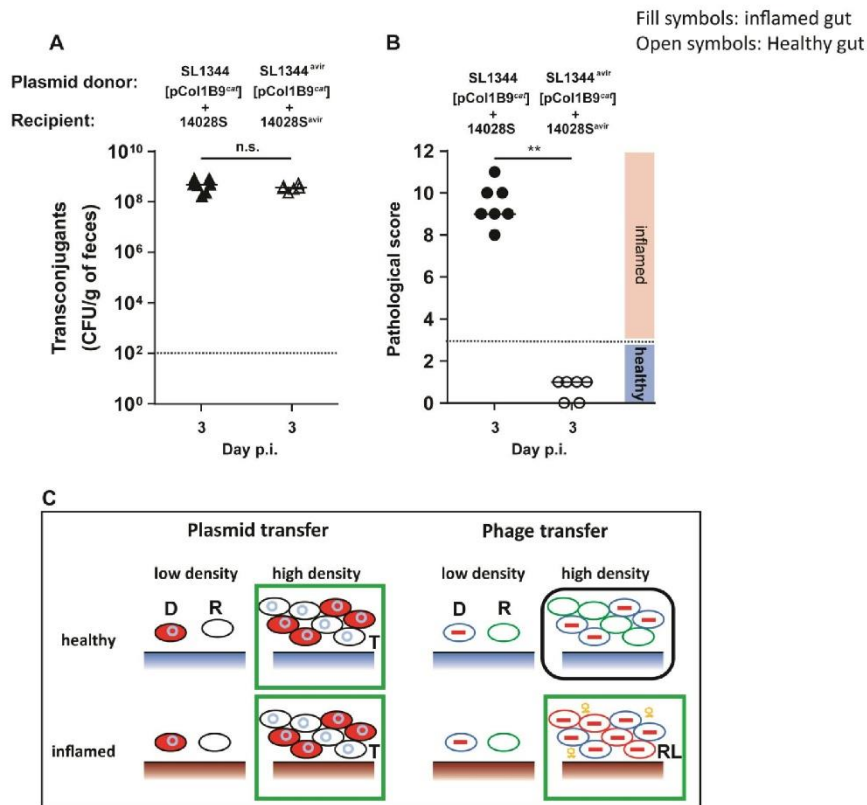
Bone-marrow-chimeric mice reconstituted with bone marrow from *cybb*<sup>-/-</sup>*nos2*<sup>-/-</sup> knockout mice lack NADPH-oxidase and inducible NO-synthase, the two key enzymes generating the reactive oxygen- and nitrogen species, in all cells of the immune system. MPO<sup>-/-</sup> mice lack myeloperoxidase, a key enzyme required for hypochlorite production. *Lpn*<sup>-/-</sup> mice lack lipocalin-2, an iron chelator produced by granulocytes and epithelial cells. Lipocalin-2 deficiency should not affect the pathogen's SOS response. Thus, *lpn*<sup>-/-</sup> mice served as a negative control. **A.** Recipient lysogens detected at day 3 p.i. in the feces from lethally irradiated CD45.1<sup>+</sup> C57BL/6 mice re-constituted with CD45.2<sup>+</sup> bone-marrow from *cybb*<sup>-/-</sup>*nos2*<sup>-/-</sup> (open squares; n=11, three independent experiments) or wild type mice (black squares; n=6, two independent experiments), MPO<sup>-/-</sup> (open circles; n=4, two independent experiments), *Lpn*<sup>-/-</sup> (open diamonds; n=3, one experiment) or wild type C57BL/6 mice (black circles; n=3, one experiment). All mice were sequentially infected with the Donor (SL1344 [SopEΦ<sup>aph1</sup>]; kan<sup>R</sup>, amp<sup>R</sup>, **Table S1**) and the Recipient (14028S; *marT::cat*; cm<sup>R</sup>, amp<sup>R</sup>, **Table S1**). Equivalent levels of phage transfer were observed in all the groups analyzed. **B.** Intestinal pathology in mice from A at day 3 p.i. was analyzed as described (**15**, **39**). The intestinal inflammation was acute in all mice. Chimeric mice reconstituted with bone-marrow from *cybb*<sup>-/-</sup>*nos2*<sup>-/-</sup> were significantly more inflamed than their counterpart reconstituted with wild-type bone marrow. This may be related to increased pathogen tissue loads attributable to the diminished innate immune defense (**43**). \*\*\* Mann Whitney U-test p<0.001. **C.** Verification of the bone-marrow reconstitution efficiency of mice from A by flow cytometric analysis of CD45.1/CD45.2 expression by peripheral blood leucocytes two weeks after reconstitution. The median reconstitution efficiency was 97% with wt and 95% with *cybb*<sup>-/-</sup>*nos2*<sup>-/-</sup> bone marrow.



**Fig. S7. Free phage particle quantification.**

Mice were infected for three days as described above. **A**, Free phage particles were harvested from feces throughout the course of the infection by PEG precipitation and specific  $\text{SopE}\Phi^{\text{aphT}}$  DNA was quantified by qPCR (15). Black filled circles: Naïve mice sequentially infected with the Donor (SL1344 [ $\text{SopE}\Phi^{\text{aphT}}$ ];  $\text{kan}^{\text{R}}$ ;  $\text{amp}^{\text{R}}$ ; Table S1) and the Recipient (14028S;  $\text{marT}::\text{cat}$ ;  $\text{cm}^{\text{R}}$ ;  $\text{amp}^{\text{R}}$ ; Table S1, 200 CFU each, by gavage). Black open circles: Naïve mice sequentially infected by avirulent Donor (SL1344<sup>avir</sup> [ $\text{SopE}\Phi^{\text{aphT}}$ ];  $\text{kan}^{\text{R}}$ ;  $\text{amp}^{\text{R}}$ ; Table S1) and the avirulent Recipient (14028S<sup>avir</sup>;  $\text{marT}::\text{cat}$ ;  $\text{cm}^{\text{R}}$ ;  $\text{amp}^{\text{R}}$ ). Red open circles: Vaccinated mice sequentially infected with the Donor (SL1344 [ $\text{SopE}\Phi^{\text{aphT}}$ ];  $\text{kan}^{\text{R}}$ ;  $\text{amp}^{\text{R}}$ ; Table S1) and the Recipient (14028S;  $\text{marT}::\text{cat}$ ;  $\text{cm}^{\text{R}}$ ;  $\text{amp}^{\text{R}}$ ; Table S1, 200 CFU each, by gavage). In these vaccinated animals, no gut inflammation was detected (B). In naïve mice infected by virulent strains (black closed circles;  $n=12$  to 14 at day 3 p.i.; four independent experiments), we detected significantly higher densities of  $\text{SopE}\Phi^{\text{aphT}}$  virions than in animals either naïve and infected by avirulent strains or vaccinated and infected by virulent strains (open black and red circles respectively;  $n=6$ ; three independent experiments). One-way Anova with Bonferroni's multiple comparisons test \*\* adjusted  $p<0.01$ , \* adjusted  $p<0.05$ . Dashed lines indicate the mean level ( $\pm$  standard deviation) of the background signal attributable to residual chromosomal DNA contamination. **B**, Pathological score at day 3 p.i., determined as described previously (15, 39). This established a clear correlation between gut inflammation and an increased abundance of free virions in the feces of infected mice. \*\*\*\* Mann Whitney U-test  $p<0.0001$ .





**Fig. S8. Plasmid-transfer has a different disease-requirement than phage-transfer.**

The Donor strain (*S.Tm* SL1344) harbors both, the prophage SopE $\Phi$  and the plasmid pCol1B9 (32) while the Recipient strain (14028S) harbors neither SopE $\Phi$ , nor pCol1B9 (33). This was verified by PCR (primers oriT\_nikA and oriT\_nikA\_rev for pCol1B9, see Table S2). Infection assays were performed to analyze the effects of gut inflammation on plasmid-transfer. SL1344 (or SL1344<sup>avir</sup>) served as a Donor and carried pCol1B9<sup>cat</sup>, an isogenic derivative of pCol1B9 conferring resistance to chloramphenicol (44). 14028S (*lpfED::aphT*, Kan<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup>) or its avirulent derivative 14028S<sup>avir</sup> ( $\Delta$ *invG*  $\Delta$ *sseD* *lpfED::aphT*, Kan<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup>) served as the Recipient (Table S1). **A**, To analyze the effect of gut inflammation, mice were infected with virulent (closed symbols; SL1344 pCol1B9<sup>cat</sup> and 14028S; n=7, two independent experiments) or avirulent (open symbols; SL1344<sup>avir</sup> pCol1B9<sup>cat</sup> and 14028S<sup>avir</sup>; n=6, two independent experiments) pairs of Donor and Recipient bacteria (200 CFU each; by gavage). Transconjugant formation (i.e. 14028S pCol1B9<sup>cat</sup> or 14028S<sup>avir</sup> pCol1B9<sup>cat</sup> respectively) was analyzed by plating feces at day 3 p.i.. **B**, Gut inflammation at day 3 p.i., determined as described previously (15,

39). Stippled lines: detection limits of the selective plating procedure. n.s. = not significant as analyzed by the Mann Whitney U-test  $p > 0.05$ ; \*\* Mann Whitney U-test  $p < 0.01$ ; C. Schematic depicting key differences between phage- and plasmid transfer. Plasmids and temperate phages are the main vehicles of horizontal gene transfer in Enterobacteriaceae. Interestingly, *in vivo* phage transfer differs in important aspects from the plasmid transfer described in earlier work. For plasmid transfer (i.e. pCol1B9 from S.Tm SL1344 to commensal *E. coli* (44)) high Donor- and Recipient densities are necessary and sufficient. Thus, at high Donor- and Recipient densities it does not matter if gut inflammation is present or not (Fig. S8A-B). This is in striking contrast to the phage-transfer dynamics discovered in the current paper. For phage-transfer, high Donor- and Recipient densities are necessary, but not sufficient. In the absence of inflammation, phage-transfer does not occur even if high Donor and Recipient densities have been reached. This is explained by the mechanistic link of lytic induction (e.g., via *tum*) to the stress-induced SOS response (Fig. S3A). Thus, phage transfer requires high Donor densities, high Recipient densities and mucosal disease. Key: D: Donor, R: Recipient, T: Transconjugant, RL: Recipient lysogen. Green box: efficient transfer, black box: inefficient transfer.



**Table S1. Strains and Plasmids**

Strain name	Relevant genotype info.	Resistance	Reference
14028S (M3145/M3169)	<i>marT::cat</i> (or <i>lpfED::aphT</i> )*	Cm or Kan	This work, (45)
SL1344 <sup>avii</sup> (M2702)	$\Delta invG \Delta sseD$		This work
14028S <sup>avii</sup> (M3170/M3171)	$\Delta invG \Delta sseD$ <i>marT::cat</i> (or <i>lpfED::aphT</i> )*	Cm or Kan	This work, (45)
SL1344 [SopE $\Phi$ <sup>aphT</sup> ] (M3146)		Kan	This work
SL1344 <sup>avii</sup> [SopE $\Phi$ <sup>aphT</sup> ] (M3172)	$\Delta invG \Delta sseD$	Kan	This work
SL1344 [SopE $\Phi$ <sup>aphT</sup> $\Delta tum$ ] (M3173)	$\Delta tum$	Kan	This work
14028S [SopE $\Phi$ <sup>aphT</sup> ] (M30)		Kan	(14)
14028S [SopE $\Phi$ <sup>aphT</sup> $\Delta attR$ ] (M3174)	$\Delta attR$	Kan	This work
14028S barcode 1 (M3175)	<i>cat</i>	Cm	This work
14028S barcode 2 (M3176)	<i>cat</i>	Cm	This work
14028S barcode 11 (M3177)	<i>cat</i>	Cm	This work
14028S barcode 13 (M3178)	<i>cat</i>	Cm	This work
14028S barcode 17 (M3179)	<i>cat</i>	Cm	This work
14028S barcode 19 (M3180)	<i>cat</i>	Cm	This work
14028S barcode 21 (M3181)	<i>cat</i>	Cm	This work
<b>Plasmid name</b>			
pCol1B9 <sup>cat</sup>	<i>cat</i>	Cm	(44)
pM975	<i>bla</i>	Amp	(34)
pM965	<i>bla</i>	Amp	(37)
pPtumGFP (pZ1603)	<i>bla</i> , <i>Ptum::gfp</i>	Amp	This work
pNoPGFP (pM3101)	<i>bla</i> , promoter-less <i>gfp</i>	Amp	This work
Ptum (pZ1602)	<i>bla</i> , <i>tum</i>	Amp	This work
p $\emptyset$ (pZ1601)	<i>bla</i>	Amp	This work

\* Resistance cassette used in plasmid transfer experiments.

**Table S2. Primers**

Primer name	Sequence
36R	GGATCAAGAGAGGTCAAAC
Left_dw	TCCCTGCAGCTCGCTG
attBF	GTGCTACGGGGCTTCG
Right_up	GGGATATCTTAGACCAATTAG
Right_dw	AGTCCCATCATAGTCCGC
Del_attR_up	AGGAGATAGTGAGCGTTTATCAACTGACAGATTTTACAAGCTAGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Del_attR_dw	CTCATTGAAGTTACAGGCTTTTTAAGGTTGATGATGCATCATGACATATGAATATCCTCCTTAG
Del_tum_up	GCAAGGTTCCTTAGTGCAGCCAGCTGTGCTCCCTCCAGACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Del_tum_dw	AGGAGGGAGATGCAGGACTATCTTTGGAGTCGTTGAAGCATATGAATATCCTCCTTAG
Ver_tum_up2	CACTAAAGCCTCGCCTTG
Ver_tum_dw2	GTCAGGGCTATCTAATTGAC
PrumSopEphi_up	CCATTCTCTAGATAAGCAATGCGGAAGTGA
PrumSopEphi_dw	TATGCAGGATCCCTTCCCTCCTTTCACCTGC
2772_4_up	GATGAGCTGCAGAAGGTTGA
2772_118_dw	CGCTGCATCCCTGATATTCTG
oriT_nikA	AGTTCCCTCATCGGTGATGTC
oriT_nikA_rev	GAAGCCATTGGCACCTTCTC
attleft_up	AGACTGACTAAGCATGTAGTAC
attleft_dw	GGCTACGTTTTCACGTAACC
qPCR_prgH_up	CCCAGGGCCATACATAGTTC
qPCR_prgH_dw	CGGCAGGTATATCAGGGAGT
Tum_xbaI_up	CCATTCTCTAGAGCAACGTTCCCTAGTGCA
Tum_EcoRV_dw	TATGCAGATATCTAAGCAATGCGGAAGTGG
aphT_to_cat_up	AATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCACGGGAACGTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
aphT_to_cat_dw	GAACATATCCCTTCCCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAAACATATGAATATCCTCCTTAG
WITScat_ver_up	CTGTCTGCTTACATAAACAG
WITScat_ver_dw	CGTCGGTCAACTTCCCTG
barcode 1	ACGACACCACTCCACACCTA
barcode 2	ACCCGCAATACCAACAACCTC
barcode 11	ATCCCACACACTCGATCTCA
barcode 13	GCTAAAGACACCCCTCACTCA
barcode 17	TCACCAGCCCACCCCTCA
barcode 19	GCACTATCCAGCCCCATAAC
barcode 21	ACAACCACCGATCACTCTCC
ygdA	GGCTGTCCGAATGGGTC

## References and Notes

1. H. Brüssow, C. Canchaya, W. D. Hardt, Phages and the evolution of bacterial pathogens: From genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 560–602 (2004). doi:10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004 [Medline](#)
2. E. V. Davies, C. Winstanley, J. L. Fothergill, C. E. James, The role of temperate bacteriophages in bacterial infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, fnw015 (2016). doi:10.1093/femsle/fnw015 [Medline](#)
3. C. Goerke, S. Matias y Papenberg, S. Dasbach, K. Dietz, R. Ziebach, B. C. Kahl, C. Wolz, Increased frequency of genomic alterations in *Staphylococcus aureus* during chronic infection is in part due to phage mobilization. *J. Infect. Dis.* **189**, 724–734 (2004). doi:10.1086/381502 [Medline](#)
4. D. W. Acheson, J. Reidl, X. Zhang, G. T. Keusch, J. J. Mekalanos, M. K. Waldor, In vivo transduction with shiga toxin 1-encoding phage. *Infect. Immun.* **66**, 4496–4498 (1998). [Medline](#)
5. E. V. Davies, C. E. James, I. Kukavica-Ibrulj, R. C. Levesque, M. A. Brockhurst, C. Winstanley, Temperate phages enhance pathogen fitness in chronic lung infection. *ISME J.* **10**, 2553–2555 (2016). doi:10.1038/ismej.2016.51 [Medline](#)
6. T. B. Broudy, V. A. Fischetti, In vivo lysogenic conversion of Tox<sup>-</sup> *Streptococcus pyogenes* to Tox<sup>-</sup> with lysogenic *Streptococci* or free phage. *Infect. Immun.* **71**, 3782–3786 (2003). doi:10.1128/IAI.71.7.3782-3786.2003 [Medline](#)
7. M. De Paepe, L. Tournier, E. Moncaut, O. Son, P. Langella, M.-A. Petit, Carriage of  $\lambda$  latent virus is costly for its bacterial host due to frequent reactivation in monoxenic mouse intestine. *PLoS Genet.* **12**, e1005861 (2016). doi:10.1371/journal.pgen.1005861 [Medline](#)
8. J. S. Tyler, K. Beeri, J. L. Reynolds, C. J. Alteri, K. G. Skinner, J. H. Friedman, K. A. Eaton, D. I. Friedman, Prophage induction is enhanced and required for renal disease and lethality in an EHEC mouse model. *PLoS Pathog.* **9**, e1003236 (2013). doi:10.1371/journal.ppat.1003236 [Medline](#)
9. S. Miold, W. Rabsch, M. Rohde, S. Stender, H. Tschäpe, H. Rüssmann, E. Igwe, W.-D. Hardt, Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella typhimurium* strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 9845–9850 (1999). doi:10.1073/pnas.96.17.9845 [Medline](#)
10. C. Pelludat, S. Miold, W. D. Hardt, The SopEPhi phage integrates into the *ssrA* gene of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium A36 and is closely related to the Fels-2 prophage. *J. Bacteriol.* **185**, 5182–5191 (2003). doi:10.1128/JB.185.17.5182-5191.2003 [Medline](#)
11. W. D. Hardt, L. M. Chen, K. E. Schuebel, X. R. Bustelo, J. E. Galán, S. typhimurium encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**, 815–826 (1998). doi:10.1016/S0092-8674(00)81442-7 [Medline](#)
12. M. W. Wood, R. Rosqvist, P. B. Mullan, M. H. Edwards, E. E. Galyov, SopE, a secreted protein of *Salmonella dublin*, is translocated into the target eukaryotic cell via a *sip*-dependent mechanism and promotes bacterial entry. *Mol. Microbiol.* **22**, 327–338 (1996). doi:10.1046/j.1365-2958.1996.00116.x [Medline](#)

13. L. Petrovska, A. E. Mather, M. AbuOun, P. Branchu, S. R. Harris, T. Connor, K. L. Hopkins, A. Underwood, A. A. Lettini, A. Page, M. Bagnall, J. Wain, J. Parkhill, G. Dougan, R. Davies, R. A. Kingsley, Microevolution of monophasic *Salmonella* Typhimurium during Epidemic, United Kingdom, 2005-2010. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 617–624 (2016). [doi:10.3201/eid2204.150531](https://doi.org/10.3201/eid2204.150531) [Medline](#)
14. S. Zhang, R. L. Santos, R. M. Tsois, S. Miold, W. D. Hardt, L. G. Adams, A. J. Bäuml, Phage mediated horizontal transfer of the *sopE1* gene increases enteropathogenicity of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for calves. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**, 243–247 (2002). [doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11482.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11482.x) [Medline](#)
15. Materials and methods are available as supplementary materials.
16. A. B. Oppenheim, O. Kobiler, J. Stavans, D. L. Court, S. Adhya, Switches in bacteriophage lambda development. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 409–429 (2005). [doi:10.1146/annurev.genet.39.073003.113656](https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.113656) [Medline](#)
17. L. Maier, M. Diard, M. E. Sellin, E.-S. Chouffane, K. Trautwein-Weidner, B. Periaswamy, E. Slack, T. Dolowschiak, B. Stecher, C. Loverdo, R. R. Regoes, W.-D. Hardt, Granulocytes impose a tight bottleneck upon the gut luminal pathogen population during *Salmonella typhimurium* colitis. *PLOS Pathog.* **10**, e1004557 (2014). [doi:10.1371/journal.ppat.1004557](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004557) [Medline](#)
18. T. Miki, O. Holst, W. D. Hardt, The bactericidal activity of the C-type lectin RegIII $\beta$  against Gram-negative bacteria involves binding to lipid A. *J. Biol. Chem.* **287**, 34844–34855 (2012). [doi:10.1074/jbc.M112.399998](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.399998) [Medline](#)
19. A. M. Brumby, I. Lamont, I. B. Dodd, J. B. Egan, Defining the SOS operon of coliphage 186. *Virology* **219**, 105–114 (1996). [doi:10.1006/viro.1996.0227](https://doi.org/10.1006/viro.1996.0227) [Medline](#)
20. K. E. Shearwin, A. M. Brumby, J. B. Egan, The Tum protein of coliphage 186 is an antirepressor. *J. Biol. Chem.* **273**, 5708–5715 (1998). [doi:10.1074/jbc.273.10.5708](https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5708) [Medline](#)
21. K. Bunny, J. Liu, J. Roth, Phenotypes of *lexA* mutations in *Salmonella enterica*: Evidence for a lethal *lexA* null phenotype due to the Fels-2 prophage. *J. Bacteriol.* **184**, 6235–6249 (2002). [doi:10.1128/JB.184.22.6235-6249.2002](https://doi.org/10.1128/JB.184.22.6235-6249.2002) [Medline](#)
22. B. Stecher, R. Robbiani, A. W. Walker, A. M. Westendorf, M. Barthel, M. Kremer, S. Chaffron, A. J. Macpherson, J. Buer, J. Parkhill, G. Dougan, C. von Mering, W.-D. Hardt, *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLOS Biol.* **5**, e244 (2007). [doi:10.1371/journal.pbio.0050244](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050244) [Medline](#)
23. M. Diard, V. Garcia, L. Maier, M. N. P. Remus-Emsermann, R. R. Regoes, M. Ackermann, W.-D. Hardt, Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype. *Nature* **494**, 353–356 (2013). [doi:10.1038/nature11913](https://doi.org/10.1038/nature11913) [Medline](#)
24. K. Moor, S. Y. Wotzka, A. Toska, M. Diard, S. Hapfelmeier, E. Slack, Peracetic acid treatment generates potent inactivated oral vaccines from a broad range of culturable bacterial species. *Front. Immunol.* **7**, 34 (2016). [doi:10.3389/fimmu.2016.00034](https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00034) [Medline](#)
25. S. E. Winter, P. Thiennimitr, M. G. Winter, B. P. Butler, D. L. Huseby, R. W. Crawford, J. M. Russell, C. L. Bevins, L. G. Adams, R. M. Tsois, J. R. Roth, A. J. Bäuml, Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* **467**, 426–429 (2010). [doi:10.1038/nature09415](https://doi.org/10.1038/nature09415) [Medline](#)



26. B. A. Duerkop, S. Vaishnav, L. V. Hooper, Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity* **31**, 368–376 (2009). [doi:10.1016/j.immuni.2009.08.009](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.009) [Medline](#)
27. M. K. Waldor, J. J. Mekalanos, Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**, 1910–1914 (1996). [doi:10.1126/science.272.5270.1910](https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1910) [Medline](#)
28. H. Schmidt, Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res. Microbiol.* **152**, 687–695 (2001). [doi:10.1016/S0923-2508\(01\)01249-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01249-9) [Medline](#)
29. J. M. Norman, S. A. Handley, M. T. Baldrige, L. Droit, C. Y. Liu, B. C. Keller, A. Kambal, C. L. Monaco, G. Zhao, P. Fleshner, T. S. Stappenbeck, D. P. B. McGovern, A. Keshavarzian, E. A. Mutlu, J. Sauk, D. Gevers, R. J. Xavier, D. Wang, M. Parkes, H. W. Virgin, Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* **160**, 447–460 (2015). [doi:10.1016/j.cell.2015.01.002](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002) [Medline](#)
30. C. L. Monaco, D. B. Gootenberg, G. Zhao, S. A. Handley, M. S. Ghebremichael, E. S. Lim, A. Lankowski, M. T. Baldrige, C. B. Wilen, M. Flagg, J. M. Norman, B. C. Keller, J. M. Luévano, D. Wang, Y. Boum, J. N. Martin, P. W. Hunt, D. R. Bangsberg, M. J. Siedner, D. S. Kwon, H. W. Virgin, Altered virome and bacterial microbiome in human immunodeficiency virus-associated acquired immunodeficiency syndrome. *Cell Host Microbe* **19**, 311–322 (2016). [doi:10.1016/j.chom.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.011) [Medline](#)
31. B. L. Bearson, B. W. Brunelle, Fluoroquinolone induction of phage-mediated gene transfer in multidrug-resistant *Salmonella*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **46**, 201–204 (2015). [doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.04.008](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.04.008) [Medline](#)
32. S. K. Hoiseth, B. A. Stocker, Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**, 238–239 (1981). [doi:10.1038/291238a0](https://doi.org/10.1038/291238a0) [Medline](#)
33. T. Jarvik, C. Smillie, E. A. Groisman, H. Ochman, Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar typhimurium 14028 genome. *J. Bacteriol.* **192**, 560–567 (2010). [doi:10.1128/JB.01233-09](https://doi.org/10.1128/JB.01233-09) [Medline](#)
34. S. Hapfelmeier, B. Stecher, M. Barthel, M. Kremer, A. J. Müller, M. Heikenwalder, T. Stallmach, M. Hensel, K. Pfeffer, S. Akira, W.-D. Hardt, The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J. Immunol.* **174**, 1675–1685 (2005). [doi:10.4049/jimmunol.174.3.1675](https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.3.1675) [Medline](#)
35. K. A. Datsenko, B. L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6640–6645 (2000). [doi:10.1073/pnas.120163297](https://doi.org/10.1073/pnas.120163297) [Medline](#)
36. N. L. Sternberg, R. Maurer, Bacteriophage-mediated generalized transduction in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Methods Enzymol.* **204**, 18–43 (1991). [doi:10.1016/0076-6879\(91\)04004-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04004-8) [Medline](#)
37. B. Stecher, S. Hapfelmeier, C. Müller, M. Kremer, T. Stallmach, W.-D. Hardt, Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect. Immun.* **72**, 4138–4150 (2004). [doi:10.1128/IAI.72.7.4138-4150.2004](https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.4138-4150.2004) [Medline](#)
38. B. Stecher, G. Paesold, M. Barthel, M. Kremer, J. Jantsch, T. Stallmach, M. Heikenwalder, W.-D. Hardt, Chronic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-

20

**Titre :** Impact des phages tempérés sur la stabilité du microbiote intestinal : la lysogénie n'est pas un long fleuve tranquille

**Mots clés :** Prophages, microbiote intestinal, écologie microbienne

Un nombre grandissant d'associations entre diverses pathologies humaines et dysbiose intestinale (définie ici comme altération de la composition du microbiote par rapport à sa composition habituelle) sont observées. Parmi les facteurs qui pourraient induire la dysbiose, les bactériophages (dit phages), sont des candidats pertinents par leur fonction prédatrice.

L'objectif de la thèse a été de déterminer si les prophages de souches bactériennes du microbiote intestinal humain ont un impact négatif sur la stabilité de leur hôte dans l'intestin. Pour cela, nous avons utilisé des souris sans germes primo-colonisées avec la souche *Escherichia coli* LF82, puis inoculées soit avec *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165, soit avec *Roseburia intestinalis* L1-82, deux souches appartenant aux espèces dominantes du microbiote intestinal humain. Chacune de ces souches possède deux prophages dans son génome, Lagaffe et Mushu pour *F. prausnitzii*, Jekyll et Shimadzu pour *R. intestinalis*. L'impact des prophages a également été étudié lors d'une inflammation intestinale induite au DSS.

Pour la combinaison *F. prausnitzii*/*E. coli*, aucun des deux prophages de *F. prausnitzii* n'a d'activité délétère pour son hôte bactérien chez la souris, même durant une inflammation induite au DSS. Afin de mieux caractériser l'ensemble des prophages présents chez cette espèce, une analyse bio-informatique effectuée sur 15 souches de *F. prausnitzii* a permis de constater que la prévalence de Mushu et Lagaffe était faible, mais aussi de découvrir une remarquable richesse phagique : au total, 18 espèces de prophages répartis en nouveaux 8 genres viraux ont été décrits. Une étude *in silico* de l'abondance de ces phages dans les viromes intestinaux humains a révélé que des phages du genre 'Lugh' et 'Epona' sont plus souvent présents et/ou abondants dans les viromes de patients des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) que chez les individus sains. Sachant que les patients atteints de MICI ont une population appauvrie de *F. prausnitzii* dans leur microbiote, ces observations suggèrent une activité accrue de ces phages pendant la maladie : ils pourraient déclencher ou aggraver la baisse de population de *F. prausnitzii* dans les patients, participant ainsi à l'aggravation des symptômes des MICI.

Avec la combinaison *R. intestinalis*/*E. coli*., aucune variation de population ou effet délétère du phage Jekyll n'a pu être observé. En revanche, la population du phage Shimadzu est loin d'être stable. Dans toutes les souris, et même en l'absence d'un traitement au DSS, un mutant virulent de Shimadzu émerge, appelé Shi-*vir*. Ce mutant lyse massivement la population intestinale de *R. intestinalis*, menant à un effondrement de la population hôte. La population bactérienne remonte ensuite à son niveau initial grâce à l'émergence de mutants bactériens résistants à l'infection. Cette résistance a essentiellement pour origine l'acquisition d'un espaceur associé au système CRISPR-Cas de type IIC de *R. intestinalis*, et dirigé contre le phage Shimadzu. Cependant, l'acquisition de cet espaceur ne peut se faire sans qu'une sous-population de *R. intestinalis* soit préalablement guérie du prophage Shimadzu, sans quoi un tel espaceur tuerait la bactérie.

J'ai ainsi démontré qu'un prophage peut déstabiliser sa population hôte dans l'environnement intestinal et créer des dysbioses intestinales transitoires. La pression de sélection qui résulte de l'infection par le phage Shi-*vir* a permis l'accélération de l'évolution de l'hôte bactérien.

En conclusion, une fraction des phages tempérés du microbiote intestinal pourrait avoir un impact négatif sur la stabilité de sa population hôte dans l'environnement intestinal, soit parce le ratio phage/bactérie augmente dans cet environnement (cas des phages Lugh et Epona de *F. prausnitzii*), soit parce qu'il évolue vers la virulence (cas de Shi-*vir* chez *R. intestinalis*) et induit une dysbiose transitoire.

**Title :** Impact of temperate phages on the stability of the gut microbiota: lysogeny is not a long quiet river

**Keywords :** Prophages, gut microbiota, microbial ecology

A growing number of associations is observed between various human pathologies and intestinal dysbiosis, here defined as an alteration of the microbiota composition. Among the potential factors inducing dysbiosis, bacteriophages, called phages, are relevant candidates by their predatory function.

The aim of the thesis was to determine whether prophages of bacterial strains from the human gut microbiota have a negative impact on the stability of their host in the gut environment. We studied this question by using germ-free mice colonized first with *Escherichia coli* strain LF82, then inoculated with two bacterial strains belonging to dominant species of the human intestinal microbiota, *Faecalibacterium prausnitzii* strain A2-165 or *Roseburia intestinalis* strain L1-82. Each of these strains has two prophages in its genome, Lagaffe and Mushu for *F. prausnitzii*, Jekyll and Shimadzu for *R. intestinalis*. The impact of these prophages was also studied during intestinal inflammation using DSS (Dextran Sulfate Sodium)-induced colitis in mice.

In mice colonized with *F. prausnitzii* and *E. coli*, prophages of *F. prausnitzii* did not have any deleterious activity for the bacterial host, even during DSS-induced inflammation. In order to better characterize prophages of the *F. prausnitzii* species, a bioinformatic analysis carried out on 15 strains of *F. prausnitzii* highlighted that the prevalence of Mushu and Lagaffe was low. However, this analysis revealed also an enormous diversity of phages and we described 18 species of prophages divided into 8 new proposed genera. An *in silico* study of their abundance in 173 human intestinal viromes revealed that the phage genera 'Lugh' and 'Epona' were more present and/or abundant in viromes of Inflammatory Bowel Disease (IBD) patients compared to healthy subjects. Given that IBD patients have lower populations of *F. prausnitzii* in their microbiota compared to healthy subjects, our observations suggest an increased activity of these phages during disease. They may trigger or worsen population decline of *F. prausnitzii* in patients, participating thus to the aggravation of IBD

In mice colonized with *R. intestinalis* and *E. coli*, we did not observe variation of Jekyll population or deleterious effect of this phage on its host. In contrast, the Shimadzu population was not stable. Indeed, even in the absence of DSS treatment we observed in all mice the emergence of a virulent mutant of Shimadzu, called Shi-*vir*. This mutant massively lysed *R. intestinalis*, leading to a collapse of the bacterial host population. Then this population rose back to its original level thanks to the emergence of bacterial mutants resistant to the viral infection. This resistance was mainly due to the acquisition of a spacer associated with the CRISPR-Cas type IIC system of *R. intestinalis*, directed against the Shimadzu phage. However, acquisition of this spacer could not be observed unless the Shimadzu prophage was cured from the strain, showing that this spacer would kill the Shimadzu lysogen.

I have shown therefore that a prophage can destabilize its host population in the intestinal environment and create transient intestinal dysbiosis. I have also highlighted that the selection pressure imposed by an ex-temperate phage infection, the Shi-*vir* phage, has allowed an acceleration of its host evolution.

Overall, this work establishes that a fraction of the temperate phages present in intestinal microbiota may impact negatively bacterial population stability, either because the phage/bacteria ratio increases (for the Lugh and Epona phages of *F. prausnitzii*), or because the temperate phage evolves towards virulence (case of the Shi-*vir* mutant on *R. intestinalis*), and induces a transient dysbiosis.

