Diversité des bactériophages et interactions au sein des communautés microbiennes de matrices cidricoles

Pierre Ledormand

▶ **To cite this version:**

Pierre Ledormand. Diversité des bactériophages et interactions au sein des communautés microbiennes de matrices cidricoles. Microbiologie et Parasitologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMC270 . tel-04332675

HAL Id: tel-04332675

https://theses.hal.science/tel-04332675v1

Submitted on 9 Dec 2023

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.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Diversité des bactériophages et interactions au sein des communautés microbiennes de matrices cidricoles

Présentée et soutenue par
PIERRE LEDORMAND

Thèse soutenue le 08/12/2022 devant le jury composé de		
M. YANN DEMARIGNY	Chercheur HDR, Université Lyon 1 Claude Bernard	Rapporteur du jury
MME CLAIRE LE HENAFF - LE MARREC	Professeur des universités, INRA Centre de Bordeaux Aquitaines	Rapporteur du jury
M. XAVIER BELLANGER	Maître de conférences HDR, Université de Lorraine	Membre du jury
MME MARION DALMASSO	Maître de conférences, Université de Caen Normandie	Membre du jury Co-encadrante
M. MICHEL GAUTIER	Professeur, AGROCAMPUS OUEST	Président du jury

Thèse dirigée par NATHALIE DESMASURES (Aliments bioprocédés toxicologie environnements)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

ABTE UR4651
Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Physiologie et biologie des organismes – populations – interactions

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Diversité des bactériophages et interactions au sein des communautés microbiennes de matrices cidricoles

Présentée et soutenue par

Pierre LEDORMAND

Thèse dirigée par le Professeur Nathalie DESMASURES et co-encadrée par le Docteur Marion DALMASSO

UR4651 - Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements

Thèse soutenue publiquement le 8 décembre 2022,

devant le jury composé de :

Madame Claire LE HÉNAFF-LE MARREC
Professeur
Université de Bordeaux
Rapportrice

Monsieur Yann DEMARIGNY
Docteur - HDR
Université de Lyon
Rapporteur

Monsieur Michel GAUTIER
Professeur
Agrocampus Ouest
Examinateur

Monsieur Xavier BELLANGER
Docteur HDR
Université de Lorraine
Examinateur

Madame Marion DALMASSO
Docteur
Université de Caen
Co-encadrante de thèse

Madame Nathalie DESMASURES
Professeur
Université de Caen
Directrice de thèse

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

ABTE UR4651
Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements

« La vie, c'est comme une boîte de chocolats,

on ne sait jamais sur quoi on va tomber »

- Forrest Gump -

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tenais à remercier tous les membres de ce jury de thèse, qui ont accepté d'évaluer et de juger ce travail.

Au Professeur **Claire Le Hénaff - Le Marrec** et au Docteur **Yann Demarigny**, merci d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Aux Docteurs **Michel Gautier** et **Xavier Bellanger**, merci d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse, Pr **Nathalie Desmasures**. Tout d'abord, merci de m'avoir fait confiance pour présenter ce projet au concours de l'école doctorale, j'en suis très reconnaissant. Merci également pour ta pédagogie, tes conseils et tes encouragements pendant ces trois années, il s'agit d'une aide précieuse pour la réussite du doctorat.

Je tiens ensuite à dire un grand MERCI à ma co-encadrante de thèse, Dr **Marion Dalmasso**. Merci également de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse et pour m'avoir transmis ta passion des bactériophages. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, ta réactivité, ton implication, tes conseils et tes encouragements tout au long de ces trois années. Merci également pour les moments partagés à l'extérieur du laboratoire et désolé si certaines de tes soirées ont été polluées par des matchs de Ligue des Champions en compagnie Fabien ! Ce fut un réel plaisir pour moi d'avoir travaillé à tes côtés, j'espère que cela fut réciproque.

Je remercie également les personnes ayant participé à mes comités de pilotage, Pr **Alain Rincé**, Dr **Éric Dugat-Bony** et Dr **Xavier Bellanger**, pour leurs conseils et leur expertise scientifique, même si ces réunions ont dû se faire en visio avec la crise du Covid.

Je remercie également les personnes avec lesquelles j'ai collaboré et avec qui les échanges scientifiques étaient très pertinents, particulièrement **Benoit Bernay**, **Christophe Monnet**, **Olivier Rué**, **Cédric Midoux**, **Didier Goux** et **André Sesboüé**.

Merci également aux membres de mon comité de suivi individuel pour les conversations autour de la thèse, **Raphaëlle Tourdot-Maréchal**, **Yann Guiavarc'h**, **Sylvie Chevalier** et **Marion Aubourg**, même si peu de sujets scientifiques ont été abordés.

J'adresse mes remerciements à tous les membres de l'UR ABTE, en particulier au Pr **François Sichel**, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire ainsi que pour les échanges lors des conseils de gestion et autres réunions.

Merci également à toute l'équipe du campus 2, EcoTEA, pour leur accueil lors de mes manips de GC-MS. Un clin d'œil particulier à **Jérôme** et son expertise des composés volatiles et à **Baptiste** pour son aide précieuse lors des injections d'échantillons de GC-MS, ce qui m'a évité quelques allers-retours avec le campus 1 !

Merci à tous les membres de l'équipe MALIM pour ces trois années de thèse, pour les pauses café dans la bonne humeur, même si le Covid est venu gâcher un peu tout ça... Merci à **Marina**, **Jean-Marie**, **Margot**, **Jean-Michel B**, **Marion B**, **Caroline A**, **Jean-Michel P**, **Boris**, **Caroline Au**, **Anne Cécile**, **Julien**, **Erwan, Florian, Céline, Simon et Chloé**.

Merci aux différents stagiaires de passage, en particulier **Morgane** et **Sarah** que j'ai pu encadrer, au pyrénéen **Brice**, mais aussi à mes deux Italiens préférés, **Nicholas** et **Eugenia**, nos échanges de vocabulaire furent très drôles (et trop court) ! Merci également à **Hugo**, même si la rivalativé Bretagne-Normandie a souvent été débattue, nos discussions sportives et nos petites parties de futsal fûrent de très bons moments ! Je te souhaite bon courage pour tes futurs projets !

Une attention particulière pour toutes les personnes parties trop rapidement du laboratoire. **Boussad**, notre passion pour le sport et nos discussions sur les paris sportifs m'ont rapidement manqué. **Sara**, ton accent chantant espagnol apportait de la bonne humeur dans l'équipe et a laissé un vide. Merci pour les petits moments hors labo, je vous souhaite le meilleur, vous le méritez tous les deux.

Merci à **Alexandra** de m'avoir bien accueilli parmi les doctorants, pour toutes les discussions, plus ou moins sérieuses, ainsi que pour les anecdotes partagées ensemble. Cela restera de bons souvenirs !

Merci au vendéen et canari **Fabien**, pour les échanges scientifiques, les discussions sportives, les petites sorties trail ou encore les soirées Ligue des Champions généralement autour d'une petite mousse ! Bon, tu n'auras pas encore réussi à me faire aimer ta passion pour le golf, mais ça, je pense que c'est voué à l'échec !

Je remercie également mes compagnons de sorties vélo, avec qui j'ai pu parcourir quelques kilomètres, j'espère que vos jambes s'en souviennent ! **Clovis**, le plus chauvin des Belges, mais à l'heure où j'écris ces remerciements, les Français sont encore champions du monde, tout comme en vélo… **Bastien**, ton sens de l'humour m'aura bien fait rire, peut-être à bientôt sur un triathlon où j'espère rattraper à vélo l'avance que tu auras prise en natation ! **Julien**, merci de m'avoir fait découvrir quelques petites bosses du Pays d'Auge, c'est dommage d'avoir appris que tu faisais du vélo qu'à la fin de ma thèse…

Comment ne pas remercier toute la bande des copains, qui a vu le jour à l'IUT GB, il y a plus de 8 ans maintenant ! Les moments passés ensemble sont toujours aussi drôles, comme l'atteste notre semaine de vacances au ski ou les différents week-ends passés ensemble chez les uns et les autres !

Parmi eux, la bande Caennaise, **Maïwenn**, **Camille**, **Bertille**, et mes deux complices, les jumeaux **Ludo** et **Micka** (# les Tournas), merci pour tous les moments passés ensemble. Notre passion commune pour le vin, les soirées au stade Michel d'Ornano (il faut sacrément aimer le foot et le SM Caen pour aller voir certaines prestations de L2, mais le club semble repartir sur de bons rails…), les apéros-repas chez les uns et les autres ou à la plage ou encore les petits futsal. Cela a été des moments importants au cours de ces trois années ! J'espère que ces liens resteront tissés très longtemps.

Aux autres copains de la bande, expatriés à d'autres coins de l'hexagone, que ce soit chez les rivaux Bretons pour **Flavie** et **Maxime**, ou chez les Ch'tis et les Lyonnais pour **Arthur**, **Valentin** et leurs compagnes, les retrouvailles sont toujours aussi bonnes !

Je souhaite par-dessus tout remercier toute ma **famille**, mais également toute ma **belle-famille**, qui m'a accueilli de la meilleure des manières.

Je pense forcément à mes **grands-parents** qui ne sont plus présents, je sais que de là où vous êtes, vous êtes fier de ce que j'ai accompli. **Papi**, merci de m'avoir fait don de quelques litres de cidre pour mes recherches, et **Mamie**, un merci particulier pour les pots de confiture maison.

Merci à mes deux petites sœurs, **Manon** et **Coline**, pour les moments passés ensemble, on ne se le dit sûrement pas assez, mais vous êtes très importantes pour moi. Merci à mes deux beaux-frères, **Thomas** et **Antonin,** pour les fous rire, les séances de sport que ce soit à vélo ou à pied et même maintenant de natation, les soirées et votre bonne humeur à toute épreuve.

Papa et **Maman**, ces quelques mots ne suffiraient pas pour vous remercier de tout ce que vous avez fait pour moi. Sans vous, rien n'aurait été possible. Merci de m'avoir toujours mis dans les meilleures dispositions, de votre soutien indéfectible et des valeurs que vous m'avez inculquées.

Mes dernières pensées s'adressent tout naturellement à **Aurélie**. Tu as toujours su me soutenir, me booster, me motiver, dans les bons comme dans les moments de doute. Ces quelques lignes ne suffiraient pas pour décrire ce que je ressens pour toi, ni pour expliquer pourquoi tu es devenue ma femme. Un chapitre se ferme avec la fin de nos thèses respectives, mais plein d'autres vont s'ouvrir, tant il nous reste de choses à écrire ensemble. Je t'aime.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ***- 1 -***

LISTE DES TABLEAUX ***- 5 -***

LISTE DES ABREVIATIONS ***- 9 -***

AVANT-PROPOS ***- 13 -***

INTRODUCTION ***- 17 -***

1. Les bactériophages - 19 -

1.1 Les bactériophages au cours du temps - 19 -

1.1.1 Historique - 19 -

1.1.2 Utilisation des bactériophages et réglementation de leur usage - 20 -

1.1.3 Définition et classification - 23 -

1.1.3.1 Définition des phages - 23 -

1.1.3.2 Les génomes phagiques - 23 -

1.1.3.3 La classification des phages - 24 -

1.2 Cycle de vie des bactériophages - 27 -

1.2.1 Adsorption du phage sur son hôte et injection de l'ADN - 27 -

1.2.2 Le cycle lytique - 29 -

1.2.3 Le cycle lysogénique ou tempéré - 30 -

1.2.4 Le cycle pseudo-lysogénique - 31 -

1.2.5 Les autres cycles - 31 -

1.2.5.1 Le cycle chronique - 31 -

1.2.5.2 L'état porteur - 32 -

1.3 Techniques d'études des bactériophages - 32 -

1.3.1 Méthodes traditionnelles d'étude des phages - 32 -

1.3.2 Utilisation de la métagénomique pour l'étude des phages - 33 -

1.4 Place et impact des phages dans les écosystèmes - 35 -

1.4.1 Equilibres microbiens dans les écosystèmes - 35 -

1.4.1.1 Modèle « kill the winner » - 35 -

1.4.1.2 Modèle « kill the relative » - 35 -

1.4.1.3 Le modèle du « community shuffling » - 36 -

1.4.1.4 Le modèle « invade the relative » - 36 -

1.4.2 Les phages : vecteurs de transmission de matériel génétique - 37 -

1.4.2.1 La transduction généralisée - 37 -

1.4.2.2 La transduction spécialisée - 37 -

1.4.3 L'impact du mode tempéré sur les écosystèmes - 38 -
1.4.4 Les mécanismes développés par les bactéries pour résister aux phages - 40 -
1.4.4.1 Inhibition de l'adsorption - 41 -
1.4.4.2 Inhibition de l'injection d'ADN - 41 -
1.4.4.3 Actions au niveau de l'ADN phagique - 41 -
1.4.4.4 Le système adaptatif CRISPR-Cas - 42 -
1.4.4.5 Les mécanismes d'auto-suicide - 44 -
1.4.4.6 Les autres moyens de résistance bactérienne aux phages - 44 -
1.4.5 Les phages contournent les résistances bactériennes - 44 -
1.4.5.1 Adaptation au niveau de l'étape d'adsorption - 44 -
1.4.5.2 Contournement des endonucléases bactériennes - 45 -
1.4.5.3 Détournement du mécanisme CRISPR-Cas - 46 -
1.4.5.4 Contournement du système d'auto-suicide bactérien - 47 -

2. Microbiologie générale des boissons fermentées - 48 -

2.1 Aperçu de la diversité microbiologique de quatre boissons fermentées - 48 -
2.1.1 Le kéfir - 48 -
2.1.2 Le kombucha - 50 -
2.1.3 La bière - 51 -
2.1.4 Le vin - 52 -
2.2 Une boisson fermentée comme modèle d'étude des phages : le cidre - 54 -
2.2.1 Historique de la fermentation des pommes et place du cidre dans le territoire - 54 -
2.2.2 Procédés de fabrication et fermentation du cidre - 55 -
2.2.3 Diversité microbienne du cidre - 57 -
2.2.3.1 La diversité levurienne - 57 -
2.2.3.2 La diversité bactérienne - 58 -
2.2.4 Composition physico-chimique et aromatique du cidre - 60 -
2.3 Les communautés de phages, ou « phageomes », des aliments - 62 -
2.3.1 Résumé de la revue bibliographique de thèse, Ledormand *et al.*, 2020 - 62 -
2.3.2 Revue bibliographique « Phage community involvement in fermented beverages: an open door to technological advances? », Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition, 2020. - 63 -
2.3.3 Éléments complémentaires - 74 -

OBJECTIFS DU PROJET DE THÈSE - 77 -

MATÉRIELS & MÉTHODES ***- 81 -***

1. Microbiologie générale du projet de thèse - 83 -

1.1 Souches microbiennes et phages utilisés - 83 -

1.2 Conditions de culture des microorganismes - 83 -

1.2.1 Milieux de culture - 83 -

1.2.2 Cinétiques de croissances - 84 -

1.2.3 Dénombrements - 84 -

1.3 Méthodes appliquées aux bactériophages - 84 -

1.3.1 Isolement de bactériophages - 84 -

1.3.2 Propagation des bactériophages - 85 -

2. Expériences réalisées dans le cadre du WP1 - 85 -

2.1 Panel des échantillons de cidre - 85 -

2.2 Extraction du phageome lytique du cidre - 86 -

2.3 Utilisation de méthodes de concentration des particules phagiques - 87 -

2.3.1 La filtration tangentielle - 87 -

2.3.2 La flocculation - 88 -

2.4 Extraction d'ADN pour la recherche des prophages - 88 -

2.5 Etude métagénomique - 88 -

2.5.1 Séquençage des acides nucléiques - 88 -

2.5.2 Recherche des prophages - 88 -

3. Expériences réalisées dans le cadre du WP2 - 89 -

3.1 Mise en place de la communauté modèle - 89 -

3.2 Vérification de la présence de prophages inductibles dans les souches bactériennes du modèle - 90 -

3.3 Sélection du mode de perturbation - 90 -

3.4 Application de l'agent perturbateur et suivi de la communauté - 91 -

3.5 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) - 93 -

3.6 Extraction des composés volatils par micro extractions en phase solide (MEPS) - 93 -

3.7 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) - 94 -

3.8 Analyses statistiques - 94 -

4. Expériences réalisées dans le cadre du WP3 - 95 -

4.1 Caractérisation du phage UCMA 21115 - 95 -

4.1.1 Détermination du temps d'adsorption - 95 -

4.1.2 One Step Growth Curve (OSGC) - 95 -

4.1.3 Détermination du spectre d'hôte - 96 -

4.1.4 Résistance au pH - 96 -
4.1.5 Purification par ultra-centrifugation - 96 -
4.1.6 Observation au microscope électronique en transmission (MET) - 97 -
4.1.7 Extraction d'ADN - 97 -
4.2 Mise en place de la communauté modèle - 97 -
4.3 Extraction des acides nucléiques - 98 -
4.3.1 Extraction de l'ADN bactérien - 98 -
4.3.2 Extraction d'ARN - 99 -
4.4 RNA-seq - 99 -
4.5 Extraction des protéines totales - 100 -
4.6 Spectrométrie de masse - 100 -

RÉSULTATS - 101 -

1. Etude de la diversité du phageome et des prophages d'échantillons de cidre - 103 -
1.1 Présentation et résumé de la publication n°1 - 103 -
1.2 Publication n°1 - 105 -
1.3 Expériences complémentaires pour les tests de flocculation - 121 -
1.3.1 Tests de flocculation - 121 -
1.4 Faits marquants du WP1 - 122 -

2. Rôle des phages dans un modèle de communauté inspirée du cidre ayant subi une perturbation - 123 -
2.1 Présentation et résumé de la publication n°2 - 123 -
2.2 Publication n°2 - 126 -
2.3 Données complémentaires du WP2 - 148 -
2.3.1 Vérification de la présence de prophages inductibles dans les souches bactériennes du modèle - 148 -
2.3.2 Sélection du modèle de perturbation - 149 -
2.3.3 Résultats dans le moût de pomme - 153 -
2.4 Faits marquants du WP2 - 158 -

3. Etude de la réponse transcriptomique et protéomique d'une souche bactérienne, à une infection par un phage lytique au sein d'une communauté modèle - 159 -
3.1 Présentation et résumé de la publication n°3 - 159 -
3.2 Publication n°3 - 162 -
3.3 Faits marquants du WP3 - 176 -

DISCUSSION GÉNÉRALE **- 177 -**

1. Etude de la diversité en phages et prophages du cidre - 179 -

2. Implication des phages dans un modèle de communauté microbienne - 182 -

3. Impacts moléculaires d'une infection phagique dans un modèle de communauté - 188 -

PERSPECTIVES **- 191 -**

CONCLUSION **- 197 -**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **- 201 -**

ANNEXES **- 241 -**

Annexe 1 : Souches microbiennes utilisées au cours de ces travaux de thèse - 247 -

Annexe 2 : Poster présenté au 13ème symposium des LAB - 253 -

Annexe 3 : Poster présenté au 16ème congrès de la SFM - 254 -

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les grandes étapes des cent premières années de recherche sur les bactériophages. _____ *- 19 -*

Figure 2 : Nombre de publications par an entre 1960 et 2021 contenant le mot clé « phage » recensés dans la base de données. _____ *- 21 -*

Figure 3 : Principales familles et ordres de bactériophages ciblant les bactéries ainsi que les différents virus d'Archées. _____ *- 25 -*

Figure 4 : Récepteurs des phages pour leur adsorption à la surface des bactéries à Gram négatif. _____ *- 27 -*

Figure 5 : Récepteurs des phages pour leur adsorption à la surface des bactéries à Gram positif. _____ *- 28 -*

Figure 6 : Différentes étapes de l'injection de l'ADN phagique dans la cellule hôte par le bactériophage T4. _____ *- 28 -*

Figure 7 : Les cycles de vie des bactériophages. _____ *- 29 -*

Figure 8: Organisation génétique du module de lysogénie du phage λ. _____ *- 30 -*

Figure 9 : Evolution du phageome intestinal au cours de la vie. _____ *- 34 -*

Figure 10 : Modèles théoriques de l'impact écologique des bactériophages dans un microbiote. _____ *- 36 -*

Figure 11 : Les mécanismes de transduction effectués par les bactériophages. _____ *- 38 -*

Figure 12 : Principales sources de résistances bactériennes aux infections phagiques.__ *- 40 -*

Figure 13 : Fonctionnement du système CRISPR._____ *- 43 -*

Figure 14: Stratégies des phages pour accéder aux récepteurs bactériens. _____ *- 45 -*

Figure 15 : Stratégies phagiques pour contourner les endonucléases bactériennes. ____ *- 46 -*

Figure 16 : Mécanisme anti-CRISPR des phages**.** _____ *- 46 -*

Figure 17 : Stratégies adaptatives des phages contre le système « abortive infection »._ *- 47 -*

Figure 18 : Aspect d'un grain de kéfir pour la fermentation du lait. _____ *- 48 -*

Figure 19 : Aspect d'un kombucha pendant la fermentation._____ *- 50 -*

Figure 20 : La fermentation malolactique chez *O. oeni*. _____ *- 52 -*

Figure 21: Distribution des appellations cidricoles de la région Normandie. _____ *- 54 -*

Figure 22 : Procédé de fabrication du cidre. _____ *- 56 -*

Figure 23 : Stratégie globale du projet de thèse. _____ *- 80 -*

Figure 24 : Aspect des différentes colonies de bactéries lactiques sur le milieu MRS X-Gal. _____ *- 92 -*

Figure 25: Tests d'induction des souches bactériennes du modèle du WP2 à la mitomycine C (MC). _____ *- 148 -*

Figure 26 : Tests de perturbation avec différentes concentrations en éthanol ajoutées après 24 h de co-culture. _____ *- 149 -*

Figure 27 : Tests de perturbation avec différentes concentrations en sulfite de sodium ajoutées après 24 h**.** _____ *- 151 -*

Figure 28 : Test d'effet cocktail avec différentes concentration d'éthanol et de sulfites de sodium ajoutés à 24 h. _____ *- 152 -*

Figure 29 : Test d'effet de perturbation par choc thermique après 24 h. _____ *- 153 -*

Figure 30 : Dynamique des populations microbiennes et du pH dans le modèle de communauté pour les trois conditions expérimentales (contrôle, perturbation sans phages et perturbation avec phages) à 25°C dans le moût de pomme. _____ *- 154 -*

Figure 31 : (A) Analyse en Composantes Principales des composés étudiés (flèches noires) avec les variables illustratives représentant les quatre souches du modèle (flèches rouges). (B) Distribution des échantillons en condition C (contrôle), D (perturbation sans phages) et P (perturbation et phages) à 168 h pour l'expérience à 25°C en moût de pomme. _____ *- 157 -*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Ordres et familles des bactériophages décrits dans le rapport de l'ICTV de 2020. ___ - *26* -

Tableau 2 : Diversité bactérienne associée au cidre. _____ - *58* -

Tableau 3 : Principaux composés aromatiques volatils identifiés dans le cidre. _____ - *61* -

Tableau 4 : Echantillons de cidre prélevés pour l'étude du phageome et des prophages. _____ - *85* -

Tableau 5 : Liste des agents perturbateurs testés._____ - *91* -

Tableau 6 : Efficacité de récupération des particules phagique après flocculation dans le cidre et dans l'eau. _____ - *121* -

Tableau 7 : Analyses statistiques des dénombrements microbiens pour l'expérience en moût de pomme à 25°C._____ - *155* -

LISTE DES ABREVIATIONS

Abi : *Abortive infection*
ABTE : Aliments, Bioprocédés, Toxicologie et Environnements
Acr : Anti-CRISPR
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
AOP : Appellation d'Origine Protégée
AMR : Résistance aux antimicrobiens
ARG : *Antibiotic Resistance Genes*
ARN : Acide RiboNucléique
ARNcr : ARN Crispr
ARNr : ARN ribosomique
ARNr 16S : ARN ribosomique 16S
ARNt : ARN de transfert
ATP : Adénosine TriPhosphate
BREX : *BacteRiophage EXclusion*
CBASS : *Cyclic oligonucleotides-Based Anti-phage Signalling System*
CO_2 : Dioxyde de carbone
CRISPR-Cas : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR associated proteins*
DISARM : *Defense Islands System Associated with R-M*
DO_{600nm} : Densité Optique à 600 nm
EDnBISE : École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement
ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EPS : ExoPolySaccharides
FML : Fermentation MaloLactique
g/L : Gramme par Litre
GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse
GRAS : *Generally Recognized As Safe*
HMC : Hydroxymethylcytosines
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
ICTV : *International Comitee on Taxonomy of Viruses*
ITS : *Internal Transcribed Spacer*
kDa kilo Dalton
KEGG : *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
kV : kilo Volt
LAB : Bactéries Lactiques
LPS : Lipopolysaccharide
M : Molaire
MALIM : Matrices ALImentaires et Microbiotes
MC : Mitomycine C
MEB : Microscopie Électronique à Balayage
MEPS : Micro Extraction en Phase Solide
MET : Microscopie Électronique à Transmission
mg/L : Milligramme par Litre
mL : Millilitre
mM : Millimolaire
MOI : *Multiplicity Of Infection*
MST *: MicroScale Thermophoresis*
NCBI : *National Center for Biotechnology Information*
ORFs : *Open Reading Frames*
OSGC : *One Step Growth Curve*
PAM : *Protospacer Adjacent Motif*
PEG : Poly Ethylene Glycol
pH : Potentiel d'Hydrogène
PVPP : PolyVinylPolyPyrrolidone
RBP : *Receptor Binding Protein*
R-M : Restriction – Modification
RNA-Seq : Séquençage total de l'ARN
ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène
RPKM : *Reads Per Kilo base per Million*
RPS : Résonance des Plasmons de Surfaces
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
Sie : *Superinfection exclusion*
TFF : *Tangential Flow Filtration*
UCMA : Université de Caen Microbiologie Alimentaire
UFC : Unités Formant Colonie
UFP : Unités Formant Plage de lyse
UV : Ultra-Violet
VBNC : *Viable But Non Culturable*
X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
µL : Microlitre
µm : Micromètre

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse portant sur l'étude des interactions entre les bactériophages et les bactéries dans une matrice alimentaire fermentée, a été réalisé au sein de l'Unité de Recherche Aliments, Bioprocédés, Toxicologie et Environnements (UR 4651 ABTE) de l'Université de Caen Normandie, dans l'équipe Matrices ALImentaires et Microbiotes (MALIM) située sur le campus 1 de l'Université de Caen Normandie.

Cette thèse a débuté le 1er octobre 2019 suite à l'obtention d'une bourse de doctorat du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation au sein de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (ED 497 NBISE). En raison de la crise sanitaire liée au virus du SARS-CoV-2 durant ces trois années de thèse, mon contrat doctoral a été prolongé de trois mois, se terminant ainsi au 31 décembre 2022.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la thématique transversale « ressources au service de l'aliment, de l'environnement et de la santé » de l'UR ABTE, et plus particulièrement au sein des travaux de l'équipe MALIM, qui ont pour objectif de comprendre comment se structure le microbiote des aliments et quelles sont les relations entre sa structure et ses fonctions à l'échelle de la matrice. De plus, ce projet s'inscrit également dans une thématique émergente de l'équipe MALIM portant sur les bactériophages dans les matrices alimentaires. Ce projet de thèse visait à mieux comprendre les relations entre les bactériophages et les bactéries au sein de produits alimentaires fermentés, en prenant comme modèle d'étude une boisson fermentée, le cidre.

La première partie de ce manuscrit présente une synthèse bibliographique sur (i) les bactériophages, (ii) les principales caractéristiques microbiologiques des boissons fermentées et (iii) les connaissances sur les communautés de bactériophages des aliments.

Dans une seconde partie, les travaux expérimentaux sont présentés sous la forme d'articles scientifiques portant sur les trois grands axes de la thèse. Les premiers portent sur la diversité des communautés de phages dans le cidre. Puis, l'influence des phages sur la dynamique et le métabolisme d'un modèle de communauté microbienne inspirée du cidre est présentée. Enfin, la réponse transcriptomique et protéomique d'une souche bactérienne, au sein d'une communauté modèle bactérienne, à la présence d'un phage lytique est décrite.

La dernière grande partie de ce manuscrit présente une discussion générale et les perspectives proposées à l'issue de ces travaux de thèse ainsi qu'une conclusion.

INTRODUCTION

1. Les bactériophages

1.1 Les bactériophages au cours du temps

1.1.1 Historique

Les bactériophages, dit également « phages », ont été découverts il y maintenant plus de 100 ans, à la fin du XIX^{ème} et au début du XX^{ème} siècle. Les grandes étapes de la recherche sur les bactériophages sont présentées dans la **Figure 1**. Ernest Hanbury Hanking est le premier auteur à mettre en évidence la présence d'un agent bactéricide en 1896 contre le bacille cholérique dans l'eau, montrant que de l'eau du Gange et de la Jumna pouvait inhiber la croissance de cette bactérie (Hankin, 1896). En 1915, le bactériologiste Frederick Twort découvre l'apparition de petites colonies translucides sur une gélose contenant des bactéries du genre *Micrococcus*. Il en conclut après plusieurs expériences, que ce phénomène était dû à la présence d'un agent infectieux capable de détruire la bactérie en question (Twort, 1915). En 1917, le biologiste Félix d'Hérelle observe pendant ses travaux sur le bacille dysentérique, *Shigella dysenteriae*, que des selles de patients malades inhibent la bactérie. Il est convaincu de la nature virale de cet agent invisible et le nomme bactériophage pour « mangeur de bactéries » (d'Herelle, 2007; Duckworth, 1976). Cependant, ce n'est que dans les années 1940 que cette hypothèse virale est confirmée, après l'utilisation de la microscopie électronique permettant d'observer ces particules virales (Luria and Anderson, 1942).

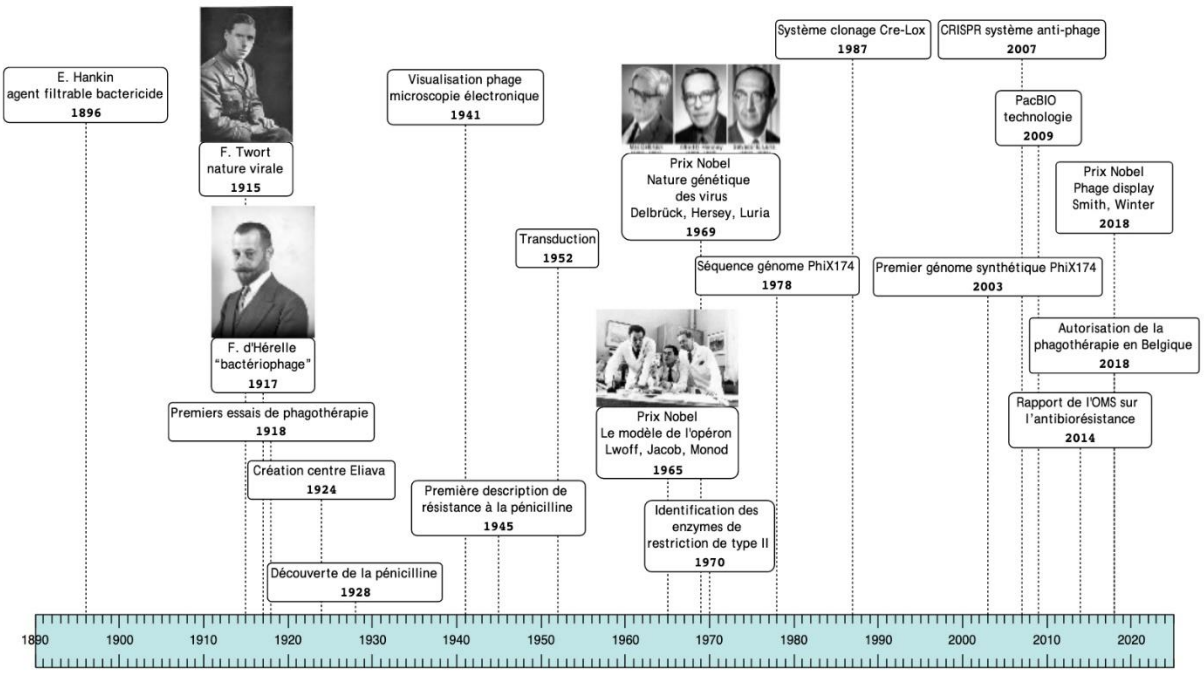


Figure 1: Les grandes étapes des cent premières années de recherche sur les bactériophages (source : https://site.phages.fr/, consulté le 25/07/2022).

Dès la découverte des bactériophages, d'Hérelle envisage leur utilisation à des fins thérapeutiques afin de traiter certaines maladies bactériennes. Ces travaux ont incité la communauté scientifique à chercher d'autres bactériophages pour soigner d'autres maladies d'origine bactérienne jusqu'aux années 1930 (D'Herelle, 1931). Cependant, ces recherches se sont rapidement estompées à cause de résultats souvent non reproductibles et imprévisibles. De plus, la découverte de la pénicilline et l'utilisation croissante des antibiotiques qui a eu lieu à la fin des années 1940, ont largement contribué au déclin de l'intérêt pour la phagothérapie en Occident (Wittebole *et al.,* 2014). Cette thérapie a néanmoins persisté en URSS et dans les pays d'Europe de l'Est comme la Pologne ou la Géorgie, où d'Hérelle a travaillé (Sulakvelidze *et al.,* 2001).

Les bactériophages sont également à l'origine de nombreuses découvertes de biologie moléculaire, comme le fait que l'ADN est le support de l'information génétique, que l'ARN est un intermédiaire entre l'ADN et la synthèse protéique ou encore de la découverte des systèmes de restriction-modification (Arber, 1966; Hershey and Chase, 1952; Volkin and Astrachan, 1956). De plus, le premier génome a avoir été séquencé était celui d'un bactériophage (phiX174), qui est l'origine de la méthode de séquençage dite de « Sanger » (Sanger *et al.,* 1977).

1.1.2 Utilisation des bactériophages et réglementation de leur usage

Depuis la dernière décennie, un regain d'intérêt pour les bactériophages a été observé, comme l'atteste la **Figure 2**. En effet, plus de 2000 publications par an ont été recensées avec le mot clé « phage » dans la base de données PubMed (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) sur la période 2012-2021 alors que ce chiffre ne dépassait pas les 1500 publications par an auparavant (**Figure 2**). Cette augmentation s'explique surtout par le fait de l'apparition de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques. Ainsi, de nombreuses équipes de recherche se tournent de nouveau vers la caractérisation et l'utilisation de bactériophages afin d'établir des collections intéressantes pour un usage thérapeutique pour lutter contre ce fléau mondial.

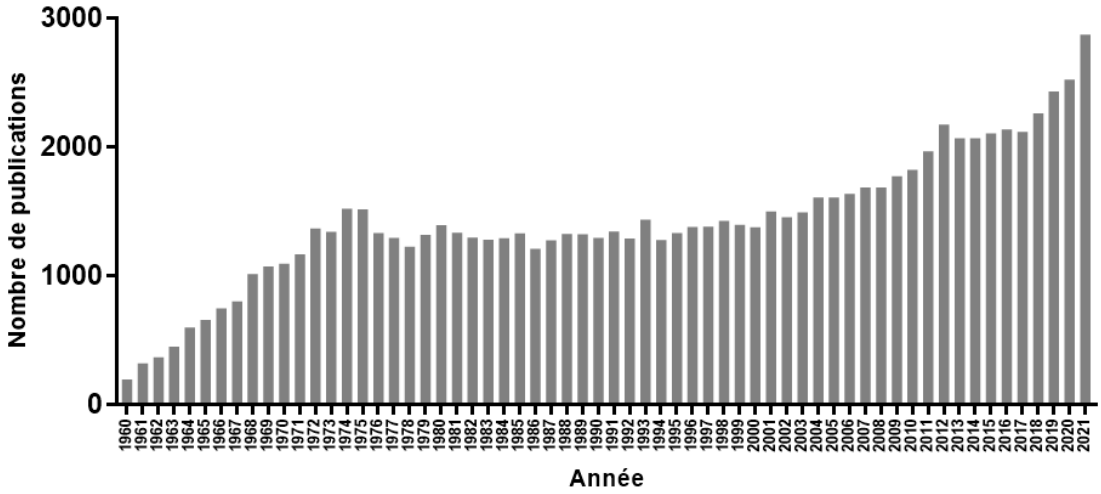


Figure 2 : Nombre de publications par an entre 1960 et 2021 contenant le mot clé « phage » recensés dans la base de données PubMed (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine).

Contrairement à l'antibiothérapie, la phagothérapie a l'avantage de présenter une spécificité vis-à-vis de l'espèce bactérienne ciblée et par conséquent de ne pas détruire d'autres microorganismes. Cependant, la limite majeure se trouve dans le fait qu'il est nécessaire d'isoler, de multiplier et de purifier un phage rapidement pour le traitement d'une infection bactérienne donnée. L'absence de législation concernant l'utilisation des bactériophages à des fins thérapeutiques a souvent été mise en avant comme étant un obstacle (Fauconnier, 2019). En effet, la phagothérapie bouleverse les règles conventionnelles et les codes établis. Par exemple, comme les phages s'auto-répliquent, ils sont considérés comme un traitement actif puisqu'ils ont tendance à s'amplifier dans le corps humain, contrairement à un traitement antibiotique, considéré comme un traitement passif, du fait de la diminution de la concentration au cours du temps (Abedon and Thomas-Abedon, 2010; Payne *et al.*, 2000). Les phages, comme les antibiotiques, seront également à l'origine de l'apparition de bactéries qui leur seront résistantes, même si le spectre d'action est beaucoup plus restreint que celui des antibiotiques (Loc-Carrillo and Abedon, 2011). Les phages, contrairement aux antibiotiques, évoluent eux-mêmes pendant leur réplication, menant donc à des schémas co-évolutifs au contact des bactéries (Koskella and Brockhurst, 2014). Pour ces raisons, il n'y a pas, à ce jour, de législation commune dans le monde concernant l'utilisation des bactériophages.

Cependant, des essais d'utilisation de bactériophages ciblant des souches d'intérêt clinique ont commencé à être mis en place. C'est le cas par exemple concernant des souches d'*Escherichia coli* pathogènes et multi-résistantes appartenant au groupe ST131-O25b du microbiote intestinal, où un phage spécifique a été sélectionné (Dufour *et al.,* 2016; Galtier *et al.,* 2016). Des essais thérapeutiques comme « PhagoBurn » pour le traitement d'infections cutanées à *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli* chez des grands brulés, ou « PHOSA » pour traiter des infections ostéoarticulaires à *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis* ont été entrepris.

Le terme de phagothérapie est globalement employé pour des usages médicaux. En revanche, l'utilisation des bactériophages en tant qu'agents de bio-contrôle dans divers domaines comme en agro-alimentaire, agriculture ou dans l'environnement est également courante. En effet, il existe de nombreux travaux portant sur l'utilisation des phages dans le domaine agroalimentaire, pour lutter contre des pathogènes ou des bactéries d'altération (Cristobal-Cueto *et al.,* 2021). Par exemple, des études sont menées concernant la bactérie phytopathogène *Xylella fastidiosa* responsable de la destruction de nombreux arbres et plantes, suite à l'obstruction des vaisseaux de xylème par formation de biofilms. Des bactériophages ciblant cette bactérie ont été étudiés et trouvés comme potentiellement utilisables pour traiter ces infections bactériennes (Clavijo-Coppens *et al.,* 2021). En aquaculture, des cocktails de phages sont utilisés afin de réduire la présence du pathogène *Vibrio harveyi* dans les élevages de crevettes (Stalin and Srinivasan, 2017).

Malgré les contraintes liées à l'utilisation de phages en fonction des pays, des produits à base de phages sont déjà commercialisés en industrie agroalimentaire (Monk *et al.,* 2010). C'est la cas notament de produits comme le ListShield™ (société Intralytix) et le Listex P100™ (société EBI Food Safety) bénéficiants du statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*), ciblant le pathogène *Listeria monocytogenes* dans les denrées alimentaires comme le fromage et la viande. Sur le même principe, le produit EcoShield (société Intralytix) autorisé aux États-Unis et au Canada, est destiné à lutter contre la présence de *E. coli* O157:H7 dans les aliments. Le produit PhageGuard S™ (société EBI Food Safety), est aussi utilisé en prévention de contaminations des surfaces à *Salmonella* dans les ateliers de production des viandes hachées et de poulet. Enfin, le produit CUSTUS®YRS (société ACD Pharma) est commercialisé en Norvège pour contrôler le pathogène *Yersinia ruckeri* du saumon, très problématique en salmoniculture.

1.1.3 Définition et classification

1.1.3.1 Définition des phages

Les bactériophages font partie d'un groupe de virus s'attaquant spécifiquement aux bactéries. Ils ne sont pas capables d'infecter les cellules eucaryotes. Actuellement, le terme désigne plus globalement les virus infectant les Eubactéries et les Archées (Clokie *et al.*, 2011). En revanche, les virus s'attaquant aux Archées ont des différences notables, en particulier au niveau de leur morphotype (Pietilä *et al.*, 2014). Les phages sont considérés comme étant des « entités biologiques » ne faisant pas partie du domaine du vivant, puisqu'ils ne possèdent pas la machinerie nécessaire pour réaliser la transcription, la traduction et la production d'énergie à la cellule. Ils doivent donc utiliser celle de leur hôte cellulaire pour se développer et se propager, ce qui en fait des parasites intracellulaires obligatoires. Les phages sont considérés comme étant l'entité biologique la plus représentée sur la planète Terre, puisqu'ils sont estimés à hauteur de 10^{31} particules, soit dix fois plus nombreux que leurs hôtes bactériens (estimés à 10^{30}) (Breitbart and Rohwer, 2005). Les phages sont relativement de petite taille (de l'ordre du nm) et généralement composés d'un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN), simple ou double brin, et protégés par une structure protéique ou parfois lipoprotéique, nommée capside.

1.1.3.2 Les génomes phagiques

La taille du génome des phages est assez variable, elle peut aller de 3 à 300 kb en moyenne. En 2020, une équipe de chercheurs a même séquencé le plus grand génome de phage jamais rencontré jusqu'alors à partir d'un échantillon provenant d'un lac, allant jusqu'à 735 kb, plus grand que certains génomes bactériens (Al-Shayeb *et al.*, 2020). Ces phages sont communément appelés « jumbo » pour « géants » et présentent souvent l'avantage d'avoir des gènes codants pour des polymérases (ADN ou ARN) et des gènes codants pour des ARN de transfert (ARNt), les rendant moins dépendants à leur hôte (Yuan and Gao, 2017).

Les génomes phagiques sont généralement organisés en unités génétiques fonctionnelles bien distinctes (Desiere *et al.*, 2002). Les principales unités fonctionnelles correspondent à la réplication et l'empaquetage de l'ADN ou l'ARN, à la synthèse des protéines phagiques, à l'assemblage des protéines participant à la morphologie du phage, comme les protéines de la tête, de la queue ou des fibres caudales, mais aussi à la lyse bactérienne, à la régulation de la transcription ou encore au contrôle de la lysogénie. Cependant, de nombreux gènes demeurent encore avec une fonction inconnue dans les bases de données.

De plus, de nombreux échanges de fragments de génomes peuvent intervenir entre les phages, médiés par des enzymes particulières, les recombinases.

Deux types de recombinaisons sont fréquemment rencontrées, la recombinaison homologue et la recombinaison illégitime, ce phénomène est appelé mosaïsme (De Paepe *et al.*, 2014). La recombinaison homologue a lieu entre des séquences fortement similaires et est généralement soutenue par des enzymes d'origine bactérienne (RecA ou RecBCD chez *E. coli* par exemple) (Craig and Roberts, 1980; Dillingham and Kowalczykowski, 2008). La recombinaison illégitime, intervient de manière plus aléatoire entre les phages, bien que cela soit souvent situé au niveau des ORFs (*Open Reading Frames*) mais aboutit la plupart du temps à un phage recombinant non fonctionnel (Hatfull *et al.*, 2008).

Ces réarrangements des génomes phagiques peuvent participer à définir la spécificité du spectre d'hôte des phages, bien qu'il s'agisse généralement de déterminants génétiques acquis, présentés plus tard (partie 1.4.5). La plupart des phages sont considérés comme ayant un spectre d'hôte étroit (Göller *et al.*, 2021), mais certains phages peuvent avoir avec un spectre d'hôte plus large, leur permettant d'infecter plusieurs souches bactériennes, comme c'est le cas concernant le genre *Salmonella* (Li *et al.*, 2020) ou encore *Staphylococcus* (Moller *et al.*, 2019).

1.1.3.3 La classification des phages

La classification des micro-organismes s'effectue aujourd'hui en se basant sur la séquence nucléotidique de gènes ou de parties de génomes conservées. L'exemple le plus connu concerne l'ARNr 16S pour les bactéries ou les régions ITS (*Internal Transcribed Spacer)* chez les levures (Sun *et al.*, 2014). Les phages ne peuvent être classifiés ainsi puisqu'ils ne possèdent pas de gène universel qui permettrait un suivi phylogénétique.

La classification des phages est proposée par l'*International Commitee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) en ordres (*-virales*), familles (*-viridae*), sous-familles et genres en se basant sur le type d'acide nucléique, la morphologie mais également plus récemment sur des propriétés physico-chimiques (Ackermann, 2011; Ackermann and Prangishvili, 2012). En juin 2022, l'ICTV a établi 65 ordres, 8 sous-ordres et 233 familles de virus. A titre de comparaison, il y avait seulement 7 ordres en 2015, et 14 en 2018. Ceci est dû à l'implémentation des bases de données qui ne cessent d'augmenter ces dernières années mais également à la volonté d'avoir une classification de plus en plus précise et homogène (Gorbalenya *et al.*, 2020). Les principaux types de bactériophages qui peuvent être rencontrés sont présentés dans la **Figure 3,** et tous

ceux recensés par le rapport de l'ICTV en 2020 sont décrits dans le **Tableau 1.** La majorité des phages connus à ce jour (96%) appartiennent à l'ancien ordre des *Caudauvirales*, récemment reclassé au niveau taxonomique supérieur dans la classe des *Caudoviricetes* (Turner *et al.,* 2021). Cette classe des *Caudoviricetes* est maintenant décomposée en 4 ordres et 33 familles, alors que l'ancien ordre des *Caudauvirales* était divisé en 14 familles. Les anciennes familles de phages les plus connues *Siphoviridae*, *Myoviridae* et *Podoviridae* n'existent plus et ces phages sont maintenant appelés siphophages, myophages et podophages. Les phages sont maintenant classés selon la composition de leur génôme plutôt que par leur morphologie (Evseev *et al.,* 2020). Les autres familles de phages se distinguent par la nature de leur acide nucléique mais également par leurs morphologies diverses (**Figure 3**). Par exemple, les ordres des Ligamenvirales et des Tubulavirales ont des morphotypes très éloignés de ceux des Kalamavirales, Vinavirales ou des Mindivirales alors que les Petitvirales ont un morphotype relativement proche de ceux des Norzivirales ou des Timlovirales (**Figure 3**).

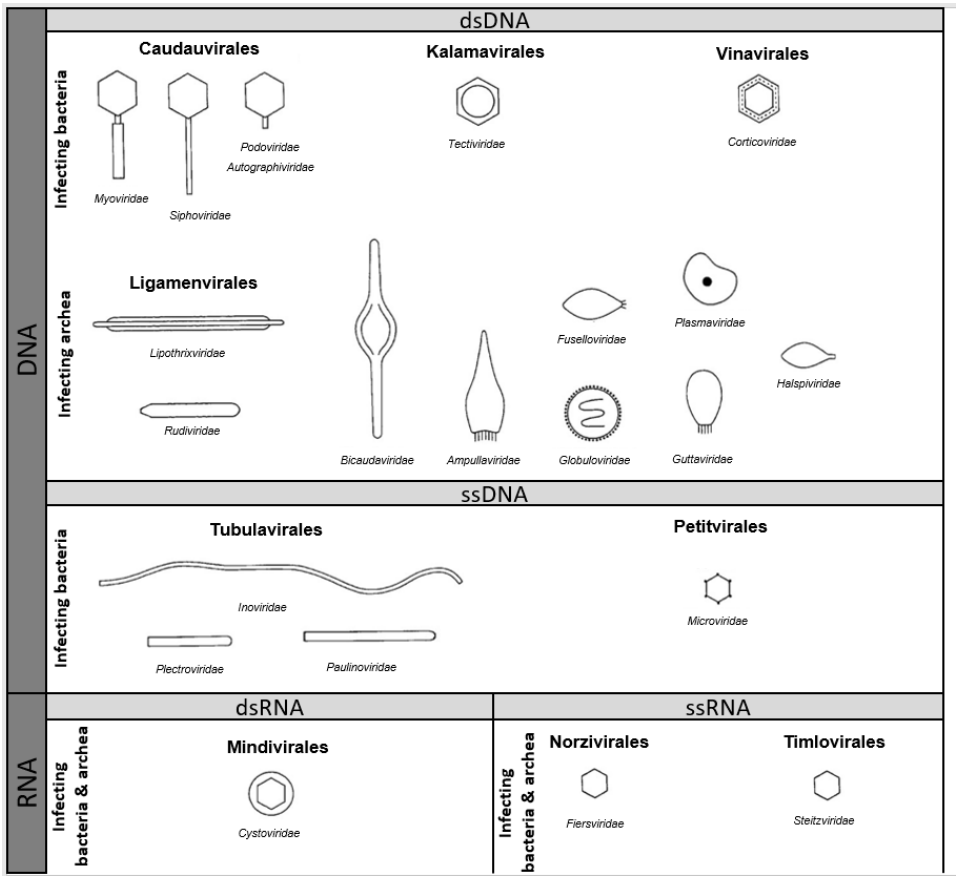


Figure 3 : Principales familles et ordres de bactériophages ciblant les bactéries ainsi que les différents virus d'Archées. Schéma adapté de Ackermann and Prangishvili, 2012, et du rapport de 2020 de l'ICTV https://talk.ictvonline.org/taxonomy/.

Tableau 1: Ordres et familles des bactériophages décrits dans le rapport de l'ICTV de 2020 (adapté depuis la source https://talk.ictvonline.org/taxonomy/).

Nucleic acid type	Order	Family	Sub-families	Genus - Genera	Host
dsDNA	Caudauvirales	*Ackermannviridae*	2	7	Bacteria
dsDNA	Caudauvirales	*Autographiviridae*	9	70	Bacteria
dsDNA	Caudauvirales	*Chaseviridae*	2	0	Bacteria
dsDNA	Caudauvirales	*Demerecviridae*	3	4	Bacteria
dsDNA	Caudauvirales	*Drexlerviridae*	4	9	Bacteria
dsDNA	Caudauvirales	*Guelinviridae*	1	2	Bacteria
dsDNA	Caudauvirales	*Herelleviridae*	5	7	Bacteria
dsDNA	Caudauvirales	*Myoviridae*	8	153	Bacteria
dsDNA	Caudauvirales	*Podoviridae*	3	44	Bacteria
dsDNA	Caudauvirales	*Rountreeviridae*	2	2	Bacteria
dsDNA	Caudauvirales	*Salasmaviridae*	3	4	Bacteria
dsDNA	Caudauvirales	*Schitoviridae*	8	14	Bacteria
dsDNA	Caudauvirales	*Siphoviridae*	22	299	Bacteria
dsDNA	Caudauvirales	*Zobellviridae*	1	6	Bacteria
dsDNA	Caudauvirales	x	x	1 (Lilyvirus)	Bacteria
dsDNA	Kalamavirales	*Tectiviridae*	x	5	Bacteria
dsDNA	Ligamenvirales	*Lipothrixviridae*	0	4	Archaea
dsDNA	Ligamenvirales	*Rudiviridae*	0	7	Archaea
dsDNA	N.S	*Ampullaviridae*	x	1	Archaea
dsDNA	N.S	*Bicaudaviridae*	x	1	Archaea
dsDNA	N.S	*Fuselloviridae*	x	2	Archaea
dsDNA	N.S	*Globuloviridae*	x	1	Archaea
dsDNA	N.S	*Guttaviridae*	x	2	Archaea
dsDNA	N.S	*Halspiviridae*	x	1	Archaea
dsDNA	N.S	*Plasmaviridae*	x	1	Bacteria
dsDNA	Vinavirales	*Corticoviridae*	x	1	Bacteria
ssDNA	Petitvirales	*Microviridae*	2	7	Bacteria
ssDNA	Tubulavirales	*Inoviridae*	x	21	Bacteria
ssDNA	Tubulavirales	*Plectroviridae*	x	3	Bacteria
ssDNA	Tubulavirales	*Paulinoviridae*	x	2	Bacteria
dsRNA	Mindivirales	*Cystoviridae*	x	1	Bacteria
ssRNA	Norzivirales	*Fiersviridae*	x	185	Bacteria and Archea
ssRNA	Norzivirales	*Atkinsviridae*	x	56	Bacteria and Archea
ssRNA	Norzivirales	*Duinviridae*	x	6	Bacteria and Archea
ssRNA	Norzivirales	*Solspiviridae*	x	24	Bacteria and Archea
ssRNA	Timlovirales	*Blumeviridae*	x	31	Bacteria and Archea
ssRNA	Timlovirales	*Steitzviridae*	x	117	Bacteria and Archea

N.S : Non spécifié.

X : Aucune donnée disponible.

1.2 Cycle de vie des bactériophages

1.2.1 Adsorption du phage sur son hôte et injection de l'ADN

La toute première étape lors d'une infection phagique correspond à l'adsorption du phage sur son hôte bactérien. Le phage va reconnaitre un récepteur spécifique de la bactérie cible afin de s'y positionner, grâce à la protéine RBP (*Receptor Binding protein*) (Abdelsattar *et al.*, 2021). Schématiquement, il s'agit d'un système clé-serrure et pour que la liaison soit la plus optimale possible, la présence de cations (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) peut être nécessaire. Cette liaison va déterminer la spécificité du spectre d'hôte du bactériophage.

Plusieurs composants de la surface bactérienne peuvent servir de récepteurs aux phages, et cela diffère entre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Concernant les bactéries à Gram négatif, trois grands types de récepteurs sont ciblés, à savoir des protéines comme FepA, FhuA, OmpA ou TolC, les (poly)saccharides comme le LPS et des organelles cellulaires comme le flagelle (**Figure 4**).

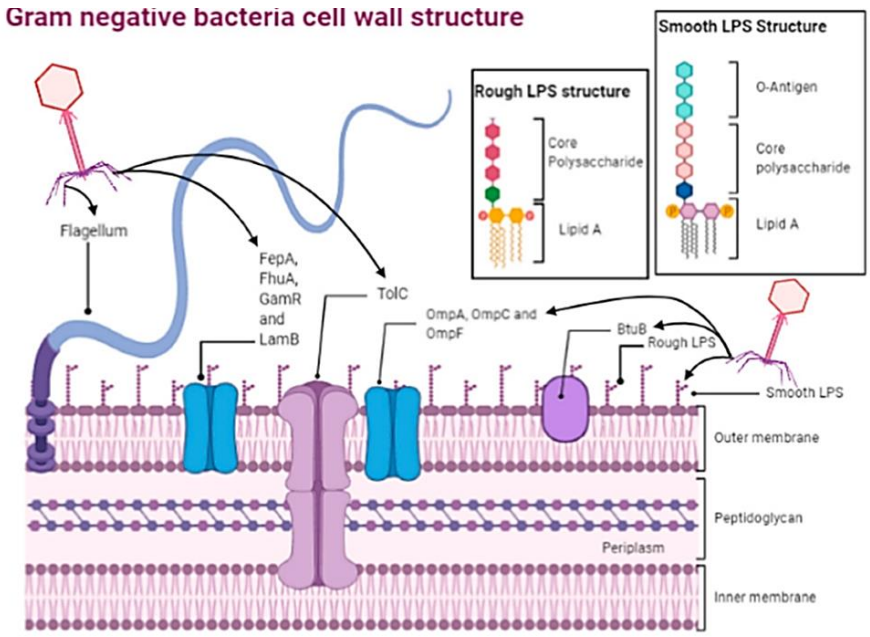


Figure 4 : Récepteurs des phages pour leur adsorption à la surface des bactéries à Gram négatif (Abdelsattar *et al.*, 2021).

En ce qui concerne les bactéries à Gram positif, les motifs saccharidiques comme les acides téichoïques et lipotéichoïques sont largement ciblés, mais le peptidoglycane ou des protéines de la membrane cytoplasmique peuvent également servir de récepteurs aux phages (**Figure 5**).

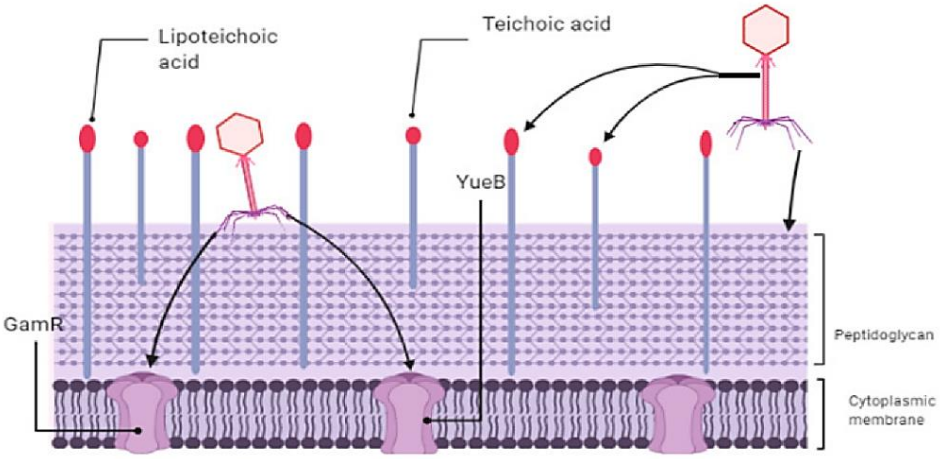


Figure 5 : Récepteurs des phages pour leur adsorption à la surface des bactéries à Gram positif (d'après Abdelsattar *et al.*, 2021).

Après l'adsorption du phage sur la bactérie hôte, le matériel génétique du phage va être injecté dans la bactérie. Le bactériophage T4, qui appartient à l'ancienne famille des *Myoviridae*, est pris comme exemple pour décrire les différentes étapes (**Figure 6**). La première étape correspond à l'attachement du phage sur la cellule hôte. Le phage reconnait le récepteur cellulaire et se lie à la membrane externe bactérienne à l'aide des longues fibres de la queue (I). Ensuite, l'attachement à la cellule hôte va devenir irréversible lorsque les fibres courtes de la queue vont également venir s'accrocher à la membrane externe bactérienne après un changement de structure de la plaque basale, qui passe d'une forme de dôme à une forme étoilée (II). L'étape suivante correspond à la contraction de la gaine centrale (III). Enfin, la dernière étape de l'infection consiste en l'injection de l'ADN phagique dans la cellule bactérienne. Suite à la contraction de la gaine centrale, le tube caudal perfore les enveloppes bactériennes et l'ADN est injecté dans la bactérie cible (IV) (**Figure 6**).

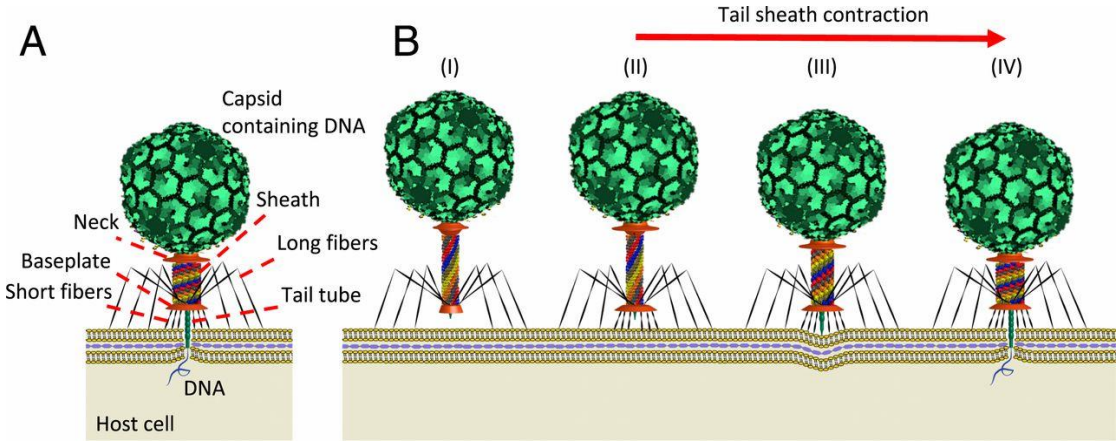


Figure 6 : Différentes étapes de l'injection de l'ADN phagique dans la cellule hôte par le bactériophage T4 (Maghsoodi *et al.*, 2019).

(A) Structure et composants du phage T4. (B) Processus d'infection du phage T4.

1.2.2 Le cycle lytique

Le cycle lytique est caractéristique des phages dits « virulents », qui sont uniquement capables d'effectuer ce type d'infection. Suite à la reconnaissance de l'hôte et l'injection d'ADN ou d'ARN dans la cellule cible (cf. § 1.2.1), le génome du phage va se répliquer en utilisant les fonctions cellulaires de la bactérie infectée (**Figure 7**). La réplication de ce génome entraine la néo-synthèse des protéines virales qui seront ensuite assemblées pour former le virion. Lorsque le génome phagique est répliqué, il est encapsidé, et la capside s'assemble avec la partie caudale du phage. Les virions néosynthétisés vont ensuite être libérés dans l'environnement extérieur suite à la lyse bactérienne provoquée par l'action simultanée de la holine et de l'endolysine phagique. La holine provoque la formation de pores dans la membrane bactérienne alors que l'endolysine phagique dégrade le peptidoglycane (Wu *et al.*, 2021). Les virions libérés sont ensuite en état d'infecter de nouvelles cellules bactériennes hôtes (**Figure 7**).

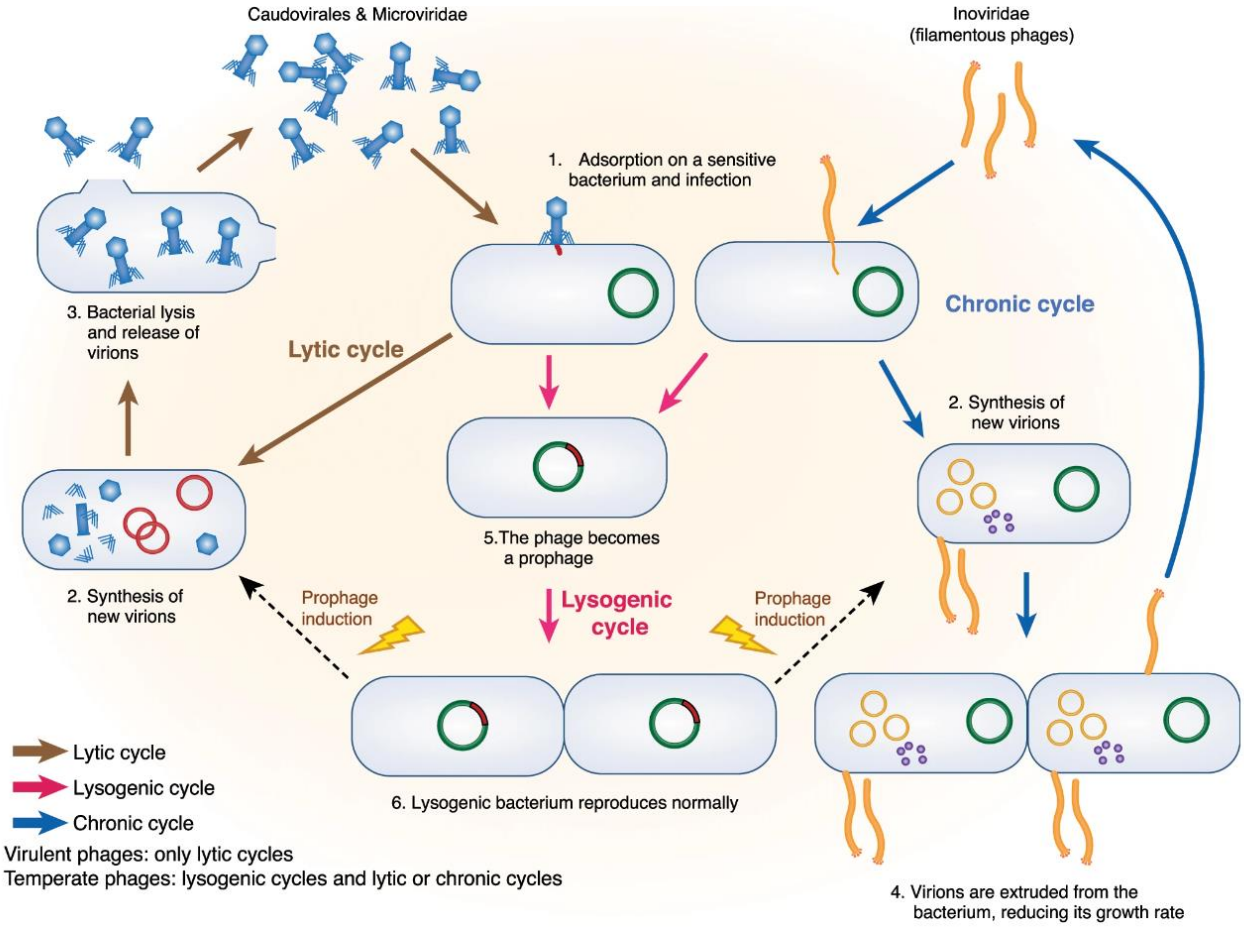


Figure 7 : Les cycles de vie des bactériophages (Sausset *et al.*, 2020).

L'état de virulence d'un phage peut être déterminé suite à l'analyse de différents paramètres. On retrouve généralement la vitesse d'adsorption du phage à la cellule hôte dans un environnement donné, la période de latence qui définit le temps entre l'infection et la production des premières particules virales mais encore le « burst size » qui estime le nombre de virions produits pour chaque cellule bactérienne infectée (Ellis and Delbrück, 1939). Tous ces paramètres sont généralement mesurés grâce aux expériences de « *One Step Growth Curve* » (OSGC) ou courbes de croissance du phage (Kropinski, 2018).

1.2.3 Le cycle lysogénique ou tempéré

Le cycle lysogénique ou tempéré caractérise les phages qui sont capables de faire deux cycles infectieux, le cycle lytique (cf. § 1.2.2) et/ou le cycle lysogénique. En effet, après injection de l'ADN du phage dans la bactérie cible, le phage va soit entrer dans un cycle tempéré, soit dans un cycle lytique, et ce choix est influencé par plusieurs paramètres.

Il s'agit d'une régulation très précise, dont celle du phage lambda (λ) est sûrement l'une des mieux étudiées. Il s'agit d'un équilibre entre protéines agissant en tant que répresseurs ou activateurs du cycle lytique. Chez le phage λ, cette régulation se passe dans une région comprenant deux promoteurs lytiques, appelés *pR* et *pL*, un promoteur lysogénique, nommé *pRM*, et avec deux gènes *cI* et *cro*, codant deux répresseurs transcriptionnels (**Figure 8**). Ces protéines (CI et Cro) sont capables de se fixer sur des régions opératrices situées entre les boites promotrices -10 et -35, qui sont nommées oR ou oL, des régions promotrices pR et pL. Dès que l'ADN du phage entre dans la bactérie, il y a transcription à partir des promoteurs *pR*, *pL* et *PRM*, suivie d'une régulation moléculaire plus complexe qui aboutira soit à la transcription de CI entrainant la lysogénie du phage λ, soit à la transcription de CRO qui mènera le phage λ à effectuer un cycle lytique (Takeda *et al.*, 1977).

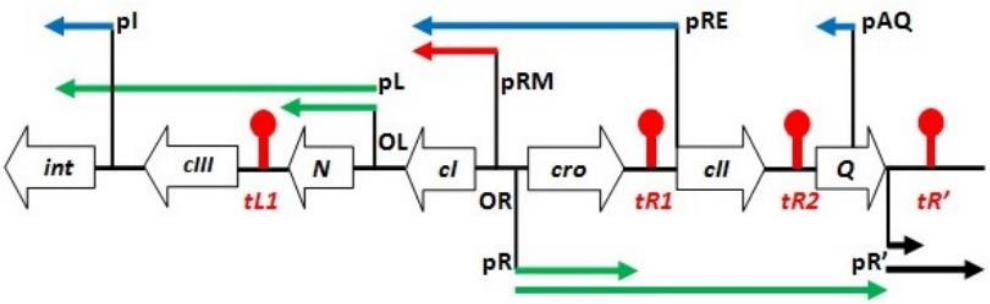


Figure 8: Organisation génétique du module de lysogénie du phage λ (Wadhwa, 2020).

Lorsque le phage entre en cycle tempéré, l'ADN phagique va s'intégrer au génome bactérien sous forme de « prophage » et sera répliqué et transmis aux générations bactériennes suivantes. Cette intégration au génome bactérien se fait grâce à des intégrases virales qui agissent sur des sites bien précis. Sur le chromosome bactérien, le locus est appelé *attB* alors qu'il est nommé *attP* dans le génome phagique. Suite à un évènement d'induction, le prophage peut basculer dans un cycle lytique, entrainant la lyse de la bactérie hôte (**Figure 7**). Cette levée d'inhibition du cycle tempéré est souvent provoquée par un stress extérieur subi par la bactérie. La mitomycine C, les rayons ultra-violets (UV), la température mais encore les espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme le peroxyde d'hydrogène, sont les facteurs les plus connus entrainant l'excision du prophage et le basculement vers un cycle lytique (Lamont *et al.*, 1989; Licznerska *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2017).

1.2.4 Le cycle pseudo-lysogénique

La mécanistique du cycle pseudo-lysogénique n'est pas encore très bien comprise mais les connaissances actuelles définissent ce dernier comme un état intermédiaire entre le cycle lytique et le cycle tempéré. En effet, l'ADN phagique serait bloqué à l'intérieur de la cellule bactérienne sans pouvoir se répliquer, ni s'intégrer dans le génome bactérien, mais en restant potentiellement producteur de virions, lorsque des conditions favorables seraient rencontrées (Miller and Ripp, 2002). Cet état serait possible lorsque les bactéries sont soumises à des conditions carencées en nutriment et en énergie. La pseudo-lysogénie permettrait au phage de perdurer dans une population bactérienne plus longtemps sans l'affecter. Il pourrait, en rencontrant des conditions plus favorables (nutriment, énergie), reprendre soit un cycle lytique, soit un cycle tempéré. Cet état pseudo-lysogénique serait par définition plus fréquent dans un environnement naturel tel que le milieu aquatique (Labonté *et al.*, 2015) et peu présent en conditions de laboratoire où des milieux riches sont utilisés.

1.2.5 Les autres cycles

1.2.5.1 Le cycle chronique

Les infections chroniques (ou cycle chronique) par les bactériophages se traduisent par la production de virions en continu durant toute la phase de croissance de la bactérie hôte, sans lyser la bactérie cible (**Figure 7**). Ce cycle serait plus fréquent pour les phages appartenant à la famille des *Inoviridae* et donnerait un avantage à certains pathogènes. Par exemple, les virions

produits par *Pseudomonas aeruginosa* pendant une infection chronique augmenteraient la production de biofilms et renforceraient la robustesse de ces derniers (Secor *et al.*, 2015).

1.2.5.2 L'état porteur

L'état porteur (ou « *carrier state* ») est défini comme étant un assortiment de bactéries porteuses produisant des phages (proche d'un état pseudo-lysogénique) qui sont dites résistantes, et de bactéries sensibles non porteuses permettant à la population phagique de se multiplier. La présence de phages en continu favorise l'émergence de variants. Par exemple, le phage LeviOr01 (ssRNA), infectant *P. aeruginosa*, confère une immunité face à la surinfection par d'autres phages ciblant le même récepteur, ici un pilus de type IV (Pourcel *et al.*, 2017).

1.3 Techniques d'études des bactériophages

1.3.1 Méthodes traditionnelles d'étude des phages

La méthode courante pour étudier les phages n'a pas changé depuis qu'elle a été découverte, il s'agit de la technique de la double couche (Adams, 1959; Kropinski *et al.*, 2009). En effet, elle permet de détecter et de quantifier les phages infectant un hôte sensible à partir d'un échantillon. La formation de « halos » dans un tapis bactérien dans une gélose, communément appelés « plages de lyse », révèle la présence d'un ou plusieurs phages attaquant la bactérie présente dans la double couche.

Cette méthode possède néanmoins des limites puisqu'elle nécessite de disposer d'une souche sensible aux phages. Elle ne permet donc pas d'avoir une idée précise de la quantité et de la diversité de l'ensemble des phages dans un échantillon. De plus, les phages peuvent interférer avec des molécules présentes dans les échantillons et par conséquent, ne pas être en capacité d'infecter la souche cible. C'est le cas dans le vin où, par exemple, les polyphénols de cette boisson fermentée peuvent interférer avec les mêmes récepteurs bactériens que ceux de phages diminuant ainsi le pouvoir infectieux des phages (Philippe *et al.*, 2020).

D'autres méthodes ont été développées afin de détecter et d'observer la présence de phages dans divers échantillons. La microscopie électronique à transmission (MET) a permis d'observer les premières particules phagiques et a évolué au cours du temps. Cette méthode permet également de mettre en évidence la diversité virale qui peut être présente dans un échantillon, comme évoqué dans des sédiments provenant d'eau douce (Borrel *et al.*, 2012). La coloration négative à l'acétate d'uranyle a permis d'observer plus précisément la structure des capsides phagiques (Ackermann, 2011).

Le développement de la microscopie en général a également facilité l'observation des phages. La microscopie électronique à balayage (MEB) a permis de montrer par exemple que les phages pouvaient être à l'origine d'une auto-reconnaissance entre bactéries de la même espèce (Song *et al.*, 2019). La microscopie à fluorescence a aussi permis de quantifier des phages dans un échantillon après un marquage au SYBR Gold (Suttle and Fuhrman, 2010).

Alternativement aux méthodes microscopiques, diverses options ont été développées pour quantifier et détecter les particules phagiques. La résonance des plasmons de surface (RPS) a permis de détecter la présence de coliphages dans des eaux usées (García-Aljaro *et al.*, 2008), la technique immuno-enzymatique ELISA a été employée pour détecter qualitativement et quantitativement la présence du phage T7 (Khan *et al.*, 2015). Des techniques de qPCR ont également été développées pour détecter par exemple la présence de phages de *Lactococcus* (Ly-Chatain *et al.*, 2011) ou encore de *Campylobacter* (Jäckel *et al.*, 2017). Une méthode fluorescente à base de résazurine a aussi été développée afin de détecter des phages dans un milieu présentant une turbidité importante. La résazurine étant un composé redox qui fluoresce lorsqu'il est réduit par une communauté active de bactéries, la fluorescence est naturellement plus faible lorsque les bactéries cibles sont attaquées par un phage (Rajnovic and Mas, 2020). Enfin des méthodes à base d'impédancemétrie peuvent également être développées pour indiquer la présence de phages (García-Aljaro *et al.*, 2009).

L'avènement ces dernières années des méthodes de séquençage a permis d'avoir un nombre de génomes de phages de plus en plus conséquent dans les bases de données, ce qui est une étape fondamentale pour étudier plus précisément les fonctions des gènes des phages. Cependant, encore aujourd'hui, de nombreux gènes restent inconnus avec une fonction hypothétique.

1.3.2 Utilisation de la métagénomique pour l'étude des phages

Grâce aux avancées en matière de séquençage à haut débit, la métagénomique est maintenant largement utilisée afin de décrire la composition virale « virome » ou phagique « phageome » de différents écosystèmes. Le virome correspond à l'ensemble des génomes viraux retrouvés dans un échantillon donné, tandis que concernant le « phageome », aucune définition consensuelle de ce terme ne semble avoir été retenue à ce jour. En effet, dans certains cas, le terme « phageome » semble englober les communautés de phages, aussi bien lytiques que tempérés, alors que d'autres études s'attachent exclusivement aux phages lytiques. Les études de métagénomique virale peuvent nécessiter une première étape de concentration des

particules virales comme au polyéthylène glycol, par floculation, filtration tangentielle ou encore sur laine de verre (Hjelmsø *et al.,* 2017). L'ADN ou l'ARN total est ensuite extrait en fonction de la matrice étudiée et des attentes de séquençage (Klenner *et al.,* 2017). Les acides nucléiques peuvent nécessiter une étape d'amplification avant d'être tous séquencés par la méthode « shotgun » avant les traitements bioinformatiques (Thurber *et al.,* 2009). Ces données permettent d'avoir un aperçu global de la diversité virale présente dans un échantillon donné.

L'exemple décrivant le mieux l'utilisation de la métagénomique virale concerne le microbiote intestinal. En effet, le microbiote intestinal héberge approximativement 10^{12} virus et ces derniers jouent un rôle important dans l'équilibre et la composition microbienne de cet écosystème. La composition du phageome intestinal varie au cours de la vie, et particulièrement durant les premières années (**Figure 9**). Dans les premières périodes de la vie, la diversité du phageome est plutôt pauvre et est dominée par l'ancien ordre des *Caudovirales*. Puis vers l'âge de 2 ans et demi, les *Microviridae* deviennent majoritaires (Lim *et al.,* 2015). Enfin, lorsque la diversité bactérienne devient plus importante vers l'âge adulte, l'ancien ordre des *Caudovirales* redevient prédominant (Manrique *et al.,* 2016) (**Figure 9**). Des phages *CrAssphage* et quelques phages à ARN sont retrouvés également dans le phageome intestinal, tout comme de nombreux phages tempérés (Shkoporov *et al.,* 2019). La composition du phageome intestinal, ainsi que la composition bactérienne, est largement influencée par le régime alimentaire (Minot *et al.,* 2011).

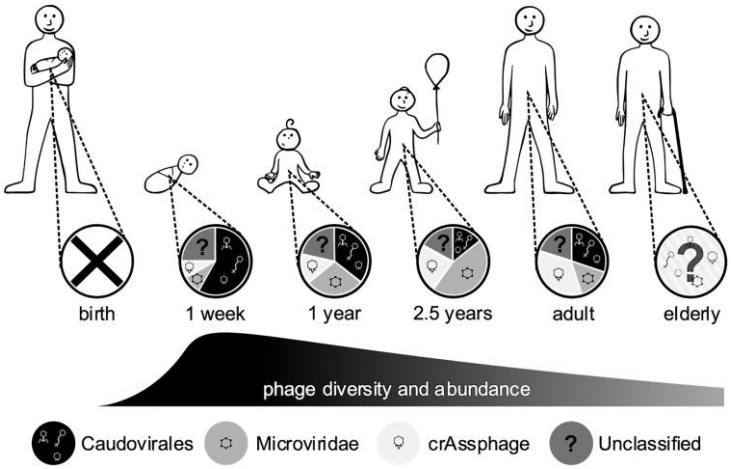


Figure 9 : Evolution du phageome intestinal au cours de la vie (Townsend *et al.,* 2021).

Les études sur le phageome intestinal ont permis de mettre en évidence le rôle important joué par les phages sur la composition du microbiote intestinal et par conséquent sur la santé humaine. Certaines études ont notamment démontré l'importance du rôle joué par les phages dans certaines pathologies comme le diabète de type 2 (Ma *et al.,* 2018; Patterson *et al.,* 2016), les maladies inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn, ou la colite ulcéreuse

(Fernandes *et al.*, 2019; Norman *et al.*, 2015; Seth *et al.*, 2019). De nombreuses revues existent sur le rôle joué par les phages dans le microbiote intestinal et décrivent plus précisément tous ces aspects (Shkoporov and Hill, 2019; Townsend *et al.*, 2021). Ces études de métagénomiques virales s'étendent également à d'autres écosystèmes, comme les aliments. Ceci sera présenté dans la section 2.3.

1.4 Place et impact des phages dans les écosystèmes

1.4.1 Equilibres microbiens dans les écosystèmes

Les phages, de par leurs différents cycles de vie présentés ci-dessus, vont influencer les microbiotes dans lesquels ils se trouvent. Plusieurs modalités ou théories sont décrites dans la littérature pour décrire l'influence qu'ils peuvent avoir sur les communautés bactériennes environnantes (De Paepe *et al.*, 2014). Certains de ces modèles d'écologie sont présentés dans la **Figure 10**.

1.4.1.1 Modèle « kill the winner »

La théorie « *kill the winner* », ou « tuer le plus fort » est une véritable « course à l'armement » entre les bactéries et les phages. Dans un environnement complexe, les bactéries sont en compétition les unes par rapport aux autres, et certaines d'entre elles vont naturellement être dominantes (« *winners* ») vis-à-vis des autres populations bactériennes, en raison de leur meilleure adaptation aux conditions du milieu. Une population dominante est généralement suivie de l'apparition d'un phage prédateur qui va venir réduire cette population dominante, contribuant ainsi au maintien de l'équilibre des populations bactériennes dans le microbiote (**Figure 10-A**). Les bactéries vont évoluer en développant des résistances aux phages. En parallèle, les phages vont eux même évoluer et acquérir des mutations contrecarrant cette résistance bactérienne, et ainsi de suite. Ce phénomène est communément appelé le « paradoxe de la reine rouge » (Marston *et al.*, 2012; Middelboe *et al.*, 2009; Van Valen, 1977).

1.4.1.2 Modèle « kill the relative »

Le modèle « *kill the relative* » ou « tuer le plus proche » concerne les populations porteuses de prophages. Ces populations induisent un cycle lytique afin d'inhiber une population bactérienne environnante également sensible à ce phage, qui est en compétition pour la même niche écologique (Bossi *et al.*, 2003). Cependant, il s'agirait d'un phénomène plutôt transitoire puisque les phages lysogènes auraient tendance à rapidement entrer en cycle tempéré chez l'hôte sensible (**Figure 10-B**).

1.4.1.3 Le modèle du « community shuffling »

Le modèle du « *community shuffling* » ou « brassage de communauté » correspond à l'induction de prophages chez des populations lysogènes par un facteur externe associé à l'environnement (polluant, salinité, antibiotiques...) (**Figure 10-C**). Par exemple, des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques peuvent provoquer la lyse d'une population lysogène (Goerke *et al.*, 2006). Les prophages de certaines populations bactériennes, comme celles retrouvées dans le microbiote intestinal, peuvent être à tout moment induits dans le but de détruire des bactéries compétitrices (Mills *et al.*, 2013; Paepe *et al.*, 2016).

1.4.1.4 Le modèle « invade the relative »

Le modèle « *invade the relative* » ou « envahir le plus proche » correspond à un écosystème où des phages tempérés vont infecter leur hôte, et ainsi apporter des gènes bénéfiques à la population bactérienne ciblée permettant à celle-ci d'augmenter sa proportion dans un environnement donné vis-à-vis d'autres populations non lysogènes (**Figure 10-D**) (Paepe *et al.*, 2016).

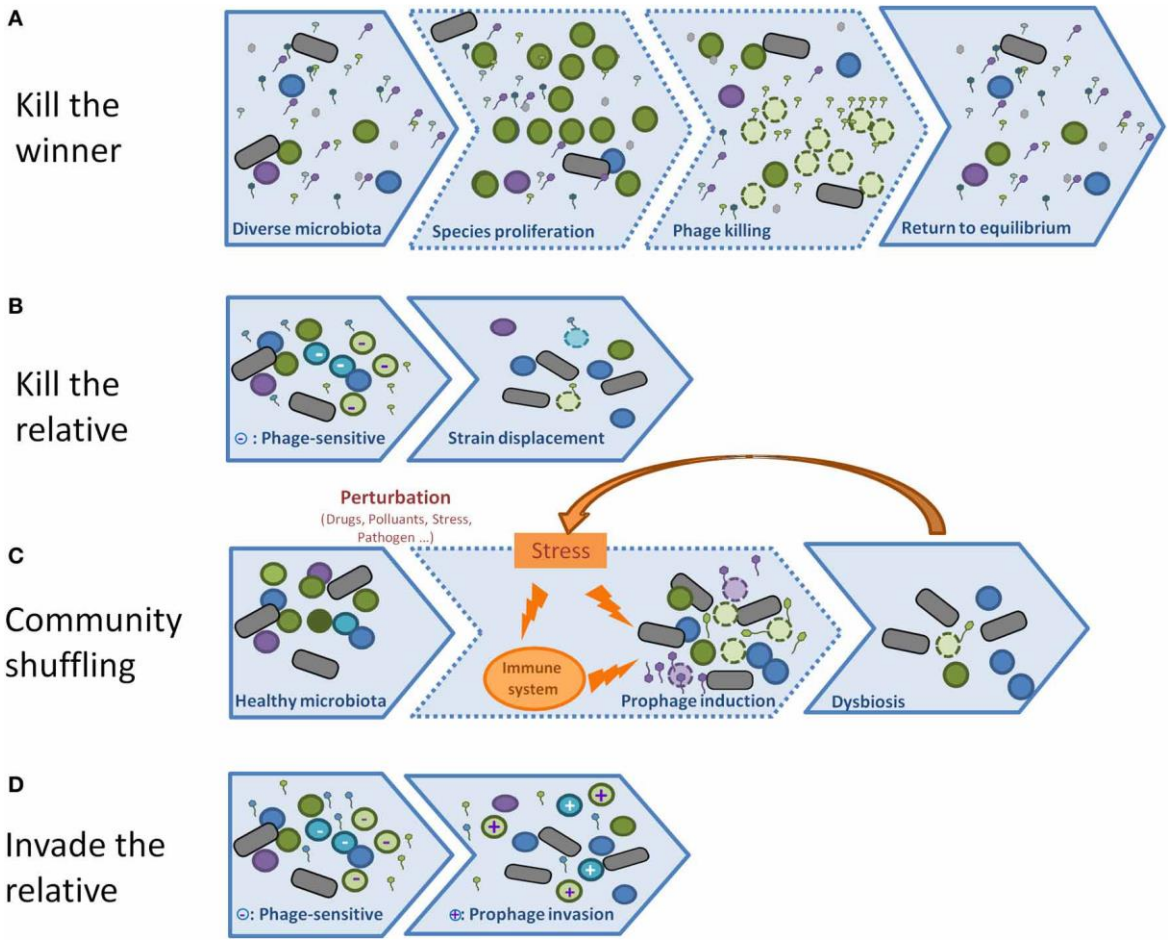


Figure 10 : Modèles théoriques de l'impact écologique des bactériophages dans un microbiote (De Paepe *et al.*, 2014).

1.4.2 Les phages : vecteurs de transmission de matériel génétique

Les bactériophages sont connus pour être des acteurs majeurs des transferts horizontaux de matériel génétique chez les bactéries par transduction (Hershey and Chase, 1952). Ce phénomène permet à la bactérie cible d'acquérir de nouveaux gènes et donc d'avoir un avantage sélectif par rapport à d'autres souches bactériennes. L'exemple le plus frappant est certainement le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques (ARG). Par exemple, il a été démontré que les phages pouvaient jouer un rôle essentiel dans le transfert d'ARGs dans des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline issues de la colonisation nasale (Stanczak-Mrozek *et al.*, 2015). Les phages peuvent aussi constituer un réservoir de résistance aux antimicrobiens (AMR), comme par exemple des β-lactamases à spectre étendu dans un environnement hospitalier, mais également contre d'autres antibiotiques utilisés en traitements cliniques (Calero-Cáceres *et al.*, 2019; Mahdavi *et al.*, 2022). Cependant, d'autres études tendent à démontrer que les phages ne sont pas ou peu impliqués dans cette transmission d'ARGs, comme au sein des fèces de porc (Billaud *et al*., 2021).

Deux types de transduction sont principalement décrites, la transduction généralisée ou la transduction spécialisée (**Figure 11**).

1.4.2.1 La transduction généralisée

La transduction généralisée correspond à l'incorporation accidentelle aléatoire d'un morceau d'ADN chromosomique bactérien lors de l'encapsidation du matériel génétique, que ce soit par un phage lytique ou tempéré. Cette bactérie sera dite « donneuse » et ce fragment d'ADN pourra être transmis à une bactérie dite « receveuse », lors d'une future infection.

1.4.2.2 La transduction spécialisée

La transduction spécialisée est, elle, caractéristique des phages tempérés. En effet, lors de l'excision d'un prophage suite à un phénomène d'induction, une erreur peut se produire. Seuls les gènes bordant les sites d'intégration du prophage au chromosome bactérien sont concernés. Le phage possèdera alors une portion de génome bactérien à une extrémité, et une perte de génome phagique à l'extrémité opposée. Si les gènes essentiels à la formation de virions sont intacts, il y a production de particules phagiques lors d'une prochaine infection. En revanche, si ces gènes essentiels sont absents, le génome restera à l'intérieur de la cellule bactérienne sans pouvoir effectuer de cycle lytique.

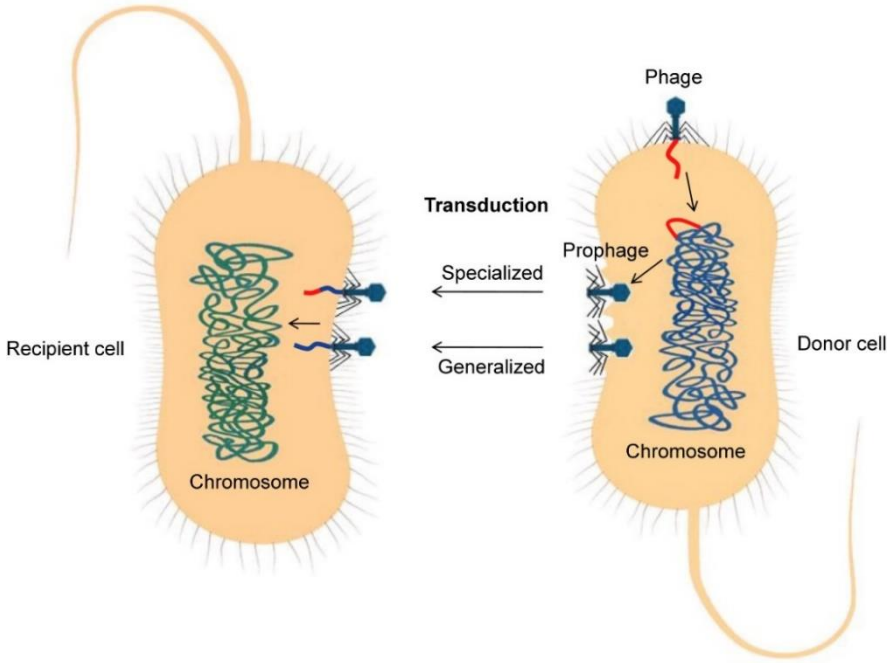


Figure 11 : Les mécanismes de transduction effectués par les bactériophages (Balcázar, 2018).

1.4.3 L'impact du mode tempéré sur les écosystèmes

L'impact des prophages sur la fitness de la cellule hôte a longtemps été sous-estimé, considérant que les prophages étaient présents dans les génomes bactériens sous forme passive et qu'ils n'influençaient pas leur bactérie hôte. Cependant, les phages tempérés peuvent jouer un rôle important dans le comportement de leur hôte bactérien, puisqu'ils peuvent par exemple éteindre l'expression de certains gènes, en particulier ceux situés au niveau des sites d'attachement ou dans le cas contraire, apporter des gènes ayant un impact positif pour la bactérie comme décrit précédemment avec les ARGs, par exemple (Wendling *et al.*, 2021). En plus de ce critère d'apport ou d'extinction de gènes, les prophages sont capables de lyser des compétiteurs, de conférer une immunité face à la surinfection par des phages homologues ou encore d'induire spécifiquement certains gènes pour l'intérêt de la bactérie hôte. C'est ce qui est communément appelé la « conversion lysogénique » (Chen *et al.*, 2021). Un des phénomènes le plus décrit concernant la conversion lysogénique est l'apport de gènes codant pour des facteurs de virulence, comme par exemple le gène de la toxine cholérique porté par le phage CTX chez *Vibrio cholerae* (Faruque *et al.*, 1998) ou encore le gène de la toxine diphtérique porté par le phage β de *Corynebacterium diphtheriae* (Holmes and Barksdale, 1969). À l'échelle de communautés bactériennes, les toxines peuvent jouer également un rôle important.

L'induction de toxines étant capable d'inhiber d'autres bactéries de la communauté, au profit de la souche porteuse du prophage, a déjà été observé. C'est notamment le cas d'une colicine codée par un prophage de *Salmonella enterica* (Collb) qui inhibe *E. coli* au profit de *S. enterica* (Spriewald *et al.,* 2020). Dans certains cas, des toxines inhibitrices de bactéries compétitrices peuvent être libérées par les prophages conférant un avantage sélectif à la population tempérée. Cela a notamment été proposé pour la famille de toxine MuF rencontrée chez des bactéries appartenant à l'ancien phylum des Firmicutes (aujourd'hui *Bacillota*), qui inhiberait la croissance des populations compétitrices des souches porteuses de ces prophages (Jamet *et al.,* 2017).

Les communautés microbiennes, lorsqu'elles sont établies, peuvent être plus ou moins diversifiées et abondantes. La mortalité de certaines populations bactériennes peut s'expliquer suite à l'induction de prophages. Par exemple, il a été démontré que les dynamiques microbiennes dans différentes régions de l'océan austral pouvaient résulter de l'induction de prophages, dépendant des conditions rencontrées comme la salinité, la température, la concentration en oxygène ou la présence de chlorophylle (Brum *et al.,* 2015). Encore concernant l'environnement marin, des chercheurs ont démontré que l'induction de prophages était nécessaire pour une diversité bactérienne plus importante dans des sédiments (Heinrichs *et al.,* 2020).

Les bactéries, lorsqu'elles colonisent un environnement donné, se développent parfois sous la forme de biofilms. C'est le cas par exemple du microbiote de la muqueuse buccale (Diaz and Valm, 2020), dans les aliments et l'industrie agro-alimentaire (Rather *et al.,* 2021), ou encore le sol (Wu *et al.,* 2019). L'ADN extracellulaire est une molécule très importante dans l'élaboration des biofilms puisqu'elle permet de conférer plus de stabilité. Cet ADN extracellulaire provient de l'induction de prophages au sein d'une communauté, libéré lors de la lyse d'une partie de la population bactérienne. L'induction de prophages favorisant la production de biofilms a été démontrée à plusieurs reprises, par exemple chez un pathogène du poisson *Vibrio anguillarum* (Tan *et al.,* 2020), chez une bactérie adaptée à des conditions métalliques hostiles *Shewanella oneidensis* (Binnenkade *et al.,* 2014) ou encore chez un pathogène humain bien connu *Streptococcus pneumoniae* (Carrolo *et al.,* 2010). L'induction de prophages peut également aboutir à la production de virions capables d'infecter d'autres bactéries sensibles compétitrices de la communauté, donnant ainsi un avantage à la bactérie lysogène jusqu'à ce que les compétiteurs ne soient lysogénisés à leur tour (Paepe *et al.,* 2016).

Enfin, il ne faut pas négliger l'impact négatif que peut avoir le mode de vie tempéré. En effet, même si la présence de prophages peut être un avantage pour la bactérie hôte, cela peut également être le contraire. Chez certaines bactéries porteuses de prophages, l'induction de ces derniers peut être temporaire ou irréversible et mener à la destruction temporaire ou totale de la population cible due à la production massive de phage ultra-virulents. C'est le cas par exemple pour une bactérie du microbiote intestinal humain, *Roseburia intestinalis* porteuse du prophage Shimadzu, qui est systématiquement induit en phage lytique lorsque cette bactérie atteint un niveau de population important lors d'une colonisation de microbiote de souris (Cornuault *et al.*, 2019).

1.4.4 Les mécanismes développés par les bactéries pour résister aux phages

Comme présenté précédemment, il existe une véritable course à l'armement entre les phages et les bactéries qui cohabitent dans un même environnement. Pour contrer l'activité des phages, les bactéries ont développé un bon nombre de stratégies pour se protéger des attaques virales. Ces mécanismes sont présentés dans la **Figure 12**.

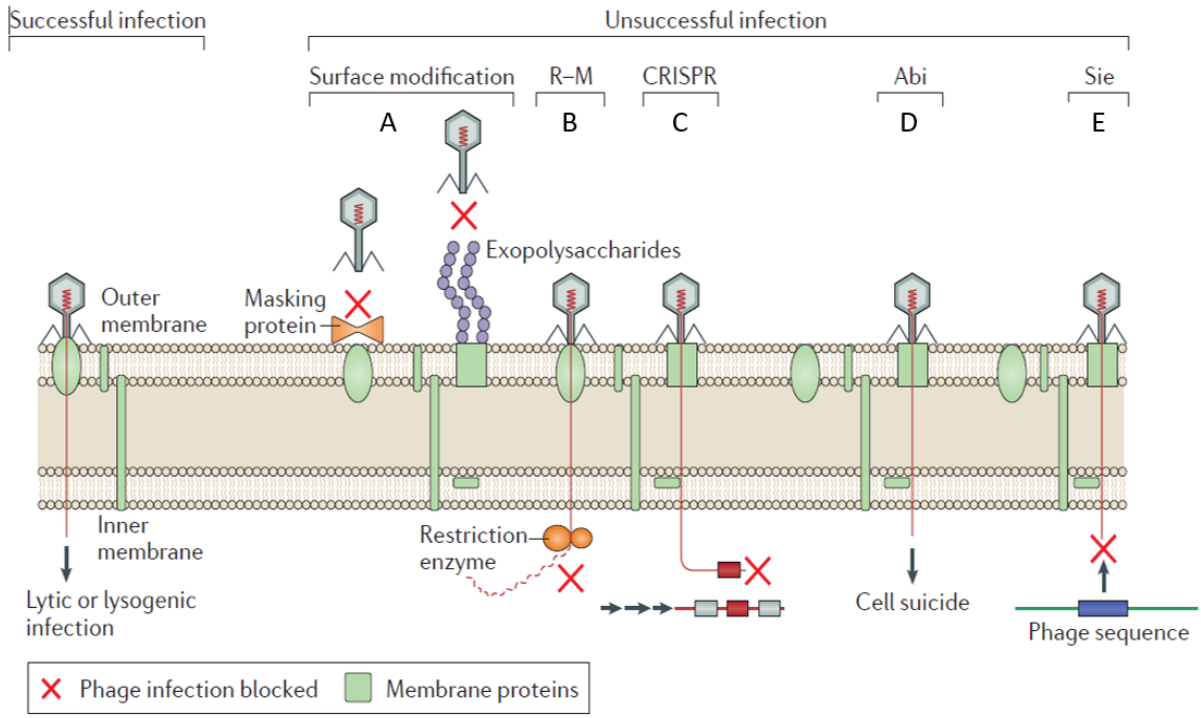


Figure 12 : Principales sources de résistances bactériennes aux infections phagiques (adapté de Mirzaei and Maurice, 2017).

1.4.4.1 Inhibition de l'adsorption

La première étape de l'infection phagique correspond à l'adsorption sur un récepteur spécifique de la bactérie. Ainsi, la bactérie peut empêcher la fixation du phage à son récepteur. Deux principaux mécanismes sont connus, une modification de la surface du récepteur ou la production d'exopolysaccharides (EPS) (**Figure 12-A**). En effet, l'accès du phage au récepteur est empêché par la modification de ce dernier, suite à une ou plusieurs mutations. C'est le cas de figure le plus rencontré chez les bactéries. Ce phénomène a par exemple été décrit chez *Vibrio cholerae* (Seed *et al.*, 2014), *Pseudomonas fluorescens* (Scanlan *et al.*, 2015) ou encore chez *Haemophilus influenzae* (Zaleski *et al.*, 2005). La production d'une protéine venant masquer le site récepteur peut également avoir lieu, comme chez *Staphylococcus aureus* qui peut produire une protéine A venant bloquer le récepteur du phage (Nordström and Forsgren, 1974). Un autre moyen de prévenir l'adsorption phagique est la production d'EPS, qui va conférer une forme de barrière entre le récepteur et le phage. Parmi les EPS, on peut retrouver l'acide hyaluronique ou encore l'alginate. Ces EPS favorisent la résistance bactérienne à l'adsorption phagique, comme cela a été montré pour des biofilms de *P. aeruginosa* (Hanlon *et al.*, 2001). Ce phénomène associé à la production d'EPS est aussi particulièrement étudié chez le ferment *Lactococcus lactis* afin d'étudier la sensibilité de ces ferments aux phages (Ainsworth *et al.*, 2014; Mahony *et al.*, 2020).

1.4.4.2 Inhibition de l'injection d'ADN

L'étape suivante du cycle infectieux du phage correspond à l'injection de son ADN dans le cytoplasme de la bactérie cible. Cette injection d'ADN peut cependant être bloquée par le système Sie, connu sous le nom de *SuperInfection Exclusion* (**Figure 12-E**). Ce système est codé par les phages eux-mêmes afin de protéger leur hôte bactérien vis-à-vis de nouvelles infections par d'autres phages. Le système Sie inhibe l'injection de l'ADN phagique ou sa réplication dans la bactérie. Ces systèmes Sie ont été bien décrits pour *Lc. lactis* où des protéines localisées sur la membrane bactérienne empêchent l'injection d'ADN (Mahony *et al.*, 2008). Des fonctionnements différents ont également pu être mis en avant, comme chez *E. coli* où le phage T5 produit une lipoprotéine au début de l'infection, qui va bloquer son propre récepteur (FhuA), ce qui protège ainsi de la surinfection (Breyton *et al.*, 2013).

1.4.4.3 Actions au niveau de l'ADN phagique

D'autres systèmes peuvent intervenir afin de résister à l'infection phagique, en particulier en agissant directement sur les acides nucléiques du génome phagique injecté. C'est le cas du

système R-M, pour *Restriction-Modification*, qui associe une endonucléase avec une activité méthylase, et qui sont représentés dans plus de 74% des génomes procaryotes (Tock and Dryden, 2005). Le système R-M clive ou dégrade l'ADN du phage en reconnaissant spécifiquement des motifs de séquences nucléotidiques, ces mêmes motifs étant préalablement méthylés dans le génome bactérien protégeant ainsi l'ADN de l'hôte (Oliveira *et al.,* 2014) (**Figure 12-B**). D'autres mécanismes de résistance bactérienne basés sur la méthylation de l'ADN sont connus comme le système BREX pour *Bacteriophage Exclusion* (Goldfarb *et al.,* 2015), ou encore le système DISARM pour *Defense Islands System Associated with R-M* (Ofir *et al.,* 2018). Leur fonction précise reste encore floue même si une modification épigénétique est bien mise en avant (Gordeeva *et al.,* 2019). La méthylation est une stratégie afin de faire la distinction entre le « soi » et le « non soi », mais ce n'est pas le seul moyen existant. Par exemple le système DND modifie l'ADN de l'hôte bactérien en y incluant un groupe sulfure (Wang *et al.*, 2007).

1.4.4.4 Le système adaptatif CRISPR-Cas

Le système CRISPR-Cas pour *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* et *CRISPR Associated proteins,* est un autre moyen de défense face à l'attaque de phages. Il est actuellement le système le plus étudié (**Figure 12-C et 13**). Ce système fonctionne également par la reconnaissance et la dégradation des acides nucléiques viraux et est considéré comme étant le système immunitaire adaptatif procaryote (Barrangou *et al.,* 2007). La région CRISPR est incluse dans le génome bactérien et correspond à un enchainement de séquences répétées, séparées elles-mêmes par des régions variables nommées *spacers*. Ces régions variables (30-40 nucléotides) correspondent à des courtes séquences d'ADN d'origine virale ou plasmidique (Amitai and Sorek, 2016). Ces séquences sont ensuite transcrites en un pré-ARNcr contenant l'ensemble des motifs répétés et variables. Ce pré-ARNcr est fractionné en plusieurs ARNcr qui contiennent chacun un spacer et des régions répétitives, pour s'associer avec des protéines Cas. Ces complexes seront ensuite capables d'aller cibler les acides nucléiques viraux par complémentarité de séquence. C'est sur ce principe que le système CRISPR-Cas permet de prévenir une nouvelle infection par le même bactériophage. Ces systèmes sont très diversifiés puisqu'il en existe 2 classes, 6 types et plus de 20 sous-types, qui diffèrent surtout par la machinerie d'interférence, les mécanismes de ciblage et l'acide nucléique ciblé (ADN ou ARN). Dans la plupart des cas, les systèmes CRISPR utilisent des motifs PAM pour *Protospacer Adjacent Motif*, qui correspondent à de courtes séquences d'ADN spécifiques

(2 à 6 nucléotides) suivant la séquence d'ADN cible. Les séquences PAM sont localisés en aval de la séquence d'ADN ciblée par l'ARNcr, pour que la protéine Cas clive l'ADN cible 3-4 nucléotides en amont de cette séquence (Bernheim and Sorek, 2020). Ceci permet au système CRISPR de ne pas dégrader les spacers intégrés dans son propre génome.

Ce système est à la base de nombreux projets de recherche innovants, également en santé humaine et a fait l'objet du prix Nobel de chimie en 2020, décerné à Emmanuelle Carpentier et Jennifer Doudna, pour l'invention de l'outil d'édition génomique CRISPR-Cas9.

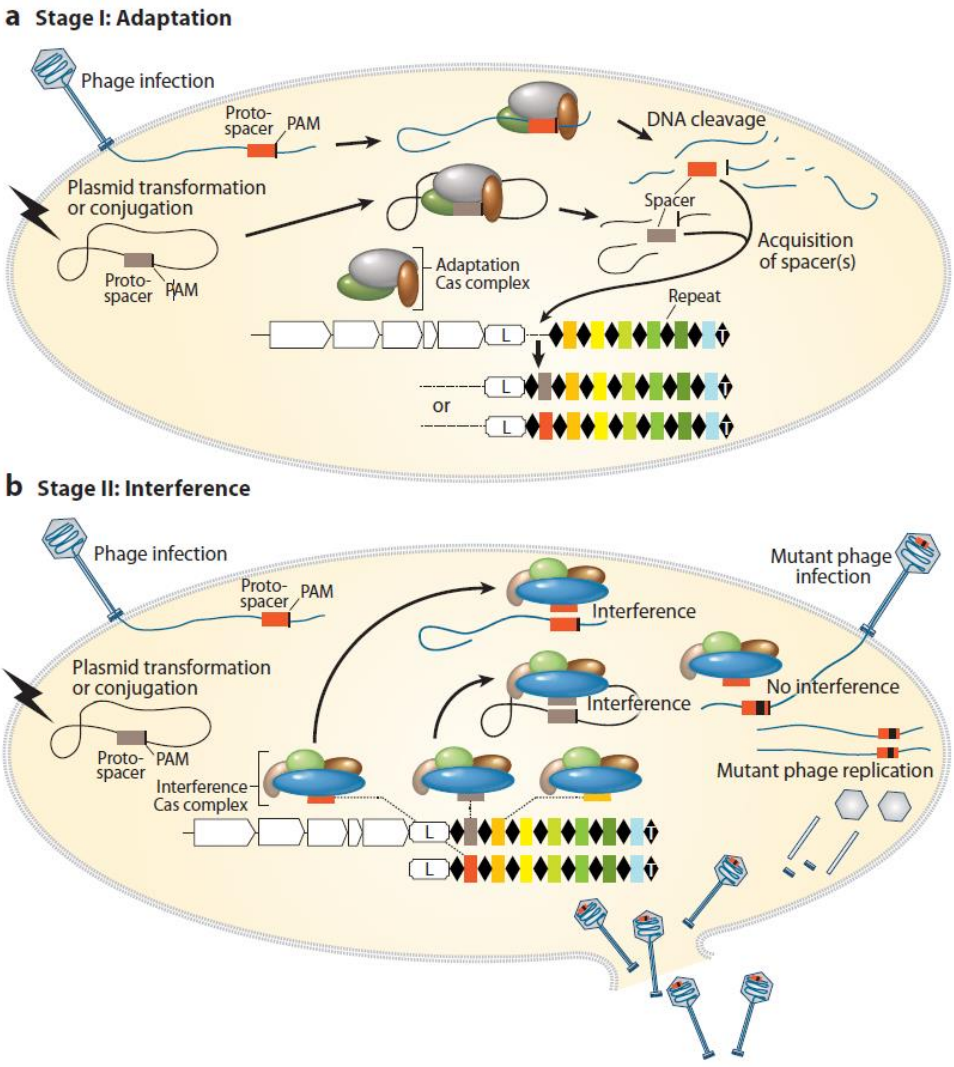


Figure 13 : Fonctionnement du système CRISPR (Deveau *et al.*, 2010).

(A) Adaptation bactérienne à l'infection phagique par l'acquisition de nouveaux « spacers » dans le locus CRISPR. (B) Interférence entre le complexe Cas-ARNcr et le génome phagique, qui est par conséquent détruit. Des mutations dans le génome phagique peuvent apparaitre et ne pas interférer avec le complexe, menant à la lyse de la bactérie.

1.4.4.5 Les mécanismes d'auto-suicide

Enfin, une autre stratégie bien connue de défense bactérienne face aux phages est le système Abi, pour *Abortive Infection* (**Figure 12-D**). Ce système permet à la bactérie une fois qu'elle est infectée, de s'auto-suicider ou de stopper son métabolisme avant que la réplication du phage soit complète, évitant ainsi la dissémination des phages aux autres bactéries de la communauté (Bernheim and Sorek, 2020). Ces systèmes ont été détectés dans beaucoup de microorganismes et leurs mécanismes de fonctionnement sont très diversifiés (Koonin *et al.,* 2017). Chez *E. coli*, lors d'une infection par le phage T4, le système Abi se met en place lorsqu'il détecte la présence d'un substrat porté par le peptide Gol du phage quand il est associé au facteur d'élongation ribosomique EF-Tu. Une protéine clive ensuite ce complexe, inhibant la traduction générale, qui finit par tuer la cellule bactérienne (Bingham *et al.,* 2000). Une nouvelle forme du système Abi a récemment été découverte, le mécanisme CBASS pour *Cyclic oligonucleotides-Based Anti-phage Signalling System*. Ce système détecte la présence de phages et génère un signal à base de petites molécules d'oligonucléotides cycliques qui activent un effecteur entraînant la mort cellulaire (Cohen *et al.,* 2019).

1.4.4.6 Les autres moyens de résistance bactérienne aux phages

D'autres systèmes de défense font également l'objet d'études un peu plus poussées. C'est en particulier le cas des défenses dites chimiques, lors desquelles des bactéries du genre *Streptomyces* sont capables de produire de petites molécules comme la doxorubicine ou la daunorubicine qui agissent en s'intercalant dans l'ADN phagique, bloquant ainsi sa réplication (Kronheim *et al.,* 2018).

Dans cette course à l'armement, les phages développent aussi des mécanismes pour contrer les défenses anti-virales mises en place par les bactéries.

1.4.5 Les phages contournent les résistances bactériennes

1.4.5.1 Adaptation au niveau de l'étape d'adsorption

Pour contourner les modifications de conformation des récepteurs bactériens, les phages vont par exemple pouvoir cibler un autre récepteur sur la bactérie ou modifier leur site de liaison RBP, cela étendant par la même occasion le spectre d'hôte du phage (Dunne *et al.,* 2019) (**Figure 14-A**).

Des stratégies ont également été mises en place par les phages pour contrer la production d'EPS par les bactéries. Certains phages ont développé des enzymes particulières pour pouvoir se lier (lyases) à ces EPS ou les détruire (hydrolases) (Ge *et al.*, 2020; Knecht *et al.*, 2020) (**Figure 14-B**).

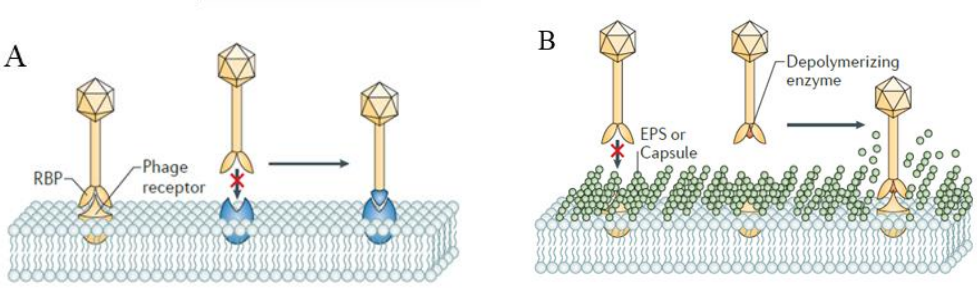


Figure 14: Stratégies des phages pour accéder aux récepteurs bactériens (Samson *et al.* 2013).

(A) Modification du site RBP. (B) Action enzymatique pour accéder aux récepteurs masqués.

1.4.5.2 Contournement des endonucléases bactériennes

Les phages peuvent également contrer l'effet des enzymes de restriction bactériennes sur leur génome. Pour ce faire, la méthylation de l'ADN est également un atout de leur côté puisque le génome des phages peut être méthylé par des méthyltransférases ou alors simplement certaines portions du génome comme les hydroxymethylcytosines (HMC), empêchant ainsi l'action des endonucléases bactériennes (Rostøl and Marraffini, 2019) (**Figure 15-A**). Des mutations dans les sites reconnus spécifiquement par les enzymes bactériennes peuvent également conférer une protection au génome phagique, comme pour le phage K ciblant *Klebsiella pneumoniae* qui a perdu un site de restriction (Kęsik-Szeloch *et al.*, 2013). Certains phages peuvent également produire des molécules inhibant les nucléases bactériennes, comme pour le phage T4 infectant *E. coli* qui inhibe grâce au peptide Stp l'endonucléase *Eco*prrI pour infecter son hôte (Penner *et al.*, 1995) (**Figure 15-B**). Par ailleurs, le phage λ code pour une protéine antirestriction Ral, qui augmente l'activité méthyltransférase de l'hôte bactérien afin d'accélérer la protection de son génome (Loenen and Murray, 1986) (**Figure 15-B**). Des phages ont également des gènes codant pour des protéines imitant structurellement les groupements phosphates de l'ADN, comme la protéine Ocr du coliphage T7 (Atanasiu *et al.*, 2002) (**Figure 15-C**). Ces protéines ont souvent une affinité supérieure pour les endonuclunéases que pour le propre ADN phagique, elles séquestrent donc l'activité de ces enzymes et protègent la dégradation de l'ADN du phage (**Figure 15-C**).

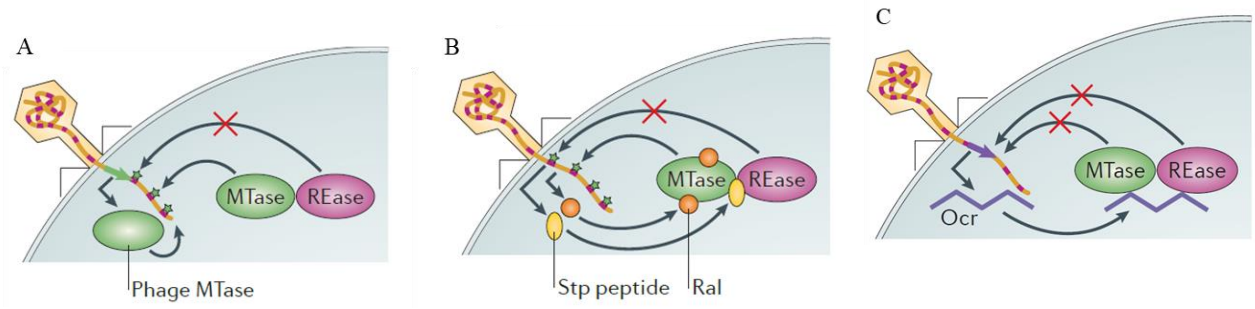


Figure 15 : Stratégies phagiques pour contourner les endonucléases bactériennes (d'après Samson *et al.*, 2013).

(A) Méthylation du génome phagique (B) Production de molécules inhibitrices des endonucléases (C) Production de protéines mimant l'ADN phagique.

1.4.5.3 Détournement du mécanisme CRISPR-Cas

Afin de contourner le système CRISPR-Cas des bactéries, des phages se sont adaptés en produisant des molécules dites anti-CRISPR (Acr) dont la transcription est contrôlée par des protéines associées à ces molécules anti-CRISPR (Aca) (Bondy-Denomy *et al.*, 2013; Stanley *et al.*, 2019). L'association de ces molécules Acr et Aca a permis aux phages de résister aux différents types de systèmes CRISPR-Cas en inhibant l'assemblage du complexe CRISPR-Cas ou en bloquant la liaison à l'ADN cible (**Figure 16**). Il a également été rapporté que les phages peuvent faire apparaître des mutations dans les séquences PAM de leur génomes, reconnues par le système CRISPR-Cas, brouillant ainsi certains types de systèmes CRISPR-Cas (Sun *et al.*, 2013).

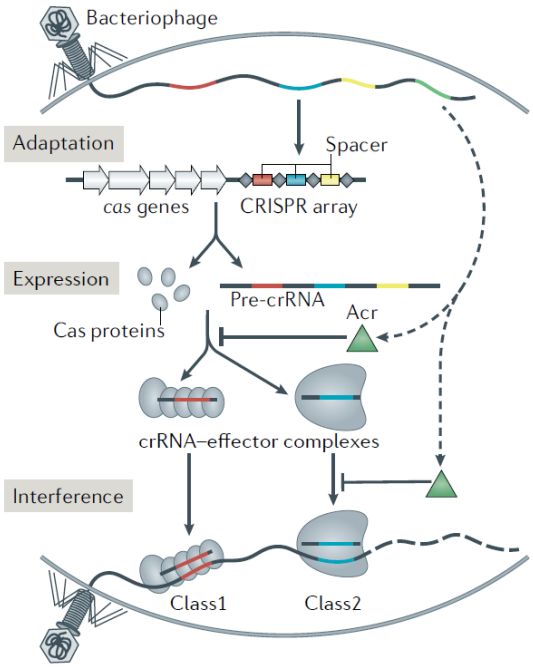


Figure 16: Mécanisme anti-CRISPR des phages (Jia and Patel, 2021).

1.4.5.4 Contournement du système d'auto-suicide bactérien

Enfin, certains phages peuvent également contourner le mécanisme Abi, par exemple avec l'apparition de mutations dans des gènes impliqués dans le métabolisme des nucléotides (**Figure 17**). Cela a été observé pour un phage de *Lactococcus* sp., ce qui lui permet d'échapper au système Abi (Blower *et al.*, 2012). Afin de prévenir les systèmes toxine-antitoxine des bactéries, les phages ont également mis en place des systèmes d'adaptation. Par exemple, le phage T4 contient un gène codant pour une protéine (Dmd) qui remplace les antitoxines bactériennes, permettant ainsi au phage de se propager (Otsuka and Yonesaki, 2012).

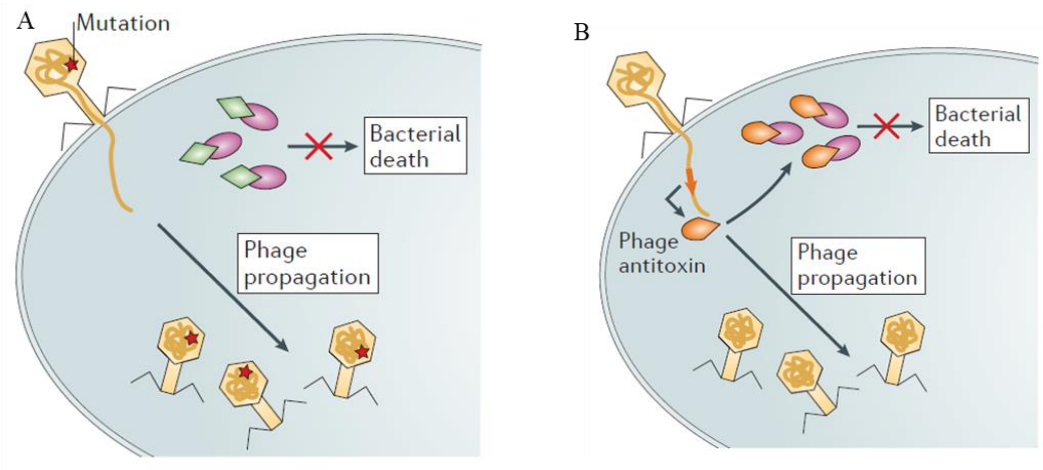


Figure 17 : Stratégies adaptatives des phages contre le système « abortive infection » (Samson *et al.*, 2013).

(A) Mutations phagiques pour échapper au système Abi. (B) Production d'antitoxines analogues pour empêcher le système Abi de se mettre en place.

2. Microbiologie générale des boissons fermentées

Depuis des millénaires, la fermentation est utilisée dans toutes les zones géographiques du globe afin de conserver les aliments comme les céréales, les légumes, les fruits, la viande, le poisson, les produits laitiers, le cacao ou encore le café. Les boissons n'échappent pas à la règle, la fermentation permet de conserver ces boissons, mais elle est également utilisée pour élaborer de nouveaux produits. De nombreuses revues sont disponibles décrivant de manière très détaillée tous les types d'aliments et boissons fermentées rencontrés dans le monde, en particulier celles de Gänzle (2015), de Tamang *et al.* (2020) et de Wolfe and Dutton (2015). Plusieurs types de fermentation sont rencontrées pour les aliments, la fermentation alcoolique (production d'éthanol et de CO_2), la fermentation homolactique (production d'acide lactique), la fermentation hétérolactique (production d'acide lactique, d'éthanol et/ou d'acide acétique, et de CO_2), la fermentation acétique (production d'acide acétique), la fermentation malolactique (production d'acide lactique et de CO_2), la fermentation propionique (production d'acide propionique, d'acide acétique, de CO_2 et de H_2) ou encore la fermentation butyrique (production d'acide butyrique, de CO_2 et de H_2). Dans cette partie, sera évoquée la diversité microbiologique de quatre boissons fermentées bien décrites à ce jour, à savoir le kéfir, le kombucha, la bière et le vin afin d'illustrer la diversité microbiologique rencontrée dans ce type de produits.

2.1 Aperçu de la diversité microbiologique de quatre boissons fermentées

2.1.1 Le kéfir

Le kéfir est une boisson pétillante, légèrement acide, à base de lait (« kéfir de lait ») ou d'eau sucrée supplémentée avec des fruits frais ou sec (« kéfir à base d'eau »), fermentée par des grains de kéfir. Ces grains de kéfir, généralement d'une taille allant de 0,3 à 3,5 cm de diamètre, renferment les microorganismes responsables de la fermentation et sont généralement incorporés dans une matrice polysaccharidique (Martínez-Puchol *et al.*, 2020) (**Figure 18**).

Figure 18 : Aspect d'un grain de kéfir pour la fermentation du lait (Ahmed *et al.*, 2013).

La fermentation du kéfir de lait se déroule entre 21°C et 30°C pendant 4 à 8 jours. Les microorganismes contenus dans ces grains de kéfir sont des bactéries lactiques (≈10^8 UFC/g), des levures (≈10^6-10^7 UFC/g) et des bactéries acétiques (≈10^5 UFC/g) (Chen *et al.*, 2015). Même si les substrats ne sont pas les mêmes (eau ou lait), la composition microbienne du kéfir reste assez similaire.

La composition bactérienne du kéfir de lait est principalement dominée par des membres de l'ancien genre *Lactobacillus*. Ce genre, récemment re-classifié en plusieurs genres dans la famille des *Lactobacillaceae* (Zheng *et al*., 2020) sera présenté dans la suite de ce manuscrit sous les termes *Lactobacillus sensu lato*. L'espèce *Lactobacillus kefiri* (80%) est majoritaire dans le kéfir, mais des espèces comme *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, et *Lactobacillus kefiranofaciens* peuvent être également retrouvées. Des espèces comme *Lactococcus lactis* ou *Leuconostoc mesenteroides* ont également été décrite, tout comme les bactéries acétiques *Acetobacter aceti* et *A. rasens* (Prado *et al.*, 2015). Le kéfir à base d'eau est globalement composé des mêmes familles bactériennes, mais les espèces peuvent différer. En effet, des espèces comme *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii*, *Ln. pseudomesenteroides* mais encore *Gluconobacter japonicus*, *Bacillus cereus* ou *Zymomonas* sp. peuvent être retrouvées plus fréquemment dans le kéfir à base d'eau (Lynch *et al.*, 2021).

Les levures du genre *Saccharomyces* sont prédominantes dans le kéfir à base d'eau, alors qu'elles sont en plus faible quantité dans le kéfir de lait, où des espèces non-*Saccharomyces* sont plus fréquemment rencontrées. L'espèce *S. cerevisiae* est retrouvée dans la majorité des cas mais des espèces comme *Hanseniaspora valbyensis* ou *Dekkera anomala* peuvent aussi être présentes (Marsh *et al.*, 2013). Dans le kéfir de lait, bien que moins présentes que dans le kéfir d'eau, les espèces retrouvées sont *S. cerevisiae*, *S. unisporus*, *Candida kefyr* et *Kluyveromyces marxianus* ssp. *marxianus* (Zanirati *et al.*, 2015).

Très peu d'études ont rapporté la prévalence de virus dans le kéfir. Quelques séquences de prophages ont été retrouvées dans des grains de kéfir, en particulier des familles *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Microviridae*, *Podoviridae* et *Herelleviridae* ciblant la famille des *Lactobacillaceae* (Tenorio-Salgado *et al.*, 2021).

Enfin, le kéfir aurait des propriétés bénéfiques pour la santé humaine, notamment des propriétés antivirales contre le Sars-Cov-2 (Hamida *et al.*, 2021), des propriétés anti-cancéreuses par induction de l'apoptose de cellules cancéreuses (Sharifi *et al.*, 2017) ou de modulation du microbiote intestinal (Peluzio *et al.*, 2021).

2.1.2 Le kombucha

Le kombucha est un thé noir ou vert fermenté, avec un goût acide et présentant une effervescence. La fermentation du kombucha est effectuée par des bactéries acétiques et des levures pendant une durée de 10 à 15 jours à 20°C, pendant laquelle le thé est généralement supplémenté en saccharose (May *et al.*, 2019). Le thé est ensemencé en surface avec le biofilm formé lors d'une précédente fermentation (**Figure 19**).

Figure 19 : Aspect d'un kombucha pendant la fermentation (May *et al.*, 2019).

Les espèces bactériennes dominantes dans les différents kombucha appartiennent à la famille des *Acetobacteraceae*. Les espèces *Gluconacetobacter europaeus*, *G. oxydans*, *G. saccharivorans* et *Acetobacter peroxydans* sont les plus dominantes dans cette boisson fermentée (Coton *et al.*, 2017). Des bactéries du genre *Komagataeibacter* ont aussi été fréquemment retrouvées dans des études concernant la diversité microbienne du kombucha (Arıkan *et al.*, 2020; Reva *et al.*, 2015). La composition microbienne du kombucha change au cours du procédé de fermentation et des bactéries lactiques comme *Oenococcus oeni* peuvent apparaitre, mais ces dernières ont plutôt été associées à des thés verts (Coton *et al.*, 2017; Lorentzen *et al.*, 2019). La composition en levures ne diffère pas entre le thé vert ou le thé noir. Les principales levures retrouvées dans le kombucha appartiennent aux genres *Dekkera*, *Hanseniaspora* et *Zygosaccharomyces*. *Zygosaccharomyces bailii* est souvent majoritaire mais *Dekkera bruxellensis*, *D. anomala* et *Hanseniaspora valbyensis* sont également les espèces les plus retrouvées dans les différents kombucha (Coton *et al.*, 2017; Marsh *et al.*, 2014; May *et al.*, 2019).

A ce jour, aucune étude n'a mentionné l'implication des virus et encore moins des phages dans le kombucha. Le rôle des virus reste donc à être évalué dans de prochaines études dans cette boisson fermentée (May *et al.*, 2019).

Peu de travaux démontrent le potentiel santé du kombucha sur la santé humaine, la plupart ayant été menés sur des animaux (Fu *et al.*, 2015; Vīna *et al.*, 2014). Mais il est mentionné que, par sa forte teneur en polyphénols, des propriétés anti-oxydantes, anti-cancéreuses et stimulatrices des fonctions gastro-intestinales sont plus que probables (Kapp and Sumner, 2019).

2.1.3 La bière

La bière est une boisson fermentée à base de malt, une céréale bourgeonnée (orge, seigle, blé, riz) et de houblon, une plante herbacée apportant de l'amertume. La fermentation de la bière dure généralement entre 3 et 21 jours à des températures variables, comprises entre 6 et 25°C (Bamforth, 2017).

La diversité microbienne de la bière est assez pauvre. En effet, la fermentation de la bière est réalisée exclusivement par des levures comme *Saccharomyces cerevisiae* ou *S. pastorianus* (Bokulich and Bamforth, 2013). Plus récemment, des industries tentent aussi d'utiliser des levures du genre *Brettanomyces*, comme *B. bruxellensis*, pouvant apporter plus de propriétés organoleptiques (Serra Colomer *et al.*, 2019). Les bactéries dans la bière sont souvent synonyme d'altération du produit, et ne sont donc par conséquent pas désirées, bien qu'elles soient présentes dans l'environnement durant la production du produit (Bokulich and Bamforth, 2013). Les principales espèces bactériennes retrouvées dans la bière sont généralement *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus acetotolerans*, *Levilactobacillus brevis*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei* ou *Fructilactobacillus lindneri* (Tyakht *et al.*, 2021). Certaines de ces bactéries sont notamment responsables de la production d'amines biogènes et de troubles opaques par la production d'exopolysaccharides, rendant le produit huileux (Pittet *et al.*, 2011; Rodríguez-Saavedra *et al.*, 2020).

La diversité virale de la bière est également très peu documentée dans la littérature. Des phages ciblant des souches appartenant à des espèces reconnues comme d'altération pour la bière ont été isolés : cinq phages ciblant *Levilactobacillus brevis* (Feyereisen *et al.*, 2019) et un ciblant une souche de *P. damnosus*, (Kelly *et al.*, 2012). Cependant ces phages ont été isolés à partir d'eaux usées et ciblaient des souches non altérantes.

2.1.4 Le vin

Le vin est une boisson fermentée qui résulte de deux fermentations successives du jus de raisin, la fermentation alcoolique puis la fermentation malolactique (FML). La fermentation alcoolique dure de quelques jours à 15 jours et est principalement réalisée par des levures, alors que la FML qui dure plusieurs semaines, est essentiellement réalisée par la bactérie lactique *Oenococcus oeni* (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

La fermentation alcoolique, est principalement assurée par la levure *Saccharomyces cerevisiae* mais d'autres levures non-*Saccharomyces* peuvent également être rencontrées comme *Lachancea*, *Metschnikowia*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Hyphopichia*, *Sporothrix*, *Candida* ou *Schizosaccharomyces* (Fleet *et al.*, 1984; Pinto *et al.*, 2015). Ces levures non-*Saccharomyces* pourraient permettre de diminuer légèrement la production d'éthanol, qui est néfaste pour les bactéries lactiques (Balmaseda *et al.*, 2018). La présence de *Brettanomyces bruxella* a également été rapportée dans le vin, mais elle est considérée comme négative du fait de sa forte capacité à produire de l'acide acétique (Agnolucci *et al.*, 2017).

La FML est généralement désirée pour les vins rouges et quelques vins blancs, puisqu'elle permet une désacidification accompagnée d'une amélioration des qualités organoleptiques du vin. Le fonctionnement de la FML est décrit dans la **Figure 20**.

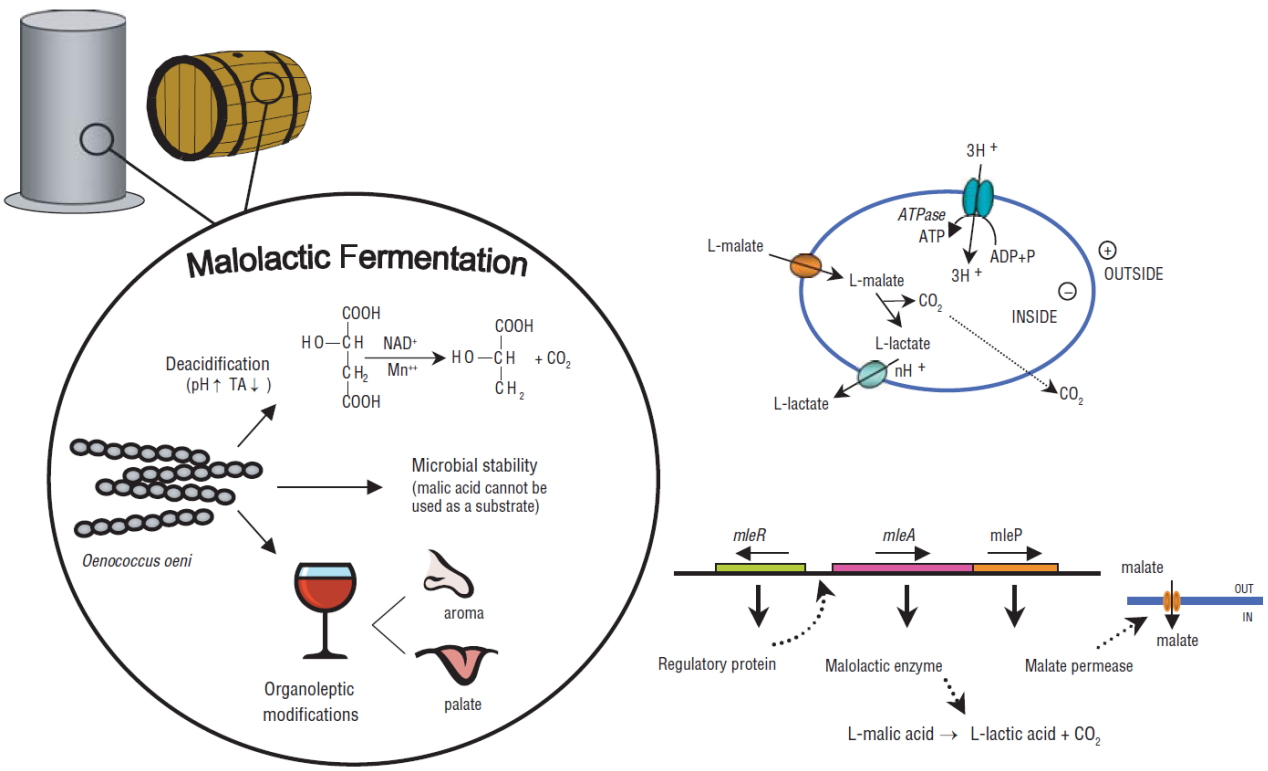


Figure 20 : La fermentation malolactique chez *O. oeni* (Bartowsky, 2005).

L'acide malique pénètre tout d'abord de façon passive dans la cellule bactérienne. Puis, la réaction de désacidification est réalisée grâce à l'activité d'une enzyme nommée enzyme malolactique, qui permet la conversion de l'acide L-malique en acide L-lactique avec production de CO_2 par décarboxylation (**Figure 20**). Cette réaction augmente légèrement le pH intra-cellulaire, puis l'acide L-lactique et le CO_2 sont expulsés de la cellule, générant ainsi un gradient de protons. Ce gradient est associé à une ATPase favorisant la production d'ATP (Bartowsky, 2005). L'accumulation d'acide lactique permet d'augmenter légèrement le pH du vin, par remplacement d'un diacide (acide malique) par un monoacide (acide lactique).

Les bactéries lactiques sont présentes sur le raisin mais leurs niveaux de populations sont faibles quand les mesures sont réalisées par mesures culturales (Lonvaud-Funel, 1999). Le niveau de ces bactéries lactiques augmente lorsque le raisin est pressé pour être transformé en moût. Des concentrations allant de 10^2 à 10^4 UFC/mL sont retrouvées et les bactéries sont essentiellement regroupées parmi les genres *Lactobacillus sensu lato, Leuconostoc, Pediococcus* et *Oenococcus*. Mais des bactéries appartenant aux familles *Halomonadaceae, Comamonadaceae, Pseudomonadaceae, Xanthomonadaceae* et des bactéries maintenant classées parmi les *Erwiniaceae* (précédemment *Enterobacteriaceae*) peuvent également être retrouvées (Pinto *et al.,* 2015). Des bactéries non désirables sont aussi présentes dans certains cas, comme les genres *Acetobacter* et *Gluconobacter*, souvent retrouvées dans les « pieds de cuves » et dans les cuves où la fermentation n'est pas contrôlée (Berbegal *et al.,* 2019). Même si différentes bactéries sont décrites, la bactérie majoritairement retrouvée en fin de fermentation alcoolique dans les vins est *O. oeni* (Bartowsky, 2017; Tofalo *et al.,* 2021).

La diversité virale du vin est aussi très peu décrite, mais les phages sont objet d'intérêt, puisqu'ils peuvent détruire des ferments. Ainsi, des études ont exploré la diversité des prophages au sein de souches d'intérêt pour le domaine de l'œnologie (Claisse *et al.,* 2021; Doria *et al.,* 2013; Jaomanjaka *et al.,* 2013; Xu *et al.,* 2021). Des phages virulents ont également pu être mis en évidence dans le vin contre des bactéries d'altération ou encore contre *O. oeni* (Jaomanjaka *et al.,* 2016; Philippe *et al.,* 2021, 2018). Ces aspects seront traités en détail dans la partie 2.3. Le vin, rouge en particulier, lorsqu'il est consommé de manière raisonnée, peut également avoir des effets bénéfiques sur la santé. Il est en effet riche en antioxydants et en polyphénols comme le resvératrol, les anthocyanes et les catéchines. Ces derniers peuvent prévenir les maladies cardiovasculaires, réduire l'agrégation plaquettaire et donc limiter la formation de caillots sanguins (Snopek *et al.,* 2018).

2.2 Une boisson fermentée comme modèle d'étude des phages : le cidre

Le choix comme modèle d'étude de cette thèse s'est porté vers une boisson fermentée largement produite et consommée dans la région Normandie : le cidre.

2.2.1 Historique de la fermentation des pommes et place du cidre dans le territoire

Les premiers documents citant des boissons alcoolisées à base de pommes remontent à l'Antiquité, et il est mentionné que la consommation de cidre était bien établie en Europe. C'est à partir de cette période que la production et la consommation de cidre s'est généralisée, notamment en Angleterre où de nombreux pommiers ont été plantés pour la production de pommes à cidre. Au début du XX^{ème} siècle, le cidre était la deuxième boisson la plus consommée en France après le vin, mais cette consommation a été largement réduite après la Seconde Guerre mondiale. Malgré les dégâts causés dans les paysages et les bocages pendant ces années de guerre, de nombreux producteurs locaux ont persisté dans la production de cidre, particulièrement en Normandie et en Bretagne, mais également au Pays Basque (Cousin *et al.*, 2017). Le cidre est une boisson régionale et tient donc une place importante dans la région normande. En effet, à ce jour, deux appellations d'origine protégée (AOP) concernant le cidre sont recensées en Normandie, le cidre « Pays d'Auge » depuis 1996 et le cidre « Cotentin » depuis 2016 (**Figure 21**).

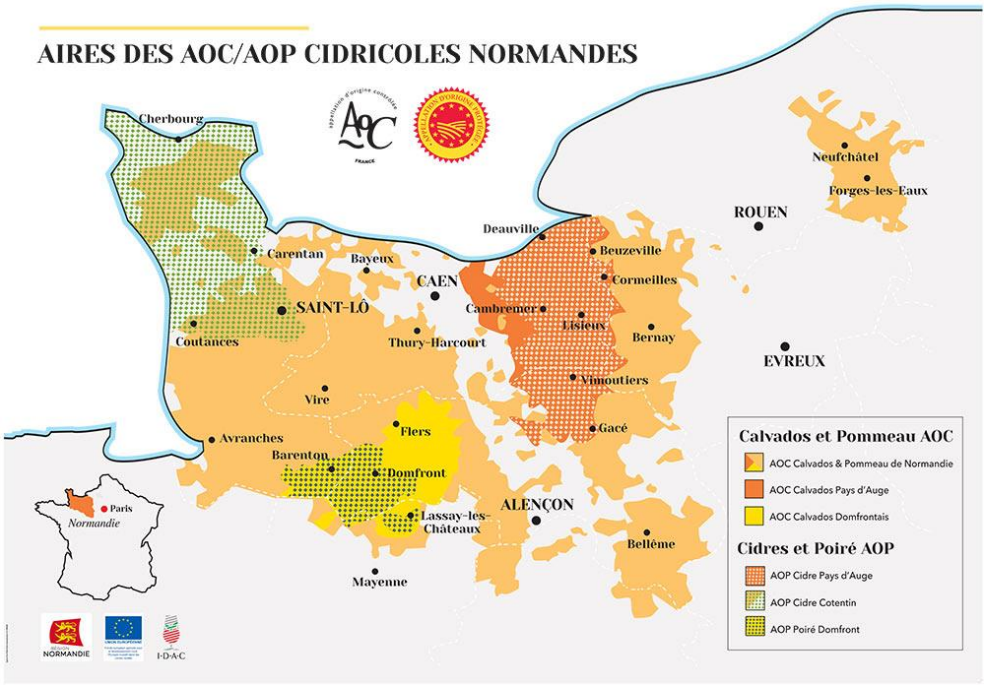


Figure 21: Distribution des appellations cidricoles de la région Normandie (source : https://www.idac-aoc.fr/fr/, consulté le 29/07/2022).

La région Normandie détient également une AOP pour le poiré de « Domfront », plutôt spécifique du département de l'Orne. Les autres AOP concernant le cidre sont détenues par la région Bretagne et le cidre « Cornouaille » dans le Finistère ainsi que pour la région Pays de la Loire, avec le cidre du « Perche », dont une petite partie du territoire est partagée avec le département de l'Orne, en Normandie.

La production de cidre s'effectue également dans le monde entier, puisque 25 pays sont reconnus comme des producteurs de cidre. En Europe, on retrouve la France, l'Angleterre, l'Espagne, l'Allemagne et l'Irlande comme principaux producteurs mais les États-Unis ainsi que quelques pays d'Amérique du Sud sont également producteurs de cidre (Cousin *et al.*, 2017).

2.2.2 Procédés de fabrication et fermentation du cidre

La fabrication du cidre s'effectue selon un procédé bien établi, présenté en **Figure 22**. Tout d'abord, les pommes sont récoltées sur une période allant de septembre à décembre en fonction de la variété de pommes. Ces pommes sont ensuite amenées au pressoir, puis triées et lavées avant d'être pressées à l'aide d'une presse. Ce pressage permet de séparer la partie liquide dite « moût de pomme », de la partie solide « marc de pomme ». Le moût est ensuite transféré dans des cuves en bois, en polyester ou en acier inoxydable pour la maturation qui s'effectue généralement entre 3 et 12°C. La clarification du moût de pommes a généralement lieu dans les premiers jours suivant la mise en cuve, elle correspond à l'étape pré-fermentaire et à la gélification des pectines par la formation d'une couche en surface, plus communément appelée « chapeau brun ». Ensuite, la fermentation alcoolique se produit. Elle correspond à la transformation des sucres du moût en éthanol et en CO_2, qui se fait par les levures indigènes présentes sur les fruits, et/ou dans l'environnement de fabrication (cuves, pressoir, etc.). Des sulfites peuvent être éventuellement ajoutés pour contrôler la composition microbienne du cidre en cours de fermentation. En fonction du type de cidre souhaité (doux, demi-sec, brut, extra brut), la fermentation sera interrompue en tenant compte de la quantité de sucres résiduels et du degré alcoolique attendu du produit final. Généralement, la mise en bouteille s'effectue lorsque la densité est comprise entre 1009 et 1029 (Cousin *et al.*, 2017). Comme pour le vin, une deuxième étape de fermentation peut avoir lieu avec la FML, réalisée par les bactéries lactiques du cidre. Celle-ci peut être désirée ou non par les producteurs en fonction du produit voulu mais son impact dans le cidre reste encore mal connu comparé au vin (Sánchez *et al.*, 2014).

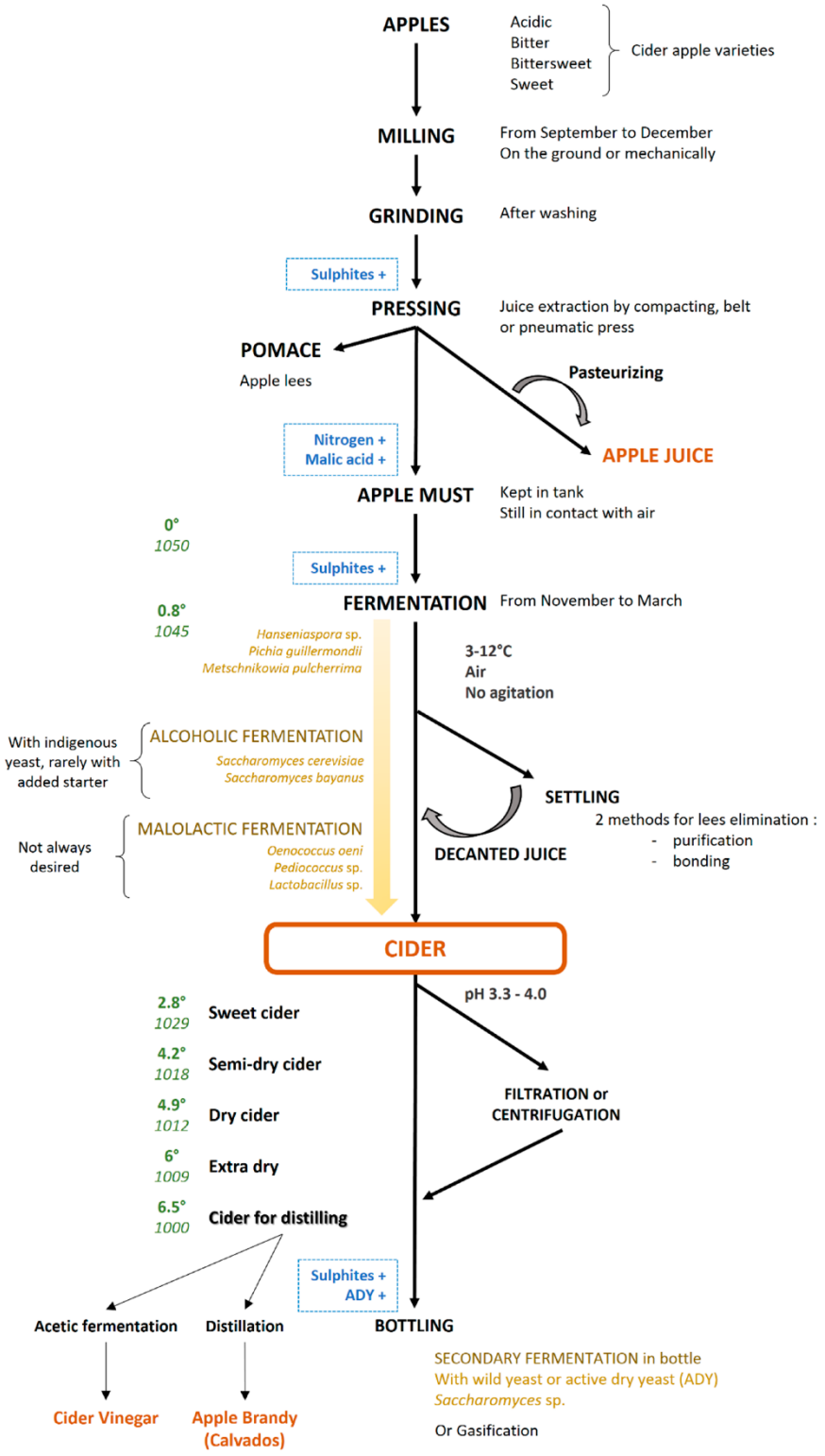


Figure 22 : Procédé de fabrication du cidre (Cousin *et al.*, 2017).

Légende : Degrés alcoolique et densité. Principales levures et bactéries impliquées dans la fermentation.

2.2.3 Diversité microbienne du cidre

La composition microbienne du cidre est caractérisée par des mélanges de populations provenant de tout l'environnement cidricole, comme le sol, l'eau, les fruits, le matériel ou les cuves de stockage des producteurs. Les principaux groupes microbiens seront présentés dans cette partie.

2.2.3.1 La diversité levurienne

La source majoritaire de levures pour la fermentation du cidre se trouve à la surface de la pomme, qui contient une communauté fongique plutôt variée. En effet, la majorité des levures présentes sont dites non-*Saccharomyces* et les genres les plus fréquemment rencontrés sont *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Metschikowia* et *Candida* (Buron *et al.*, 2011; Coton *et al.*, 2006; Misery *et al.*, 2021; Valles *et al.*, 2007). Parmi tous ces genres de levures, des espèces comme *H. valbyensis*, *H. uvarum*, *H. osmophila*, *M. pulcherrima*, *P. anomala* ou encore *C. pomicola* sont souvent retrouvées au début de la fermentation du cidre, lorsqu'il y a encore de l'oxygène disponible (Kurtzman *et al.*, 2001; Valles *et al.*, 2007).

La diminution progressive de l'oxygène disponible entraine le remplacement de cette flore par les levures du genre *Saccharomyces*, dont l'origine peut être multiple comme la surface des pommes, le matériel de pressage ou encore les cuves de stockage. La population peut atteindre 10^4 UFC/cm² sur certaines surfaces (Morrissey *et al.*, 2004). Trois espèces sont principalement rencontrées dans le cidre, *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ou encore *S. uvarum*, ces dernières participant majoritairement à la fermentation alcoolique du jus de pomme (Cabranes *et al.*, 1997; Coton *et al.*, 2006).

Des levures appartenant aux genres *Dekkera* et *Brettanomyces* sont également souvent rencontrées dans les cidres, et en particulier les espèces *D. anomala/bruxellensis* et *B. anomala/bruxellensis* (Misery *et al.*, 2021). Ces dernières ont généralement un impact négatif sur la qualité organoleptique et aromatique des cidres, en particulier par leur aptitude à acidifier le cidre par la production d'acide acétique mais aussi à produire des composés organiques volatils non désirables comme par exemple le lactate d'éthyle (Buron *et al.*, 2011; Guichard *et al.*, 2019).

2.2.3.2 La diversité bactérienne

La composition bactérienne associée aux cidres a été assez peu décrite dans la littérature, mais quelques études montrent tout de même qu'elle semble assez diversifiée (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Diversité bactérienne associée au cidre (adapté de Cousin *et al.*, 2017).

Famille	Origine	Genre/Espèce	Références
Lactobacillaceae	Fleur de la pomme Pomme Cidre	*Levilactobacillus brevis* *Secundilactobacillus (para)collinoides* *Lacticaseibacillus casei* *Lentilactobacillus diolivorans* *Lentilactobacillus hilgardii* *Liquorilactobacillus sicerae* *Liquorilactobacillus mali* *Paucilactobacillus suebicus* *Pediococcus ethanolidurans* *Pediococcus parvulus*	(Carr and Davies, 1970; Claisse and Lonvaud-Funel, 2001; Garai *et al.*, 2007; Graça *et al.*, 2015; Jung and Lovitt, 2010; Puertas *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2012)
Leuconostocaceae	Cidre	*Oenococcus oeni* *Oenococcus sicerae* *Leuconostoc mesenteroides*	(Cousin *et al.*, 2019a; Salih *et al.*, 1988; Sánchez *et al.*, 2012)
Acetobacteraceae	Fleur de la pomme Cidre Vinaigre	*Acetobacter* sp. *Komagataeibacter* sp. *Gluconobacter* sp.	(Shade *et al.*, 2013; Trček *et al.*, 2016)
Sporolactobacillaceae	Cidre	*Sporolactobacillus* sp.	(Coton *et al.*, 2010)
Sphingomonadaceae	Cidre	*Zymomonas mobilis*	(Bauduin *et al.*, 2006; Coton *et al.*, 2005; M. Coton *et al.*, 2006; Misery *et al.*, 2021)
Enterobacteriaceae sensu lato (incluant *Erwiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov.)	Surface de la pomme Fleur de la pomme	Bactéries coliformes Genres de l'ancienne famille des *Enterobacteriaceae*	(Graça *et al.*, 2015; Shade *et al.*, 2013)

Au cours des différentes étapes de l'élaboration du cidre, plusieurs genres et espèces bactériens sont retrouvés. Ces bactéries sont globalement divisées en deux grands groupes, les bactéries d'intérêt technologique et les bactéries d'altération. Parmi ces groupes, les bactéries lactiques sont largement représentées et quatre principaux genres sont retrouvés, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* et des membres de la famille des *Lactobacillaceae* (Cousin *et al.*, 2017).

En effet, les LAB sont les mieux adaptées aux conditions rencontrées lors de la fermentation du cidre, c'est-à-dire un pH faible, la présence d'éthanol et l'absence d'oxygène. Les genres *Lactobacillus sensu lato* et *Oenococcus* sont les mieux adaptés pour se développer avec une acidité importante (Alegría *et al.,* 2004). Ces genres sont également ceux participant le plus à la FML, alors que les genres *Leuconostoc* et *Pediococcus* n'y participent pas, ou très peu (Bartowsky, 2017, 2005; Jung and Lovitt, 2010; Salih *et al.,* 1988; Sánchez *et al.,* 2012).

Parmi ces LAB, une espèce fait l'objet d'une attention particulière de la filière cidricole, et plus particulièrement des cidres de distillation, *Secundilactobacillus collinoides*. Elle a la particularité de pouvoir dégrader le glycérol en 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) via une glycérol déshydratase. En conditions de températures élevées, comme c'est le cas lors de la distillation du cidre, le 3-HPA est spontanément déshydraté en acroléine, un composé jaunâtre présentant une odeur désagréable (Sauvageot *et al.,* 2002). Cette bactérie n'est donc pas recherchée dans les cidres destinés à être distillés en Calvados, puisqu'elle est responsable de la « piqure acroléïque ».

Les bactéries acétiques des genres *Acetobacter*, *Gluconobacter* et *Komagataeibacter* sont plutôt retrouvées dans le moût fraîchement pressé mais également pendant la FML. Elles sont globalement associées à un rôle d'altération, on parle alors de « piqûre acétique » mais sont désirées lors de la production de vinaigre de cidre (Qi *et al.,* 2020). L'origine de la présence de ces genres bactériens est surtout associée à l'utilisation des fruits en mauvais état, de matériel mal désinfecté et à une oxydation trop importante du cidre (cuves mal remplies, par exemple).

Enfin, des bactéries du phylum des *Pseudomonadota* (précedemment *Proteobacteria*) sont également retrouvées dans les cidres. Notamment des familles des *Erwiniaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., et *Pseudomonadaceae*, principalement dans le moût de pomme et dans les premiers jours de fermentation. Ces bactéries sont majoritairement issues des fruits ainsi que du sol et les principaux genres retrouvés sont *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Rhanella* et *Serratia*, et tendent à disparaître après la fermentation alcoolique (Misery *et al.,* 2021). Pour la filière cidricole, une espèce est particulièrement problématique puisqu'elle est responsable de la « maladie du framboisé ». Cette maladie est caractérisée par une forte production d'éthanol à partir de glucose, de fructose et de saccharose à des pH supérieurs à 3,7 par la bactérie *Zymomonas mobilis*, rendant le cidre impropre à la consommation (Coton *et al.,* 2005; M. Coton *et al.,* 2006).

2.2.4 Composition physico-chimique et aromatique du cidre

La pomme est un fruit naturellement riche en sucres, et cette teneur varie en fonction de la variété de pommes utilisée. Ainsi, des mélanges de variétés de pommes sont généralement effectués afin de complexifier la composition physico-chimique des cidres (Keller *et al.,* 2004). Trois principaux sucres composent la pomme et donc le moût : le fructose (80%), le glucose (15%) et le saccharose (5%). Le glucose et le saccharose sont les sucres consommés de manière préférentielle par les levures alors que le fructose est consommé en dernier.

Des acides organiques sont également présents dans la pomme et dans le moût, avec en majorité l'acide malique (représentant 90% des acides et souvent estimé à hauteur de 5 g/L dans le moût), mais l'acide lactique, l'acide quinique, l'acide citrique et l'acide succinique sont aussi retrouvés dans les cidres. Ces acides font, en outre, que le pH du cidre se situe généralement entre 3,0 et 4,0 (Ye *et al.,* 2014).

La présence de substances azotées dans le moût est également essentielle pour assurer le bon métabolisme des levures. En effet, l'azote permet d'assurer une cinétique fermentaire optimale. S'il est présent en trop faible quantité, la fermentation alcoolique sera trop rapide et s'il est en excès, la fermentation alcoolique sera trop longue et nécessitera une intervention du producteur (filtration/clarification). Les sources d'azote sont sous forme organique par les acides aminés présents, comme la glutamine, l'acide aspartique, l'asparagine, la sérine et l'acide glutamique mais également sous forme minérale, avec l'ammoniac (NH_3) (Bell and Henschke, 2005), dont la concentration est généralement comprise entre 40 et 150 mg/L dans les moûts.

Les composés phénoliques (polyphénols) du cidre sont déterminants de par leurs propriétés antioxydantes mais également pour leurs caractéristiques organoleptiques (couleur, astringence, amertume). Dans le moût de pomme et le cidre, les polyphénols retrouvés sont les flavonols, les anthocyanidines et les acides hydroxycinnamiques et ont généralement pour origine la peau des pommes (Guo *et al.,* 2019). Leur concentration peut atteindre 200 mg/L dans certains jus (Rosend *et al.,* 2020; Wicklund *et al.,* 2020).

La composition aromatique des cidres dépend majoritairement des variétés de pommes utilisées et du métabolisme microbien mis en jeu (Rosend *et al.,* 2019). Les composés aromatiques les plus retrouvés dans le cidre sont les esters, les alcools et les aldéhydes et sont formés pendant la fermentation alcoolique et la FML. Les principaux composés volatils retrouvés dans les cidres sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Principaux composés aromatiques volatils identifiés dans le cidre (adapté de Rosend *et al.*, 2019).

Catégorie	Composé	Description de l'odeur
Alcool	1-propanol	Fermenté, fruité, pomme, poire
Alcool	2-methyl-1-propanol	Vin, whisky
Alcool	1-butanol	Balsamique
Alcool	3-methyl-1-butanol	Cognac, banane, fruité
Alcool	2-methyl-1-butanol	Vin, fruité
Alcool	2-hexen-1-ol	Vert, feuillu
Alcool	1-hexanol	Vert, piquant
Alcool	1-octen-3-ol	Terreux, végétal, champignon
Alcool	2-ethyl-1-hexanol	Agrumes, floral
Alcool	1-octanol	Agrumes, floral, gras
Alcool	2-phenylethanol	Floral, rose
Ester	Ethyl acetate	Fruité, vert
Ester	Methyl-2-methylpropanoate	Fruité, éther
Ester	Ethyl propionate	Fruité, raisin, ananas, rhum
Ester	Methyl butanoate	Piquant, fermenté
Ester	Ethyl-2-methylpropanoate	Éther, piquant, fruité
Ester	Methyl-2-methylbutanoate	Fruité, mûr, gras
Ester	Ethyl butanoate	Ananas, cognac
Ester	Butyl acetate	Solvant, banane
Ester	Ethyl-3-methylbutanoate	Fruité, ananas, pomme, orange
Ester	Isoamyl acetate	Banane, poire
Ester	Ethyl-2-methylbutanoate	Fruité, pomme
Ester	Ethyl pentanoate	Fruité, baie, tropical
Ester	Ethyl hexanoate	Fruité, ananas, banane
Ester	Hexyl acetate	Fruité, pomme verte, banane
Ester	Hexyl butanoate	Vert, fruité, végétal
Ester	Ethyl octanoate	Fruité, vin, banane, brandy
Ester	2-phenylethyl acetate	Miel, rose
Ester	Ethyl decanoate	Cireux, fruité, pomme, raisin
Ester	3-methylbutyl octanoate	Cireux, fruité, ananas, noix de coco
Acide	Butanoic acid	Fromage
Acide	2-methylbutanoic acid	Fromage, fermenté
Aldehyde	Benzaldehyde	Amande, cerise
Aldehyde	Octanal	Cireux, agrumes
Aldehyde	Phenylacetaldehyde	Miel, rose
Aldehyde	Vanillin	Vanille
Cétone	3-octanone	Herbeux, lavande, champignon

2.3 Les communautés de phages, ou « phageomes », des aliments

2.3.1 Résumé de la revue bibliographique de thèse, Ledormand *et al.*, 2020

Les communautés de phages ou « phageomes », commencent à être étudiées, particulièrement dans le microbiote intestinal où il a été démontré que les phages jouaient un rôle important dans les fluctuations des populations microbiennes. En revanche, les communautés de phages sont peu étudiées dans les matrices alimentaires, où les phages sont principalement étudiés comme destructeurs de ferments d'intérêt, ou comme agents antimicrobiens contre des bactéries d'altération ou pathogènes.

L'objectif de cette revue était d'abord de faire le point sur les données disponibles sur les communautés de phages des aliments et des boissons fermentées, avec un focus particulier sur le cidre. Il s'est avéré que seulement trois études portaient sur le phageome d'aliments fermentés au moyen d'approches métagénomiques : deux études s'intéressaient aux phageomes de produits asiatiques fermentés (le kimchi, le chou et les crevettes fermentées) et une étude portait sur le phageome de la croûte d'un fromage français, l'Epoisse. Les produits fermentés asiatiques étaient dominés par les bactériophages de l'ancien ordre des *Caudovirales*. Les principaux phages de l'Epoisse ciblaient *Lactococcus lactis*, et les genres *Glutamicibacter* et *Pseudoalteromonas*.

Cette revue a également permis de recenser les méthodes de métagénomique utilisées pour d'autres études dédiées aux phageomes comme dans le microbiote intestinal et l'environnement ou encore celles pour l'étude du microbiote des aliments, afin d'envisager leur application à la boisson modèle de cette thèse, le cidre. Globalement, toutes les méthodologies pour les études de phageomes sont semblables mais il est souligné que des adaptations comme l'utilisation de molécules, tel que le polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), peuvent être envisagées pour contrecarrer l'effet des polyphénols, qui rendent les extractions d'acides nucléiques plus difficiles.

En conclusion de cette revue, il est apparu important de s'intéresser aux phageomes des boissons fermentées, et en particulier du cidre, puisque les phages jouent un rôle majeur dans les fluctuations et les équilibres microbiens des écosystèmes. Les caractéristiques assez rudes du cidre (acidité, polyphénols, alcool) sont également pressenties comme pouvant rendre ces études plus complexes à entreprendre que dans d'autres matrices.

2.3.2 Revue bibliographique « Phage community involvement in fermented beverages: an open door to technological advances? », Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition, 2020.

Phage Community Involvement in Fermented Beverages: An Open Door to Technological Advances?

Ledormand P, Desmasures N, Dalmasso M,

Critical Reviews in Food Science and Nutrition **2020**, 1–10,
doi.org/10.1080/10408398.2020.1790497

CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION
https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1790497

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

REVIEW

Check for updates

Phage community involvement in fermented beverages: an open door to technological advances?

Pierre Ledormand, Nathalie Desmasures, and Marion Dalmasso

Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, Caen, France

ABSTRACT

Bacteriophages (phages) are considered the most abundant biological entities on Earth. An increasing interest in understanding phage communities, also called viromes or phageomes, has arisen over the past decade especially thanks to the development and the accessibility of Next Generation Sequencing techniques. Despite the increasing amount of available metagenomic data on microbial communities in various habitats, viromes remain poorly described in the scientific literature particularly when it comes to fermented food and beverages such as wine and cider. In this review, a particular attention is paid to the current knowledge on phage communities, with a special focus on fermented food viromes and the methodological tools available to undertake their study. There is a striking lack of available data on the fermented foods and beverages viromes. As far as we know, and although a number of phages have been isolated from wine, no general study has to date been carried out to assess the diversity of viromes in fermented beverages and their possible interactions with microbiota throughout the fermentation process. With the aim of establishing connections between the currently used technologies to carry out the analysis of viromes, possible applications of current knowledge to fermented beverages are examined.

KEYWORDS

Phageome; virome; phage; fermented foods; fermented beverages; cider

Introduction: the viral world remains partly unexplored

Since the massive expansion of next generation sequencing (NGS) techniques over the recent years, the use of metagenomic data has been drastically widened, and thus led to a better description and understanding of the composition and dynamics of various microbiota. Metagenomics provides very complementary information to the traditional culture-dependent methods, since it makes it possible to avoid the obstacle of unculturable microorganisms, and generally gives a more complete overview of microbial communities. Thus, over the last decade, an exponential increase in the number of metagenomic studies on microbiota has been observed (Figure 1, PubMed database, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine). The microbiota in the human gut is scrutinized for its potential impact on health and for its implication in some diseases (Kurokawa et al. 2007; Armour et al. 2019). For example, the role of the gut microbiota has been identified in disorders such as obesity and type 2 diabetes (Patterson et al. 2016), inflammatory bowel disease (Nishida et al. 2018), mental illnesses (Dinan and Cryan 2017; Quigley 2017), cancer (Scott et al. 2019), and aging (O'O'Toole and Jeffery 2015).

As for microbiota, metagenomic data regarding viral communities, largely called viromes, are expanding. Nonetheless, the number of published studies on viromes still lags far behind that of microbiota publications, with only 182 publications dedicated to the study of viromes in 2019 against 7697 publications dedicated to microbiota in the same year (Figure 1). In the current published literature, the term "virome" includes viruses of eukaryotic cells and viruses of bacteria or bacteriophages (phages). As phages are highly dominant in microbial ecosystems, virome studies often deal exclusively with phage communities. In recent literature, the term "phageomes" gradually tends to be used to describe phage communities (Dalmasso, Hill, and Ross 2014; Manrique et al. 2016; Shkoporov et al. 2018; Shkoporov and Hill 2019), but the number of publications using this term is scarce with only 7 studies published in 2019 (Figure 1). Most of the studies undertaken on phageomes focus on human health. In general, these studies aim to describe the gut virome composition in diseases such as type 2 diabetes (Ma et al. 2018), schizophrenia (Yolken et al. 2015), and inflammatory bowel disease (Norman et al. 2015) (Table 1).

Although bacteria are present in 10^{30} cells in the biosphere, phages are the most represented entity on Earth, representing about 10^{31} particles, or ten times the amount of bacteria (Breitbart and Rohwer 2005). Phages are viruses capable of specifically infecting bacteria, without affecting eukaryotic cells or archaea. They are not regarded as living organisms but as biological "entities" because they do not have the cellular machinery required for transcription, translation and energy production. They are relatively small in size (isometric heads are typically 45–170 nm in diameter) and composed of a single type of nucleic acid, DNA or RNA, single or double stranded, protected by a protein or lipoprotein structure called capsid

CONTACT Marion Dalmasso marion.dalmasso@unicaen.fr ER MALIM, EA 4651 ABTE, 14032 Caen cedex 05, France.

© 2020 Taylor & Francis Group, LLC

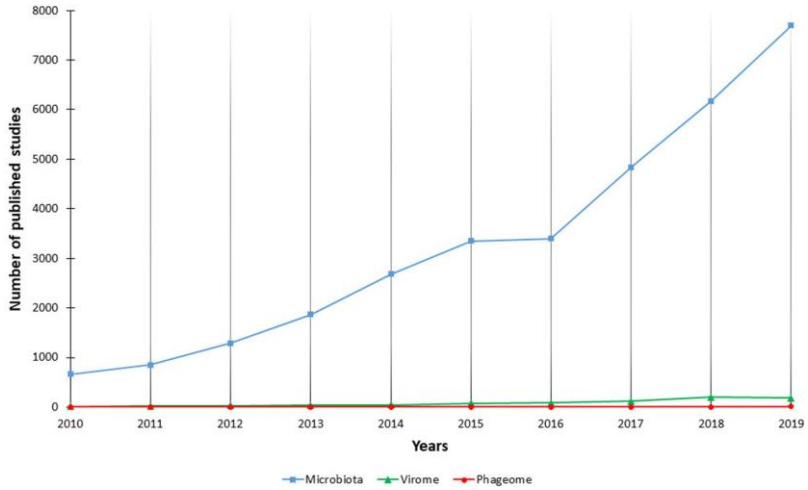


Figure 1. Number of published studies per year dealing with microbiota (blue squares), virome (green triangles) and phageome (red dots) from 2010 to 2019. The number of studies was obtained by the PubMed database (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) using the key-words "microbiota," "virome" and "phageome," separately, and excluding reviews and meta-analysis from the document type search builder.

(King et al. 2012). Enveloped phages may also have an additional membrane surrounding the capsid (Wei et al. 2009). Phage genomes vary from 3 kb to 300 kb, depending on the different families (King et al. 2012). To date, the *Caudovirales* order represents 96.3% of the known phages (Ackermann and Prangishvili 2012; Lefkowitz et al. 2018), and is composed of nine families and one unclassified member (*Lilyvirus*) according to the International Committee on Taxonomy of Viruses (classification consulted in May 2020). Among the so far studied viromes, the *Myoviridae, Siphoviridae* and *Podoviridae* families have been most described and account for 68% of the *Caudovirales* order. However, it is possible that lysogenic phages are more abundant than lytic phages at high bacterial densities, in environments such as corals (Knowles et al. 2016). It has been shown that free virus-like particles are relatively less abundant at high host densities, suggesting that temperate dynamics become increasingly important in ecosystems with high microbial densities, such as the human gut (Kim and Bae 2018; Mavrich et al. 2018; Luque and Silveira 2020).

There is a glaring lack of data on phageomes in foods, and notably in fermented foods, which involves a higher concentration and a lower diversity of microbiota than in other habitats. This review deals with phageomes from fermented foods, with a special focus on fermented beverages such as cider. In particular, it aims to draw up an inventory of the methods used for the study of complex microbial ecosystems, and to discuss their possible application to the study of phageomes in fermented foods and beverages.

Phageomes are poorly studied in fermented foods and beverages

Current knowledge on microbiota and phageomes in fermented foods and beverages

Fermentation is an ancient form of food preservation, which also improves the nutritional content of foods. Fermented foods and beverages are consumed all over the world, accounting for approximately one third of the global human diet (Selhub, Logan, and Bested 2014). Fermented foods production is based on a wide variety of raw materials such as milk, vegetables, meat, fish, legumes, and cereals (Figure 2). For a complete overview of the large variety of fermented foods and beverages around the world the review by Tamang et al. (2020) can be consulted. The microbiota of many fermented foods like cheese (Wolfe et al. 2014), meat (Nieminen et al. 2012), fruit (Clooney et al. 2016), and grains (Nalbantoglu et al. 2014) have already been described using NGS techniques, and revealed a great diversity of microbiota depending on the type of fermented food and on the region of production (Figure 2).

The global fermented beverage market is a particularly growing sector of the food industry, with an increasing demand from consumers (Marsh et al. 2014). Very little is known about phageomes in fermented foods and beverages. At the time of writing the current review, only three published studies have dealt with this topic, two describing the phageomes of Asian fermented foods, and one the phageome of a French cheese. The first study published in 2011 described the phageomes of kimchi, sauerkraut and fermented shrimps (Park et al. 2011). The most dominant phages in these foods belonged to the *Caudovirales* order (tailed phages), in varying proportions depending on the food analyzed. *Podoviridae*, phages with short non-contractile tails, were reported to be the most abundant in kimchi while *Siphoviridae*, phages with long non-contractile tails, were proven dominant in sauerkraut and fermented shrimps. The phageomes of these foods were less complex and diverse than those described in other environments such as soil, marine environment, and feces (Park et al. 2011). This illustrates the plausible correlation between phage and bacterial communities in foods, as the latter are known to be less diverse in foods than in other habitats (Marco et al. 2017).

Table 1. Main studies published dealing with viromes and phageomes in different ecosystems over the last 10 years (2010–2019).

Habitat	Studied Ecosystem	Main results of the study	Sequencing method used	Reference
Environment	Phytoplankton	• Viral communities dominated by *Phycodnaviridae* (≈ 90% of the reads) instead of the *Myoviridae* family (≈ 82% of the reads) after a phytoplankton bloom.	Illumina HiSeq	(Alarcón-Schumacher et al. 2019)
Environment	Corals	• Relative increase in the abundance of genes encoded by temperate viruses when the microbial abundance increases. • More important temperate dynamics in ecosystems with high microbial densities.	Illumina MiSeq and Ion Torrent	(Knowles et al. 2016)
Environment	Ocean	• Assembly of complete viral genomes and of large genomic fragments (Tara Oceans and Malaspina research expeditions). • Host range interactions of viruses predicted using the CRISPR spacer indicator.	Illumina HiSeq	(Roux et al. 2016)
Environment	Hot springs	• Positive correlation found between virus-like particles and prokaryote abundance. • Few phages found; each of *Caudovirales* order.	Epifluorescence microscopy and flow cytometry	(Parikka et al. 2018)
Environment	Lake	• Large proportions of eukaryotic viruses (phycodnaviruses and single stranded DNA viruses) compared to other aquatic viromes dominated by phages.	Pyrosequencing 454	(López-Bueno et al. 2009)
Environment	Plants	• Plant virome (phytovirome) dominated by RNA viruses.	Illumina HiSeq	(Ma et al. 2019)
Environment	Plants	• Investigation on the virome of 'Pinot Noir' grapevine exhibiting strong leaf roll symptoms (RNA extraction), revealing a very complex infection status. • Detection of five virus and viroid isolates with a total of eleven variants.	Illumina HiSeq	(Beuve et al. 2018)
Gut	Human	• Gut virome alteration, and especially phage populations, in murine models miming Gulf War Illness (bowel disease, chronic fatigue, neuroinflammation, headache …). • Correlation between bacterial dysbiosis in the intestine and the richness and the presence of some phages.	Illumina MiSeq	(Seth et al. 2019)
Gut	Human	• From birth to 2 years of age: high proportions of phages correlated to the bacterial dynamics.	Illumina MiSeq	(Lim et al. 2015)
Gut	Human	• Rebuilding of the microbiota diversity by a fecal virome transplantation after an antibiotic treatment, to its pre-antibiotic state.	Illumina MiSeq	(Draper et al. 2019)
Gut	Human	• Modulation of the virome composition through diet. • Convergence of the viromes between individuals following the same diet.	Pyrosequencing 454	(Minot et al. 2011)
Gut	Human	• Two virus sources among human gut viruses: persistence of a small portion of the global virome within each individual's gut, and rapid evolution of some long-term virome members.	Illumina HiSeq	(Minot et al. 2013)
Gut	Human	• High proportions of *Caudovirales* in the enteric virome of IBD patients. • Each inflammatory disease was associated to a specific abnormal virome compared to healthy viromes.	Illumina MiSeq	(Norman et al. 2015)
Gut	Human	• Possible correlation of the gut phageome composition with type 2 diabetes.	Sequences downloaded from the SRA NCBI database	(Ma et al. 2018)
Gut	Human	• Description of an efficient protocol requiring low sample amounts to obtain purified viromes containing phages.	Illumina NextSeq	(Deng et al. 2019)
Gut	Human	• Design of a reproducible and high throughput sample preparation for viral metagenomic analysis from fecal samples.	Illumina HiSeq	(Conceição-Neto et al. 2015)
Gut	Human	• Design of a reproducible protocol for the metagenomic analysis of the human fecal phageome: rapid storage, limited freeze-thaw cycling and spiking of fecal samples	Illumina MiSeq	(Shkoporov et al. 2018)

(*continued*)

Table 1. Continued.

Habitat	Studied Ecosystem	Main results of the study	Sequencing method used	Reference
		with an exogenous phage standard were recommended.		
Gut	Human	• Description of an easy, low-cost and reproducible methodology to analyze gut phageome. • Deceased genetic diversity with Multiple Displacement Amplification.	Illumina HiSeq	(d'Humières et al. 2019)
Gut	Dogs	• Characterization of the fecal virome in healthy dogs and in dogs with acute diarrhea. • *Astroviridae*, *Picornaviridae* and *Caliciviridae* only found in dogs with acute diarrhea. • No differences in phages found between groups (same proportions of *Caudoviridae* in each group).	Illumina MiSeq	(Moreno et al. 2017)
Gut	Bat	• Eukaryotic viruses found in the largest proportions; phage sequences never reaching more than 4% of the total sequences. • Viruses infecting plants, fungi and mammals also found.	Pyrosequencing 454	(Li et al. 2010)
Fermented foods	Cheese	• Phage sequences mainly assigned to phage targeting bacterial species like *Glutamicibacter*, *Lactococcus lactis* and *Pseudoalteromonas*.	Illumina MiSeq	(Dugat-Bony et al. 2020)
Fermented foods	Kimchi, shrimp, sauerkraut	• Viral communities dominated by phages belonging to the *Caudovirales* order. • The virome of fermented food is less complex than in other habitats.	Pyrosequencing 454	(Park et al. 2011)
Fermented foods	Kimchi	• Better discrimination of the geographical origin of kimchi with viral metagenomics than with bacterial metagenomics.	Illumina HiSeq	(Jung et al. 2018)

The second study also showed that the major part of the viral community of Korean and Chinese kimchi samples belonged to the three phage families of the *Caudovirales* order, i.e. *Podoviridae*, *Siphoviridae*, and *Myoviridae* (phages with contractile tails). Some ssDNA viruses, including *Circoviridae*, *Genomoviridae*, and *Microviridae* were predominant in some Korean kimchi samples (Jung et al. 2018). The geographic origin of the Korean and Chinese kimchi samples was also better discriminated when using the phageome metagenomic data than when using the bacterial metagenomic data in the Beta-diversity analysis (Jung et al. 2018). The authors put this down to a higher taxonomic resolution of whole-metagenome genotyping techniques and contig-based sequence comparisons of viral data than in the analysis of bacterial communities by sequencing of single phylogenetic marker genes (e.g., 16S rRNA) and OTU-based sequence comparison at a 97% level of similarity.

The third study described the phageome on the surface of an Epoisse cheese, a French red-smear cheese. The most abundant contigs assigned to phages that could be identified in databases were essentially associated with phages of *Lactococcus lactis*, and species of the *Glutamicibacter* and *Pseudoalteromonas* genera, and to a lesser extent with phages of species of the *Vibrio*, *Leuconostoc* and *Halomonas* genera (Dugat-Bony et al. 2020). Apart from these three studies, to our knowledge, no other published work has focused on the phageomes present in fermented foods. No published data are currently available regarding the phageome of fermented beverages. Nonetheless, the phageome of fermented beverages has the potential to be explored, as it has been done for fermented foods. As described above, phages are able to drive the bacterial diversity of an ecosystem. Thus, the phageome-microbiota relationships could also be scrutinized in fermented beverages.

Phages as friends and foes in the food industry

Although phageomes are not yet well described in foods, single phages have been subject of studies for a long time. Most works related to phages in foods are based on single phage isolation and characterization, reviewed, among others, by Połaska and Sokołowska (2019) excluding the global aspect of phage communities. Strategies using phages have been and are still being assessed to reduce the presence of foodborne bacterial pathogens in many foods, in order to reduce the risks of illness due to the consumption of contaminated foods. A special attention is paid to pathogens such as *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and *Listeria monocytogenes*. Many studies involving the use of phages have been carried out on these pathogens, and as several reviews exist on this subject: García et al. (2008), Janež and Loc-Carrillo (2013), LeLièvre et al. (2019) and Pietrysiak, Smith, and Ganjyal (2019), this matter will not be further commented here.

In addition to controlling the occurrence of pathogenic bacteria, it is also crucial to control the development of spoilage bacteria, since it can cause defects in fermented foods and beverages. Phage-based approaches for reducing the development of spoilage bacteria have been investigated in some fermented beverages. For example, phages directed

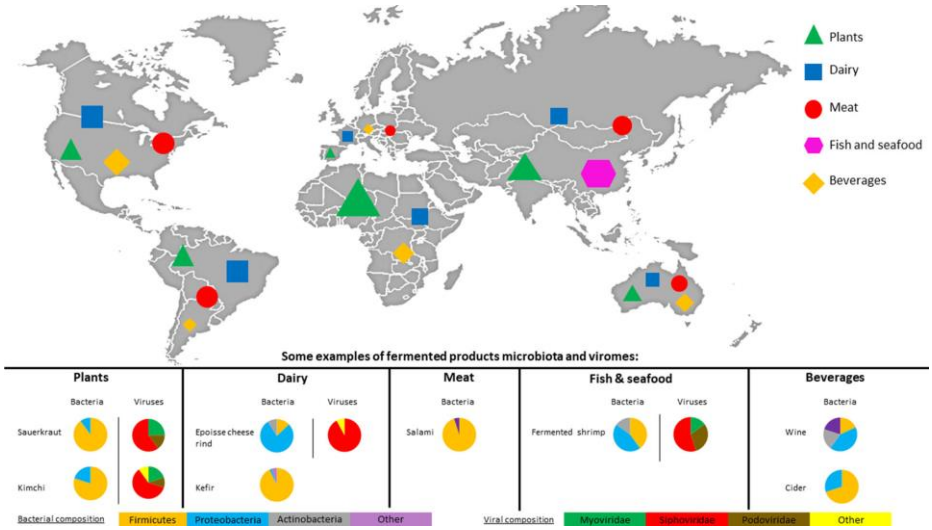


Figure 2. Overview of the major groups of fermented foods consumed all around the world (adapted from Tamang et al. 2020). The regions of production of fermented plants (green triangle), fermented dairy (blue square), fermented meat (red ring), and fermented fish and seafood (pink hexagon) products, and of fermented beverages (yellow diamond) are indicated on the map. The size of the symbols is correlated to the most frequently encountered products. Some examples of fermented products microbiota are given for each group: sauerkraut (Zabat et al. 2018), kimchi (Jung et al. 2013, 2018; Lee et al. 2017, 2019), Epoisse cheese (Dugat-Bony et al. 2016), kefir (Zamberi et al. 2016), salami (Połka et al. 2015), fermented shrimps (Park et al. 2011), wine (Pinto et al. 2015) and cider (personal data). The three viromes of fermented foods known to date are also presented: sauerkraut and fermented shrimps (Park et al. 2011), kimchi (Jung et al. 2018) and Epoisse cheese (Dugat-Bony et al. 2020).

against spoilage LAB such as *Lactobacillus brevis* (Duenas et al. 1995), causing an unwanted taste and spoilage in beer and cider, have been identified and tested for the biocontrol of these bacteria (Deasy et al. 2011; Feyereisen et al. 2019). In wine, phages targeting spoilage bacteria such as *Gluconobacter* (Philippe et al. 2018) and *Acetobacter* (Philippe et al. 2017), two genera responsible for the formation of acetic acid, have been isolated and extensively characterized.

Despite the advantages of biocontrol, some phages can also be responsible for food fermentation defects by targeting LAB starters, and have been extensively studied (Mahony et al. 2016, 2017). Many phages cause problems during the production of dairy food, as they target *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus*, two of the main species used for milk fermentation (Stuer-Lauridsen et al. 2003; Lavelle, Martinez, et al. 2018; Lavelle, Murphy, et al. 2018; Oliveira et al. 2018). Thus, several strategies have been designed to foil phage action in order to protect starters during food fermenting processes (Mahony and Van Sinderen 2014). In fermented beverages, phages potentially causing fermenting defects have been described. In wine, virulent phages targeting *O. oeni* have thus been identified (Jaomanjaka et al. 2016; Costantini et al. 2017), and sequenced (Jaomanjaka et al. 2018). Phages active against *Leuconostoc* and *Weissella* have also been isolated and characterized (Kot et al. 2014). It also appears that many technological *O. oeni* strains can carry prophages and some techniques have been developed to quickly detect them. This can be performed by the detection of integrase genes by PCR, integrases being enzymes that enable phage DNA to integrate into the bacterial chromosome (Jaomanjaka et al. 2013). A simple agar method based on red grape juice has also recently been developed to rapidly detect lysogenic *O. oeni* strains (Chaïb et al. 2019). This partly allows controlling the presence or absence of potentially harmful LAB that could impair fermentation whenever their prophages start a lytic cycle.

Methods for studying microbial communities in foods: are they transposable to the study of phageomes in fermented beverages?

Phageomes and their roles during food fermentation processes may be indirectly monitored by assessing microbial communities which are easier to manipulate. In the complex food matrices fermented beverages represent, the composition and the roles of bacterial communities have been scrutinized. For instance, the evolution of biochemical parameters, such as organic acid and ethanol concentrations, pH, and sugar density were correlated to the bacterial composition during the fermentation process of kombucha tea and wine (Trček, Mahnič, and Rupnik 2016; Coton et al. 2017). In the same way, the analysis of the production of aroma compounds in foods by bacteria has been largely assessed in cheese, wine and vinegars for instance (Schueuermann et al. 2016; Reale et al. 2019). All these approaches could thus be transposed to the study of the influence of phageomes on bacterial communities during other foods and beverages fermentation processes by monitoring bacterial metabolism in the presence of phages.

The direct monitoring of phageomes in foods is more complex, and the studies dealing with phageomes are still at

an early stage. However, in recent years, some methods for describing viromes have been proposed. In order to focus on phageomes, it seems appropriate, in the first instance, to target the whole viral communities. Indeed, the major hurdle in studying viruses, and consequently for the study of phages, is that their propagation involves growing the target hosts under specific conditions, which is impossible when dealing with an entire community, regardless of the considered habitat. Metagenomics, and more specifically shotgun sequencing, is therefore a solution to overcome this problem, since it allows the sequencing of all the genetic material present in a given environment (Thomas, Gilbert, and Meyer 2012), making it the gold standard method for the study of viral diversity. To perform these metagenomic studies, the first step consists in collecting the microorganisms of interest from the samples and proceed to the genetic material extraction. Some protocols have been developed to extract viral DNA from complex matrices. For example, Shkoporov et al. (2018) described a reproducible protocol for the metagenomics analysis of phageome from human feces. These protocols are constantly being optimized and compared with one another for a more precise analysis, in which some steps are added or modified, especially for feces (Kleiner, Hooper, and Duerkop 2015; Milani et al. 2018; d'Humières et al. 2019). These protocols might be extended to other complex matrices, such as foods. In the abovementioned study focusing on Epoisse cheese viromes, Dugat-Bony et al. (2020) used a viral DNA extraction method based on chloroform treatment and filtration steps. It is clear that each method should be adapted to the matrix studied. For now, there has been no protocol published regarding DNA extraction from phageomes of fermented beverage. Developing such a protocol should be made on the basis of the protocols available for other matrices. However, it is important to consider the properties of the fermented beverage matrices. They are generally characterized by a high polyphenol level, which is known to impair viruses (Catel-Ferreira et al. 2015), and to make microbial nucleic acid extraction more difficult. Some molecules, such as Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) and Polyvinylpyrrolidone (PVP), can be used to remove or to restrict polyphenols, like previously described in beer (Mitchell et al. 2005). These molecules have also been used in a method for extracting whole DNA from human and environmental samples for metagenomic studies (Bag et al. 2016). Thus, the use of molecules such as PVPP and PVP should be envisaged for future attempts to extract phageome DNA in fermented beverage matrixes.

After DNA extraction, sequencing occurs using NGS shotgun technologies, which have been thoroughly described by Bruijns, Tiggelaar, and Gardeniers (2018) amongst others. Illumina HiSeq and MiSeq technologies are the most frequently used for describing viromes in fermented foods like kimchi (Jung et al. 2018), in the human gut (Draper et al. 2019), or in marine ecosystems like phytoplankton (Alarcón-Schumacher et al. 2019) (Table 1). Pyrosequencing has also been used for studying viromes in several habitats including foods (Table 1), and thus could also be taken into consideration for phageome analysis in fermented beverages, even if the HiSeq and MiSeq methods are generally preferred in recent works. All the methods based on metagenomic approaches for studying phages communities are largely described in a review by Hayes et al. (2017), in which every stage from sample treatments to sequencing pipelines are described. Contrary to bacterial metagenomics which can be based on the universal 16S rDNA gene (Liu et al. 1997; Jovel et al. 2016), virome studies cannot rely on a universal genetic target, since there is no such universally conserved marker; this is probably due to the paucity of phage-encoded genes relative to bacteria in the databases. The number of available phage genomes is growing rapidly. In February 2020, 14,324 complete genomes of phages were available on the NCBI Virus database (Hatcher et al. 2017) against 6355 reported in December 2015 by Hurwitz, U'Ren, and Youens-Clark (2016). Despite this significant increase, the number of sequenced phages is still too low to carry out fully accurate metagenomic studies, which usually leads to partial and unclassified phage identifications since no sequence homology can be found in current databases (Bikel et al. 2015). Thus, there is a general need to carry on mining phage genomes by isolating and sequencing new phages, and especially phages of food bacteria.

Future perspectives: Is cider a natural reservoir for phageome studies?

Beyond the mere assessment of the composition and diversity of phageomes, and even though it is difficult to identify them, the correlation between bacterial communities and phageomes, depending on the environmental conditions or stresses, remains unexplored. The dynamics and interactions of the different microbial communities are to be precisely deciphered in fermented foods, not to mention in fermented beverages. The literature focusing on phages in fermented beverages is scarce. Among these fermented beverages, cider (fermented apple juice) is of importance since it is produced in more than 25 countries worldwide, with 60% of these beverages being consumed in Europe (Global Data and the European Cider and Fruit Wine Association, 2018). Overall, microbial communities present in cider remain poorly documented. The cider production process relies on the crushing and pressing of apples followed by the most important stage, fermentation (Cousin et al. 2017). The fermentation process is divided into two phases, occurring simultaneously or sequentially: the alcoholic fermentation performed by yeasts, and the malolactic fermentation (TML) run by *O. oeni* (Salih et al. 1988; Sánchez et al. 2012; Cousin et al. 2017). The other LAB encountered in cider are from the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus*, and contribute to the quality and taste of the final product (Cousin et al. 2017). Although phages have not yet been studied in cider, it makes sense to believe that they play an important role on the balance and fluctuations of microbial populations throughout the fermentation process, as it has been suggested that phages can be drivers of microbial diversity in ecosystems (Mills et al. 2013). Phageomes can stabilize

microbial ecosystems during food fermentation, perhaps by inhibiting the proliferation of some microbes while allowing others to grow (May et al. 2019). Based on this hypothesis, it is possible to imagine that phages can be directly or indirectly beneficial to the product. It thus appears significant to understand the microbial communities of such a fermented beverage in the production of sustainable food.

In this review, it has been underlined that the diversity of phage communities is beginning to be described in various ecosystems, such as the environment, the gut or fermented foods. The complexity of such ecosystems makes it difficult to study the impact of phages in situ. From this point of view, cider could be an interesting model. Indeed, the bacterial diversity level seems rather low, compared to other foods and could facilitate experimental approaches and data analysis. Cider communities, including phageomes, could also be more easily modeled through synthetic microbial communities. Nevertheless, cider is also a challenging model as its physico-chemical conditions make it a harsh environment, with low pH values, the presence of ethanol, CO_2, sulfites and polyphenols. Using approaches previously developed to apply to other ecosystems on cider matrix can be a way to understand the role of phages in cider. Acquired knowledge might then be extended to other fermented beverages, and may open doors to new technological advances in the study of fermented beverages.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation under a PhD Grant MENRT.

ORCID

Marion Dalmasso http://orcid.org/0000-0003-1875-2748

References

Ackermann, H.-W., and D. Prangishvili. 2012. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Archives of Virology* 157 (10): 1843–9. doi: 10.1007/s00705-012-1383-y.

Alarcón-Schumacher, T., S. Guajardo-Leiva, J. Antón, and B. Díez. 2019. Elucidating viral communities during a phytoplankton bloom on the West Antarctic Peninsula. *Frontiers in Microbiology* 10: 1014doi: 10.3389/fmicb.2019.01014.

Armour, C. R., S. Nayfach, K. S. Pollard, and T. J. Sharpton. 2019. A metagenomic meta-analysis reveals functional signatures of health and disease in the human gut microbiome. *MSystems* 4 (4):e00332. doi: 10.1128/mSystems.00332-18.

Bag, S., B. Saha, O. Mehta, D. Anbumani, N. Kumar, M. Dayal, A. Pant, P. Kumar, S. Saxena, K. H. Allin, et al. 2016. An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples. *Scientific Reports* 6 (1):26775–9. doi: 10.1038/srep26775.

Beuve, M., J.-M. Hily, A. Alliaume, C. Reinbold, J. Le Maguet, T. Candresse, E. Herrbach, and O. Lemaire. 2018. A complex virome unveiled by deep sequencing analysis of RNAs from a French Pinot Noir grapevine exhibiting strong leafroll symptoms. *Archives of Virology* 163 (11):2937–46. doi: 10.1007/s00705-018-3949-9.

Bikel, S., A. Valdez-Lara, F. Cornejo-Granados, K. Rico, S. Canizales-Quinteros, X. Soberón, L. Del Pozo-Yauner, and A. Ochoa-Leyva. 2015. Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: Towards a systems-level understanding of human microbiome. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 13:390–401. doi: 10.1016/j.csbj.2015.06.001.

Breitbart, M., and F. Rohwer. 2005. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology* 13 (6):278–84. doi: 10.1016/j.tim.2005.04.003.

Bruijns, B.,. R. Tiggelaar, and H. Gardeniers. 2018. Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review. *Electrophoresis* 39 (21):2642–54. doi: 10.1002/elps.201800082.

Catel-Ferreira, M., H. Tnani, C. Hellio, P. Cosette, and L. Lebrun. 2015. Antiviral effects of polyphenols: Development of bio-based cleaning wipes and filters. *Journal of Virological Methods* 212:1–7. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.10.008.

Chaïb, A., C. Philippe, F. Jaomanjaka, O. Claisse, M. Jourdes, P. Lucas, S. Cluzet, and C. L. Marrec. 2019. Lysogeny in the lactic acid bacterium *oenococcus oeni* is responsible for modified colony morphology on red grape juice agar. *Applied and Environmental Microbiology* 85 (19):e00997. doi: 10.1128/AEM.00997-19.

Clooney, A. G., F. Fouhy, R. D. Sleator, A. O. Driscoll, C. Stanton, P. D. Cotter, and M. J. Claesson. 2016. Comparing apples and oranges? Next generation sequencing and its impact on microbiome analysis. *PLoS ONE* 11 (2):e0148028doi: 10.1371/journal.pone.0148028.

Conceição-Neto, N., M. Zeller, H. Lefrère, P. De Bruyn, L. Beller, W. Deboutte, C. K. Yinda, R. Lavigne, P. Maes, M. V. Ranst, et al. 2015. Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: A reproducible protocol for virome analysis. *Scientific Reports* 5 (1):16532–14. doi: 10.1038/srep16532.

Costantini, A., F. Doria, J.-C. Saiz, and E. Garcia-Moruno. 2017. Phage-host interactions analysis of newly characterized *Oenococcus oeni* bacteriophages: Implications for malolactic fermentation in wine. *International Journal of Food Microbiology* 246:12–9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.020.

Coton, M., A. Pawtowski, B. Taminiau, G. Burgaud, F. Deniel, L. Coulloumme-Labarthe, A. Fall, G. Daube, and E. Coton. 2017. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology* 93 (5):fix048. doi: 10.1093/femsec/fix048.

Cousin, F. J., R. Le Guellec, M. Schlusselhuber, M. Dalmasso, J.-M. Laplace, and M. Cretenet. 2017. Microorganisms in fermented apple beverages: Current knowledge and future directions. *Microorganisms* 5 (3):39.

Dalmasso, M., C. Hill, and R. P. Ross. 2014. Exploiting gut bacteriophages for human health. *Trends in Microbiology* 22 (7):399–405. doi: 10.1016/j.tim.2014.02.010.

Deasy, T., J. Mahony, H. Neve, K. J. Heller, and D. Van Sinderen. 2011. Isolation of a virulent *Lactobacillus brevis* phage and its application in the control of beer spoilage. *Journal of Food Protection* 74 (12):2157–61. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-262.

Deng, L., R. Silins, J. L. Castro-Mejía, W. Kot, L. Jessen, J. Thorsen, S. Shah, J. Stokholm, H. Bisgaard, S. Moineau, et al. 2019. A protocol for extraction of infective viromes suitable for metagenomics sequencing from low volume fecal samples. *Viruses* 11 (7):667. doi: 10.3390/v11070667.

Dinan, T. G., and J. F. Cryan. 2017. Brain-gut-microbiota axis and mental health. *Psychosomatic Medicine* 79 (8):920–6. doi: 10.1097/PSY.0000000000000519.

Draper, L. A., F. J. Ryan, M. Dalmasso, P. G. Casey, A. McCann, V. Velayudhan, R. P. Ross, and C. Hill. 2019. Autochthonous faecal virome transplantation (FVT) reshapes the murine microbiome after antibiotic perturbation. Biorxiv 591099.

Duenas, M., A. Irastorza, K. Fernandez, and A. Bilbao. 1995. Heterofermentative Lactobacilli causing ropiness in Basque country ciders. *Journal of Food Protection* 58 (1):76–80. doi: 10.4315/0362-028X-58.1.76.

Dugat-Bony, E., J. Lossouarn, M. De Paepe, A.-S. Sarthou, Y. Fedala, M.-A. Petit, and S. Chaillou. 2020. Viral metagenomic analysis of the cheese surface: A comparative study of rapid procedures for extracting viral particles. *Food Microbiology* 85:103278doi: 10.1016/j.fm.2019.103278.

Dugat-Bony, E., L. Garnier, J. Denonfoux, S. Ferreira, A. S. Sarthou, P. Bonnarme, and F. Irlinger. 2016. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology* 238:265–73. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026.

Dugat-Bony, E., C. Straub, A. Teissandier, D. Onésime, V. Loux, C. Monnet, F. Irlinger, S. Landaud, M.-N. Leclercq-Perlat, P. Bento, et al. 2015. Overview of a surface-ripened cheese community functioning by meta-omics analyses. *Plos ONE* 10 (4):e0124360doi: 10.1371/journal.pone.0124360.

Feyereisen, M., J. Mahony, G. A. Lugli, M. Ventura, H. Neve, C. M. Franz, J.-P. Noben, T. O'Sullivan, and D. Sinderen. 2019. Isolation and characterization of *Lactobacillus brevis* phages. *Viruses* 11 (5): 393. doi: 10.3390/v11050393.

García, P., B. Martínez, J. M. Obeso, and A. Rodríguez. 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology* 47 (6):479–85. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02458.x.

Hatcher, E. L., S. A. Zhdanov, Y. Bao, O. Blinkova, E. P. Nawrocki, Y. Ostapchuck, A. A. Schäffer, and J. R. Brister. 2017. Virus variation resource - Improved response to emergent viral outbreaks. *Nucleic Acids Research* 45 (D1):D482–D490. doi: 10.1093/nar/gkw1065.

Hayes, S., J. Mahony, A. Nauta, and D. Van Sinderen. 2017. Metagenomic approaches to assess bacteriophages in various environmental niches. *Viruses* 9 (6):127. doi: 10.3390/v9060127.

d'Humières, C., M. Touchon, S. Dion, J. Cury, A. Ghozlane, M. Garcia-Garcera, C. Bouchier, L. Ma, E. Denamur, and E. P.C.Rocha. 2019. A simple, reproducible and cost-effective procedure to analyse gut phageome: From phage isolation to bioinformatic approach. *Scientific Reports* 9 (1):1–13. doi: 10.1038/s41598-019-47656-w.

Hurwitz, B. L., J. M. U'Ren, and K. Youens-Clark. 2016. Computational prospecting the great viral unknown. *FEMS Microbiology Letters* 363 (10):fnw077. doi: 10.1093/femsle/fnw077.

Janež, N., and C. Loc-Carrillo. 2013. Use of phages to control Campylobacter spp. *Journal of Microbiological Methods* 95 (1):68–75. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.024.

Jaomanjaka, F., P. Ballestra, M. Dols-Lafargue, and C. Le Marrec. 2013. Expanding the diversity of oenococcal bacteriophages: Insights into a novel group based on the integrase sequence. *International Journal of Food Microbiology* 166 (2):331–40. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.032.

Jaomanjaka, F., O. Claisse, M. Blanche-Barbat, M. Petrel, P. Ballestra, and C. Le Marrec. 2016. Characterization of a new virulent phage infecting the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology* 54:167–77. doi: 10.1016/j.fm.2015.09.016.

Jaomanjaka, F., O. Claisse, C. Philippe, and C. Le Marrec. 2018. Complete genome sequence of lytic *Oenococcus oeni* bacteriophage OE33PA. *Microbiology Resource Announcements* 7 (6):e00818. doi: 10.1128/MRA.00818-18.

Jovel, J.,. J. Patterson, W. Wang, N. Hotte, S. O'Keefe, T. Mitchel, T. Perry, D. Kao, A. L. Mason, K. L. Madsen, et al. 2016. Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. *Frontiers in Microbiology* 7: 459. doi: 10.3389/fmicb.2016.00459.

Jung, J. Y., S. H. Lee, H. M. Jin, Y. Hahn, E. L. Madsen, and C. O. Jeon. 2013. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 163 (2-3):171–9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.022.

Jung, M.-J., M.-S. Kim, J.-H. Yun, J.-Y. Lee, P. S. Kim, H.-W. Lee, J.-H. Ha, S. W. Roh, and J.-W. Bae. 2018. Viral community predicts the geographical origin of fermented vegetable foods more precisely than bacterial community. *Food Microbiology* 76:319–27. doi: 10.1016/j.fm.2018.06.010.

Kim, M.-S., and J.-W. Bae. 2018. Lysogeny is prevalent and widely distributed in the murine gut microbiota. *The ISME Journal* 12 (4): 1127–41. doi: 10.1038/s41396-018-0061-9.

King, A. M. Q., M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz. eds., 2012. Order - Caudovirales. In *Virus taxonomy*, 39–45. San Diego: Elsevier.

Kleiner, M., L. V. Hooper, and B. A. Duerkop. 2015. Evaluation of methods to purify virus-like particles for metagenomic sequencing of intestinal viromes. *BMC Genomics* 16 (1):7doi: 10.1186/s12864-014-1207-4.

Knowles, B., C. B. Silveira, B. A. Bailey, K. Barott, V. A. Cantu, A. G. Cobián-Güemes, F. H. Coutinho, E. A. Dinsdale, B. Felts, K. A. Furby, et al. 2016. Lytic to temperate switching of viral communities. *Nature* 531 (7595):466–70. doi: 10.1038/nature17193.

Kot, W., H. Neve, K. J. Heller, and F. K. Vogensen. 2014. Bacteriophages of *Leuconostoc, Oenococcus*, and *Weissella*. *Frontiers in Microbiology* 5:186. doi: 10.3389/fmicb.2014.00186.

Kurokawa, K.,. T. Itoh, T. Kuwahara, K. Oshima, H. Toh, A. Toyoda, H. Takami, H. Morita, V. K. Sharma, T. P. Srivastava, et al. 2007. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 14 (4):169–81. doi: 10.1093/dnares/dsm018.

Lavelle, K., I. Martinez, H. Neve, G. A. Lugli, C. M. A. P. Franz, M. Ventura, F. D. Bello, D. V. Sinderen, and J. Mahony. 2018. Biodiversity of *Streptococcus thermophilus* phages in global dairy fermentations. *Viruses* 10 (10):577. doi: 10.3390/v10100577.

Lavelle, K., J. Murphy, B. Fitzgerald, G. A. Lugli, A. Zomer, H. Neve, M. Ventura, C. M. Franz, C. Cambillau, D. Sinderen, et al. 2018. A decade of *Streptococcus thermophilus* phage evolution in an Irish dairy plant. *Applied and Environmental Microbiology* 84 (10):e02855-17. doi: 10.1128/AEM.02855-17.

Lee, M., J. H. Song, M. Y. Jung, S. H. Lee, and J. Y. Chang. 2017. Large-scale targeted metagenomics analysis of bacterial ecological changes in 88 kimchi samples during fermentation. *Food Microbiology* 66:173–83. doi: 10.1016/j.fm.2017.05.002.

Lee, M., J. H. Song, J. M. Park, and J. Y. Chang. 2019. Bacterial diversity in Korean temple kimchi fermentation. *Food Research International (Ottawa, Ont.)* 126:108592doi: 10.1016/j.foodres.2019.108592.

Lefkowitz, E. J., D. M. Dempsey, R. C. Hendrickson, R. J. Orton, S. G. Siddell, and D. B. Smith. 2018. Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)). *Nucleic Acids Res* 46 (D1):D708–D717. doi: 10.1093/nar/gkx932.

LeLièvre, V., A. Besnard, M. Schlusselhuber, N. Desmasures, and M. Dalmasso. 2019. Phages for biocontrol in foods: What opportunities for *Salmonella* sp. control along the dairy food chain? *Food Microbiology* 78:89–98. doi: 10.1016/j.fm.2018.10.009.

Li, L., J. G. Victoria, C. Wang, M. Jones, G. M. Fellers, T. H. Kunz, and E. Delwart. 2010. Bat guano virome: Predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *Journal of Virology* 84 (14):6955–65. doi: 10.1128/JVI.00501-10.

Lim, E. S., Y. Zhou, G. Zhao, I. K. Bauer, L. Droit, I. M. Ndao, B. B. Warner, P. I. Tarr, D. Wang, and L. R. Holtz. 2015. Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nature Medicine* 21 (10):1228–34. doi: 10.1038/nm.3950.

Liu, W.-T., T. L. Marsh, H. Cheng, and L. J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (11):4516–22. doi: 10.1128/AEM.63.11.4516-4522.1997.

López-Bueno, A., J. Tamames, D. Velázquez, A. Moya, A. Quesada, and A. Alcamí. 2009. High diversity of the viral community from an Antarctic Lake. *Science (New York, N.Y.)* 326 (5954):858–61. doi: 10.1126/science.1179287.

Luque, A., and C. Silveira. 2020. Quantification of lysogeny caused by phage coinfections in microbial communities from biophysical principles. bioRxiv 2020.

Ma, Y., A. Marais, M. Lefebvre, S. Theil, L. Svanella-Dumas, C. Faure, and T. Candresse. 2019. Phytovirome analysis of wild plant populations: Comparison of double-stranded RNA and virion-associated nucleic acid metagenomic approaches. *Journal of Virology* 94 (1): e0146219. doi: 10.1128/JVI.01462-19.

Ma, Y., X. You, G. Mai, T. Tokuyasu, and C. Liu. 2018. A human gut phage catalog correlates the gut phageome with type 2 diabetes. *Microbiome* 6 (1):24. doi: 10.1186/s40168-018-0410-y.

Mahony, J., A. Moscarelli, P. Kelleher, G. A. Lugli, M. Ventura, L. Settanni, and D. Van Sinderen. 2017. Phage biodiversity in artisanal cheese wheys reflects the complexity of the fermentation process. *Viruses* 9 (3):45. doi: 10.3390/v9030045.

Mahony, J., S. R. Stockdale, B. Collins, S. Spinelli, F. P. Douillard, C. Cambillau, and D. Van Sinderen. 2016. *Lactococcus lactis* phage TP901-1 as a model for Siphoviridae virion assembly. *Bacteriophage* 6 (1):e1123795doi: 10.1080/21597081.2015.1123795.

Mahony, J., and D. Van Sinderen. 2014. Current taxonomy of phages infecting lactic acid bacteria. *Frontiers in Microbiology* 5:7. doi: 10.3389/fmicb.2014.00007.

Manrique, P., B. Bolduc, S. T. Walk, J. van der Oost, W. M. de Vos, and M. J. Young. 2016. Healthy human gut phageome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (37):10400–5. doi: 10.1073/pnas.1601060113.

Marco, M. L., D. Heeney, S. Binda, C. J. Cifelli, P. D. Cotter, B. Foligné, M. Gänzle, R. Kort, G. Pasin, A. Pihlanto, et al. 2017. Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology* 44:94–102. doi: 10.1016/j.copbio.2016.11.010.

Marsh, A. J., C. Hill, R. P. Ross, and P. D. Cotter. 2014. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology* 38 (2):113–24. doi: 10.1016/j.tifs.2014.05.002.

Mavrich, T. N., E. Casey, J. Oliveira, F. Bottacini, K. James, C. M. A. P. Franz, G. A. Lugli, H. Neve, M. Ventura, G. F. Hatfull, et al. 2018. Characterization and induction of prophages in human gut-associated *Bifidobacterium* hosts. *Scientific Reports* 8 (1):12772. doi: 10.1038/s41598-018-31181-3.

May, A., S. Narayanan, J. Alcock, A. Varsani, C. Maley, and A. Aktipis. 2019. Kombucha: A novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ* 7:e7565. doi: 10.7717/peerj.7565.

Milani, C., E. Casey, G. A. Lugli, R. Moore, J. Kaczorowska, C. Feehily, M. Mangifesta, L. Mancabelli, S. Duranti, F. Turroni, et al. 2018. Tracing mother-infant transmission of bacteriophages by means of a novel analytical tool for shotgun metagenomic datasets: METAnnotatorX. *Microbiome* 6 (1):145. doi: 10.1186/s40168-018-0527-z.

Mills, S., F. Shanahan, C. Stanton, C. Hill, A. Coffey, and R. P. Ross. 2013. Movers and shakers: Influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota. *Gut Microbes* 4 (1):4–16. doi: 10.4161/gmic.22371.

Minot, S., A. Bryson, C. Chehoud, G. D. Wu, J. D. Lewis, and F. D. Bushman. 2013. Rapid evolution of the human gut virome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (30):12450–5. doi: 10.1073/pnas.1300833110.

Minot, S., R. Sinha, J. Chen, H. Li, S. A. Keilbaugh, G. D. Wu, J. D. Lewis, and F. D. Bushman. 2011. The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res* 21 (10): 1616–25. doi: 10.1101/gr.122705.111.

Mitchell, A. E., Y.-J. Hong, J. C. May, C. A. Wright, and C. W. Bamforth. 2005. A comparison of polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), silica xerogel and a polyvinylpyrrolidone (PVP)–silica co-product for their ability to remove polyphenols from beer. *Journal of the Institute of Brewing* 111 (1):20–5. doi: 10.1002/j.2050-0416.2005.tb00644.x.

Moreno, P. S., J. Wagner, C. S. Mansfield, M. Stevens, J. R. Gilkerson, and C. D. Kirkwood. 2017. Characterisation of the canine faecal virome in healthy dogs and dogs with acute diarrhoea using shotgun metagenomics. *PLoS ONE* 12 (6):e0178433. doi: 10.1371/journal.pone.0178433.

Nalbantoglu, U., A. Cakar, H. Dogan, N. Abaci, D. Ustek, K. Sayood, and H. Can. 2014. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. *Food microbiology* 41:42–51. doi: 10.1016/j.fm.2014.01.014.

Nieminen, T. T., K. Koskinen, P. Laine, J. Hultman, E. Säde, L. Paulin, A. Paloranta, P. Johansson, J. Björkroth, and P. Auvinen. 2012. Comparison of microbial communities in marinated and unmarinated broiler meat by metagenomics. *International Journal of Food Microbiology* 157 (2):142–9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.016.

Nishida, A., R. Inoue, O. Inatomi, S. Bamba, Y. Naito, and A. Andoh. 2018. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical Journal of Gastroenterology* 11 (1):1–10. doi: 10.1007/s12328-017-0813-5.

Norman, J. M., S. A. Handley, M. T. Baldridge, L. Droit, C. Y. Liu, B. C. Keller, A. Kambal, C. L. Monaco, G. Zhao, P. Fleshner, et al. 2015. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 160 (3):447–60. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.002.

Oliveira, J., J. Mahony, L. Hanemaaijer, T. R. H. M. Kouwen, and D. van Sinderen. 2018. Biodiversity of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis* starter cultures. *Journal of Dairy Science* 101 (1): 96–105. doi: 10.3168/jds.2017-13403.

O'Toole, P. W., and I. B. Jeffery. 2015. Gut microbiota and aging. *Science (New York, N.Y.)* 350 (6265):1214–5. doi: 10.1126/science.aac8469.

Parikka, K. J., S. Jacquet, J. Colombet, D. Guillaume, and M. Le Romancer. 2018. Abundance and observations of thermophilic microbial and viral communities in submarine and terrestrial hot fluid systems of the French Southern and Antarctic Lands. *Polar Biology* 41 (7):1335–52. doi: 10.1007/s00300-018-2288-3.

Park, E.-J., K.-H. Kim, G. C. Abell, M.-S. Kim, S. W. Roh, and J.-W. Bae. 2011. Metagenomic analysis of the viral communities in fermented foods. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (4): 1284–91. doi: 10.1128/AEM.01859-10.

Patterson, E., P. M. Ryan, J. F. Cryan, T. G. Dinan, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and C. Stanton. 2016. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgraduate Medical Journal* 92 (1087):286–300. doi: 10.1136/postgradmedj-2015-133285.

Philippe, C., F. Jaomanjaka, O. Claisse, R. Laforgue, J. Maupeu, M. Petrel, and C. Le Marrec. 2017. A survey of oenophages during wine making reveals a novel group with unusual genomic characteristics. *International Journal of Food Microbiology* 257:138–47. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.014.

Philippe, C., M. Krupovic, F. Jaomanjaka, O. Claisse, M. Petrel, and C. Le Marrec. 2018. Bacteriophage GC1, a novel tectivirus infecting *Gluconobacter cerinus*, an acetic acid bacterium associated with wine-making. *Viruses* 10 (1):39. doi: 10.3390/v10010039.

Pietrysiak, E., S. Smith, and G. M. Ganjyal. 2019. Food safety interventions to control *Listeria monocytogenes* in the fresh apple packing industry: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18 (6):1705–26. doi: 10.1111/1541-4337.12496.

Pinto, C., D. Pinho, R. Cardoso, V. Custódio, J. Fernandes, S. Sousa, M. Pinheiro, C. Egas, and A. C. Gomes. 2015. Wine fermentation microbiome: A landscape from different Portuguese wine appellations. *Frontiers in Microbiology* 6: 905. doi: 10.3389/fmicb.2015.00905.

Połaska, M., and B. Sokołowska. 2019. Bacteriophages-a new hope or a huge problem in the food industry. *AIMS Microbiology* 5 (4): 324–46. doi: 10.3934/microbiol.2019.4.324.

Połka, J., A. Rebecchi, V. Pisacane, L. Morelli, and E. Puglisi. 2015. Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons. *Food Microbiology* 46:342–56. doi: 10.1016/j.fm.2014.08.023.

Quigley, E. M. M. 2017. Microbiota-BRAIN-GUT AXIS AND NEURODEGENERATIVE DISEASES. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 17 (12):94doi: 10.1007/s11910-017-0802-6.

Reale, A., T. Di Renzo, F. Boscaino, F. Nazzaro, F. Fratianni, and M. Aponte. 2019. Lactic acid bacteria biota and aroma profile of Italian

traditional sourdoughs from the Irpinian Area in Italy. *Frontiers in Microbiology* 10:1621. doi: 10.3389/fmicb.2019.01621.

Roux, S., J. R. Brum, B. E. Dutilh, S. Sunagawa, M. B. Duhaime, A. Loy, B. T. Poulos, N. Solonenko, E. Lara, J. Poulain, et al. 2016. Ecogenomics and potential biogeochemical impacts of globally abundant ocean viruses. *Nature* 537 (7622):689–93., doi: 10.1038/nature19366.

Salih, A. G., J. F. Drilleau, F. F. Cavin, C. Divies, and C. M. Bourgeois. 1988. A survey of microbiological aspects of cider making. *Journal of the Institute of Brewing* 94 (1):5–8. doi: 10.1002/j.2050-0416.1988.tb04545.x.

Sánchez, A., M. Coton, E. Coton, M. Herrero, L. A. García, and M. Díaz. 2012. Prevalent lactic acid bacteria in cider cellars and efficiency of *Oenococcus oeni* strains. *Food Microbiol* 32 (1):32–7. doi: 10.1016/j.fm.2012.02.008.

Schueuermann, C., B. Khakimov, S. B. Engelsen, P. Bremer, and P. Silcock. 2016. GC-MS metabolite profiling of extreme southern pinot noir wines: Effects of vintage, barrel maturation, and fermentation dominate over vineyard site and clone selection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (11):2342–51. doi: 10.1021/acs.jafc.5b05861.

Scott, A. J., J. L. Alexander, C. A. Merrifield, D. Cunningham, C. Jobin, R. Brown, J. Alverdy, S. J. O'Keefe, H. R. Gaskins, J. Teare, et al. 2019. International Cancer Microbiome Consortium consensus statement on the role of the human microbiome in carcinogenesis. *Gut* 68 (9):1624–32. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318556.

Selhub, E. M., A. C. Logan, and A. C. Bested. 2014. Fermented foods, microbiota, and mental health: Ancient practice meets nutritional psychiatry. *Journal of Physiological Anthropology* 33 (1):2. doi: 10.1186/1880-6805-33-2.

Seth, R. K., R. Maqsood, A. Mondal, D. Bose, D. Kimono, L. A. Holland, P. Janulewicz Lloyd, N. Klimas, R. D. Horner, K. Sullivan, et al. 2019. Gut DNA virome diversity and its association with host bacteria regulate inflammatory phenotype and neuronal immunotoxicity in experimental gulf war illness. *Viruses* 11 (10):968. doi: 10.3390/v11100968.

Shkoporov, A. N., and C. Hill. 2019. Bacteriophages of the human gut: The "Known Unknown" of the microbiome. *Cell Host Microbe* 25 (2):195–209. doi: 10.1016/j.chom.2019.01.017.

Shkoporov, A. N., F. J. Ryan, L. A. Draper, A. Forde, S. R. Stockdale, K. M. Daly, S. A. McDonnell, J. A. Nolan, T. D. S. Sutton, M. Dalmasso, et al. 2018. Reproducible protocols for metagenomic analysis of human faecal phageomes. *Microbiome* 6 (1):68. doi: 10.1186/s40168-018-0446-z.

Stuer-Lauridsen, B., T. Janzen, J. Schnabl, and E. Johansen. 2003. Identification of the host determinant of two prolate-headed phages infecting *Lactococcus lactis*. *Virology* 309 (1):10–7. doi: 10.1016/S0042-6822(03)00012-6.

Tamang, J. P., P. D. Cotter, A. Endo, N. S. Han, R. Kort, S. Q. Liu, B. Mayo, N. Westerik, and R. Hutkins. 2020. Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19 (1):184–217. doi: 10.1111/1541-4337.12520.

Thomas, T., J. Gilbert, and F. Meyer. 2012. Metagenomics – A guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation* 2 (1):3. doi: 10.1186/2042-5783-2-3.

Trček, J., A. Mahnič, and M. Rupnik. 2016. Diversity of the microbiota involved in wine and organic apple cider submerged vinegar production as revealed by DHPLC analysis and next-generation sequencing. *International Journal of Food Microbiology* 223:57–62. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.007.

Wei, H., R. H. Cheng, J. Berriman, W. J. Rice, D. L. Stokes, A. Katz, D. G. Morgan, and P. Gottlieb. 2009. Three-dimensional structure of the enveloped bacteriophage phi12: An incomplete T = 13 lattice is superposed on an enclosed T = 1 shell. *PLoS ONE* 4 (9):e6850. doi: 10.1371/journal.pone.0006850.

Wolfe, B. E., J. E. Button, M. Santarelli, and R. J. Dutton. 2014. Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell* 158 (2):422–33. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.041.

Yolken, R. H., E. G. Severance, S. Sabunciyan, K. L. Gressitt, O. Chen, C. Stallings, A. Origoni, E. Katsafanas, L. A. B. Schweinfurth, C. L. G. Savage, et al. 2015. Metagenomic sequencing indicates that the oropharyngeal phageome of individuals with schizophrenia differs from that of controls. *Schizophrenia Bulletin* 41 (5):1153–61. doi: 10.1093/schbul/sbu197.

Zabat, M. A., W. H. Sano, J. I. Wurster, D. J. Cabral, and P. Belenky. 2018. Microbial community analysis of sauerkraut fermentation reveals a stable and rapidly established community. *Foods* 7 (5):77. doi: 10.3390/foods7050077.

Zamberi, N. R., N. E. Mohamad, S. K. Yeap, H. Ky, B. K. Beh, W. C. Liew, S. W. Tan, W. Y. Ho, S. Y. Boo, Y. H. Chua, et al. 2016. 16S Metagenomic microbial composition analysis of kefir grain using MEGAN and BaseSpace. *Food Biotechnology* 30 (3):219–30. doi: 10.1080/08905436.2016.1200987.

2.3.3 Éléments complémentaires

Depuis la parution de la revue, d'autres études et/ou revues ont souligné l'importance de prendre en compte l'étude des phageomes dans les aliments fermentés. C'est notamment le cas des travaux de Paillet et Dugat-Bony, (2021), de Maske *et al.,* (2021) ainsi que de Mahony et van Sinderen, (2022). Une nouvelle étude portant sur la fermentation du kimchi, a montré que les phages modulaient les communautés bactériennes associées aux procédés de fermentation et que les myophages, les siphophages et les podophages étaient les familles de phages les plus rencontrées. Au fur et à mesure de la fermentation, les phages ciblant des bactéries appartenant au phylum des *Pseudomonadota*, anciennement *Proteobacteria* (*Acinetobacter*, *Cronobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*) diminuaient alors que les phages ciblant des bactéries du phylum des *Bacillota*, anciennement *Firmicutes* (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella*) augmentaient (Jung *et al*., 2022). Une autre étude s'est intéressée au virome de l'air ambiant de deux fromageries montrant que les myophages, les siphophages, les podophages et les anciennes familles *Mimiviridae* et *Phycodnaviridae*, étaient retrouvées, et que cela pouvait être une source de phages dans le fromage pendant sa fabrication (Colombo *et al.,* 2018). D'autres ont été menées sur des viromes/phageomes provenant d'autres écosystèmes, comme chez le porc (Barrón-Rodríguez *et al.,* 2021; Nantel-Fortier *et al.,* 2021), les insectes (Li *et al.,* 2022), le sol (Sorensen *et al.,* 2021), le microbiote vaginal (H.-T. Zhang *et al.,* 2021), l'appareil respiratoire (Rajagopala *et al.,* 2021) ou encore dans le microbiote intestinal humain (Cao *et al.,* 2020; Liang *et al.,* 2020; F. Zhang *et al.,* 2021).

Un autre aspect commence à être pris en compte dans les études, et concerne les prophages au sein des génomes bactériens mais également dans des études de métagénomes. Il a, par exemple, été montré que dans les fèces de porc, les prophages ne contenaient pas ou que très peu de gènes de résistance aux antibiotiques et donc que la transmission de ces gènes se faisaient vraisemblablement par un autre moyen (Billaud *et al.,* 2021). Des méthodes ont commencé à être développées pour identifier l'état d'activité de prophages dans des données de métagénomique. Un outil comme PropagAtE (Prophage Activity Estimator), est capable d'identifier automatiquement le stade d'un prophage (stade lytique après induction, ou tempéré) grâce à des analyses statistiques déterminant les prophages à réplication active dans des données de séquençage (Kieft and Anantharaman, 2022). Des données commencent donc à voir le jour mais, à notre connaissance, aucune étude de ce type n'a été publiée concernant les aliments fermentés au moment de la rédaction de ce manuscrit.

La présence de prophages au sein même de génomes bactériens a été étudiée de manière plus poussée ces dernières années. Une étude a montré que sur 1472 génomes de *Lactobacillus sensu lato* disponibles, 99,8% présentaient des fragments de prophages et 64,1% avaient des prophages intacts (Pei *et al.*, 2021). Des travaux ont également été menés sur 231 génomes de l'espèce *O. oeni* en s'intéressant aux sites d'insertion des prophages et leur prévalence. Il a ainsi été montré que 134/231 souches possédaient des prophages intacts dans leur génome, et que ces prophages étaient globalement situés au niveau de six sites d'insertions (Claisse *et al.*, 2021). Cet aspect d'étude des prophages dans les génomes et les métagénomes bactériens reste à être pris en compte afin de clarifier par exemple leur implication sur la fitness, le métabolisme et les interactions bactériennes au sein des communautés auxquelles ils sont associés.

OBJECTIFS DU PROJET DE THÈSE

Les bactériophages jouent vraisemblablement un rôle important dans la construction, l'équilibre et les fluctuations des populations microbiennes des différents écosystèmes auxquels ils sont associés. Les communautés bactériennes des écosystèmes alimentaires sont bien étudiées, cependant il existe un manque flagrant de données à propos de la diversité, de l'impact et de l'influence des communautés de phages sur les communautés microbiennes auxquelles ils sont associés au sein des produits alimentaires. Ce projet de thèse visait à apporter de nouvelles connaissances relatives aux communautés phagiques dans les boissons fermentées. Le modèle qui a été choisi pour cette étude est une boisson fermentée de la région Normandie : le cidre. L'objectif était de faire un premier état des lieux de la diversité des phages dans la matrice cidre et de mieux comprendre, en utilisant des communautés microbiennes modèles, les mécanismes d'interactions entre les phages et les bactéries qui peuvent avoir lieu dans une matrice alimentaire fermentée. La thèse s'est articulée autour de trois volets (**Figure 23**).

Le premier enjeu de ce travail (WP1) était d'étudier la diversité du phageome lytique du cidre. Ce travail a été mené en comparant les communautés de phages chez deux producteurs différents au cours du procédé de fermentation, afin d'obtenir des informations sur l'évolution de la diversité des communautés phagiques pendant l'élaboration du produit. L'exploration du phageome lytique et des prophages a été effectuée grâce à une étude métagénomique dans les différents échantillons.

Le deuxième volet de la thèse (WP2) visait à explorer le potentiel des phages en tant que moteurs de la diversité microbienne dans un modèle de communauté synthétique inspirée du cidre, après une perturbation. Les dynamiques microbiennes ont été étudiées et couplées avec des analyses par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) afin de suivre les paramètres chimiques comme la consommation des sucres, la production d'acides organiques et de composés volatils.

Enfin, le troisième axe de cette thèse (WP3) concernait l'étude de la réponse transcriptomique et protéomique d'une souche bactérienne issue du cidre à une infection par un phage lytique, au sein d'une communauté bactérienne synthétique. Le transcriptome et le protéome de cette réponse ont pu être étudiés par des approches de RNA-Seq et de protéomique globale.

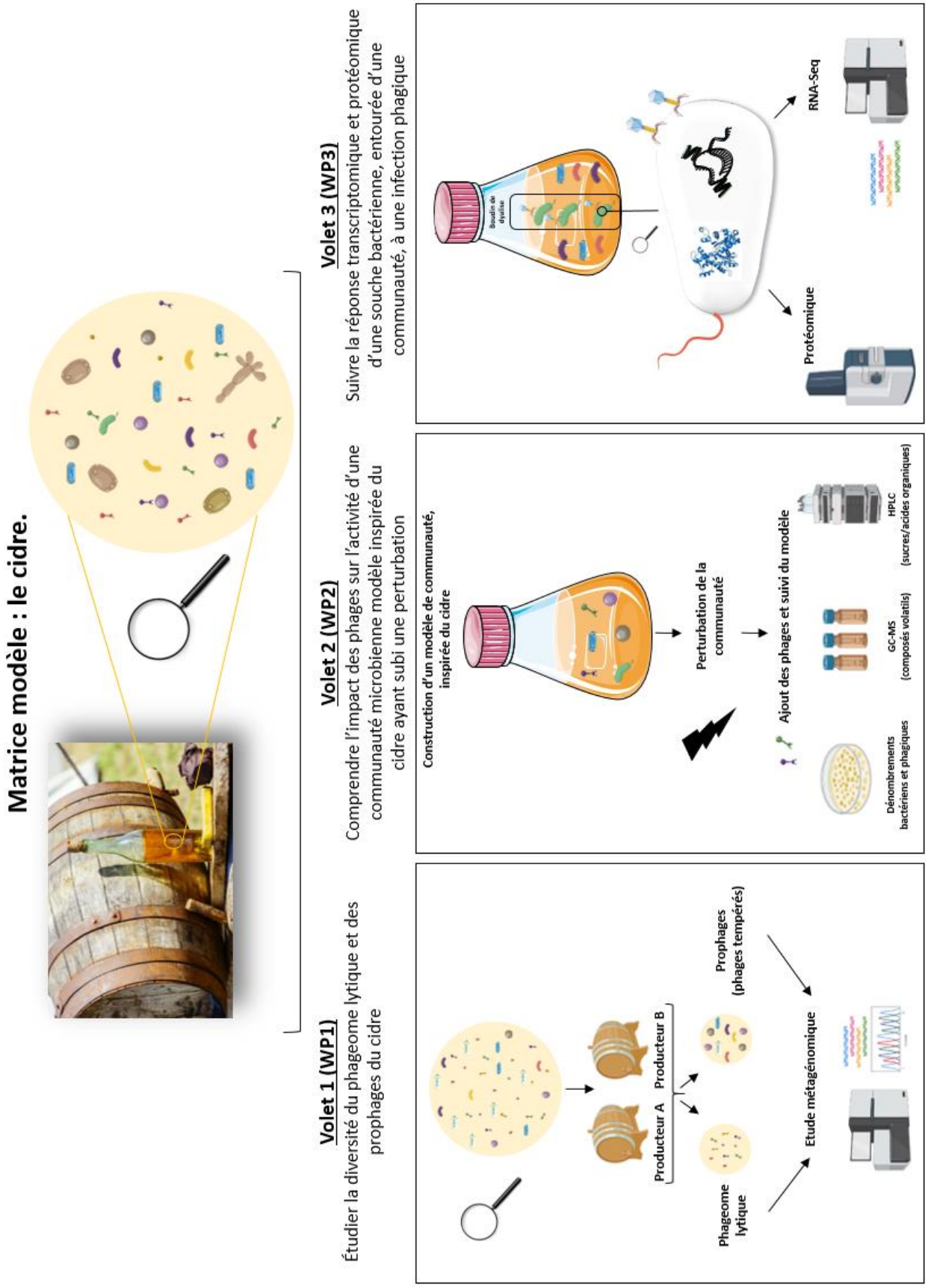


Figure 23 : Stratégie globale du projet de thèse.

MATÉRIELS

&

MÉTHODES

Cette section présente l'ensemble des matériels et méthodes utilisés lors de toutes les expériences réalisées pendant ce projet de thèse, aussi bien celles décrites dans les publications issues de ce travail que celles réalisées en complément des travaux publiés.

1. Microbiologie générale du projet de thèse

1.1 Souches microbiennes et phages utilisés

L'ensemble des bactéries, des levures et des phages utilisés dans ces travaux de thèse sont listés en **Annexe 1**. Parmi eux, 160 souches bactériennes et deux souches de levures appartiennent à la collection Université de Caen Microbiologie Alimentaire (UCMA) et ont toutes été préalablement isolées de différents échantillons de cidre provenant de plusieurs producteurs normands, principalement localisés dans le Calvados, la Manche et l'Orne lors d'autres projets de recherche du laboratoire. Seule la souche *Leuconostoc mesenteroides* CIM 3004, isolée de l'environnement laitier, provenait de la collection nationale FranceMIL (Collection Nationale de ressources génétiques pour les microorganismes d'intérêt laitier, CNIEL). Deux phages ont été utilisés pour cette thèse, le phage UCMA 21115 isolé du cidre pendant ce projet de thèse, ciblant la souche *Liquorilactobacillus mali* UCMA 16447 et inclus dans la collection UCMA, et le phage PLE01, ciblant la souche *Ln. mesenteroides* CIM 3004 issu de la collection FranceMIL. Les souches microbiennes ont été stockées à -80°C dans un milieu liquide approprié et variable selon les espèces, en présence de 15% de glycérol.

1.2 Conditions de culture des microorganismes

1.2.1 Milieux de culture

Les bactéries lactiques et les levures ont toutes été cultivées en milieu liquide ou solide de Man Rogosa & Sharpe (MRS ; Difco), supplémenté à 5 g/L de fructose (Panreac) et à 0,5 g/L de L-cystéine (Merck), à 30°C sous atmosphère régulée à 5% en CO_2 pendant 24 à 72 h. Ce milieu a été supplémenté avec du fructose, puisqu'il s'agit du sucre majoritaire retrouvé dans le cidre. Les bactéries des genres *Zymomonas*, *Acetobacter* et *Gluconobacter* ont été cultivées dans du milieu ZPP, comprenant 20 g/L de glucose (Panreac), 3 g/L d'extrait de malt (Oxoid), 3 g/L d'extrait de levure (Biokar Diagnostics) et 5 g/L de peptone (Panreac). Ce milieu a été supplémenté avec 100 mg/L de pénicilline (Panreac), 100 mg/L de pimaricine (laboratoire Standa) et 7 mg/L de cycloheximide (Merck). L'incubation a été également réalisée à 30°C sous atmosphère régulée à 5% en CO_2 pendant 24 à 48 h.

1.2.2 Cinétiques de croissances

La croissance microbienne de certaines souches a été suivie lors de ces travaux de thèse. A partir d'une culture de nuit, la densité optique (DO) des puits d'une microplaque a été ajustée à DO_{600nm} = 0,02 dans le milieu MRS. Le suivi de croissance était ensuite effectué dans l'appareil NanoTECAN (Life Sciences) avec des mesures de la DO_{600nm} toutes les 30 min pendant 48 h à 30°C ou à 25°C, selon les souches utilisées.

1.2.3 Dénombrements

Le milieu gélosé MRS, supplémenté avec 5 g/L de fructose et 0,5 g/L de L-cystéine a été utilisé pour les dénombrements des LAB, ainsi que pour les dénombrements des phages. Le milieu gélosé Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC ; Biokar Diagnostics) a été utilisé pour dénombrer les différentes levures.

1.3 Méthodes appliquées aux bactériophages

1.3.1 Isolement de bactériophages

La recherche de bactériophages dans le cidre a été effectuée dans différents échantillons provenant de l'environnement cidricole (cidre, moûts, pommes) issus de différents producteurs locaux, à plusieurs moments de la fermentation. Cette recherche a été effectuée sur les 160 souches de bactéries (**Annexe 1**). Les échantillons de cidre à tester ont tout d'abord été enrichis pour favoriser le développement et donc la détection d'éventuels phages. Pour ce faire, à partir d'une préculture de nuit de chaque souche bactérienne, des co-cultures par genre bactérien ont été réalisées sur une nuit complète. Pour réaliser ces co-cultures, 50 mL de bouillon MRS ont été ensemencés avec 100 µL des précultures de chaque souche bactérienne. Le lendemain, 10 mL de bouillon MRS ont été ensemencés à 1% avec cette co-culture de nuit jusqu'à DO_{600nm} = 0,2-0,3 et l'échantillon de cidre a été ajouté à 2%, puis l'incubation a été poursuivie 24 h. Cet enrichissement a ensuite été centrifugé à 4700 × g pendant 10 min et le surnageant filtré à 0,45 µm pour obtenir un filtrat potentiellement enrichi en phages. La détection de plages de lyse a alors été effectuée par la méthode classique de double couche. Brièvement, 200 µL de la souche sensible et 10 µL du filtrat enrichi ont été ajoutés à une gélose molle de MRS (0,5% agar, 10 mM $CaCl_2$ et 10 mM $MgSO_4$) avant de la couler sur une gélose MRS. La présence de plages de lyse a ensuite été observée pour chaque souche bactérienne testée, après incubation dans les conditions optimales de croissance de la bactérie indicatrice pendant au moins 24 h.

1.3.2 Propagation des bactériophages

Les phages ont été propagés en routine en inoculant 10 mL de bouillon MRS à 1% avec une culture de nuit de la souche sensible au phage. Cette culture a été incubée jusqu'à une DO_{600nm} de 0,2-0,3 correspondant au début de la phase exponentielle de croissance. Puis, 100 µL d'un filtrat de phage concentré ont été ajoutés, et l'incubation poursuivie à la température de croissance optimale de la souche. Lorsque la lyse cellulaire a été visible, la culture a été centrifugée pendant 10 min à 4700 × g et le surnageant filtré à 0,45 µm. Le titre phagique a été déterminé en réalisant des dilutions en série dans du tampon de phage TBT (100 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 100 mM NaCl et 10 mM $CaCl_2$) avant un dénombrement par la technique de la double couche. Les boites ont été ensuite incubées à 30°C pendant 24-48 h à 30°C et le titre phagique déterminé en unités formant plage de lyse par mL (UFP/mL).

2. Expériences réalisées dans le cadre du WP1

2.1 Panel des échantillons de cidre

Une cuve d'un producteur industriel (B) et une cuve d'un producteur artisanal (P), situées dans la région de Normandie (France), ont été échantillonnées au cours du premier mois de fermentation du cidre, à quatre moments différents, afin d'explorer le phageome lytique (particules de phages libres) et les prophages. Les informations concernant les échantillons collectés sont présentées dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : Echantillons de cidre prélevés pour l'étude du phageome et des prophages.

Identifiant des échantillons	Producteur (Département)	Durée de fermentation (jours)	Identifiant des cuves – volume (hL)	Concentration de sucre (kg/m^3)	pH
C1B1	B (Calvados)	0	C1 – 120	1060	4,02
C1B2	B (Calvados)	7	C1 – 120	1056	4,05
C1B3	B (Calvados)	14	C1 – 120	1048	4,03
C1B4	B (Calvados)	27	C1 – 120	1036	4,01
C2P1	P (Manche)	0	C2 – 10	1056	3,32
C2P2	P (Manche)	12	C2 – 10	1049	3,35
C2P3	P (Manche)	25	C2 – 10	1040	3,52
C2P4	P (Manche)	36	C2 – 10	1036	3,58

2.2 Extraction du phageome lytique du cidre

Pour extraire l'ADN total des phages du cidre, différentes approches ont été testées (résumés dans le tableau 2 de la publication n°1, partie résultats 1.2 de la thèse : nommé « Table 2 » Ledormand *et al.*, 2022).

Tout d'abord, l'extraction de l'ADN du phageome a été testée sur des échantillons de cidre innoculés avec le phage UCMA 21115, afin de valider la méthode utilisée. Des concentrations du phage UCMA 21115 allant de 10^4 à 10^9 UFP/mL ont été utilisées (Article n°1 : Table 2-I, II et III). Les échantillons de cidre innoculés (50 mL) étaient centrifugés à 4700 × g pendant 20 min à 4°C, et le culot remis en suspension dans 500 µL de tampon SM (200 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$, 50 mM Tris pH 7,5) (Article n°1 : Table 2-I).

L'ajout de 10% de PEG-8000 (w/v) avec 0,5 M de NaCl a également été testé en l'ajoutant directement au cidre inoculé, ajusté (Article n°1 : Table 2-III) ou non (Article n°1 : Table 2-II) à pH 5,5. L'ajout de PEG-8000 a été suivi d'une étape de précipitation des phages à 4°C pendant la nuit. Ensuite, les précipités de PEG ont été centrifugés comme décrit ci-dessus, et les culots également remis en suspension dans 500 µL de tampon SM.

Dans tous les cas, un volume de chloroforme a été ajouté aux culots ou précipités préalablement mis en suspension dans 500 µL de tampon SM, afin d'éliminer les vésicules membranaires. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 8000 × g pendant 5 min. La phase aqueuse a été traitée à la DNAse (Fisher Bioreagents) et à la RNAse (Thermofisher) pendant 1 h à 37°C pour éliminer l'ADN non viral et les ARNs. Ensuite, de la protéinase K à 20 mg/mL (Thermofisher) a été ajoutée et une étape d'incubation à 56°C pendant 20 min a été réalisée. Enfin, l'ADN viral a été extrait par trois méthodes différentes. La première (tampon 1), basée sur la méthode décrite par Shkoporov *et al.*, (2018) pour des échantillons fécaux, consistait en l'ajout de 100 µL de tampon de lyse de phages (isothiocyanate de guanidinium 4,5 M, citrate de sodium 44 mM pH 7,0, sarkosyl 0,88%, 2-mercaptoéthanol 0,72%). Dans les deux autres méthodes, le tampon de lyse des phages était complété par 1% ou 2% de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), nommés respectivement tampons 2 et 3, afin de limiter l'impact des polyphénols du cidre. Ces approches ont été basées sur des protocoles précédents conçus pour l'extraction d'ADN végétal (Kasajima *et al.*, 2013). Les échantillons ont ensuite été incubés à 65°C pendant 10 min.

La purification de l'ADN de phage a été réalisée par deux étapes successives de traitement phénol:chloroforme:alcool isoamylique 25:24:1 (Sigma Aldrich, USA) (v/v) et de centrifugation à 8000 × g pendant 5 min. La précipitation de l'ADN a été réalisée avec 2,5 volumes d'éthanol absolu glacial avant une étape de centrifugation à 13000 × g pendant 15 min à 4°C. L'ADN a été élué dans 50 µL de tampon ADN, et quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre Nano TECAN (Life Science). L'intégrité de l'ADN a été vérifiée sur un gel d'agarose à 1% coloré au Midori Green (Dutscher), avec une migration à 100 V pendant 40 min, puis visualisation sous UV dans une Ebox (Vilber).

Les protocoles d'extraction de l'ADN du phageome ont ensuite été appliqués à des échantillons de cidre pur (non inoculés avec le phage UCMA 21115), en utilisant différents volumes (20, 50 et 1000 mL) (Table 2-IV, V, VI, VII). Comme décrit ci-dessus, les extractions étaient réalisées sur les culots après l'étape de centrifugation à 4700 × g pendant 20 min à 4°C (Table 2-IV). Les surnageants correspondants étaient filtrés sur des filtres de 0,45 µm et précipités avec du PEG-8000. Les échantillons étaient ensuite centrifugés à 4700 × g pendant 20 minutes à 4°C. Les surnageants étaient éliminés et les culots remis en suspension dans 500 µL de tampon SM (Table 2-V). Des extractions étaient également réalisées directement après l'ajout de PEG-8000 et de NaCl, avant la première étape de centrifugation, sur des échantillons de cidre ajustés à pH 5,5 (Table 2-VII) ou non (Table 2-VI). Les précipitats étaient centrifugés comme décrit ci-dessus, et les culots resuspendus dans 500 µL de tampon SM. L'ADN a été extrait selon les mêmes méthodes que celles décrites ci-dessus.

2.3 Utilisation de méthodes de concentration des particules phagiques

2.3.1 La filtration tangentielle

Afin de concentrer les particules de phages du cidre, 400 mL de cidre ont été filtrés avec une méthode de filtration à flux tangentiel (TFF). Le système TFF utilisé était le Vivaflow® 50 (Sartorius), une cassette à membrane PES avec une surface totale de 50 cm^2 et un seuil de poids moléculaire de 100 kDa. Afin de valider et vérifier le bon fonctionnement du système TFF, le cidre a été inoculé avec le phage exogène UCMA 21115, à une concentration de 10^5 UFP/mL. Des extractions d'ADN et des recherches de phages sur les 160 souches de bactéries isolées du cidre (**Annexe 1**) en utilisant la méthode de la double couche ont été aussi réalisées sur le rétentat.

2.3.2 La flocculation

La deuxième méthode utilisée pour concentrer les particules de phages a été la floculation chimique à base de Fer, telle que décrite par John *et al.*, (2011), pour la concentration des virus marins à partir d'échantillons de grand volume. Deux milieux ont été testés : 400 mL de cidre et 400 mL d'eau, tous deux inoculés avec le phage exogène UCMA 21115 à des concentrations allant de 10^4 à 10^8 UFP/mL. Rapidement, du $FeCl_3$ était ajouté aux échantillons de cidre et d'eau pour obtenir une concentration finale de 1 mg/L. Une fois le $FeCl_3$ ajouté, les solutions ont été incubées à température ambiante pendant 1 h pour permettre aux complexes Fe-virus de floculer. Ensuite, les solutions ont été filtrées sur des filtres Whatman en polycarbonate avec des pores de 0,8 µm. Enfin, les filtres ont été plongés dans 10 mL de tampon de re-suspension (0,25M acide ascorbique, 0,2M Mg_2EDTA, pH 6,0). Des extractions d'ADN et des recherches de phages ont aussi été réalisées à partir de ces suspensions.

2.4 Extraction d'ADN pour la recherche des prophages

L'ADN total provenant des échantillons de cidre a été extrait de la manière suivante. Tout d'abord, 50 ml d'échantillons de cidre ont été centrifugés à 4700 × g pendant 20 min à 4°C. Puis, l'ADN total des culots a été extrait et purifié à l'aide du kit NucleoSpin Soil (Macherey Nagel, France) conformément aux instructions du fabricant.

La qualité et la quantité d'ADN ont été vérifiées au Nano TECAN (Life Science) et sur un gel d'agarose à 1%, comme décrit précédemment.

2.5 Etude métagénomique

2.5.1 Séquençage des acides nucléiques

La préparation des librairies d'ADN et le séquençage ont été effectués par la société Azenta Life Sciences (Chelmsford, MA, USA), sur un séquenceur Illumina HiSeq produisant des reads « paired-end » de 2×150 pb de longueur.

2.5.2 Recherche des prophages

La qualité des données de séquençage a été analysée avec le logiciel FastQC v.0.11.9 (de Sena Brandine and Smith, 2019). FastP v 0.20.0 a été utilisé pour éliminer les reads dont la longueur était inférieure à 50 nucléotides et les nucléotides de mauvaise qualité (Chen *et al.*, 2018). L'assemblage des séquences a été réalisé avec SPADES v 3.14.0 avec l'option --meta et seuls les contigs de plus de 1 kb ont été conservés (Nurk *et al.*, 2017). De plus, les assignations

taxonomiques pour accéder à la composition des reads ont été faites en utilisant kaiju v 1.7.3 dans la base de données nr_euk (103M de séquences protéiques de nr : Bactéries, Archaea, Virus, Fungi et eucaryotes microbiens) (Menzel *et al.*, 2016).

La prédiction des prophages a été ensuite réalisée grâce au logiciel VIBRANT (Kieft *et al.*, 2020). VIBRANT est un logiciel automatique hybride utilisé pour maximiser l'identification des génomes viraux lytiques et des prophages. VIBRANT a été utilisé séparément pour chaque échantillon et les contigs identifiés avec VIBRANT ont été regroupés entre tous les échantillons à l'aide de cd-hit-est avec les paramètres par défaut (identité de séquence globale de 90%) (Li and Godzik, 2006). Pour générer des matrices d'abondance, les résultats de la cartographie ont été convertis en reads par longueur de contigs (en kb) par million (RPKM) et les valeurs RPKM des contigs supérieurs à 5,0 ont été conservées pour les analyses. Les contigs identifiés par VIBRANT ont été soumis à un BLAST sur la base de données nucléotidiques non redondantes du NCBI (E value < 10^{-16} et pourcentage d'identité > 90%) pour générer des informations sur l'hôte des prophages.

3. Expériences réalisées dans le cadre du WP2

3.1 Mise en place de la communauté modèle

L'objectif était de construire une communauté microbienne modèle inspirée du cidre afin d'étudier l'impact des phages suite à une perturbation des équilibres microbiens. Pour ce faire, quatre souches ont été sélectionnées, à savoir *L. mali* UCMA 16447, *Ln. mesenteroides* CIM 3004, *S. uvarum* UCMA 10446, et *O. oeni* UCMA 19297. Deux phages faisaient également partie du modèle, le phage UCMA 21115 infectant la souche *L. mali* UCMA 16447 et le phage PLE01 infectant la souche *Ln. mesenteroides* CIM3004.

Une pré-culture de chaque souche a été préparée pendant une nuit dans du bouillon MRS à 30°C. Ensuite, 600 mL de bouillon MRS ajusté à pH 5,5 ont été inoculés à 10^1 UFC/mL avec les souches *L. mali* UCMA 16447, *Ln. mesenteroides* CIM 3004, *S. uvarum* UCMA 10446, et à 10^3 UFC/mL avec la souche *O. oeni* UCMA 19297 puis incubés à 25°C. L'objectif était de synchroniser la croissance des quatre souches pour qu'elles atteignent les mêmes niveaux cellulaires (environ 10^5 UFC/mL) à peu près au bout de 24 h de co-culture.

3.2 Vérification de la présence de prophages inductibles dans les souches bactériennes du modèle

Afin de vérifier la présence potentielle de prophages inductibles dans les souches bactériennes utilisées dans le modèle, des tests d'induction ont été réalisés. L'induction de prophages dans les génomes bactériens peut être spontanée ou provoquée par des agents mutagènes, dont le plus connu est la mitomycine C (MC). La présence de MC entraine des dommages à l'ADN bactérien et par conséquent, entraine une réponse de la bactérie. Le système SOS de réparation de l'ADN est alors activé qui aboutit à l'initiation du cycle lytique du prophage (Raya and H'bert, 2009).

Le protocole utilisé a été inspiré des travaux de Jaomanjaka *et al*., (2013). Brièvement, la MC a été ajoutée aux cultures des différentes souches bactériennes (*L. mali* UCMA 16447, *Ln. mesenteroides* CIM 3004 et *O. oeni* UCMA 19297) en début de phase exponentielle ($DO_{600nm} \approx 0,2$), en milieu MRS, à une concentration finale de 1 µg/ml ou 0,1 µg/mL à 30°C. Un témoin négatif sans MC a été réalisé en parallèle pour chaque souche. Le suivi de DO_{600nm} a été réalisé dans l'appareil NanoTECAN (Life Sciences) avec des mesures de la DO_{600nm} toutes les 30 min pendant 48 h à 72 h en fonction des souches.

3.3 Sélection du mode de perturbation

Après ces 24 h de co-culture, différents modes de perturbation ont été testés pour modifier les équilibres microbiens de la communauté. Les différentes conditions testées sont résumées dans le **tableau 5**.

Des agents chimiques (sulfite de sodium, éthanol) seuls ou en association, mais également des chocs thermiques, ont été testés. Des effets ON/OFF ont également été testés, c'est-à-dire qu'après ajout de l'agent perturbateur, une centrifugation de la co-culture à 4700 × g pendant 10 min a été effectuée, le surnageant a été éliminé et remplacé par le surnageant d'une co-culture témoin (mêmes conditions de culture mais sans agents perturbateurs). Des dénombrements ont été effectués toutes les 24 h afin de suivre le comportement de la communauté suite à l'ajout du/des agents perturbateurs.

Tableau 5 : Liste des agents perturbateurs testés.

Agent perturbateur	Conditions testées
Éthanol	5% 8% 10% 15%
Sulfites de sodium	50 mg/mL 100 mg/mL 150 mg/mL 200 mg/mL 250 mg/mL 300 mg/mL 400 mg/mL
Cocktail éthanol + sulfites de sodium	5% et 150 mg/mL 8% et 300 mg/mL
Cocktail éthanol + sulfites de sodium ON/OFF	5% et 150 mg/mL
Température	40°C - 10 minutes 50°C - 10 minutes 60°C - 15 minutes

3.4 Application de l'agent perturbateur et suivi de la communauté

Après les différents essais de perturbations, le choix final s'est porté sur le choc thermique de 50°C pendant 10 minutes. Le suivi de la communauté s'est déroulé de la manière suivante (Figure 1, publication n°2, partie 2.2 de la thèse).

Lorsque chaque souche atteignait ≈ 10^5 UFC/mL, les 600 mL de co-culture ont été divisés en trois flacons de 200 mL. Le premier flacon a été utilisé comme condition témoin (C), les deux autres (D et P) ont été soumis à un choc thermique de 50°C pendant 10 min. Après le choc thermique, les flacons ont été immédiatement et rapidement refroidis pour retrouver une température de 25°C. Vingt-quatre heures après la perturbation, le phage UCMA 21115 a été introduit à une MOI d'environ 0,1 et le phage PLE001 à une MOI d'environ 0,01 dans le flacon P uniquement. Des prélèvements ont été effectués pour chaque condition (C, D et P) toutes les 24 h pendant au moins 5 jours, pour des mesures de pH, la numération des bactéries, des levures et des bactériophages, et pour l'analyse des surnageants par HPLC et GC-MS. Le même schéma expérimental a été répété à 15°C et dans du moût de pomme stérile ajusté à pH 5,5, à 25°C.

Le milieu gélosé YGC a été utilisé pour dénombrer les levures. Le milieu gélosé MRS supplémenté avec 5 g/L de fructose (Fisher), 32 mg/L de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal, Fisher), 100 mg/L de pimaricine (laboratoire Standa) et 7 mg/L cycloheximide (Merck) a été utilisé pour le dénombrement des LAB utilisées en co-culture. Sur ce milieu, les colonies de *Ln. mesenteroides* CIM 3004 étaient d'une coloration bleue bien distincte des colonies de *L. mali* UCMA 16447 et de *O. oeni* UCMA 19297, qui elles-mêmes étaient de couleur blanche avec des morphologies distinctes (**Figure 24**) : grosses colonies bombées et crémeuses pour *L. mali* UCMA 16447 et petites colonies blanches en forme de bille pour *O. oeni* UCMA 19297 (**Figure 24**). Les différents milieux ont tous été incubés pendant 72-96 h afin de permettre la bonne croissance de tous les microorganismes et incubés à 30°C pour les LAB et 25°C pour les levures.

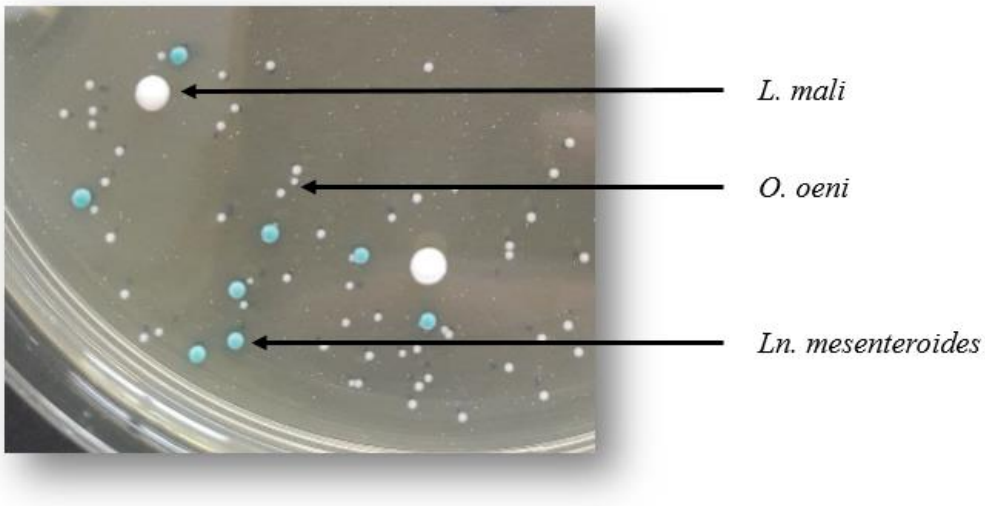


Figure 24 : Aspect des différentes colonies de bactéries lactiques sur le milieu MRS X-Gal. Les colonies bleues correspondent à *Ln. mesenteroides* CIM 3004, les grosses colonies blanches à *L. mali* UCMA 16447 et les petites colonies blanches à *O. oeni* UCMA 19297.

Afin de valider et confirmer les dénombrements bactériens sur le milieu MRS-X-Gal, en particulier la distinction des colonies de *L. mali* UCMA 16447, *Ln. mesenteroides* CIM3004 et de *O. oeni* UCMA 19297, une PCR multiplexe mise au point pour la différenciation des LAB du cidre (*Lactobacillus, Oenococcus, Pediococcus, Leuconostoc*) a été utilisée (Cousin *et al.*, 2019b).

Brièvement, des colonies ont été prélevées sur les géloses d'intérêt, et des PCR sur colonies ont été effectuées pour valider la bonne distinction des trois types de colonies. Les PCR ont été réalisées dans un Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) avec les conditions suivantes : 3 min à 95°C pour la dénaturation initiale, 35 cycles comprenant : 15 sec à 95°C pour la dénaturation, 15 sec à 53°C pour l'hybridation des amorces et 20 sec à 72°C pour la phase d'élongation et enfin une élongation finale de 5 min à 72°C.

Les amplifications PCR ont ensuite été analysées par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% avec une migration de 30 min à 100 V. Le marqueur de taille moléculaire GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) a été utilisé. Les gels d'agarose ont enfin été analysés comme décrit précédemment.

3.5 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie en phase liquide à haute performance (système HPLC Alliance de Waters avec pompe 2695) a été réalisée à 0,6 mL/min en mode isocratique pendant 30 min en utilisant un tampon H_2SO_4 à 5 mM comme phase mobile. La séparation a été réalisée avec une colonne Carbomix HNP5 à 8% de réticulation de 7,8 x 300 mm à 40°C (Sepax) et les composés ont été suivis par réfractométrie à 30°C (détecteur d'indice de réfraction 2414). Après centrifugation à 4700 × g pendant 10 min, les surnageants des différents échantillons (C, D et P) ont été dilués deux fois avec la phase mobile avant injection de 20 µL. La production d'éthanol et d'acides organiques (acétique, lactique ou citrique) ainsi que la consommation de sucre (fructose ou glucose) ont été suivies par comparaison avec les étalons de chaque composé. Les étalons ont été injectés à des concentrations allant de 2 mM à 64 mM.

3.6 Extraction des composés volatils par micro extractions en phase solide (MEPS)

Les composés volatils ont été extraits et purifiés à partir d'un aliquot de 1 mL de surnageant de chaque échantillon selon une méthode développée dans une précédente étude (Haider *et al*., 2014). Brièvement, les échantillons ont tous été supplémentés avec deux étalons internes, le 4-méthylpentan-2-ol et l'undécanoate d'éthyle, tous deux à une concentration finale de 2 mg/L. La micro-extraction en phase solide (MEPS) a été réalisée à l'aide d'un ensemble baril/aiguille (BIN) rempli d'un sorbant C18 en utilisant les conditions de purification suivantes : 2 × 200 µL d'acétate d'éthyle et 2 × 200 µL d'éthanol 100% pour le conditionnement de la colonne, 8 × 150 µL d'échantillon pour le chargement de la colonne, 1 × 50 µL d'acétate

d'éthyle pour l'élution des composés volatils, 2 × 200 µL d'acétate d'éthyle, 2 × 200 µL d'éthanol 100% et 2 × 200 µL d'eau ultra-pure pour le rinçage de la colonne. Les échantillons ont ensuite tous été stockés à -20°C.

3.7 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Un microlitre de l'extrait a été injecté avec un rapport de division 1/5 dans un chromatographe en phase gazeuse (GC-MS) Varian 3800 couplé à un spectromètre de masse Varian Saturn 2000R. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur avec un débit de 1 mL/min. Les composés ont été séparés sur une colonne capillaire DB-5MS (60 m, 0,25 mm de diamètre interne, 0,25 mm d'épaisseur de film, J&W Scientific) avec le programme de température suivant : 40°C pendant 10 min, suivi d'une augmentation de 5°C par min, et une température finale de 240°C maintenue pendant 10 min.

Les composés volatils ont été identifiés selon une procédure développée dans des travaux précédents (Ledauphin *et al*., 2010). Les aires de pics de chaque composé organique volatil (COV) ont été obtenues en utilisant l'ion le plus abondant et le plus spécifique (rapport m/z) produit en mode ionisation électronique (IE) avec le spectromètre de masse. Les aires relatives ont ensuite été calculées en divisant les aires de pics par l'aire du pic de l'undécanoate d'éthyle (étalon interne). Le contrôle de qualité des analyses a été opéré en comparant les aires obtenues pour les pics des deux étalons internes (undécanoate d'éthyle et 4-méthylpentan-2-ol). Les niveaux de chaque COV ont été comparés en utilisant les surfaces relatives obtenues entre les trois conditions.

3.8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques des dénombrements microbiens ont été réalisées à l'aide du logiciel R (v 4.1.2) et de Prism (Graphpad, San Diego, CA, USA). Les différences entre les conditions C, D et P ont été analysées avec un test de Kruskal Walis suivi de la procédure de Dunn pour les comparaisons multiples avec une p-value ajustée avec la méthode de Benjamini-Hochberg. Pour chaque analyse statistique, une valeur $p \leq 0,05$ a été considérée comme significative. Les analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées à l'aide du logiciel R (v 4.1.2) et pour chaque temps d'analyse, les variables ayant une contribution supérieure à 3 et un cos^2 supérieur à 0,5 (pour les dimensions 1 et 2) ont été conservées.

4. Expériences réalisées dans le cadre du WP3

4.1 Caractérisation du phage UCMA 21115

4.1.1 Détermination du temps d'adsorption

Le temps d'adsorption du phage a été déterminé de la manière suivante. Le phage UCMA 21115 a été mis en contact de la souche bactérienne sensible (*L. mali* UCMA 16447) à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,1 et incubé à 30°C pendant 30 min. Toutes les 5 min, 2 mL ont été recueillis et filtrés à travers un filtre de 0,45 µm afin d'évaluer le titre phagique dans le surnageant. Ce titre phagique a été obtenu grâce à la méthode de la double couche. Le taux d'adsorption a été calculé avec la formule $(N_0\text{-}N_t/N_0) \times 100$, où N_0 représente le titre de phage utilisé avant la co-incubation, et N_t le titre de phage au temps t dans le surnageant après filtration (Feng *et al.*, 2020).

4.1.2 One Step Growth Curve (OSGC)

L'OSCG a été réalisée comme décrit par Jaomanjaka *et al.*, (2016). Brièvement, la souche *L. mali* UCMA 16447 a été cultivée jusqu'à une valeur DO_{600nm} de 0,2-0,3, et 1 mL de culture centrifugé à 10000 × g pendant 2 min. Le culot a été remis en suspension dans 1 mL de lysat de phage afin d'obtenir une MOI de 0,01. Un dénombrement de la souche *L. mali* UCMA 16447 a préalablement été réalisé pour obtenir la concentration bactérienne à la valeur de DO_{600nm} de 0,2-0,3. Ensuite, ce mélange a été incubé pendant 30 min à 30°C afin de permettre l'adsorption du phage sur la bactérie cible. L'échantillon a ensuite été centrifugé à 10000 × g pendant 2 min pour éliminer les phages non absorbés. Le culot était repris dans 1 mL de milieu MRS et aussitôt dilué à 10^{-3} par dilutions successives. L'échantillon (1 mL) était d'abord transféré dans 9 mL de MRS, puis 500 µL de ce mélange ont été ajoutés à un volume de 49,5 mL de MRS préalablement incubé à 30°C. Ce mélange était ensuite réparti dans 8 tubes différents puis incubé à 30°C pendant 4 h. Toutes les 30 min, un tube a été prélevé puis filtré avec des filtres de 0,45 µm, et la quantité de phages libre dans le milieu était dénombrée par la méthode de la double couche.

Les résultats sont présentés sous la forme d'une courbe représentant la quantité de phages libres dans la culture au cours du temps. En théorie, la quantité de phages libres au départ est faible (adsorbés et intégrés), puis cette quantité augmente après que ces derniers se soient répliqués et aient lysé les cellules avant d'atteindre un plateau. Le nombre de phages libérés par

bactérie était obtenu grâce au rapport entre la concentration initiale de phages pendant la période de latence et la concentration de phages dans la culture après la lyse bactérienne.

4.1.3 Détermination du spectre d'hôte

La détermination du spectre d'hôte du phage UCMA 21115 sur d'autres souches bactériennes s'effectue en déterminant l'inhibition ou la destruction de la population bactérienne testée. Le spectre d'hôte des phages à tester a été évalué sur un panel de LAB disponibles au laboratoire (**Annexe 1**). Pour ce faire, une culture de nuit de chaque souche bactérienne à tester a été réalisée et 200 µL de cette pré-culture ont été ajoutés à une gélose molle de MRS (0,5% agar, 10 mM $CaCl_2$ et 10 mM $MgSO_4$), elle-même coulée sur une gélose de MRS. Après solidification, 5 µL de dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-6} du filtrat du phage UCMA 21115 ont été déposés sous forme de spots à des endroits bien définis de chaque gélose molle contenant la souche à tester. Un témoin négatif de TBT par gélose a également été déposé pour valider le bon fonctionnement de l'expérience. La visualisation d'un halo transparent ou de plages de lyse traduisait de la sensibilité de la souche vis-à-vis du phage testé.

4.1.4 Résistance au pH

Des expériences de survie du phage UCMA 21115 à différents pH ont été entreprises. Le phage a tout d'abord été propagé afin d'obtenir un filtrat concentré. Le pH du milieu MRS a été ajusté à des valeurs de pH de 3,0 ; 3,5 ; 4,0 ; 4,5 ; 5,0 et 5,5. Le phage a ensuite été inoculé dans les différents milieux à hauteur de 10^7 UFP/mL et des dénombrements ont été réalisés après 3 h, 6 h, 24 h, 48 h et 72 h sur milieu MRS avec la technique de la double couche. Le taux de survie des phages a ensuite été calculé pour chaque condition. L'expérience a été réalisée en 3 réplicats biologiques.

4.1.5 Purification par ultra-centrifugation

Les lysats de phages (10^9 UFP/mL, ou plus) ont été purifiés sur un gradient de chlorure de césium (3M et 5M) par ultra-centrifugation à 35000 × g pendant 3 h (Beckman, modèle XL-70, rotor 70.1 Ti). La phase contenant les particules phagiques ont ensuite été collectée à l'aide d'une aiguille et d'une seringue puis dialysée dans un tampon phagique (100 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$) pendant une nuit à 4°C. Les phages concentrés purifiés ont ensuite été stockés à -80°C avec une concentration finale de 15% de glycérol.

4.1.6 Observation au microscope électronique en transmission (MET)

La coloration et l'observation des particules phagiques a été réalisée au Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie (CMABio[3], Université de Caen Normandie). Les phages purifiés par ultracentrifugation ont été observés au microscope électronique à transmission JEOL 1011 (tension d'accélération de 80 kV), après une coloration négative à l'acétate d'uranyle. Pour ce faire, 10 µL de filtrat concentré ont été déposés sur une grille pendant 45 sec, puis l'excès de liquide était absorbé par du papier filtre. Deux volumes d'acétate d'uranyle (1,5%) ont successivement été appliqués pendant 45 sec sur cette grille avant un séchage. Les préparations ont ensuite été observées au MET.

4.1.7 Extraction d'ADN

L'ADN phagique a été extrait après récupération de la fraction phagique issue de l'ultra-centrifugation. Cette solution a été traitée avec la TURBO DNase Invitrogen™ (Fisher Scientific) à une concentration finale de 1X, pendant 5 min à température ambiante pour éliminer l'ADN non viral résiduel. Ensuite la lyse des capsides virales a été effectuée avec ajout successif de 40 µL de protéinase K à 20 mg/mL (Thermofisher), avec une incubation à 56°C pendant 20 min et de 100 µL de SDS à 10% avec une incubation à 65°C pendant 10 min. La purification de l'ADN de phage a ensuite été réalisée par deux étapes successives de traitement phénol:chloroforme:alcool isoamylique 25:24:1 (Sigma Aldrich) (v/v) et de centrifugation à 8000 × g pendant 5 min. La précipitation de l'ADN a été réalisée avec 2,5 volumes d'éthanol glacial absolu avant une étape de centrifugation à 13000 × g pendant 15 min à 4°C. L'ADN a ensuite été élué dans 50 µL de tampon ADN, et quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre Nano TECAN (Life Science, Suisse). L'intégrité de l'ADN était vérifiée sur un gel d'agarose à 1% coloré au Midori Green, après migration à 100 V, 30 min. La visualisation du gel a été réalisée sous UVavec une Ebox (Vilbert).

4.2 Mise en place de la communauté modèle

Afin de favoriser les possibles échanges entre la souche infectée (*L. mali* UCMA 16447) par son phage (UCMA 21115) et d'autres LAB proches, quatre souches du genre *Lactobacillus sensu lato* ont été utilisées : *L. mali* UCMA 19420, *Secundilactobacillus collinoides* UCMA 16566, *S. collinoides* UCMA 20009, et *Lactobacillaceae sp. nov.* UCMA 15818 (non publiée). Toutes les souches ont été cultivées séparément dans du milieu MRS, en pré-culture de nuit.

Chaque pré-culture servait ensuite à inoculer 1 L de bouillon MRS frais à 1%, soit 10 mL de chaque souche (UCMA 19420, UCMA 16566, UCMA 20009, et UCMA 15818) afin de constituer la communauté modèle. La communauté modèle a été incubée à 30°C jusqu'à une valeur de DO_{600nm} de 0,2. En parallèle, 500 mL de bouillon MRS ont été inoculés avec 5 mL de la souche *L. mali* UCMA 16447. Lorque la culture de *L. mali* UCMA 16447 atteignait une valeur de DO_{600nm} de 0,2, elle a été divisée en deux fractions : une fraction infectée par le phage UCMA 21115 à une MOI de 0,1, et une autre fraction non infectée servant de témoin. Les deux fractions ont immédiatement été placées dans des tubes de dialyse en cellulose (MWCO 12000 - 14000, ROTH) (Saraoui *et al.*, 2013), et immergées dans la co-culture bactérienne synthétique composée des souches UCMA 19420, UCMA 16566, UCMA 20009 et UCMA 15818. Les tubes de dialyse ont été choisis pour contenir la souche *L. mali* UCMA 16447 tout en permettant l'échange de molécules de petite taille avec la communauté bactérienne modèle. L'incubation a été poursuivie à 30°C. Les échantillons des tubes de dialyse ont été prélevés à 0, 15 et 60 min (Le T0 ne tient pas compte des 30 min d'adsorption, il correspond au moment où les phages ont été ajoutés) correspondant à la phase d'infection précoce (10 mL et 30 mL pour les extractions d'ARN et de protéines, respectivement). Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 4700 × g pendant 10 min et les culots cellulaires conservés à -80°C avant l'extraction de l'ARN et des protéines. Trois réplicats biologiques indépendants par condition ont été effectués, représentant ainsi un total de 15 échantillons (3 répétitions à T0, 3 répétitions à T15 avec et sans phages, et 3 répétitions à T60 avec et sans phages). À T0 et T60, 30 mL de la communauté modèle ont également été échantillonnés pour l'extraction des protéines.

4.3 Extraction des acides nucléiques

4.3.1 Extraction de l'ADN bactérien

L'ADN bactérien de la souche UCMA 16447 a été extrait avec le kit Quick DNA Miniprep (ZymoResaerch) selon les recommandations du fournisseur après une étape de lyse à 6000 × g à 4°C au Precellys® (Bertin Technologie) en utilisant un mélange de billes de verre (1,5 mm, Dutsher) et de billes de zirconium (0,5 et 0,1 mm, Dutsher).

La qualité et la quantité d'ADN étaient vérifiées au Nano TECAN (Life Science) et sur un gel d'agarose à 1%, 100 V, 30 min.

4.3.2 Extraction d'ARN

Les culots cellulaire (10 mL) ont été remis en suspension dans 500 µL de tampon TE (0,01M Tris pH 7,5 ; 0,01M EDTA) et les cellules lysées à 6000 × g à 4°C au Precellys® (Bertin Technologie) en utilisant un mélange de billes de verre (1,5 mm, Dutsher) et de billes de zirconium (0,5 et 0,1 mm, Dutsher). L'extraction de l'ARN total a été réalisée avec le réactif TRIzol (Fisher Scientific, Illkirch, France) et avec une séparation chloroforme:alcool isoamylique (24:1) (Sigma Aldrich). L'ARN a ensuite été purifié à l'aide du kit Direct-Zol RNA Miniprep (ZymoResaerch) selon les recommandations du fournisseur. La qualité et l'intégrité de l'ARN ont été vérifiée sur un gel d'agarose dénaturant à base de javel comme décrit par Aranda *et al.,* (2012). La quantification de l'ARN a été réalisée au spectrophotomètre Nano TECAN (Life Science, Suisse).

4.4 RNA-seq

La déplétion des ARNr (kit Fastselect, Qiagen), la construction de la bibliothèque d'ADNc et le séquençage des ARN ont été réalisés par la société Genewiz (South Plainfield, NJ, États-Unis). Le séquençage de l'ARN a été effectué sur un séquenceur Illumina HiSeq, produisant des reads « paired-end » de 2×150 pb de longueur.

Afin d'éliminer les adaptateurs Illumina du séquençage, le processeur FastP (Chen *et al.*, 2018) a été utilisé avant de vérifier la qualité des données de séquençage avec FastQC v.0.11.8 (de Sena Brandine et Smith, 2019). Les reads ont ensuite été mappés sur le génome de la souche *L. mali* UCMA 16447 à l'aide de Bowtie 2 (Langmead and Salzberg, 2012) avec une taille de fragment minimale de 50 pb. Les comptages des reads ont été effectués à l'aide du processeur HTSeq v.0.9.1 (Anders *et al.,* 2015). Seuls les reads correspondant aux séquences d'ADN codantes (CDS) ont été extraits de l'ensemble des données brutes pour les futures analyses. Les données ont ensuite été filtrées pour éliminer les gènes affichant une moyenne de moins de 10 reads par échantillon pour toutes les données. L'analyse statistique des données RNA-Seq a été réalisée à l'aide de l'outil SARTools DESeq2 v.1.7.3 (Varet *et al.,* 2016) avec les paramètres par défaut. Les transcrits de gènes avec une p-value ajustée ($p < 0,05$) et un fold change en valeurs absolues de ≥ 2 et $\leq 0,5$ ont été considérés comme étant différentiellement exprimés entre les différentes conditions. L'annotation fonctionnelle des transcrits a été réalisée à l'aide de l'encyclopédie des gènes et des génomes de Kyoto (KEGG).

4.5 Extraction des protéines totales

Les culots cellulaires (30 mL) ont été remis en suspension dans 2 mL de tampon de lavage (50 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM PMSF), lysés à 6000 × g au Precellys® (Bertin Technologie) en utilisant un mélange de billes de verre (1,5 mm) et de billes de zirconium (0,5 et 0,1 mm), et centrifugés à 10000 × g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été récupéré et les protéines ont ensuite été précipitées avec quatre volumes de tampon de précipitation (80% d'acétone, 20% de TrisHCl 50 mM pH 8.0), et incubées pendant 1 h à -80°C, puis pendant la nuit à -20°C. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 13000 × g pendant 10 min à 4°C le lendemain. Le surnageant a été éliminé et les culots séchés pendant 30 min sous une hotte chimique. Enfin, les protéines ont été remises en suspension dans un tampon adapté aux protéines (50 mM TrisHCl pH 8.0, 5% glycérol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 100 mM NaCl), et quantifiées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

4.6 Spectrométrie de masse

Les analyses de protéomique ont été réalisées par la platerforme PROTEOGEN de l'Université de Caen.

Brièvement, la préparation des protéines et l'analyse nLCMS ont été effectuées comme décrit précédemment (Aubourg *et al.*, 2020). Les expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées sur l'appareil TIMS-TOF (Bruker Daltonics). Les échantillons ont été analysés à l'aide du logiciel Preview (ProteinMetrics) afin d'estimer la qualité de la digestion par la trypsine puis la recherche dans la base de données effectuée à l'aide du logiciel Peaks X+. Une base de données « interne » composée de *L. mali* UCMA 16447, *L. mali* UCMA 19420, *S. collinoides* UCMA 16566, *S. collinoides* UCMA 20009 et de la souche UCMA 15818, a été constituée pour la recherche des protéines. Pour quantifier les niveaux relatifs d'abondance des protéines entre les différents groupes, les échantillons ont été analysés en utilisant la fonction de quantification sans étiquette du logiciel Peaks X+. Les protéines enrichies ont été sélectionnées lorsque l'abondance relative était supérieure à 1,5 après analyse de la variance (ANOVA).

RÉSULTATS

1. Etude de la diversité du phageome et des prophages d'échantillons de cidre

1.1 Présentation et résumé de la publication n°1

Le premier objectif de mon projet de thèse visait à explorer le phageome d'une boisson fermentée locale, le cidre. Le phageome est généralement défini comme étant l'ensemble des communautés de phages, aussi bien lytiques que tempérés, d'un écosystème donné. Cependant, la majorité des études s'intéressant au phageome d'un environnement donné, n'incluent que les phages lytiques. Ainsi, pour éviter toute confusion par la suite, lorsque le terme phageome sera employé dans cette partie, il ne désignera que les communautés de phages lytiques. Ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées au phageome de divers environnements comme le microbiote intestinal (Draper *et al.,* 2019; Fitzgerald *et al.,* 2021; Manrique *et al.,* 2016), le milieu marin (Roux *et al.,* 2016), les plantes (Ma *et al.,* 2019) ou encore les glaciers (Zhong *et al.,* 2021) en montrant que les phages étaient bel et bien présents et qu'ils jouaient un rôle dans la fluctuation des populations microbiennes. Comme présenté dans la revue bibliographique en partie introductive, au moment de l'écriture de ce manuscrit, seulement quatre études se sont attachées au phageome des aliments fermentés, et aucune ne décrit le phageome de boissons fermentées. Ainsi, il est apparu intéressant d'explorer cet aspect dans une boisson fermentée, en dehors du fait d'isoler des phages de ces matrices.

Le premier enjeu de ce travail était donc d'extraire le phageome dans deux cuves de cidre chez deux producteurs, un industriel et un artisanal, pour suivre l'évolution du phageome au cours du procédé de fermentation. Ainsi, en se basant sur des protocoles déjà utilisés pour d'autres matrices, comme l'intestin (Shkoporov *et al.,* 2018) et le fromage (Dugat-Bony *et al.,* 2020), différentes méthodes pour l'extraction de l'ADN du phageome ont été testées. Le développement de ces méthodes d'extraction a été fait en parallèle de la recherche de bactériophages lytiques dans différents échantillons de cidre, sur un panel de 160 souches prélablement isolées du cidre. Au cours de ce projet de thèse, un seul phage lytique a été isolé parmi les 120 échantillons de l'environnement cidricole utilisés (cidre, moûts, pommes), le phage UCMA 21115, qui sera présenté plus en détail dans la partie 3 des résultats. Ainsi, ce phage a servi de témoin pour développer les méthodes d'extraction du phageome. Avec les méthodes utilisées, il est apparu difficile d'extraire l'ADN phagique lorsque la concentration en phages était inférieure à 10^7 UFP/mL, dans un cidre ajusté à pH 5,5. Des améliorations portant sur les protocoles d'extraction, par exemple avec l'utilisation de molécules comme le

polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) pour contrecarrer l'effet des polyphénols présents en grande quantité dans le cidre, ont été entreprises pour tenter d'améliorer l'extraction d'ADN des particules phagiques, en vain. De plus, des techniques permettant de concentrer les particules virales dans les eaux, comme la filtration tangentielle ou la flocculation ont été également utilisées sur de plus gros volumes de cidre afin de concentrer et maximiser les chances d'extraction du phageome des échantillons de cidre, sans plus de réussite. Naturellement, il est donc apparu que le cidre était un réservoir assez pauvre en phages lytiques, et donc que le phageome du cidre serait difficile à explorer plus en détail.

En parallèle de l'exploration du phageome lytique, la dynamique et la diversité des prophages au sein des génomes bactériens au cours du procédé de fermentation des deux producteurs ont été étudiées. Pour ce faire, une étude métagénomique a été réalisée sur les différents échantillons de cidre des deux producteurs. Un total de 1174 prophages putatifs a été identifié dans les deux cuves des deux producteurs, avec une abondance plus importante chez le producteur industriel que chez le producteur artisanal. Les hôtes potentiels de ces prophages ont été identifiés et les dynamiques de ces prophages ont pu être comparées aux données des populations bactériennes. Comme attendu, la dynamique de ces prophages était sensiblement la même que celle des genres bactériens auxquels les prophages étaient identifiés. Des hypothèses sur la dynamique de ces prophages ont ainsi pu être émises. Par exemple, qu'une diminution de la fréquence des prophages pouvait être liée à une entrée de ces prophages en cycle lytique, entrainant ainsi une diminution de la population cible et, qu'a contrario, une augmentation de la fréquence des prophages pouvait être le signe que la lysogénie était prédominante dans les échantillons. Pour valider ces hypothèses, il est également mentionné que des expérimentations sur les phages lytiques seraient nécessaires, mais en gardant à l'esprit qu'il est compliqué d'extraire des particules phagiques dans cette matrice en dessous du seuil de 10^7 UFP/mL déterminé précédemment.

Ce travail a ainsi permis de démontrer la faible occurrence des phages lytiques dans le cidre au cours du procédé de fermentation et plus largement, les difficultés rencontrées pour l'étude du phageome dans les boissons fermentées. Il a également permis de mettre en évidence la prédominance du mode tempéré au cours du procédé de fermentation du cidre.

Les résultats de ce travail ont été valorisés par la présentation d'un poster scientifique au 13th Lactic Acid Bacteria symposium, en août 2021 (**Annexe 2**) ainsi qu'au congrès de la Société Française de Microbiologie, en septembre 2021 (**Annexe 3**).

Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique, publié dans le journal « *Microorganisms* ».

1.2 Publication n°1

Investigation of the phageome and prophages in French cider, a fermented beverage.

Pierre Ledormand, Nathalie Desmasures, Cédric Midoux, Olivier Rué, Marion Dalmasso

Microorganisms **2022**, 10, 1203

doi.org/10.3390/microorganisms10061203

microorganisms

MDPI

Article

Investigation of the Phageome and Prophages in French Cider, a Fermented Beverage

Pierre Ledormand [1], Nathalie Desmasures [1], Cédric Midoux [2,3,4], Olivier Rué [2,3] and Marion Dalmasso [1,*]

[1] Normandie Univ., UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, 14000 Caen, France; pierre.ledormand@unicaen.fr (P.L.); nathalie.desmasures@unicaen.fr (N.D.)
[2] INRAE, MaIAGE, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France; cedric.midoux@inrae.fr (C.M.); olivier.rue@inrae.fr (O.R.)
[3] INRAE, BioinfOmics, MIGALE Bioinformatics Facility, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France
[4] INRAE, PROSE, Université Paris-Saclay, 92761 Antony, France
* Correspondence: marion.dalmasso@unicaen.fr; Tel.: +33-(0)2-31-56-51-56; Fax: +33-(0)2-31-56-61-79

Abstract: Phageomes are known to play a key role in the functioning of their associated microbial communities. The phageomes of fermented foods have not been studied thoroughly in fermented foods yet, and even less in fermented beverages. Two approaches were employed to investigate the presence of phages in cider, a fermented beverage made from apple, during a fermentation process of two cider tanks, one from an industrial producer and one from a hand-crafted producer. The phageome (free lytic phages) was explored in cider samples with several methodological developments for total phage DNA extraction, along with single phage isolation. Concentration methods, such as tangential flow filtration, flocculation and classical phage concentration methods, were employed and tested to extract free phage particles from cider. This part of the work revealed a very low occurrence of free lytic phage particles in cider. In parallel, a prophage investigation during the fermentation process was also performed using a metagenomic approach on the total bacterial genomic DNA. Prophages in bacterial metagenomes in the two cider tanks seemed also to occur in low abundance, as a total of 1174 putative prophages were identified in the two tanks overtime, and only two complete prophages were revealed. Prophage occurrence was greater at the industrial producer than at the hand-crafted producer, and different dynamics of prophage trends were also observed during fermentation. This is the first report dealing with the investigation of the phageome and of prophages throughout a fermentation process of a fermented beverage.

Keywords: phages; phageome; prophage; metagenomics; fermented beverages; cider

check for updates

Citation: Ledormand, P.; Desmasures, N.; Midoux, C.; Rué, O.; Dalmasso, M. Investigation of the Phageome and Prophages in French Cider, a Fermented Beverage. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1203. https://doi.org/10.3390/microorganisms10061203

Academic Editors: Salam A. Ibrahim and Denis Roy

Received: 24 May 2022
Accepted: 8 June 2022
Published: 12 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Bacteriophages (phages) are viruses infecting bacteria, and that can establish lytic, chronic or temperate (lysogenic) infections. To designate phage communities, the term "phageome" is frequently used in the scientific literature. However, it seems that no consensual definition of this term has been retained to date. In some cases, the term "phageome" seems to encompass communities of free lytic phages and of prophages (temperate phages included in bacterial genomes) [1]. Nevertheless, the majority of the studies dealing with phageomes often consider free lytic phages, without including prophages [2,3]. Consequently, the term "phageome" will be used in the current study for designating free lytic phage communities only. Prophages will be considered separately. Phageomes are studied in multiple environments such as the human gut [1–3], the human oral cavity [4], plants [5], oceans [6], and more recently, glaciers [7]. Studies of the phageomes in fermented foods and beverages are scarce [8]. To date, only three studies strictly describing the phageomes of Asian fermented food products such as kimchi, sauerkrauts and fermented shrimps [9,10], and of a French cheese [11] are available, but none about fermented beverages. Environmental sources of phages in cheese have also been studied by investigating the airborne viromes

(whole virus communities) in two cheese production plants [12]. Prophages (temperate phages) are also well known for their impact on the functioning of the bacterial cells that carry them, either through beneficial or non-beneficial interactions [13]. Their impact at the scale of a microbial community remains underexplored, and still needs to be taken into account [14]. In this way, exploring the diversity of prophages also seems essential to assess their role in microbial fluxes within ecosystems such as fermented foods and beverages, as phages are recognised to be the drivers of microbial diversity [15].

Although the phageomes of fermented foods are not well described yet, their presence in such matrices has been known for decades. Lytic phages are extensively studied for their antibacterial properties against pathogenic bacteria encountered in the food industry such as, for example, *Salmonella* sp. [16] and *Listeria monocytogenes* [17], and against spoilage bacteria such as *Acetobacter* in wine [18] and *Levilactobacillus brevis* in beer [19]. Lytic phages are also known as killers of such industrial starters as in dairy products, where phages targeting *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* [20] can cause fermentation defects. No study is available about the phageomes in fermented beverages, especially in cider. Cider is an alcoholic fermented apple beverage, consumed all around the world, presenting harsh physico-chemical conditions with low pH values (3.0–4.0) and the presence of ethanol [21], polyphenols and volatiles [22]. Two types of fermentation occur during cider elaboration. First, the alcoholic fermentation is performed by yeasts, including the *Saccharomyces* species (*S. cerevisiae* and *S. uvarum*) and non-*Saccharomyces* species (*Hanseniaspora*, *Candida*) [21]. Then, the malolactic fermentation (MLF) is performed by Lactic Acid Bacteria (LAB) belonging to *Oenococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp. and *Lactobacillus sensu lato* [22]. Describing phageome diversity in cider is thus interesting to better understand the microbial dynamics during the fermentation processes. The aim of this work was to study the diversity of the phageome, and also the prophage distribution in cider, throughout the fermentation process in two cider tanks from two producers. Several methods were thus tested to extract free phage particles from cider, in order to explore the phageome, and prophages were searched for inside bacterial metagenomes throughout the cider fermentation.

2. Materials and Methods

2.1. Cider Sample Collection for Phageome and Prophage Investigation

A tank from an industrial producer (B) and a tank from a hand-crafted producer (P), located in the Normandy region (France), were sampled during the first month of the cider fermentation process, at four time points, to explore the presence of free phage particles and of prophages. Details about the collected samples are given in Table 1.

Table 1. Cider samples collected for the study of the phageome and for the prophage investigation.

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

2.2. Methodological Developments for Collecting Phage Particles from Cider and for Phageome DNA Extraction

To collect and extract total phage DNA from cider, different approaches were tested and are summarised in Table 2.

Table 2. Overview of the conditions tested for the collection of the phageome from cider. Roman numerals from I to IX indicate methodological steps referred to in the text.

	Tested Conditions to Collect Viral Particles from Cider								
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**	**VII**	**VIII Tangential Flow Filtration**	**IX Flocculation with $FeCl_3$**
Tested volumes of cider (mL)	50			20, 50, 1000				400	
Sample spiked with phage UCMA 21115 (PFU/mL)	Yes (10^4–10^9)							Yes (10^5)	Yes (10^4–10^8)
pH adjusted to 5.5			Yes				Yes		
Precipitation with 10% PEG-8000 and 0.5 M NaCl		Yes	Yes		Yes	Yes	Yes		
Centrifugation step	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes		
DNA extraction from	Pellet	Supernatant	Pellet	Pellet	Supernatant	Pellet	Pellet	Retentate	Flocculate

2.2.1. Validation of Methods on Cider Samples Spiked with Phages

First, phageome DNA extraction was tested on cider samples spiked with phage UCMA 21115, previously isolated from cider [23] and originating from the UCMA collection (Université de Caen Microbiologie Alimentaire, Caen, France), in order to validate the method used. Concentrations of phage UCMA 21115 ranging from 10^4 to 10^9 PFU/mL were used (Table 2—**I**, **II** and **III**). Spiked cider samples (50 mL) were centrifuged at 4700× *g* for 20 min at 4 °C, and the pellet was suspended into 500 µL SM buffer (200 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$, 50 mM Tris pH 7.5) (Table 2—**I**). Phage precipitation with PEG-8000 (*w*/*v*) and 0.5 M NaCl was also tested by adding them directly to spiked cider, adjusted (Table 2—**III**) or not (Table 2—**II**) to pH 5.5. PEG-8000 addition was followed by an incubation step at 4 °C overnight to maximise the precipitation of phage particles. Then, samples were centrifuged, as described above, and the pellets were suspended into 500 µL SM buffer.

In all cases, one volume of chloroform was added to the pellets or to the precipitates suspended into 500 µL SM buffer beforehand, in order to eliminate membrane vesicles [11]. Samples were then centrifuged at 8000× *g* for 5 min. The aqueous phase was treated with DNAse (Fisher Bioreagents, Vilnius, Lithuania) and RNAse (Thermofisher, Vilnius, Lithuania) for 1 h at 37 °C to eliminate non-viral DNA. Then, 10% SDS and 20 mg/mL proteinase K (Thermofisher, Vilnius, Lithuania) were added and an incubation step at 56 °C for 20 min was performed [24]. Finally, phage DNA were extracted with three different methods. The first one (named buffer 1), based on a method described for faecal samples, consisted in the addition of 100 µL Phage Lysis Buffer (4.5 M guanidinium isothiocyanate, 44 mM sodium citrate pH 7.0, 0.88% sarkosyl, 0.72% 2-mercaptoethanol) [2]. In the two other methods, Phage Lysis Buffer was supplemented with 1% (buffer 2) or 2% (buffer 3) of polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), in order to counteract the effects of cider polyphenols. These approaches were based on previous protocols designed for plant DNA extraction [25]. Samples were then incubated at 65 °C for 10 min.

Phage DNA purification was performed by two successive steps of phenol:chloroform: isoamyl 25:24:1 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (*v*/*v*) treatment and centrifugation at 8000× *g* for 5 min. DNA precipitation was performed with 2.5 volumes of absolute ice-cold ethanol before a centrifugation step at 13,000× *g* for 15 min at 4 °C. DNA was eluted in 50 µL of water, and quantified using a Nano TECAN spectrophotometer (Life Science, Zürich, Switzerland). DNA integrity was checked on a 1% agarose gel.

2.2.2. Application to Non-Spiked Cider Samples

Phageome DNA extraction protocols were then applied to cider samples (not spiked with exogenous phage UCMA 21115), using different volumes (20, 50 and 1000 mL) (Table 2—**IV**, **V**, **VI**, **VII**). Cider samples were centrifuged at 4700× *g* for 20 min at 4 °C, and DNA extractions were performed on the pellets suspended into 500 µL SM buffer beforehand (Table 2—**IV**) and on the supernatants (Table 2—**V**) to maximise the chances of obtaining phage DNA. Supernatants were first filtered through 0.45 µm filters and precipitated overnight with PEG-8000 at 4 °C, before being centrifuged at 4700× *g* for 20 min at

4 °C. The resulting pellets were suspended into 500 µL SM buffer prior to DNA extraction, as described above.

DNA extractions were also directly performed after the addition of PEG-8000 and NaCl, prior to the first centrifugation step, on cider samples adjusted to pH 5.5 (Table 2—**VII**) or not (Table 2—**VI**). The precipitates were centrifuged as described above, and the pellets were suspended into 500 µL SM buffer. DNA was extracted following the same methods as described above.

2.2.3. Optimisation of the Method to Collect Phage Particles from Cider

To concentrate phage particles from cider, 400 mL of cider was filtered with a tangential flow filtration (TFF) method (Table 2—**VIII**). The TFF system used was the Vivaflow® 50 (Sartorius, Göttingen, Germany), a PES membrane cassette with a total surface area of 50 cm^2 and a molecular weight cut-off of 100 kDa. In order to validate the functioning of the TFF system, cider was spiked with exogenous phage UCMA 21115, at a concentration of 10^5 PFU/mL. Retentate was filtered through 0.45 µm filters before DNA extraction, as described above.

The second method used to concentrate phage particles was the chemical Fe-based flocculation, as described for the concentration of ocean viruses from large volume samples (Table 2—**IX**) [26]. As for TFF, 400 mL of cider spiked with exogenous phage UCMA 21115, at concentrations ranging from 10^4 to 10^8 PFU/mL, was tested. Briefly, $FeCl_3$ was added to cider samples to obtain a final concentration of 1 mg/L before incubation at room temperature for 1 h to allow Fe-phage complexes to flocculate. Then, the solutions were filtered on Whatman polycarbonate membrane filters with 0.8 µm-pores. Finally, filter retentates were suspended into 10 mL suspension buffer (0.25 M ascorbic acid, 0.2 M Mg_2EDTA, pH 6.0) before DNA extraction, as described above.

In parallel, phage isolation was also performed on these retentates from TFF and flocculation, potentially enriched in phages. Isolation and propagation were carried out on 160 strains from genera found in cider (Table S1), using the classical double layer plate technique with MRS 0.5% (*w*/*v*) supplemented with 10 mM $CaCl_2$ and 10 mM $MgSO_4$, and incubated at 30 °C for 24 h to allow for the formation of plaques.

2.3. Microbial DNA Extraction for Prophage Investigation

At each sampling time (Table 1), 50 mL of cider samples were centrifuged at 4700× *g* for 20 min at 4 °C. Total DNA from pellets was extracted and purified using the NucleoSpin Soil kit (Macherey Nagel, France) according to the manufacturer's instructions. DNA quality and quantity were checked as described above.

2.4. DNA Sequencing and Bioinformatics Analysis

DNA library preparation and sequencing were carried out at Genewiz facilities (Leipzig, Germany), on an Illumina HiSeq sequencer producing paired-end reads of 2 × 150 bp in length. To access the quality of raw reads FastQC v.0.11.9 [27] was used. FastP v 0.20.0 [28] was used to eliminate reads with a length inferior to 50 nucleotides and bases with a bad quality (lower than 15). Sequence assembly was performed with SPADES v 3.14.0 with option—meta [29]—and only contigs longer than 1 kb were kept. Moreover, taxonomic assignations to access the composition of trimmed reads was done using kaiju v 1.7.3 [30] against database nr_euk (103 M protein sequences from nr: Bacteria, Archaea, Viruses, Fungi and microbial eukaryotes). The sequencing data from this study are available in NCBI SRA repository, reference number PRJNA803977.

2.5. Prophage Prediction

VIBRANT was used for prophage prediction [31]. VIBRANT is a hybrid machine learning used to maximise identification of lytic viral genomes and integrated proviruses, including highly diverse viruses. VIBRANT was used separately for each sample and contigs identified with VIBRANT were clustered between all samples using cd-hit-est [32]

with default parameters (global sequence identity 90%). Reads were finally mapped on this set of contigs identified as potential phages. To generate abundance matrices, mapping results were converted into reads per length of the contig (in kb) per million (RPKM) and RPKM values of contigs above 5.0 were kept for analyses. Contigs identified by VIBRANT were aligned with BLAST against the NCBI non-redundant nucleotide database (E-value < 10^{-16} and percentage of identity >90%) to generate information about the host.

3. Results

3.1. Development of Methods for Phageome DNA Extraction from Cider

In order to explore the diversity of the phageome of cider, the total phage DNA was intended to be extracted from cider samples. Consequently, several methods for the collection of phages were tested (Table 2). For each type of sample preparation, three DNA extraction methods were performed (buffers 1, 2 and 3).

3.1.1. Validation of the Extraction Method after Collection of Phage Particles from Spiked Cider Samples

Phageome DNA extraction methods adapted from other matrices [2,11] were first tested on cider samples spiked with phage UCMA 21115 [23], at concentrations ranging from 10^4 to 10^9 PFU/mL. In some cases, the pH of the samples was adjusted to 5.5 (Table 2—**III–VII**), as it corresponded to a pH value suitable for phage DNA extraction from cider in preliminary experiments (data not shown).

This step was also intended to determine the threshold of phages necessary to collect enough DNA in this matrix. In all the tested conditions, phage DNA was only extracted in cider samples adjusted to pH 5.5 after PEG precipitation (Table 2—**III**). At phage concentrations inferior to 10^7 PFU/mL, no phage DNA was detected on agarose gel (Figure S1) whatever the DNA extraction buffer used, and very low quantities of DNA were obtained (less than 5–10 ng/µL). Phage DNA was detected at phage concentrations starting from 10^7 PFU/mL whatever the DNA extraction buffer used (Figure S1). No phage DNA was extracted (data not shown) from spiked cider samples when the pH was not adjusted to 5.5 (Table 2—**I**,**II**). This result showed that phage DNA extraction methods were only efficient at a phage concentration starting from 10^7 PFU/mL and at pH 5.5.

3.1.2. Extraction of Phage Particles from Non-Spiked Cider Samples

The methods to collect phages and to extract the phageome DNA were then tested in non-spiked cider samples (Table 2—**IV–VII**). No phage DNA was extracted regardless of the tested buffers, the sample volume or the sample preparation (pellets, supernatants, cider concentrated with PEG and cider adjusted to pH 5.5 before PEG precipitation) (data not shown). As no phage DNA could be recovered in the non-spiked cider samples, whatever the tested conditions, it suggested a low occurrence of lytic phages in cider (probably less than 10^7 PFU/mL), resulting in the difficulty to extract phageome DNA in such a fermented beverage.

3.1.3. Viral Concentration Methods Were Tested to Improve the Phageome DNA Extraction

The previous results revealed a presumably low quantity of lytic phages in cider shown by the difficulty to extract phageome DNA from non-spiked cider samples. Thus, concentration methods were used in order to improve the phageome DNA extraction, starting from larger volumes of cider than the volumes tested above.

TFF was intended to be used to concentrate phages from up to 5 L of cider. A primary attempt was performed with a reduced batch of 400 mL of cider spiked with phage UCMA 21115 at a concentration of about 1.9×10^5 PFU/mL (i.e., resulting in a total quantity of 7.6×10^7 phages in 400 mL) as a positive control and to set the filtration parameters. At first, TFF appeared to be a suitable method to concentrate phages in cider samples because the total quantity of spiked phages was recovered in the retentate, with 8×10^7 collected phages compared to the calculated 7.6×10^7 expected phages. Concerning the filtration

parameters, the flow rate was of 120 mL per hour for this cider sample, whereas it is rather around 750 mL per hour for sea water samples (supplier data). The attempts to filter (0.45 µm) the retentate (15 mL) to remove yeasts, bacteria and other cider components failed, as the cider retentate was too thick. As a result, phages were lost at this step with only 3.4×10^4 phages that were recovered, which represents a loss of 3 $\log_{10}$. In view of these results, the option to use TFF in larger volumes of non-spiked cider samples was abandoned.

Another method to concentrate phages was tested, the iron (Fe)-based flocculation, which has the advantage of using large-pore-size filters (0.8 µm) compared to TFF. Concerning cider samples spiked with phage UCMA 21115, phage recovery was quite good at high phage concentrations. It was of 8.5×10^8 for cider samples, for an initial inoculation of 4.0×10^{10}, representing a phage loss of about ≈1 $\log_{10}$ (Table 3). At low phage concentrations, the phage recovery with Fe-based flocculation was less efficient. For example, with an initial inoculation of 4.0×10^6, 5.0×10^3 phage particles were retrieved in cider samples (Table 3). In addition, filtration of the cider sample was also quite complicated due to clogging. In view of these results, the option to use (Fe)-based flocculation on larger volumes of non-spiked cider samples was also abandoned.

Table 3. Efficiency of iron-based flocculation to recover phage UCMA 21115 from cider samples.

Inoculated Quantity of Phage UCMA 21115 in 400 mL of Cider (i.e., Concentration)	Retrieved Quantity of Phage UCMA 21115 after Flocculation in Cider
4×10^{10} (1×10^8 PFU/mL)	8.5×10^8
4×10^9 (1×10^7 PFU/mL)	9.9×10^7
4×10^8 (1×10^6 PFU/mL)	6.6×10^6
4×10^7 (1×10^5 PFU/mL)	7.6×10^5
4×10^6 (1×10^4 PFU/mL)	5.0×10^3

In addition, the isolation of phages was attempted by using 160 potential host strains from genera found in cider, from the TFF retentate and after cider flocculation, to check the presence of potential lytic phages on these bacteria. No phage, except phage UCMA 21115 used as positive control, was retrieved from these samples, confirming that the phageome of cider was not abundant, and thus not easily accessible.

3.2. Prophage Investigation in Two Cider Tanks during Cider Fermentation

To complete the data concerning the lytic phageome, prophages present inside the metagenomes of the bacterial community involved in the cider fermentation process were investigated. As described in Table 1, cider sampling was carried out during the first month of cider fermentation in two tanks from two producers (B: industrial and P: handcrafted). The prophage investigation was performed after a shotgun sequencing of whole genomic DNA, at each sampling time, through the exploration of prophage sequences in the bacterial metagenomic data. The number of reads was homogenous for all samples, with an amount of 2×10^7 reads per sample, except for C1B3 which had more reads than the others (8×10^7). The microbial composition of tanks B and P was of course accessible through these data, with tank P containing more reads assigned to Eukaryota than tank B (Figures S2 and S3, Table S2). Tank B presented a higher abundance in bacteria than tank P (Figure S2, Table S2). Within the bacteria, both tanks were dominated by the *Proteobacteria* phylum during the first three sampling times, while LAB appeared on the last sampling time (C1B4 and C2P4) (Figure S4).

After the phage prediction in the bacterial sequences with VIBRANT, 1603 contigs of putative phages were identified (114 were initially predicted as temperate and 1489 as lytic), the vast majority with a low- or medium-quality level. Among these contigs, only two complete prophages were identified, NODE_55 and NODE_129. The prophage NODE_55 was of 46,931 bases in length and matched with a *Podoviridae* CT3IJ1 (identity of 93%, coverage <1%, accession number BK023809.1) after a BLAST search against the NCBI virus database. The prophage NODE_129 was of 37,572 bases in length and matched with a *Siphoviridae* CTEVG3 (identity of 81%, coverage 16%, accession number BK027610.1) after a BLAST against the NCBI virus database. The 1603 phage contigs identified with VIBRANT were subjected to BLAST against the NCBI non-redundant nucleotide database (E-value < 10^{-16} and percentage of identity >90%) to generate information about the potential host. A total of 429 contigs (417 initially identified as lytic and 12 as temperate) gave no host identification according to the selected criteria, and were eliminated from the analysis of the prophages. So, 1174 contigs were retained, among them, 101 classified as temperate and 1073 as lytic by VIBRANT. Further analysis finally showed that all phage contigs matched with bacterial genomes and, therefore, were confirmed prophages. These results showed that the analysis of the life cycle by VIBRANT was a bit more uncertain in this case, probably due to the low-quality level of identification obtained.

A heatmap representation was used to visualise the dynamics of the temperate phage contigs inside bacterial metagenomes during the first month of the fermentation process for producer B (Figure 1). No heatmap could be made for producer P because the abundance was too small (RPKM max = 11.4 and 1593 values under an RPKM of 5.0 almost all equal to 0). Overall, the abundance of prophages in producer B samples tended to increase for some hosts, while other prophages fluctuated or decreased. For example, the occurrence of contig NODE_10382, affiliated to the *Rahnella aqualitis* species, increased overtime (RPKM of 13.6, 39.5, 36.4 and 35.6 in C1B1, C1B2, C1B3 and C1B4, respectively) (Table S3). Contig NODE_10904, affiliated to *Pantoea agglomerans*, decreased after C1B1 (RPKM moving from 29.2 to 7.7, 9.0 and 9.7 in C1B1, C1B2, C1B3 and C1B4, respectively) and contig NODE_3329, associated to *Kluyvera intermedia*, varied over time (RPKM passing from 17.9 to 25.9, 20.1 and 17.1 in C1B1, C1B2, C1B3 and C1B4, respectively) (Table S3). As expected, these observations of prophage occurrence altogether followed the same patterns as the levels of abundance of the bacterial genera to which they were associated. For example, the genus *Rahnella* increased overtime (total abundance of 4%, 14%, 12% and 11% in C1B1, C1B2, C1B3 and C1B4, respectively), the genus *Pantoea* decreased overtime (total abundance of 15%, 4%, 5% and 5% in C1B1, C1B2, C1B3 and C1B4, respectively), and the genus *Kluyvera* varied overtime (total abundance of 7%, 11%, 10% and 8% in C1B1, C1B2, C1B3 and C1B4, respectively) (data not shown).

Furthermore, gene identification in all the phage contigs was carried out using PROKKA. It did not reveal any gene of potential interest, as more than 95% of the coding DNA sequences were identified as hypothetical proteins (data not shown).

In addition to eukaryotic and bacterial sequences, which included prophages, a marginal part of viral DNA was also recovered (only 0.08% of the total reads), indicating traces of viral particles in the tanks (Figure 2). Among this small part of the total sequences, 75% of the viral sequences in tank B belonged to phages of the *Caudoviricetes* class (former *Caudovirales* order) [33], 39% to the myophages (former *Myoviridae* family), 23 to 26% to the siphophages (former *Siphoviridae* family) and 6 to 8% to the podophages (former *Podoviridae* family) at all the time points (Figure 2). In tank P, phages of the *Caudoviricetes* class were also recovered (16 to 28% of myophages, 10 to 19% of siphophages and 1 to 7% of podophages) (Figure 2). In this tank, the most abundant recovered sequences were those of viruses belonging to the *Mimiviridae* family, infecting amoeba and protists (10 to 35%) (Figure 2).

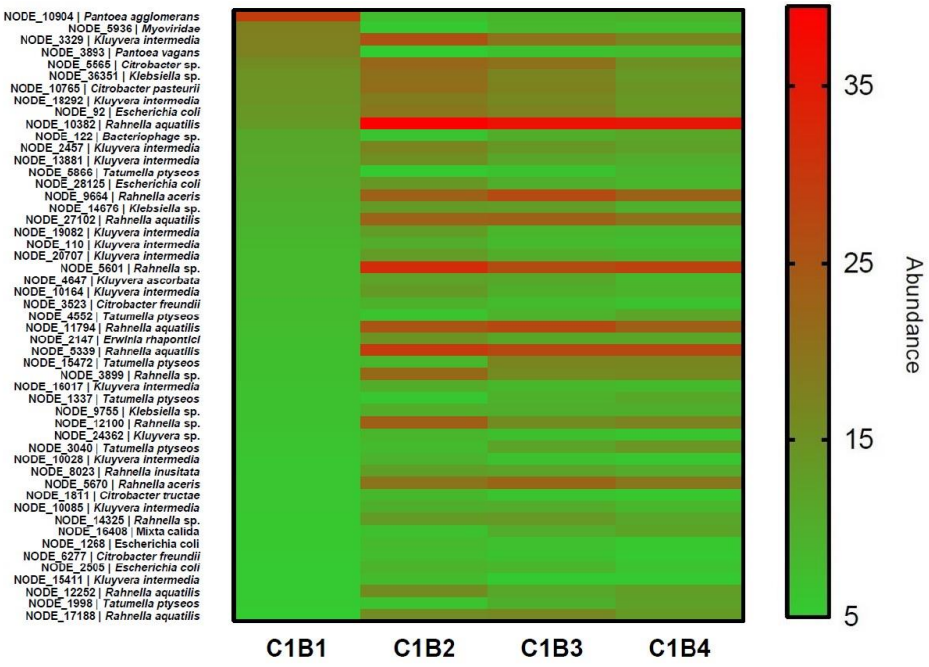


Figure 1. Heatmap showing the dynamics of the most abundant prophages retrieved during the first month of the fermentation process for producer B. C1 indicates the tank ID, and B1, B2, B3 and B4 are the sampling points during the fermentation process, in reference to Table 1. NODE referred to the identified prophage and the mentioned bacterial identifications represent the best host species of the prophage predicted after blast (E-value < 10^{-16}; % of identity >85%). RPKM value above 5.0 was considered for the construction of the heatmap. Green to red: lowest to highest abundance.

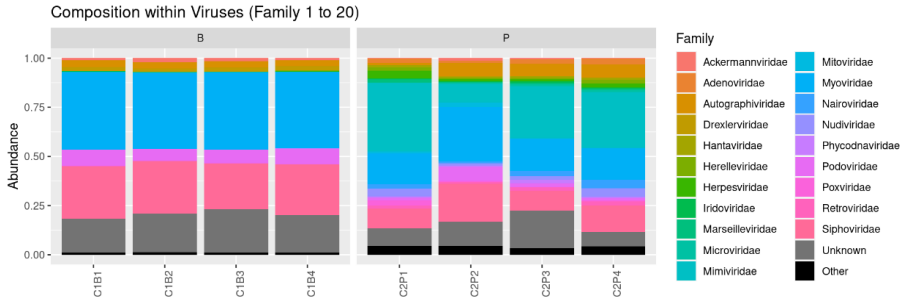


Figure 2. Virus taxonomic assignations at the family level during cider fermentation process for two producers (B: industrial and P: hand-crafted). C1 and C2 indicate the tank ID, and B1, B2, B3, B4, P1, P2, P3 and P4 are the sampling points during the fermentation process, in reference to Table 1.

4. Discussion

The interest in phageomes, has been growing in recent years [8]. However, only three studies have been strictly dedicated to the phageome of fermented foods to date [9–11], and one to the airborne virome in cheese-making factories [12]. No published study about the phageomes in fermented beverages is available so far. It has been shown that the phageome

plays an essential role in the microbial structure and balance of ecosystems, this being especially described in the human gut microbiota [24]. In this context, it was interesting to investigate the phageome of a fermented beverage, cider, in order to assess the diversity and occurrence of free lytic phages in different cider samples throughout a fermentation process in an industrial producer (B) and in a hand-crafted producer (P). It appeared that extracting free phage DNA from cider is not easily achievable when adapting protocols used for other types of samples, such as faeces [2] and cheese [11]. Indeed, in these matrices, the level of phages is usually high (>10^9 particles per gram), and phage DNA extraction seems thus facilitated. When using these methods in cider samples spiked with exogenous phage UCMA 21115, no phage DNA was recovered when the phage levels were under 10^7 PFU/mL. To improve phage DNA extraction in cider, PVPP at 1% and 2% was used to limit the potential negative impact of polyphenols in cider, known to be present at high concentration levels [22]. This molecule was used in buffers for plant DNA extraction, also known for their high contents of phenolic compounds, and its use showed an improvement in DNA extraction [25]. No improvement in phage DNA extraction was achieved using PVPP in cider. Polyphenols can be a way to explain the low quantity of phages in cider due to their antiviral properties [34]. They can act either by affecting the host killing the activity of phages, such as for two phages (OE33PA and Vinitor162) infecting *Oenococcus oeni* in wine, either by interacting with the phage tail or competing with the host site of recognition [35].

Tangential flow filtration [36] and Fe-based flocculation [24], two classical methods used for the concentration of viruses from marine waters, were then tested to increase the likelihood of getting higher quantities of phages and thus of extracting phage DNA from larger volumes of cider samples. Even so, free phage DNA extraction could not be improved in cider. Considering these results, it appears that cider is a fermented matrix with probable low levels of free lytic phages, that are difficult to concentrate for extracting phageome DNA. This was corroborated in the current study as no lytic phage was isolated against 160 strains by a double layer agar plate, even after TFF and flocculation. It is probably the case for other fermented beverages, as very few lytic phages from fermented beverages are described in the literature to date. Two lytic phages targeting *O. oeni* (OE33PA and Vinitor162) and one lytic phage targeting *Gluconobacter cerinus* (GC1) have been recently described in wine [18,37,38]. Moreover, in a previous work, 120 samples (cider, apple must, crushed apples) were screened for phages targeting 160 potential strains from genera found in cider, and only one lytic siphophage UCMA 21115 was isolated [23]. This result strengthens the hypothesis that cider is a poor reservoir of free lytic phages.

Cider, due to its harsh environment, presents a less complex bacterial diversity than other fermented foods or habitats [22]. The low microbial diversity could favour the temperate lifestyle of phages (lysogeny of prophages) because it results in an absence of predator/prey dynamics [15]. As the phageome of cider seemed scarce, a particular attention was thus paid to the prophages in cider throughout the fermentation process of producer (B) and producer (P). To date, no study has been focused on the prophages in their entirety in fermented foods and beverages, even if this topic is becoming an emerging field of investigations. A recent study on wine samples from three wineries investigated the prevalence of prophages in *O. oeni* strains through the fermentation process [39]. The majority of studies investigated the distribution of prophages in bacterial genomes, as is the case for the *Lactobacillaceae* strains, members of the former *Lactobacillus* genus [40], and for the *O. oeni* strains [41]. These studies highlight that prophage diversity varies from one species to another, and that prophages are retrieved in many strains. Prophages are also recognised as markers of diversity within a species in the case of *O. oeni*, and as sources of horizontal gene transfer in *Lactobacillus*. Prophages are also known as bacterial fitness enhancers. For example, *Streptococcus pyogenes* prophage, carrying genes encoding exotoxins, increased colonisation during scarlet fever [42], and an *Escherichia coli* strain carrying a prophage with a gene encoding antibiotic resistance was more adapted to its environment under antibiotic pressure [43]. These examples demonstrate the importance

of prophages on their host and the necessity to evaluate their impact and diversity in fermented foods and beverages, which is little documented to date at the scale of the whole bacterial community.

In the current study, a metagenomic approach was carried out to observe prophage signatures in bacterial metagenomes throughout the cider fermentation process. A total of 1174 putative prophage contigs were identified in silico in the bacterial metagenomes using VIBRANT software, such as has been done in cheese [44] and kefir [45]. Among them, two complete prophages were found, NODE_55 and NODE_129, matching with phages isolated from human gut metagenomic data. The majority of the prophages identified in the current study were related to bacterial genera classically associated with the apple microbiota, such as, for example, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pantoa*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas* [46,47]. The prophage dynamics in cider were correlated to their bacterial host dynamics over time. For example, some prophages, such as NODE_10382, increased, others, such as NODE_10904, decreased and some others, such as NODE_3329, fluctuated during the fermentation process. These observations were correlated to the level of bacteria of the same genera with which they were associated at each fermentation time point. The increase in the frequency of prophages over time could tend to show that lysogeny had probably been established and was predominant. Conversely, a decrease in prophage frequency could be associated to a decrease in lysogeny. Indeed, this decrease could be due to the fact that the prophages have entered a lytic cycle, and consequently, are less present in their hosts [48–50]. In the current study, it was not possible to determine if these prophages were active or not with this method of analysis and with the encountered difficulties to extract free lytic viral particles, as described above. In a study dealing with the virome of pigs, active and inactive prophages were distinguished with bioinformatic tools after the extraction of lytic viral particles [51]. Another possible method could be to induce prophages with mitomycine C as it has been performed on gut microbiota to study active prophages [52], bearing in mind a bias due to the fact that not all prophages are inducible. The main barrier for these types of approaches in cider, and probably in other fermented beverages, is the problematic extraction of phage DNA, due to their very low occurrence, and also to the particular physicochemical conditions encountered in these fermented beverages. Positive and negative correlations could be made in future experiments between lytic phages, prophages and bacterial proportions in cider throughout the fermentation process by combining the analyses of metabolites and food properties, as it has been described in cheese, for example [44]. For a better view of these dynamics in cider, and especially with LAB, it would be interesting to extend the timespan of the study looking at longer fermentation processes, such as cider intended to be used for the making of spirits and vinegars [53].

5. Conclusions

This study revealed the low occurrence of free lytic phages, and thus of phageome, in cider. This fermented beverage appears to be a poor reservoir of lytic phages in contrast to other food ecosystems, such as cheeses [11]. The presence of phages in cider is more likely to occur essentially as prophages throughout the fermentation process. Besides the fact that cider does not contain many phages, a number of questions are raised about fermented beverages. What is special about this type of ecosystem compared to other hostile environments where phages are found? Why have lytic phages not been able, at first sight, to adapt to this environment, even though it is quite rich in bacteria? Are polyphenols implicated in this situation? All these questions remain unanswered for the time being, and show the importance of looking at them in more details in order to better understand the place of phages in these ecosystems.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms10061203/s1, Figure S1: Agarose gels of phage DNA extraction from cider adjusted to pH 5.5 spiked with phage UCMA 21115. Figure S2: Microbial taxonomic assignations at the domain level during the cider fermentation process for two producers

(B: industrial and P: hand-crafted). Figure S3: Eukaryota taxonomic assignations at the genus level during the cider fermentation process for two producers (B: industrial and P: hand-crafted). Figure S4: Bacterial taxonomic assignations at the family level during cider fermentation process for two producers (B: industrial and P: hand-crafted). Table S1: Percentage of the number of reads attributed to Super-kingdoms in NCBI. Table S2: Bacterial strains used to isolate bacteriophages. Table S3: Occurrence of prophages for producer B and P.

Author Contributions: Conceptualisation: P.L., M.D. and N.D. Methodology: P.L., M.D. and N.D. Formal analysis: O.R., C.M. and P.L. Data curation: O.R., C.M., P.L., M.D. and N.D. Writing—original draft preparation: P.L., M.D. and N.D. Writing—review and editing: P.L., M.D., O.R., C.M. and N.D. Supervision: M.D. and N.D. Project administration: M.D and N.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation under a PhD Grant MENRT.

Data Availability Statement: Publicly available datasets were analysed in this study. This data can be found in the NCBI SRA repository, reference number PRJNA803977.

Acknowledgments: The authors would like to thank Céline Caillard and Erwan Renard for their technical support. We are grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAE, 2020. Migale bioinformatics Facility, doi:10.15454/1.5572390655343293E12) for providing computing and storage resources.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Manrique, P.; Bolduc, B.; Walk, S.T.; van der Oost, J.; de Vos, W.M.; Young, M.J. Healthy Human Gut Phageome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 10400–10405. [CrossRef]
2. Shkoporov, A.N.; Ryan, F.J.; Draper, L.A.; Forde, A.; Stockdale, S.R.; Daly, K.M.; McDonnell, S.A.; Nolan, J.A.; Sutton, T.D.S.; Dalmasso, M.; et al. Reproducible Protocols for Metagenomic Analysis of Human Faecal Phageomes. *Mi-Crobiome* **2018**, *6*, 68. [CrossRef] [PubMed]
3. Dalmasso, M.; Hill, C.; Ross, R.P. Exploiting Gut Bacteriophages for Human Health. *Trends Microbiol.* **2014**, *22*, 399–405. [CrossRef] [PubMed]
4. Carr, V.R.; Shkoporov, A.; Gomez-Cabrero, D.; Mullany, P.; Hill, C.; Moyes, D.L. The Human Oral Phageome Is Highly Diverse and Rich in Jumbo Phages. *bioRxiv* **2020**. [CrossRef]
5. Ma, Y.; Marais, A.; Lefebvre, M.; Theil, S.; Svanella-Dumas, L.; Faure, C.; Candresse, T. Phytovirome Analysis of Wild Plant Populations: Comparison of Double-Stranded RNA and Virion-Associated Nucleic Acid Metagenomic Approaches. *J. Virol.* **2019**, *94*, e01462-19. [CrossRef]
6. Roux, S.; Brum, J.R.; Dutilh, B.E.; Sunagawa, S.; Duhaime, M.B.; Loy, A.; Poulos, B.T.; Solonenko, N.; Lara, E.; Poulain, J.; et al. Ecogenomics and Potential Biogeochemical Impacts of Globally Abundant Ocean Viruses. *Nature* **2016**, *537*, 689–693. [CrossRef]
7. Zhong, Z.-P.; Tian, F.; Roux, S.; Gazitúa, M.C.; Solonenko, N.E.; Li, Y.-F.; Davis, M.E.; Van Etten, J.L.; Mosley-Thompson, E.; Rich, V.I.; et al. Glacier Ice Archives Nearly 15,000-Year-Old Microbes and Phages. *Microbiome* **2021**, *9*, 160. [CrossRef]
8. Ledormand, P.; Desmasures, N.; Dalmasso, M. Phage Community Involvement in Fermented Beverages: An Open Door to Technological Advances? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *61*, 2911–2920. [CrossRef]
9. Jung, M.-J.; Kim, M.-S.; Yun, J.-H.; Lee, J.-Y.; Kim, P.S.; Lee, H.-W.; Ha, J.-H.; Roh, S.W.; Bae, J.-W. Viral Community Predicts the Geographical Origin of Fermented Vegetable Foods More Precisely than Bacterial Community. *Food Microbiol.* **2018**, *76*, 319–327. [CrossRef]
10. Park, E.-J.; Kim, K.-H.; Abell, G.C.; Kim, M.-S.; Roh, S.W.; Bae, J.-W. Metagenomic Analysis of the Viral Communities in Fermented Foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 1284–1291. [CrossRef]
11. Dugat-Bony, E.; Lossouarn, J.; De Paepe, M.; Sarthou, A.-S.; Fedala, Y.; Petit, M.-A.; Chaillou, S. Viral Metagenomic Analysis of the Cheese Surface: A Comparative Study of Rapid Procedures for Extracting Viral Particles. *Food Microbiol.* **2020**, *85*, 103278. [CrossRef] [PubMed]
12. Colombo, S.; Arioli, S.; Gargari, G.; Neri, E.; Della Scala, G.; Mora, D. Characterization of Airborne Viromes in Cheese Production Plants. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *125*, 1444–1454. [CrossRef] [PubMed]
13. Feiner, R.; Argov, T.; Rabinovich, L.; Sigal, N.; Borovok, I.; Herskovits, A.A. A New Perspective on Lysogeny: Prophages as Active Regulatory Switches of Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 641–650. [CrossRef] [PubMed]
14. Howard-Varona, C.; Lindback, M.M.; Bastien, G.E.; Solonenko, N.; Zayed, A.A.; Jang, H.; Andreopoulos, B.; Brewer, H.M.; del Rio, T.G.; Adkins, J.N.; et al. Phage-Specific Metabolic Reprogramming of Virocells. *ISME J.* **2020**, *14*, 881–895. [CrossRef] [PubMed]
15. Mills, S.; Shanahan, F.; Stanton, C.; Hill, C.; Coffey, A.; Ross, R.P. Movers and Shakers: Influence of Bacteriophages in Shaping the Mammalian Gut Microbiota. *Gut Microbes* **2013**, *4*, 4–16. [CrossRef] [PubMed]

16. LeLièvre, V.; Besnard, A.; Schlusselhuber, M.; Desmasures, N.; Dalmasso, M. Phages for Biocontrol in Foods: What Opportunities for *Salmonella* sp. Control along the Dairy Food Chain? *Food Microbiol.* **2019**, *78*, 89–98. [CrossRef]
17. Pietrysiak, E.; Smith, S.; Ganjyal, G.M. Food Safety Interventions to Control *Listeria monocytogenes* in the Fresh Apple Packing Industry: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2019**, *18*, 1705–1726. [CrossRef]
18. Philippe, C.; Krupovic, M.; Jaomanjaka, F.; Claisse, O.; Petrel, M.; Le Marrec, C. Bacteriophage GC1, a Novel Tectivirus Infecting *Gluconobacter cerinus*, an Acetic Acid Bacterium Associated with Wine-Making. *Viruses* **2018**, *10*, 39. [CrossRef]
19. Deasy, T.; Mahony, J.; Neve, H.; Heller, K.J.; Van Sinderen, D. Isolation of a Virulent *Lactobacillus brevis* Phage and Its Application in the Control of Beer Spoilage. *J. Food Prot.* **2011**, *74*, 2157–2161. [CrossRef]
20. Mahony, J.; Van Sinderen, D. Current Taxonomy of Phages Infecting Lactic Acid Bacteria. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 7. [CrossRef]
21. Misery, B.; Legendre, P.; Rue, O.; Bouchart, V.; Guichard, H.; Laplace, J.M.; Cretenet, M. Diversity and Dynamics of Bacterial and Fungal Communities in Cider for Distillation. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, *339*, 108987. [CrossRef]
22. Cousin, F.J.; Le Guellec, R.; Schlusselhuber, M.; Dalmasso, M.; Laplace, J.-M.; Cretenet, M. Microorganisms in Fermented Apple Beverages: Current Knowledge and Future Directions. *Microorganisms* **2017**, *5*, 39. [CrossRef] [PubMed]
23. Ledormand, P.; Desmasures, N.; Bernay, B.; Goux, D.; Monnet, C.; Dalmasso, M. Molecular Approaches to Uncover Phage-Lactic Acid Bacteria Interactions in a Model Community Simulating Fermented Beverages. *Food Microbiol.* 2022, *in press*. [CrossRef]
24. Draper, L.A.; Ryan, F.J.; Dalmasso, M.; Casey, P.G.; McCann, A.; Velayudhan, V.; Ross, R.P.; Hill, C. Autochthonous Faecal Virome Transplantation (FVT) Reshapes the Murine Microbiome after Antibiotic Perturbation. *bioRxiv* **2019**. [CrossRef]
25. Kasajima, I.; Sasaki, K.; Tanaka, Y.; Terakawa, T.; Ohtsubo, N. Large-Scale Extraction of Pure DNA from Mature Leaves of Cyclamen Persicum Mill. and Other Recalcitrant Plants with Alkaline Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). *Sci. Hortic.* **2013**, *164*, 65–72. [CrossRef]
26. John, S.G.; Mendez, C.B.; Deng, L.; Poulos, B.; Kauffman, A.K.M.; Kern, S.; Brum, J.; Polz, M.F.; Boyle, E.A.; Sullivan, M.B. A Simple and Efficient Method for Concentration of Ocean Viruses by Chemical Flocculation. *Environ. Microbiol. Rep.* **2011**, *3*, 195–202. [CrossRef]
27. Andrews, S. Fastqc: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data; Babraham Bioinformatics. 2010. Available online: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/ (accessed on 8 June 2022).
28. Chen, S.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Gu, J. Fastp: An Ultra-Fast All-in-One FASTQ Preprocessor. *Bioinformatics* **2018**, *34*, i884–i890. [CrossRef]
29. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19*, 455–477. [CrossRef]
30. Menzel, P.; Ng, K.L.; Krogh, A. Fast and Sensitive Taxonomic Classification for Metagenomics with Kaiju. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11257. [CrossRef] [PubMed]
31. Kieft, K.; Zhou, Z.; Anantharaman, K. VIBRANT: Automated Recovery, Annotation and Curation of Microbial Viruses, and Evaluation of Viral Community Function from Genomic Sequences. *Microbiome* **2020**, *8*, 90. [CrossRef]
32. Li, W.; Godzik, A. Cd-Hit: A Fast Program for Clustering and Comparing Large Sets of Protein or Nucleotide Sequences. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1658–1659. [CrossRef] [PubMed]
33. Turner, D.; Kropinski, A.M.; Adriaenssens, E.M. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses* **2021**, *13*, 506. [CrossRef] [PubMed]
34. Catel-Ferreira, M.; Tnani, H.; Hellio, C.; Cosette, P.; Lebrun, L. Antiviral Effects of Polyphenols: Development of Bio-Based Cleaning Wipes and Filters. *J. Virol. Methods* **2015**, *212*, 1–7. [CrossRef] [PubMed]
35. Philippe, C.; Chaïb, A.; Jaomanjaka, F.; Cluzet, S.; Lagarde, A.; Ballestra, P.; Decendit, A.; Petrel, M.; Claisse, O.; Goulet, A.; et al. Wine Phenolic Compounds Differently Affect the Host-Killing Activity of Two Lytic Bacteriophages Infecting the Lactic Acid Bacterium *Oenococcus oeni*. *Viruses* **2020**, *12*, 1316. [CrossRef] [PubMed]
36. Cai, L.; Yang, Y.; Jiao, N.; Zhang, R. Evaluation of Tangential Flow Filtration for the Concentration and Separation of Bacteria and Viruses in Contrasting Marine Environments. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136741. [CrossRef]
37. Jaomanjaka, F.; Claisse, O.; Blanche-Barbat, M.; Petrel, M.; Ballestra, P.; Le Marrec, C. Characterization of a New Virulent Phage Infecting the Lactic Acid Bacterium *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol.* **2016**, *54*, 167–177. [CrossRef]
38. Philippe, C.; Chaïb, A.; Jaomanjaka, F.; Claisse, O.; Lucas, P.M.; Samot, J.; Cambillau, C.; Le Marrec, C. Characterization of the First Virulent Phage Infecting *Oenococcus oeni*, the Queen of the Cellars. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 596541. [CrossRef]
39. Chaïb, A.; Claisse, O.; Delbarre, E.; Bosviel, J.; Le Marrec, C. Assessment of the Lysogenic Status in the Lactic Acid Bacterium *O. oeni* during the Spontaneous Malolactic Fermentation of Red Wines. *Food Microbiol.* **2022**, *103*, 103947. [CrossRef] [PubMed]
40. Pei, Z.; Sadiq, F.A.; Han, X.; Zhao, J.; Zhang, H.; Ross, R.P.; Lu, W.; Chen, W. Comprehensive Scanning of Prophages in *Lactobacillus*: Distribution, Diversity, Antibiotic Resistance Genes, and Linkages with CRISPR-Cas Systems. *mSystems* **2021**, *6*, e0121120. [CrossRef]
41. Claisse, O.; Chaïb, A.; Jaomanjaka, F.; Philippe, C.; Barchi, Y.; Lucas, P.M.; Le Marrec, C. Distribution of Prophages in the *Oenococcus oeni* Species. *Microorganisms* **2021**, *9*, 856. [CrossRef]
42. Brouwer, S.; Barnett, T.C.; Ly, D.; Kasper, K.J.; De Oliveira, D.M.P.; Rivera-Hernandez, T.; Cork, A.J.; McIntyre, L.; Jespersen, M.G.; Richter, J.; et al. Prophage Exotoxins Enhance Colonization Fitness in Epidemic Scarlet Fever-Causing *Streptococcus pyogenes*. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5018. [CrossRef] [PubMed]

43. Wendling, C.C.; Refardt, D.; Hall, A.R. Fitness Benefits to Bacteria of Carrying Prophages and Prophage-Encoded Antibiotic-Resistance Genes Peak in Different Environments. *Evolution* **2021**, *75*, 515–528. [CrossRef] [PubMed]
44. Yang, C.; You, L.; Kwok, L.-Y.; Jin, H.; Peng, J.; Zhao, Z.; Sun, Z. Strain-Level Multiomics Analysis Reveals Significant Variation in Cheeses from Different Regions. *LWT* **2021**, *151*, 112043. [CrossRef]
45. Tenorio-Salgado, S.; Castelán-Sánchez, H.G.; Dávila-Ramos, S.; Huerta-Saquero, A.; Rodríguez-Morales, S.; Merino-Pérez, E.; Roa de la Fuente, L.F.; Solis-Pereira, S.E.; Pérez-Rueda, E.; Lizama-Uc, G. Metagenomic Analysis and Antimicrobial Activity of Two Fermented Milk Kefir Samples. *Microbiol. Open* **2021**, *10*, e1183. [CrossRef] [PubMed]
46. Abadias, M.; Cañamás, T.P.; Asensio, A.; Anguera, M.; Viñas, I. Microbial Quality of Commercial "Golden Delicious" Apples throughout Production and Shelf-Life in Lleida (Catalonia, Spain). *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *108*, 404–409. [CrossRef]
47. Liu, J.; Abdelfattah, A.; Norelli, J.; Burchard, E.; Schena, L.; Droby, S.; Wisniewski, M. Apple Endophytic Microbiota of Different Rootstock/Scion Combinations Suggests a Genotype-Specific Influence. *Microbiome* **2018**, *6*, 18. [CrossRef] [PubMed]
48. Kim, M.-S.; Bae, J.-W. Lysogeny Is Prevalent and Widely Distributed in the Murine Gut Microbiota. *ISME J.* **2018**, *12*, 1127–1141. [CrossRef]
49. Chevallereau, A.; Pons, B.J.; van Houte, S.; Westra, E.R. Interactions between Bacterial and Phage Communities in Natural Environments. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *20*, 49–62. [CrossRef]
50. Howard-Varona, C.; Hargreaves, K.R.; Abedon, S.T.; Sullivan, M.B. Lysogeny in Nature: Mechanisms, Impact and Ecology of Temperate Phages. *ISME J.* **2017**, *11*, 1511–1520. [CrossRef] [PubMed]
51. Billaud, M.; Lamy-Besnier, Q.; Lossouarn, J.; Moncaut, E.; Dion, M.B.; Moineau, S.; Traoré, F.; Le Chatelier, E.; Denis, C.; Estelle, J.; et al. Analysis of Viromes and Microbiomes from Pig Fecal Samples Reveals That Phages and Prophages Rarely Carry Antibiotic Resistance Genes. *ISME Commun.* **2021**, *1*, 55. [CrossRef]
52. Zünd, M.; Ruscheweyh, H.-J.; Field, C.M.; Meyer, N.; Cuenca, M.; Hoces, D.; Hardt, W.-D.; Sunagawa, S. High Throughput Sequencing Provides Exact Genomic Locations of Inducible Prophages and Accurate Phage-to-Host Ratios in Gut Microbial Strains. *Microbiome* **2021**, *9*, 77. [CrossRef] [PubMed]
53. Trček, J.; Mahnič, A.; Rupnik, M. Diversity of the Microbiota Involved in Wine and Organic Apple Cider Submerged Vinegar Production as Revealed by DHPLC Analysis and Next-Generation Sequencing. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *223*, 57–62. [CrossRef] [PubMed]

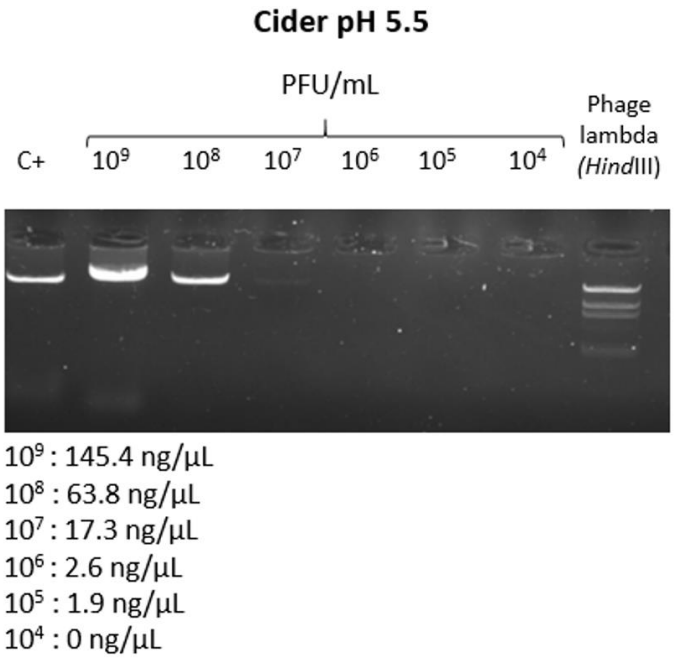


Figure S1: Agarose gels of phage DNA extraction from cider adjusted to pH 5.5 spiked with phage UCMA 21115.

Concentrations ranging from 10^4 to 10^9 PFU/mL and buffer 1 was used. C+ means positive control of extraction, with no adjusted pH MRS (≈ 7.6) spiked with phage UCMA 21115 at 10^8 PFU/mL.

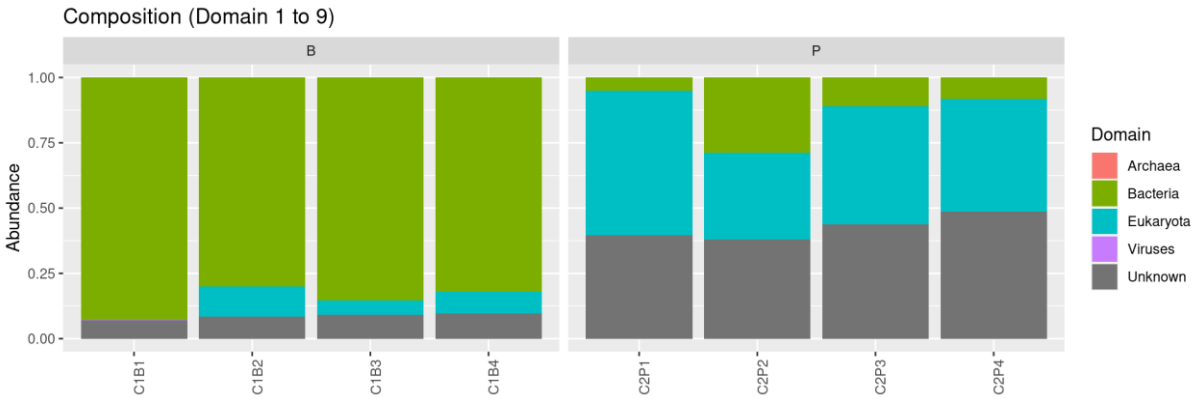


Figure S2: Microbial taxonomic assignations at the domain level during the cider fermentation process for two producers (B: industrial and P: hand-crafted).

C1 and C2 indicate the tank ID, and B1, B2, B3, B4, P1, P2, P3, and P4 the sampling points during the fermentation process, in reference to Table 1. The identification of domains was based on "super-kingdoms" from NCBI.

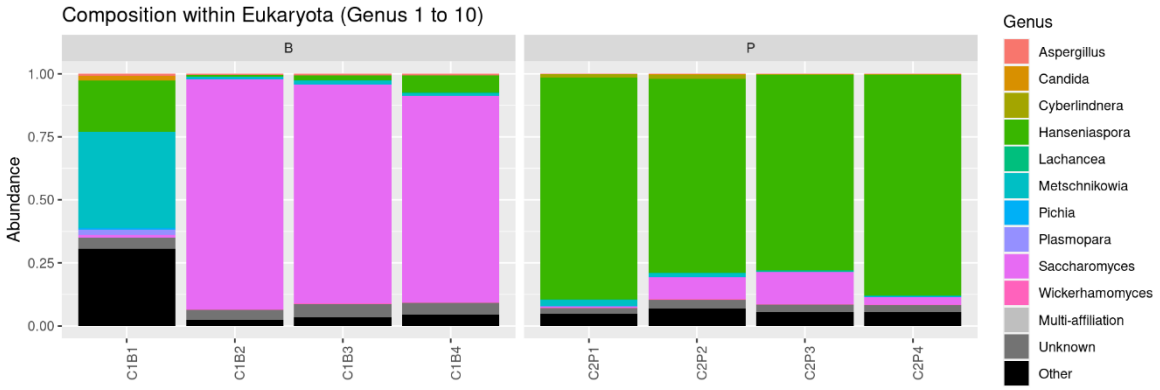


Figure S3: Eukaryota taxonomic assignations at the genus level during the cider fermentation process for two producers (B: industrial and P: hand-crafted). C1 and C2 indicate the tank ID, and B1, B2, B3, B4, P1, P2, P3, and P4 the sampling points during the fermentation process, in reference to Table 1.

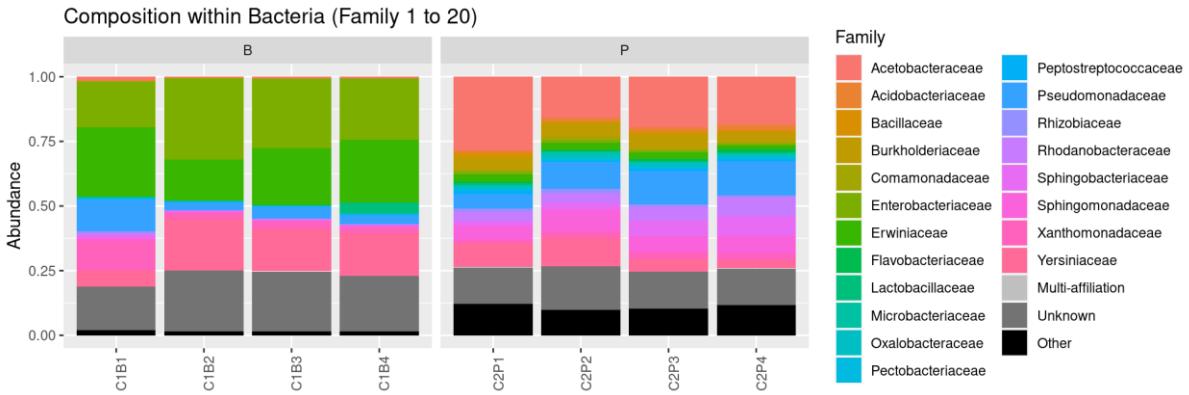


Figure S4: Bacterial taxonomic assignations at the family level during cider fermentation process for two producers (B: industrial and P: hand-crafted).

C1 and C2 indicate the tank ID, and B1, B2, B3, B4, P1, P2, P3, and P4 the sampling points during the fermentation process, in reference to Table 1.

1.3 Expériences complémentaires pour les tests de flocculation

1.3.1 Tests de flocculation

La flocculation est principalement utilisée pour concentrer les particules virales dans des échantillons à base d'eau. Ainsi, afin de comparer l'efficacité de récupération des particules phagique dans le cidre, de l'eau a été utilisée comme témoin « positif » en parallèle des essais sur cidre pour valider la méthode. Ces tests ont été réalisés dans les mêmes conditions, sur les mêmes volumes (400 mL) avec l'inoculation du phage UCMA 21115. Les quantités de phages récupérées après la flocculation sont présentées dans le **tableau 6**. Ces résultats viennent compléter ce qui a été présenté dans l'article, qui montrait uniquement la récupération des particules phagique dans le cidre. La récupération des particules de phages était assez efficace à des concentrations élevées en phages, aussi bien dans le cidre que dans l'eau. En effet, elle était de $5{,}6\times10^{9}$ et de $8{,}5\times10^{8}$ pour les échantillons d'eau et de cidre, respectivement, pour une inoculation initiale de $4{,}0\times10^{10}$, ce qui représente une perte de phages d'environ 1 $\log_{10}$ (**Tableau 6**). À de faibles concentrations de phages, la récupération des phages avec la floculation était moins efficace. Avec une inoculation initiale de $4{,}0 \times 10^{6}$, $2{,}0 \times 10^{4}$ et $5{,}0 \times 10^{3}$ particules de phages ont été récupérées dans les échantillons d'eau et de cidre, respectivement (**Tableau 6**), représentant plus de 2 $\log_{10}$ de perte dans l'eau et près de 3 $\log_{10}$ dans le cidre. Au vu de ces résultats, le cidre est donc une matrice plus délicate que l'eau pour la récupération de particules phagiques à de faibles concentrations. L'option d'utiliser la floculation à base de (Fe) sur des volumes plus importants d'échantillons de cidre non inoculés a donc aussi été abandonnée au cours de ce projet de thèse.

Tableau 6 : Efficacité de récupération des particules phagiques après flocculation dans le cidre et dans l'eau.

Quantité inoculée dans 400 mL d'eau ou de cidre (i.e. concentration)	Quantité récupérée après flocculation dans l'eau	Quantité récupérée après flocculation dans le cidre
4×10^{10} (concentration de 1×10^{8} UFP/mL)	$5{,}6 \times 10^{9}$	$8{,}5 \times 10^{8}$
4×10^{9} (concentration de 1×10^{7} UFP/mL)	$7{,}2 \times 10^{7}$	$9{,}9 \times 10^{7}$
4×10^{8} (concentration de 1×10^{6} UFP/mL)	$7{,}1 \times 10^{6}$	$6{,}6 \times 10^{6}$
4×10^{7} (concentration de 1×10^{5} UFP/mL)	$7{,}4 \times 10^{5}$	$7{,}6 \times 10^{5}$
4×10^{6} (concentration de 1×10^{4} UFP/mL)	$2{,}0 \times 10^{4}$	$5{,}0 \times 10^{3}$

1.4 Faits marquants du WP1

- Le cidre, au vu de ses caractéristiques physicochimiques, présente une faible concentration de phages lytiques ; ce qui est probablement le cas d'autres boissons fermentées, rendant l'étude du phageome difficile dans ces matrices alimentaires.

- L'extraction de l'ADN des particules phagiques du cidre est particulièrement difficile en dessous de 10^7 UFP/mL, lorsque le pH est inférieur à 5,5.

- L'utilisation de méthodes de concentration comme la filtration tangentielle et la flocculation n'augmente pas la récupération de phages lytiques dans le cidre.

- Le mode tempéré semble prédominer dans le cidre, au moins pendant le premier mois de fermentation.

- 1174 prophages putatifs ont été identifiés *in silico* au cours du premier mois de fermentation des deux cuves suivies, avec une abondance plus élevée chez le producteur industriel.

- Les prophages varient au cours du temps pendant la fermentation.

- Il s'agit de la première étude de ce type menée sur une matrice alimentaire.

2. Rôle des phages dans un modèle de communauté inspirée du cidre ayant subi une perturbation

2.1 Présentation et résumé de la publication n°2

Le deuxième objectif de mon travail de thèse visait à comprendre le rôle et l'influence des phages sur une communauté microbienne modèle inspirée du cidre. Les communautés microbiennes modèles sont en effet souvent développées afin de mieux comprendre le fonctionnement des microbiotes. Par exemple, dans le domaine agroalimentaire, des modèles de communautés ont été développées pour améliorer les procédés de fermentation, comme pour la sauce soja (Det-Udom *et al.,* 2019) ou encore pour la fabrication de fromages (Özcan *et al.,* 2021). Cependant, les modèles tenant compte de l'impact potentiel des phages sont très limités. Ce type d'études concerne essentiellement le microbiote intestinal, et montre que les phages jouent un rôle prépondérant dans les dynamiques des populations microbiennes ainsi que sur le métabolisme du microbiote (Hsu *et al.,* 2019). Au sein de ces microbiotes, les microorganismes sont très souvent sujets aux variations environnementales que subit leur écosystème, comme par exemple avec des changements de températures, qui perturbent les équilibres des populations microbiennes. Ce phénomène est couramment connu sous le nom de dysbiose, et est particulièrement étudié dans le microbiote intestinal. Par exemple, il a été montré que chez des souris ayant subi une dysbiose par un traitement antibiotique, les communautés de phages autochtones permettaient un ré-équilibre rapide de la composition microbienne de ce microbiote (Draper *et al.,* 2019). Ainsi, afin d'évaluer l'impact des phages sur la communauté microbienne modèle, une perturbation des équilibres microbiens a été créée et les dynamiques microbiennes et le métabolisme ont été suivis.

La composition de cette communauté microbienne modèle inspirée du cidre a été bâtie en considérant des espèces bactériennes et levuriennes principalement retrouvées dans le cidre. Ainsi, la souche de levure *Saccharomyces uvarum* UCMA 10446 a été choisie ainsi que trois souches bactériennes, *Oenococcus oeni* UCMA 19297, *Liquorilactobacillus mali* UCMA 16447 et *Leuconostoc mesenteroides* CIM 3004. Ces deux dernières souches ont été sélectionnées puisque des phages les ciblant étaient disponibles : le phage UCMA 21115 qui cible *L. mali* UCMA 16447 et le phage PLE01 qui cible *Ln. mesenteroides* CIM 3004. La perturbation sélectionnée a été un choc thermique de 10 minutes à 50°C, appliqué lorsque la concentration de la communauté bactérienne approchait 10^4-10^5 UFC/mL. D'autres agents ou phénomènes de perturbation ont également été testés sans que les résultats soient publiés dans

cet article. Ils sont présentés en partie 2.3.2 des résultats comme complément d'information. Les phages ont été ajoutés 24 h ou 48 h après cet évènement dans le but d'observer leur effet sur la communauté microbienne perturbée. Ainsi, trois conditions ont été suivies, une condition témoin (C) sans perturbation et sans phages, une condition avec perturbation sans phages (D) et une condition avec perturbation ainsi qu'avec phages (P), dans le milieu MRS à 25°C et à 15°C. Les populations microbiennes ont ainsi été suivies par dénombrements et le métabolisme de la communauté suivi par HPLC et GC-MS.

A 25°C, il a été montré que, d'une manière générale, les dénombrements de la condition P étaient significativement plus proches de la condition C ($p < 0,05$), que de la condition D. À 168 h (fin du suivi de la communauté), les populations microbiennes des conditions C et P étaient à des niveaux semblables en termes de dénombrements, avec 10^7-10^8 UFC/mL pour *O. oeni* UCMA 19297 et *L. mali* UCMA 16447, et 10^3-10^5 UFC/mL pour *Ln. mesenteroides* CIM 3004 et *S. uvarum* UCMA 10446. La condition D était différente. En effet, à partir de 72 h, *L. mali* UCMA 16447 et *Ln. mesenteroides* CIM 3004 étaient dominantes (10^7-10^8 UFC/mL) tandis que *O. oeni* UCMA 19297 et *S. uvarum* UCMA 10446 étaient retrouvées à des plus faibles concentrations (10^5-10^6 UFC/mL). Les populations de phages étaient similaires à 168 h, puisque le phage UCMA 21115 était présent à une concentration 10^9 UFP/mL tandis que le phage PLE01 était à 10^8 UFP/mL. Ainsi, à 25°C, il a été montré que les phages semblaient participer au retour des populations microbiennes à l'équilibre initial, et à leur maintien dans un état semblable à celui retrouvé dans la condition témoin n'ayant pas subi de perturbation.

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

Le métabolisme de la communauté a également été suivi par des analyses HPLC et GC-MS, afin d'observer l'impact des phages sur la signature métabolique dans chaque condition. La consommation des sucres, la production d'éthanol et la production de composés organiques volatils ont été suivies au cours du temps, et des analyses en composantes principales ont été effectuées. Au total, 32 composés ont été suivis dans les différentes conditions. A 25°C, les signatures métaboliques des conditions C et P étaient proches avec une plus grande richesse en composés volatils comme certains esters éthyliques (octanoate d'éthyle, hexanoate d'éthyle) et en 2-phényl-éthanol que dans la condition D, elle-même caractérisée par des niveaux plus élevés en lactate d'éthyle, notamment. Ces résultats confirment par la même occasion ceux obtenus par l'observation des niveaux cellulaires des souches de la communauté modèle dans chaque condition. Pour l'expérience réalisée à 15°C, la signature métabolique de chaque condition reflétait également les tendances observées pour les dénombrements microbiens. En effet, la signature métabolique de la condition P était différente de celle des conditions C et D. Par exemple, des composés comme le phényl-acetaldéhyde, le lactate, le citrate et l'acétate étaient retrouvés en plus grande quantité dans les conditions C et D que dans la condition P. Cependant, les différences entre les trois conditions étaient moins marquées que pour l'expérience réalisée à 25°C. Dans l'ensemble, la présence de phages, outre son influence sur les dynamiques microbiennes, impacte aussi la signature métabolique de chaque condition, et donc des communautés.

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

Les résultats de ce travail ont été valorisés par deux communications orales : l'une au colloque national du Club des Bactéries Lactiques (Juin 2022 – Rennes) et l'autre lors du 27ème congrès international FoodMicro2022 (Août 2022 – Athènes).

Ce travail fait l'objet d'un article scientifique, soumis au journal « *Viruses* ».

2.2 Publication n°2

Phages shape microbial dynamics and metabolism of a model community mimicking cider, a feemented beverage.

Pierre Ledormand, Nathalie Desmasures, Margot Schlusselhuber, André Sesboüé, Jérôme Ledauphin, Marion Dalmasso

viruses

MDPI

Article

Phages Shape Microbial Dynamics and Metabolism of a Model Community Mimicking Cider, a Fermented Beverage

Pierre Ledormand [1], Nathalie Desmasures [1], Margot Schlusselhuber [1], André Sesboüé [2], Jérôme Ledauphin [1] and Marion Dalmasso [1,*]

[1] Normandie University, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, 14000 Caen, France
[2] Normandie University, UNICAEN, LMNO, UMR CNRS 6139, 14000 Caen, France
* Correspondence: marion.dalmasso@unicaen.fr; Tel.: +33-(0)2-31-56-51-56; Fax: +33-(0)2-31-56-61-79

Abstract: Model microbial communities are often studied to better understand interactions and fluxes during fermentation processes. However, models that take into account the potential impact of bacteriophages (phages), which are recognized as drivers of microbial communities, are scarce, especially in fermented foods. This study aimed at investigating the behavior of a cider model microbial community, which was subjected to disturbance in the presence or absence of phages and at two different temperatures (25 °C and 15 °C). The model microbial community was composed of three lactic acid bacteria (LAB) strains belonging to the species *Liquorilactobacillus mali*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Oenococcus oeni*, and of a *Saccharomyces uvarum* yeast strain. Two phages were selected, targeting *L. mali* and *Ln. mesenteroides* strains. In order to follow the behavior of the microbial community model, the phages and microbial strains were enumerated at several time points, and the metabolic signatures (sugar consumption, production of organic acids and volatile organic compounds) of the model microbial community were monitored. At 25 °C, the community with phages (P) was significantly closer to the control condition (C) than to the condition without phages (D). Microbial levels were similar between conditions C and P, which were characterized by high concentrations of compounds such as 2-phenylethanol, ethyl octanoate and isoamyl alcohol, and more globally by a more complex metabolic signature than that of condition D. In condition D, *L. mali* and *Ln. mesenteroides* were dominant while *S. uvarum* and *O. oeni* were less present, and this condition was characterized by a high concentration of ethyl lactate. At 15 °C, condition P differed from conditions C and D, as *Ln. mesenteroides* was not detected while the other strains all reached approximately the same levels. The metabolic range of condition P was less important than for conditions C and D. The current study showed that the influence of phages on the model microbial community dynamics and metabolisms after a disturbance phenomenon was temperature-dependent.

Keywords: model microbial communities; phages; disturbance; fermented beverage; cider; phage–bacteria interactions

check for updates

Citation: Ledormand, P.; Desmasures, N.; Schlusselhuber, M.; Sesboüé, A.; Ledauphin, J.; Dalmasso, M. Phages Shape Microbial Dynamics and Metabolism of a Model Community Mimicking Cider, a Fermented Beverage. *Viruses* **2022**, *14*, 2283. https://doi.org/10.3390/v14102283

Academic Editors: Cécile Philippe, Jennifer Mahony and Adeline Goulet

Received: 31 August 2022
Accepted: 13 October 2022
Published: 17 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The fermentation of food products has been used for centuries to preserve and stabilize foods. Thus, many fermented foods and beverages have been developed and continue to be created worldwide. The diversity of fermented foods and beverages around the world is well reviewed [1,2]. Many works tend to demonstrate that microbial diversity is correlated to ecosystem functioning across different habitats and spatial scales [3]. The diversity and dynamics of microbial communities in a large variety of fermented foods are well described [4]. Within these communities, micro-organisms can be extremely responsive to environmental changes such as temperature variations, oxidative stress or chemical exposure such as xenobiotics, which can disturb microbial equilibria and result in an unbalanced state. This phenomenon is extensively described in the gut microbiota, for example, particularly, to try to explain the link with some diseases and dysbiosis [5,6].

In this context, the role of phages, the viruses of bacteria, still needs to be thoroughly investigated to evaluate their potential as drivers of microbial communities [7,8]. For example, they are known to contribute to reshaping the gut microbiota diversity after autochthonous fecal virome transplantation following antibiotic-based dysbiosis in a mouse model [9]. In fermented food and beverages, the studies of the impact of phages on the microbial communities are scarce and almost exclusively focused on the ability of phages, used alone or in cocktails, to destroy undesirable and pathogenic bacteria [10–14].

Model microbial communities are often constructed to better understand the functioning of a complex microbial community, especially in foods. These model microbial communities are often used to understand interactions and fluxes during fermentation processes, as is the case when studying the co-cultures of cheese starters [15] or bioprotective microbial communities [16,17]. Model microbial communities are also of interest to improve industrial processes, for example, when used to extend the shelf-life of a cooked meat product [18]. Model microbial communities have also been developed to improve food quality, for example, in the case of soy sauce, whose fermentation properties were improved by the co-cultures of *Bacillus subtilis* strains [19]. Microbial models in foods were also established and used to improve the production of specific metabolites such as vitamin C [20,21]. Concerning fermented beverages, few studies using model microbial communities are available. For example, yeast co-cultures have been tested to improve the aromatic profile of white wine Sauvignon blanc [22]. In the same way, the model microbial communities of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts were developed to improve the probiotic properties of a fermented cereal beverage, boza [23]. To date, no model microbial communities are involved in studies of the role of phages in the modulation of microbial equilibria in fermented foods. This is especially true when it comes to fermented beverages, and more particularly to cider. Cider is an alcoholic fermented apple beverage with harsh physico-chemical conditions such as low pH values (3.0–4.0), and the presence of ethanol, polyphenols and volatiles [24,25]. The micro-organisms involved in cider fermentation are mainly yeasts (*Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* species), performing the alcoholic fermentation, and LAB, i.e., *Oenococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp. and *Lactobacillus* sensu lato, performing the malolactic fermentation. Even if phage occurrence in cider seems to be low, their role still needs to be taken into consideration in this complex matrix [26,27]. The aim of the current study was to investigate the role played by phages on the behavior of a model microbial community inspired by cider. The creation of a disturbance in the model microbial community was used to assess the impact of phages on the microbial fluctuations. Thus, microbial dynamics and some metabolic fluxes were explored.

2. Materials and Methods

2.1. Bacteriophages, Bacterial Strains and Growth Conditions

Four microbial strains, *Liquorilactobacillus mali* UCMA 16447, *Leuconostoc mesenteroides* CIM 3004, *Oenococcus oeni* UCMA 19297 and *Saccharomyces uvarum* UCMA 10446, were used in this study to create a model microbial community. Phage UCMA 21115 targeting *L. mali* UCMA 16447 was used because it was the first lytic siphophage isolated from cider [27]. The lytic phage PLE001 targeting *Ln. mesenteroides* CIM 3004 was also used to complete the model, as *Ln. mesenteroides* is a species found in cider. Strains UCMA 16447, UCMA 19297, UCMA 10446 and the phage UCMA 21115 all originated from cider and came from the UCMA collection (Université de Caen Microbiologie Alimentaire, Caen, France). The strain CIM 3004 and its phage PLE001 originated from the dairy environment, and came from the FranceMIL national collection (CNIEL, Paris, France).

Bacterial strains were routinely grown in de Man Rogosa & Sharpe (MRS; Difco) broth adjusted to pH 5.5, which was supplemented with 5 g/L of fructose and 0.5 g/L of cysteine and incubated at 30 °C for 24 h or more. Phage propagations were carried out in MRS broth, which was supplemented with 10 mM of M_gCl_2 and 10 mM of M_gSO_4. Briefly, host strains were grown until an OD_{600nm} value of 0.2, and then 100 µL of phage lysate (10^9–10^{10} PFU/mL) was added, followed by an incubation at 30 °C until lysis occurred.

The phage lysate was centrifuged at 4700× *g* for 20 min and filtered using 0.45 µm filters, then stored at 4 °C. Phage titration was performed using the double-layer plate technique in MRS (0.5% (*w*/*v*) agar), which was supplemented with 10 mM of $CaCl_2$ and 10 mM of $MgSO_4$ and incubated at 30 °C for 24 h to allow the formation of plaques. Phage titration was expressed in plaque-forming units per mL (PFU/mL).

2.2. Experimental Design

The global experimental design is summarized in Figure 1.

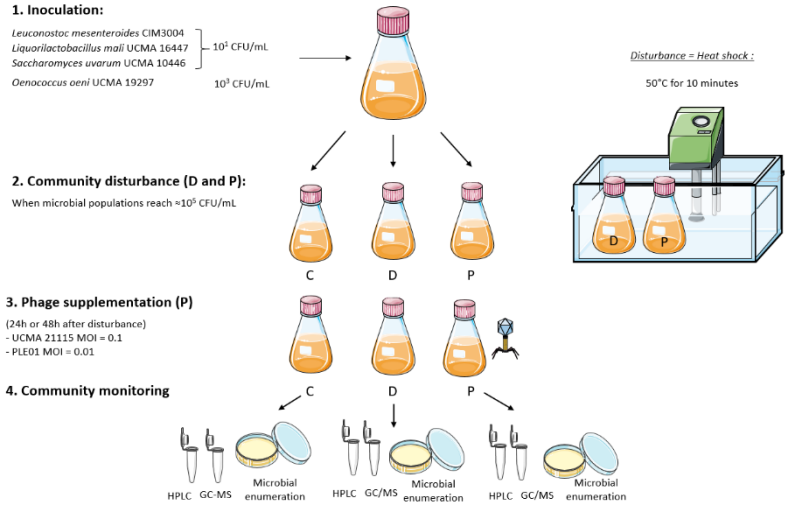


Figure 1. Experimental design of the study. The model microbial community was incubated at 25 °C or at 15 °C, and the control community (C), the community subjected to disturbance (D) and the community subjected to disturbance followed by phage addition (P) were monitored over time.

The four bacterial and yeast strains were separately grown overnight in MRS broth at 30 °C as pre-cultures. Then, 600 mL of fresh MRS broth adjusted to pH 5.5 was simultaneously inoculated at 10^1 CFU/mL with each of the three strains *L. mali* UCMA 16447, *Ln. mesenteroides* CIM 3004, and *S. uvarum* UCMA 10446, and at 10^3 CFU/mL with *O. oeni* UCMA 19297 strain, and incubated at 25 °C. After 24 h of incubation (when strains reached ~10^5 CFU/mL), the 600 mL of co-culture was divided into three aliquots of 200 mL each. The first aliquot was used as control (C), while the two others (D and P) were subjected to a heat shock of 50 °C for 10 min, in order to create a disturbance of the microbial equilibria. The objective was to disturb the microbial equilibria without eliminating a microbial strain of the model. After the heat shock, the aliquots were immediately and rapidly cooled down to 25 °C, and incubation continued. Twenty-four hours after disturbance, phage UCMA 21115 and phage PLE001 were introduced at a MOI of 0.1 and of 0.01, respectively, into aliquot P only, in order to mimic the low abundance of phages in cider [26]. Preliminary tests of different MOIs were performed to determine the most suitable MOI to be used in this experiment (data not shown). Samples were taken from C, D and P every 24 h from inoculation, for at least 5 days, for pH measurements (Mettler Toledo, Colombus, OH, USA) and microbial and phage enumerations, and the HPLC and GC-MS analysis, as described below.

The same experimental design was repeated at 15 °C. Disturbance was performed in the same conditions when each strain had reached ~10^5 CFU/mL (at 72 h). The phages were introduced into aliquot P at 120 h, i.e., 48 h after disturbance.

All the experiments were performed in biological triplicates.

2.3. Microbial Enumeration

For each sample, bacterial counting was performed on MRS agar medium (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA), which was supplemented with 32 mg/L of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-Gal; Fisher, Illkirch, France), 100 mg/L of pimaricin (Laboratoire Standa, Caen, France) and 7 mg/L of cycloheximide (Merck, Darmstadt, Germany) after 72–96 h incubation at 30 °C. On this medium, *Ln. mesenteroides* CIM 3004 colonies were the only ones that adopted a characteristic blue coloration. *L. mali* UCMA 16447 and *O. oeni* UCMA 19297 were distinguished by their morphological aspect: the *L. mali* colonies were rather big, bulging and creamy, while the *O. oeni* colonies were small. *Saccharomyces uvarum* UCMA 10446 was enumerated on Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC; Biokar Diagnostics, Allonne, France) after 48 h of incubation at 25 °C.

2.4. Organic Acids and Ethanol Quantification by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Reverse phase HPLC (Waters Alliance HPLC system with 2695 pump) was performed at 0.6 mL/min in an isocratic mode for 30 min using 5 mM of H_2SO_4 buffer as mobile phase. Separation was carried out with a Carbomix HNP5 8% cross-linking 7.8 × 300 mm column at 40 °C (Sepax Technologies, Guangzhou, China) and compounds were monitored by refractometry at 30 °C (2414 Refractive Index Detector; Waters, Milford, MA, USA). After centrifugation at 4700× *g* for 10 min, the supernatants of the different samples (C, D and P) were two-fold diluted with mobile phase before an injection of 20 µL. Ethanol and organic acid (acetic, lactic or citric) production as well as sugar consumption (fructose or glucose) were monitored by a comparison to the standards of each compound. The standards were injected at concentrations ranging from 2 mM to 64 mM.

2.5. Volatile Compounds Identification and Quantification Level by Gas-Chromatography Mass Spectrometry Analyses (GC-MS)

Volatile compounds were extracted from 1 mL of sample aliquot of supernatant according to a method developed in a previous study [28]. Briefly, all samples were spiked with 2 internal standards, 4-methylpentan-2-ol and ethyl undecanoate, both at a final concentration of 2 mg/L. Micro-extraction by Packed Sorbent (MEPS) was operated using a Barrel Insert and Needle (BIN) assembly filled with a C18 sorbent using 8 × 150 µL of spiked samples. Volatile compounds were recovered by elution with 50 µL of ethyl acetate. One microliter of the extract was injected with a 1/5 split ratio in a GC-MS Varian 3800 Gas Chromatograph coupled with a Varian Saturn 2000R Mass Spectrometer. Helium was used as the carrier gas with a 1 mL/min flow rate. The compounds were separated on a DB-5MS capillary column (60 m, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness, J&W Scientific, Santa Clara, CA, USA) with the following program temperature of the GC oven: 40 °C during 10 min, followed by a 5 °C-increase per min, and a final temperature of 240 °C held for 10 min. Volatile compounds were identified according to a procedure developed in previous works [29]. The peak areas of each volatile organic compound (VOC) were obtained using the most abundant and specific ion (m/z ratio) produced in electron ionization (EI) mode with the Mass Spectrometer. The relative areas were then calculated by dividing the peak areas by the peak area of ethyl undecanoate (internal standard). The quality control of the analyses was operated by comparing the areas obtained for the peaks of the two internal standards (ethyl undecanoate and 4-methylpentan-2-ol). The levels of each VOC were compared using the relative areas obtained between the three conditions.

2.6. Statistical Analysis

Statistical analyses of the microbial enumeration data were conducted using R software (v 4.1.2) and Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA). The differences between C, D and P conditions were analyzed with a Kruskal–Wallis test followed by Dunn's procedure for multiple comparisons, with a p-value adjusted with the Benjamini–Hochberg method. Concerning sugars, organic acids and VOC concentrations, statistical analyses were performed at each sampling time with the same method. A p-value of ≤ 0.05 was considered

to be significant. A Principal Component Analysis (PCA) was performed using R software (v 4.1.2) and for each time of analysis, variables with a contribution superior to 3 and with a $\cos^2$ superior to 0.5 (for Dim 1 and Dim 2) were retained.

3. Results

3.1. Phages Have a Different Impact on the Microbial Dynamics Depending on the Temperature

The model microbial community was designed to assess the effect of phages on the microbial equilibria after a disturbance phenomenon. First, the presence of prophages inside the bacterial genomes was checked. Only the genome of *L. mali* UCMA 16447 was available, and one complete prophage was found with PHASTER [30] (data not shown). The induction of potential prophages was checked using mitomycin C at 0.1 and 1 µg/mL, and no induction was observed for the three bacterial strains, suggesting that no inducible prophage was present (Figure S1). Thus, the microbial composition of the control community (C, without disturbance, without phage); of the community subjected to disturbance without phage addition (D); and of the community subjected to disturbance followed by phage addition (P), at 25 °C (Figure 2A) and at 15 °C (Figure 2B), was monitored over time.

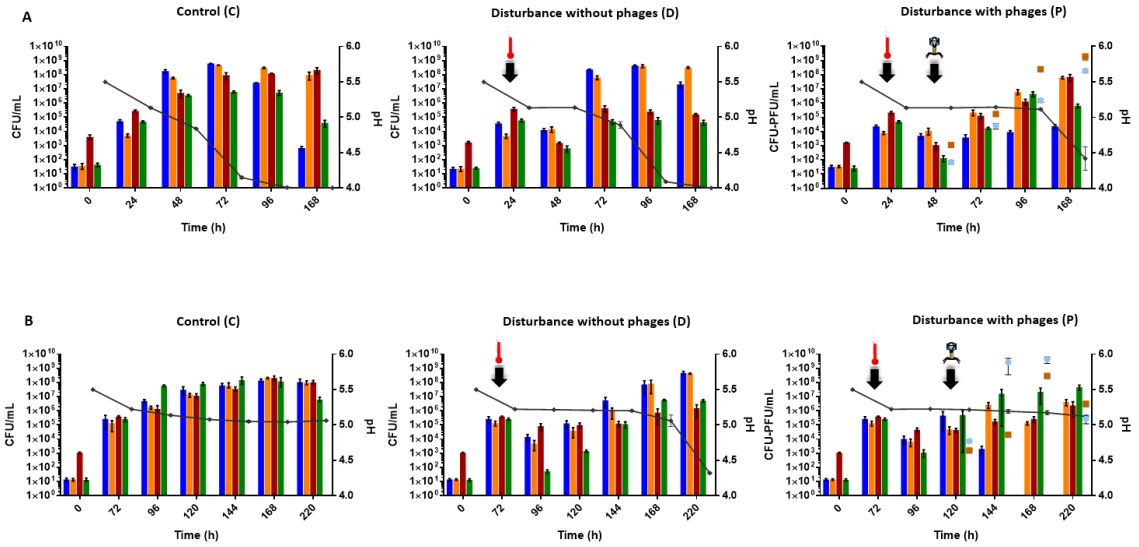


Figure 2. Dynamics of the microbial populations and pH (black curve) of the model microbial community in the three experimental conditions (control, disturbance without phages and disturbance with phages) at 25 °C (**A**) and at 15 °C (**B**). *Ln. mesenteroides* CIM 3004 is represented in blue, *L. mali* UCMA 16447 in orange, *O. oeni* UCMA 19297 in red and *S. uvarum* UCMA 10446 in green. Phage UCMA 21115 was added at a MOI of 0.1 and phage PLE001 at a MOI of 0.01, and are represented with orange squares and blue circles, respectively. The black arrows indicate heat shock and phage addition. The values were derived from biological triplicates and error bars represent standard deviations.

3.1.1. Disturbance Occurred in the Model Microbial Community after a Heat Shock

The first step of this work was to ensure that the heat shock applied to the model microbial community disrupted the initial microbial equilibria, and thus, generated a disturbance without completely eradicating any strain from the model. This was a prerequisite before further assessing the role of phages. Two other disrupting agents were tested apart from temperature: sodium sulfite (50 to 400 mg/L), which is employed as a food preservative agent in the industry [31], and ethanol (5 to 15%), as it is generated in cider. No disturbance of the microbial equilibria was observed in the tested conditions with these two compounds, which mainly had a micro-bistatic effect (data not shown). Thus, a heat shock was used as a

disruptive agent and was applied to the model community after 24 h of incubation at 25 °C. Twenty-four hours after the heat shock (i.e., 48 h from the beginning of the experiment), the microbial counts were 10^2–10^4 CFU/mL in conditions D and P for all the strains (just before phage addition), whereas they reached 10^6–10^8 CFU/mL in condition C (Figure 2A). Although 2-log variations were observed, these differences were not statistically different in the short term after heat shock, probably due to the use of non-parametric statistics. Nevertheless, the mead-term significant differences (p-value < 0.05) between conditions C and D were shown at 96 h for strain *S. uvarum* UCMA 10446 and *O. oeni* UCMA 19297, and at 168 h for *Ln. mesenteroides* CIM 3004 and *O. oeni* UCMA 19297 (Table S1), thus, confirming that a perturbation of the community occurred.

After 72 h, the heat shock was performed at 15 °C, so that beforehand, the strains could reach similar cellular levels (≈10^5 CFU/mL) to those obtained at 25 °C (Figure 2B). Twenty-four hours after the heat shock (96 h from the beginning of the experiment), the microbial concentrations ranged between 10^6 and 10^8 CFU/mL in conditions C and between 10^1 and 10^4 CFU/mL in condition D and P. Again, although wide variations were observed, a significant difference was shown between conditions C and D only for the strain *S. uvarum* UCMA 10446 at 96 h (p-value = 0.02) (Table S2), confirming a real but more limited disturbance at this temperature.

This perturbation of the microbial equilibria in the model microbial community being established, it was possible to continue the experiment with the addition of phages in aliquot P, and to continue monitoring the behavior of the microbial model.

3.1.2. Phages Contributed to Restoring Microbial Equilibria at 25 °C

The second step of the work was to assess the differences between the different conditions, in order to determine the effect of the addition of phages to the model microbial community (condition P).

In condition C at 72 h and 96 h, *L. mali* UCMA 16447, *Ln. mesenteroides* CIM 3004 and *O. oeni* UCMA 19297 co-dominated, reaching 10^8-10^9 CFU/mL, while *S. uvarum* UCMA 10446 was sub-dominant (10^7 CFU/mL). At 168 h, *Ln. mesenteroides* CIM 3004 and *S. uvarum* UCMA 10446 decreased, while *L. mali* UCMA 16447 and *O. oeni* UCMA 19297 remained stable and co-dominant (Figure 2A).

In the condition subjected to disturbance without phage (D), at 72 h (2 days after the heat shock), the *L. mali* UCMA 16447 and *Ln. mesenteroides* CIM 3004 strains were dominant (10^7–10^8 CFU/mL at 72 h and at 10^8–10^9 CFU/mL at 96 h), whereas the *O. oeni* UCMA 19297 and *S. uvarum* UCMA 10446 strains remained sub-dominant, with counts around 10^5–10^6 CFU/mL at 72 h and 96 h (Figure 2A), and were significantly different from condition C (p-values < 0.05, Table S1). These levels remained similar at 168 h.

In condition P, the cellular levels of the four strains were not significantly different from those of condition D, except for *Ln. mesenteroides* CIM 3004 at 96 h, showing that phage addition reduced the cellular levels of one of the target LABs and modified the equilibria. Compared to condition C, phage addition was associated to significantly lower cellular levels at 72 h, with *Ln. mesenteroides* CIM 3004 around 10^4 CFU/mL (p-value = 0.02 at 72 h) (Table S1), and the other strains around 10^5 CFU/mL (p-values < 0.05, Table S1). At 96 h, only a significant difference for *L. mali* UCMA 16447 between conditions C and P was still observed (p-value = 0.02, Table S1). For the other strains at this point, and for all four strains at 168 h, microbial dynamics were similar in conditions C and P. *L. mali* UCMA 16447 and *O. oeni* UCMA 19297 co-dominated at the end, while *Ln. mesenteroides* CIM 3004 and *S. uvarum* UCMA 10446 were sub-dominant, and no significant differences were observed (p-values > 0.05) (Figure 2A, Table S1). Phage dynamics increased over time to reach 10^9 PFU/mL for phage UCMA 21115 and 10^8 PFU/mL for phage PLE001 at 168 h.

The pH evolution was quite different in condition P compared to conditions C and D. The final pH was 4.5 ± 0.5 for condition P, while it was 4.0 ± 0.01 for condition C and 3.90 ± 0.01 for condition D.

To summarize, the microbial equilibria in the condition with phages (P) were closer to those of the control condition (C) than to those of the condition without phages (D) at 25 °C, especially at 96 h and 168 h. Indeed, in conditions C and P, the microbial levels were the same overall, while in condition D, the *L. mali* UCMA 16447 and *Ln. mesenteroides* CIM 3004 strains were dominant. Overall, it seemed that at 25 °C, the two phages targeting the *L. mali* UCMA 16447 and *Ln. mesenteroides* CIM 3004 strains contributed to compensating for the effects of the heat-shock disturbance on the model microbial community.

3.1.3. Phages Enhanced Disturbance at 15 °C

At 15 °C in condition C, all the strains had similar cellular levels and co-dominated over time, and all reached about 10^8 CFU/mL at 220 h with a slight decrease in the *S. uvarum* UCMA 10446 strain at this time point (10^7 CFU/mL) (Figure 2B).

In the condition subjected to disturbance without phage (D), although no significant differences (p-values > 0.05, Table S2) in microbial counts were observed between conditions C and D over time, except for the *S. uvarum* UCMA 10446 strain at 96 h, the *O. oeni* UCMA 19297 and *S. uvarum* UCMA 10446 strains appeared as sub-dominant in condition D from 144 h (Figure 2B).

The addition of phages in condition P disturbed the microbial equilibria in the community, which was especially visible for the *Ln. mesenteroides* CIM 3004 strain. At 144 h, *Ln. mesenteroides* CIM 3004 was reduced to 10^3 CFU/mL. It was no longer detected (detection threshold of 10^1 CFU/mL) from 168 h and thereafter in condition P, which contrasted with conditions C and D (Figure 2B). Since null values create a false result of the non-parametric statistic tests, statistical significance was not assessed for this strain at 168 h and 220 h between condition P and conditions C and D. Nonetheless, these observations showed the influence of phages targeting this strain. The *L. mali* UCMA 16447 strain seemed less impacted by the presence of its phages than the *Ln. mesenteroides* CIM 3004 strain at this temperature. However, *L. mali* UCMA 16447 increased slowly over time and remained at a level lower than 10^7 CFU/mL (Figure 2B). No significant differences (p-values > 0.05, Table S2) were observed for this strain between condition P and conditions C and D. Regarding phage dynamics, phages UCMA 21115 and PLE001 increased until 168 h, reaching 10^8 PFU/mL and 10^9 PFU/mL, respectively (Figure 2B). A decrease to 10^6 PFU/mL and 10^5 PFU/mL for phage UCMA 21115 and phage PLE001, respectively, was then observed at 220 h (Figure 2B).

The pH values remained around 5.2 ± 0.12 after 72 h and during all the experiment in conditions C and P, whereas in condition D, the pH dropped from 5.2 ± 0.3 to 4.3 ± 0.04 at 220 h (Figure 2B).

To summarize, microbial levels in the condition with phages (P) were distant from the control condition (C) and the condition without phages (D), at 15 °C. In condition P, the microbial levels were unbalanced with the lack of the strain *Ln. mesenteroides* CIM 3004, which was undetectable, contrary to conditions C and D. Overall, at 15 °C, the presence of the phages impacted the microbial equilibria and seemed to worsen the microbial imbalance caused by the heat-shock disturbance.

3.2. The Metabolic Signatures Followed the Same Patterns as Microbial Enumerations

Thirty-two compounds including glucose, fructose, ethanol, lactic acid, acetic acid and citric acid, which were analyzed by HPLC, and 26 volatile organic compounds (VOCs), which were identified by GC-MS, were monitored (Table S3).

3.2.1. Phages Partly Restored the Metabolic Signature of the Community after Disturbance at 25 °C

A Principal Component Analysis (PCA) was performed using HPLC and GC-MS data for all the time points (from T0 to T168 h) (Figure S2). Overall, the samples were distributed according to their analysis time rather than the treatment performed (C, D or P). The first sampling times (C48, D48, P48, C72, D72 and P72) were associated to high concentrations

of glucose, fructose and citric acid, whereas the last sampling times (C96, D96, P96, C168, D168 and P168) were associated to a high value of VOCs (Figure S2). As the majority of VOCs were detected at the last sampling points (after 96 h), PCA was performed at 96 h, and the two principal component dimensions (Dim 1 and Dim 2) accounted for 84.47% of the total variance (49.80% and 34.67% for Dim 1 and Dim 2, respectively) (Figure S3). According to the selected criteria (contribution ≥ 3 and $\cos^2 \geq 0.5$ for Dim 1 and Dim 2), 27 variables were displayed on Dim 1 and Dim 2, and the samples were clearly separated into three distinct groups (C, D and P). Condition C was characterized by a high abundance of organic acids (lactic and acetic acids), fatty acids (hexanoic acid) and ethanol, and by a low abundance of sugars (fructose and glucose) and alcohols (2-methylbutanol) (Figure S3). Condition D was characterized by a high abundance of aldehydes (nonanal, phenylacetaldehyde) and esters (isoamyl acetate), and by a low abundance of fatty acids (hexanoic acid, butanoic acid) (Figure S3). Condition P was distinguished by a high abundance of esters (methyl lactate, ethyl octanoate), sugars (glucose, fructose) and alcohols (isoamyl alcohol, 2-phenylethanol), and by a low abundance of organic acids (lactic and acetic acids) and ethanol (Figure S3).

In the same way, PCA was displayed at 168 h where Dim 1 and Dim 2 accounted for 84.37% of the total variance (54.69% and 29.68% for Dim 1 and Dim 2, respectively) (Figure 3).

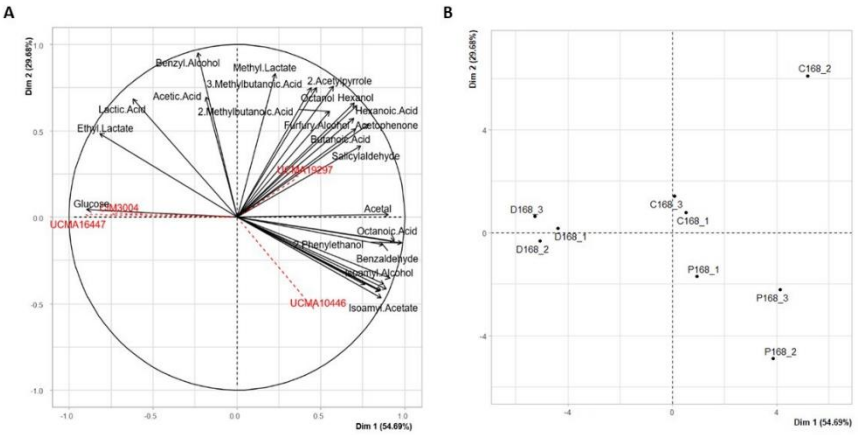


Figure 3. (**A**) Principal Component Analysis of the studied compounds (black arrows) with illustrative variables representing the four strains of the model microbial community (red arrows). (**B**) Distribution of the samples in condition C (control), D (disturbance without phages) and P (disturbance with phages) at 168 h for the experiment at 25 °C. Samples are named as follows: Condition (C: control, D: disturbance without phages, P: disturbance with phages). Time point (0, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h). Biological replicate (1, 2, 3) (e.g., C168_1 means Control at 168 h, biological replicate 1).

According to the selected criteria (contribution ≥ 3 and $\cos^2 \geq 0.5$ for Dimensions 1 and 2), 27 variables were selected for this PCA analysis. Condition D was separated from conditions C and P, themselves being close to each other on Dim 1 but more distant on Dim 2. Condition D was characterized by higher abundances of ethyl lactate, lactic acid and glucose, and by lower abundances of fatty acids (octanoic acid) and alcohols (2-phenylethanol) than the other conditions (Figure 3). Replicates from conditions C and P were slightly separated from each other on Dim 1 and Dim 2 (C168_1 and C168_3 from C168_2 for condition C, and P168_2 and P168_3 from P168_1 for condition P), but remained grouped when compared to condition D. Indeed, conditions C and P were represented by higher abundances of fatty acids (hexanoic acid, butanoic acid, octanoic acid), alcohols (hexanol, isoamyl alcohol, 2-phenylethanol) and esters (isoamyl acetate, methyl lactate) than condition D (Figure 3).

In order to observe the differences in the abundances of the most involved compounds in the PCA, compounds with a contribution value of ≥ 5 and a $\cos^2$ value of ≥ 0.5 for Dim 1 and Dim 2 were selected at the final sampling time (168 h). A total of 15 compounds were, thus, retained (Figure 4).

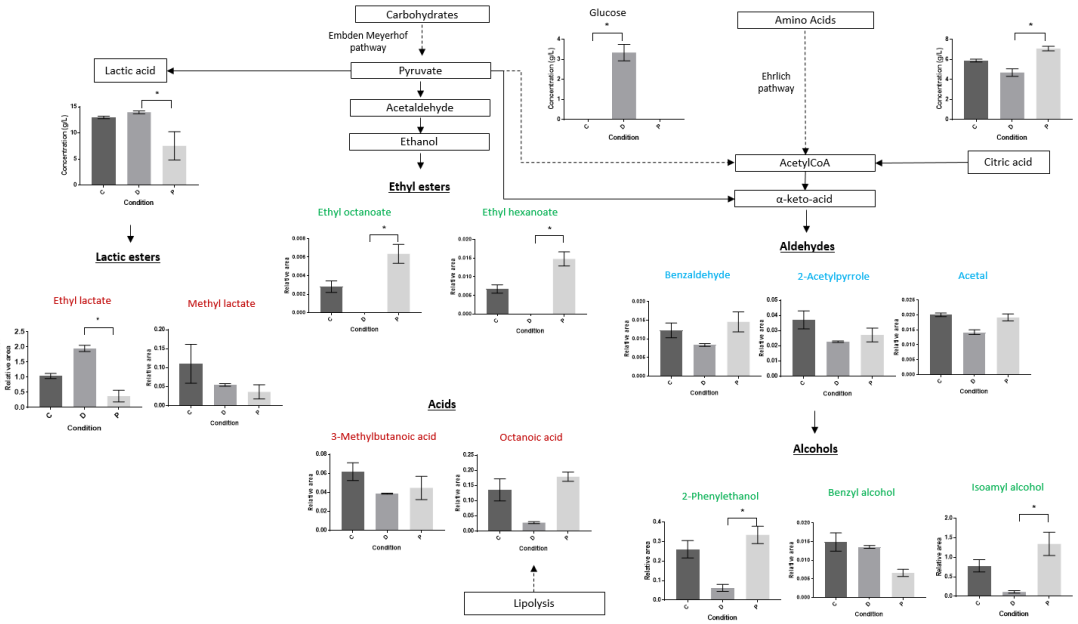


Figure 4. Principal compounds and hypothetical representation of the metabolic pathways potentially involved in the production/consumption of these compounds at 25 °C between conditions C, D and P at 168 h. Green compounds were principally associated to yeast activity, red compounds to LAB activity and blue compounds to yeast and/or LAB activity. Concentrations of lactic acid and citric acid were determined by HPLC and expressed in g/L. The volatile compounds were analyzed by GC-MS and expressed with relative area (standardized with internal standards). A Kruskal–Wallis test was performed for each compound, and multiple comparisons were performed using Dunn's procedure. A p-value of ≤ 0.05 was considered significant (*).

Among these compounds, only those analyzed by HPLC (lactic acid, citric acid, glucose) were quantified in grams per liter, while the others, which were identified by GC-MS, were expressed in relative area (standardized with internal standard). Overall, the abundance levels between conditions C and P were close compared to condition D. For example, esters that were principally associated to yeast activity—such as ethyl octanoate, ethyl hexanoate and alcohols derived from amino acid degradation such as 2-phenylethanol—showed significant differences (p-value < 0.05) between conditions P and D, with abundances higher in condition P than in condition D, and, as such, closer to the abundances of condition C (Figure 4). Even if no significant statistical differences were found between conditions D and C, the abundance levels were still higher in condition C than in condition D for these compounds (Figure 4). For example, the relative area of 2-phenylethanol was 0.3 in condition P, 0.25 in condition C and 0.05 in condition D (Figure 4). The same trends were observed for citric acid and isoamyl alcohol, for which the abundance levels were significantly higher in condition P than in condition D (p-value < 0.05, Figure 4). The concentration of citric acid was of 7 g/L in P, 6 g/L in C and 4 g/L in D, and the relative area of isoamyl alcohol was 1.3 in condition P, 0.8 in condition C and 0.1 in condition D (Figure 4). The same tendencies were observed for fatty acids probably originating from

lipolysis or β-oxidation (octanoic acid), and for aldehydes (benzaldehyde, acetal), even if no significant difference was found (p-value > 0.05, Figure 4). Concentrations of lactic acid and its ester, ethyl lactate, which is mostly associated to LAB activity, were significantly higher in condition D than in condition P, and the concentration of glucose was significantly higher in condition D than in condition C (p-value < 0.05, Figure 4). For example, the relative area of ethyl lactate was 2 in condition D, while it was 0.5 and 1 in condition P and condition C, respectively. No significant differences were observed for compounds such as 2-acetylpyrrole, 3-methylbutanoic acid, methyl lactate and benzyl alcohol between the three conditions (p-value > 0.05, Figure 4).

To summarize, the metabolic signatures of the control condition (C) and the condition with phages (P), at 25 °C and after 168 h, were close, with a higher abundance in volatile organic compounds such as esters (ethyl octanoate, ethyl hexanoate) and alcohols (2-phenylethanol) than in the condition without phages (D). This condition was characterized by higher levels of lactic acid and its ester ethyl lactate, presumably reflecting a higher activity of the LAB strains, and a lower activity of the yeast strain than in conditions C and P, at 25 °C. Overall, the presence of phages, in addition to contributing to restoring the microbial equilibria, also influenced the metabolic signature of the condition where they were present.

3.2.2. The Metabolic Signature of Condition P Was Different from Conditions C and D at 15 °C

At 15 °C, PCA was also displayed using time points from T0 to T220 h (Figure S4). As at 25 °C, the samples were distributed according to time rather than condition (C, D or P). The first sampling times (0, 96 h and 144 h) were associated to high concentrations of sugars (glucose, fructose) and citric acid, and the last sampling time (220 h) was associated to VOCs in high abundance. For this time point, little differences between replicates from the three conditions were observed (Figure S4). A PCA was performed at the last time point (220 h), where Dim 1 and Dim 2 represented 82.86% of the total variance (49.61% and 33.25% for Dim 1 and Dim 2, respectively (Figure 5).

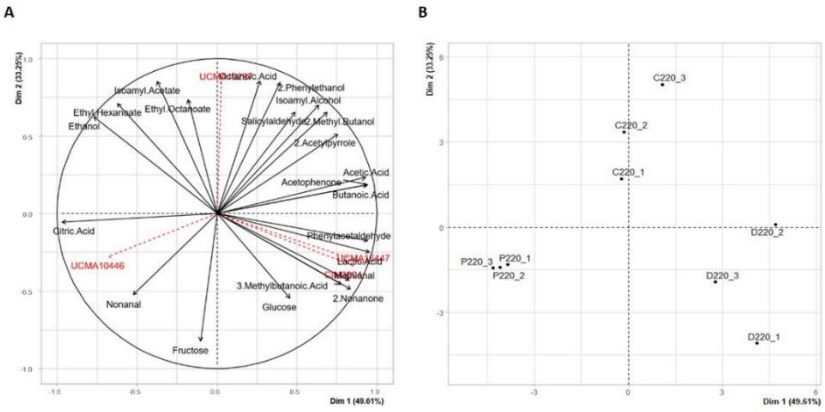


Figure 5. (**A**) Principal Component Analysis of the studied compounds (black arrows) with illustrative variables representing the four strains of the model (red arrows). (**B**) Distribution of the samples in condition C (control), D (disturbance without phages) and P (disturbance with phages) at 220 h for the experiment at 15 °C. Samples are named as follows: Condition (C: control, D: disturbance without phages, P: disturbance with phages). Time point, 220 h. Biological replicate (1, 2, 3) (e.g., C220_1 means Control at 220 h, biological replicate 1).

Among the 32 identified compounds, 22 were retained for further analyses, as described above and according to the selected criteria (contribution ≥ 3 and $\cos^2 \geq 0.5$ for Dim 1 and Dim 2). Condition P was separated from conditions C and D and presented a

higher abundance of citric acid and aldehydes (nonanal) than conditions C and D. Condition C was characterized by high levels of alcohols (2-phenylethanol, isoamyl alcohol, 2-methylbutanol), and condition D by high levels of fatty acids (octanoic acid, butanoic acid, 3-methylbutanoic acid) (Figure 5).

Compounds with a contribution value of ≥ 5 and a $\cos^2$ value of ≥ 0.5 for Dim 1 and Dim 2 were selected at the final sampling time (220 h) at 15 °C (Figure S5). Differences in abundance levels between conditions C, D and P were less marked than in the experiment at 25 °C. Nevertheless, significant differences between conditions D and P were found for compounds such as aldehydes (phenylacetaldehyde, methional), organic acids (lactic, citric and acetic acids) and fatty acids (butanoic acid), with higher values in condition D than in condition P, excepted for citric acid, reflecting a higher activity of LAB (p-values < 0.05, Figure S5). No significant differences between conditions C and P were observed for these compounds (p-values > 0.05, Figure S5). For example, the relative area of phenylacetaldehyde was 0.16 in condition D, while it was 0.02 in condition P and 0.09 in condition C (Figure S5). The concentration of lactic acid was also 80 g/L in condition D, whereas it was 5 g/L in condition P and 30 g/L in condition C (Figure S5). The abundance levels in conditions C and D were close for some compounds, such as acids (lactic and acetic acids), alcohols (2-phenylethanol), aldehydes (phenylacetaldehyde, methional and acetylpyrrole) and fatty acids (butanoic acid), compared to those in condition P, except for some compounds which fluctuated, such as esters (ethyl octanoate, ethyl hexanoate) or ketone (2-nonanone) (Figure S5).

To summarize, the metabolic signature of the condition without phage (D) was different from the control condition (C) and the condition with phages (P) at 15 °C, with a less marked variety of metabolic compounds than for the other conditions. Overall, the presence of phages also influenced the metabolic signature at 15 °C and enhanced the microbial imbalance after the disturbance.

4. Discussion

Model microbial communities are often used for industrially-oriented research, for example, to enhance the metabolism of microbial strains in order to produce compounds of interest. For example, these microbial models have been developed for the production of bacterial cellulose-based composite materials [32], or for the biosynthesis of butyl acetate by co-cultures of *Clostridium acetobutylicum* and *Actinobacillus succinogenes* [33]. These model microbial communities can also be used to obtain knowledge about microbial interactions in nature [34]. Model microbial communities that take phages into consideration are still to be developed, even if first attempts have been made, especially for studying the intestinal gut microbiota [35]. For example, after microbiota dysbiosis in mice caused by antibiotic treatment, commensal phage transplantations contributed to reshaping the microbial equilibria of the microbiota to a state close to that observed before the antibiotic treatment [9]. The role of phages in fermented foods and beverages is little described on the scale of microbial communities taking into account the interactions between phages and bacteria [36,37]. To our knowledge, the literature on model microbial communities integrating phages is not available for the study of microbial interactions in fermented foods and beverages. In this context, it was interesting to monitor the behavior of a model microbial community that was inspired by a fermented beverage (cider), which included phages, in order to understand their potential role in microbial dynamics, especially when the microbial equilibria were disturbed (creation of a disturbance). The model microbial community included four microbial strains (three LAB and a yeast strain) belonging to genera and species retrieved in cider, and two phages targeting the *L. mali* UCMA 16447 and *Ln. mesenteroides* CIM 3004 strains of this microbial community model. The experiments were performed in MRS medium, which was supplemented with fructose, the main sugar in cider. As it was the first model of this type, synthetic medium was preferred to sterile cider in order to better standardize the cellular levels and phage activity, and thus, to better visualize phage–bacteria interactions. Indeed, bacterial growth and phage stability are more

fastidious and less reproducible in the cider matrix, which would have certainly blurred the monitoring of the community. The impact of phages on the model microbial community varied depending on the temperature of incubation. At 25 °C, the phages seemed to help restore the microbial equilibria after disturbance caused by a heat shock, the microbial dynamics in the presence of phages (P) being closer to those of the control condition (C) than of the community without phages (D). In the model microbial community, the disturbance caused by the heat shock at 50 °C unintentionally led to the dominance of the two strains targeted by phages (*L. mali* UCMA 16447 and *Ln. mesenteroides* CIM 3004). The presence of phages was permitted to approximately restore their cellular levels to the same levels as in the control condition. The temperature is known to affect both phage activity and bacterial physiology. This could explain the differences between the two tested conditions. This has already been observed for *Weissella* phages from kimchi, which were more stable and active at 7 °C than at 30 °C [38]. The *Ln. mesenteroides* CIM 3004 strain may also be in a physiological state that allows it to better resist phage infection at 25 °C than at 15 °C. This phenomenon has already been observed in a study about the *Leuconostoc* and *Weissella* strains from kimchi, which were co-cultivated at 7 °C in the presence of their phages. In this case, the phages destroyed their hosts, suggesting that the *Leucosnostoc* strains were sensitive to phage attack at low temperatures [39]. The dynamics were different concerning phage UCMA 21115 targeting the *L. mali* UCMA 16447 strain. At 15 °C and 25 °C, phage UCMA 21115 did not significantly affect its hosts in the view of the enumeration results. Such a phenomenon has already been demonstrated for Swiss hard cheese starter cultures, where two highly abundant *Streptococcus* phages co-existed in the starter community without any negative impact on host growth and persistence [40]. In this last study, phages persisted despite the presence of CRISPR spacers within the bacterial population, suggesting that they could evade the CRISPR-based immunity. For the *L. mali* UCMA 16447 strain, no CRISPR locus was identified within its genome, suggesting that other mechanisms that still need to be deciphered occurred to resist the lytic phage UCMA 21115, which was present at high concentrations (about 10^9 PFU/mL at 168 h in the experiment at 25 °C).

Phages have been shown to affect the host bacteria, leading to cascading effects on other bacterial species and, as a consequence, on the gut metabolome in a mouse model [35]. The presence of phages targeting *L. mali* UCMA 16447 and *Ln. mesenteroides* CIM 3004 led to a variation in the *O. oeni* UCMA 19297 and *S. uvarum* UCMA 10446 strains, which were not targeted by the phages. In order to observe whether the phages could also influence the metabolic signature of the current study's model microbial community, the production of organic acids and volatile organic compounds was monitored and visualized using PCA analyses. As observed for the microbial dynamics, metabolic trends were similar between the control condition (C) and the condition with phages (P) at 25 °C, whereas the condition without phages (D) differed. At 15 °C, the metabolic composition in condition P was different from conditions C and D. For example, ethyl lactate, which is associated to LAB activity, was highly predominant in condition D at 25 °C, where the *L. mali* UCMA 16447 and *Ln. mesenteroides* CIM 3004 strains were predominant. When in excess, this compound is often undesirable in fermented beverages, particularly in cider, as it causes olfactory defects [41]. On the contrary, conditions C and P showed high contents of esters (ethyl octanoate, ethyl hexanoate) and aromatic compounds such as 2-phenylethanol, which are often associated to yeast activity, and generated fruity notes and good perceptions in fermented beverages [42]. These results are in agreement with microbial counts, because the *S. uvarum* UCMA 10446 strain was at high concentrations in conditions C and P at 25 °C. Regarding the experiment at 15 °C, condition P was characterized by high contents in citric acid compared to conditions C and D. Citric acid metabolism is often associated to LAB activity, and *Ln. mesenteroides* is especially studied for its ability to metabolize citric acid [43]. The high level of citric acid and the lower level of volatile organic compounds in condition P could be explained, in part, by the absence of the *Ln. mesentoides* CIM 3004 strain. Deciphering the contribution of each micro-organism to

the consumption and production of specific compounds is not easy, as LABs, in particular, share common enzymes that are implicated in several metabolic pathways. To complete the current study and delve deeper into the metabolome analysis in relation to the presence of phages, it would be interesting, for example, to perform metatranscriptomic assays on the community, as it was performed in Swiss-type Maasdam cheese during ripening to associate the production of flavor compounds to each strain used in a cheese community model [44]. Metabolomic approaches enable the study of huge numbers of metabolites in a sample, and thus, could be another way to more precisely characterize the model with very specific metabolic signatures of the different conditions. Metabolomics has already been performed on fermented food products, such as for the characterization of new recipes of beer [45], to characterize fermented milk with different probiotics [46] and to identify three different teas, thanks to their metabolites [47]. These metabolomic techniques also enabled observation of the impact of a bioprotective strain of *Metschnikowia pulcherrims* on the volatile composition of different wines [48]. Thus, the use of these methods could allow to more precise information to be obtained about the impact of phages in more complex model microbial communities.

5. Conclusions

This is the first study regarding the impact of phages on a model microbial community inspired by cider. It showed that phages shape the microbial dynamics as well as the metabolism of the community, especially depending on the temperature, after a disturbance. Differences were observed regarding sugar consumption, organic acid production and volatile organic-compound production. This work provides information about the dynamics of phages–bacteria interactions in a model microbial community inspired by a fermented beverage and strengthens the idea of the important role played by phages in microbial communities in such a matrix, as they can directly and indirectly modulate both microbial populations and associated metabolites. A better understanding of this type of interaction in fermented foods is essential to provide information about the dynamics of microbial populations during the fermentation processes, and even so, for the sensorial properties of foods.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/v14102283/s1, Figure S1: Prophages induction with mitomycin C (MC) in *L. mali* UCMA 16447 (A), *Ln. mesenteroides* (B) and *O. oeni* UCMA 19297 (C). Green curve: negative control (without MC), blue curve: MC 0.1 µg/mL, and red curve: MC 1 µg/mL. Error bars were obtained from 4 technical replicates, and optical density at 600 nm was measured using a microplate reader (TECAN SPARK). Figure S2: (A) Principal Component Analysis of the studied compounds (black arrows) with illustrative variables representing the four strains of the model (red arrows). (B) Distribution of the samples in condition C (control), D (disturbance without phages) and P (disturbance with phages) for all times at 25 °C. Figure S3: (A) Principal Component Analysis of the studied compounds (black arrows) with illustrative variables representing the four strains of the model (red arrows). (B) Distribution of the samples in condition C (control), D (disturbance without phages) and P (disturbance with phages) at 96 h for the experiment at 25 °C. Figure S4: (A) Principal Component Analysis of the studied compounds (black arrows) with illustrative variables representing the four strains of the model (red arrows). (B) Distribution of the samples in condition C (control), D (disturbance without phages) and P (disturbance with phages) for all times at 15 °C. Figure S5: Principal compounds and hypothetical representation of the metabolic pathways potentially involved in the production/consumption of these compounds at 15 °C between conditions C, D and P at 220 h. Table S1: Kruskal–Wallis and Dunn's multiple comparison analysis results of microbial enumerations for the experiment at 25 °C. Table S2: Kruskal–Wallis and Dunn's multiple comparison analysis results of microbial enumeration for the experiment at 15 °C. Table S3: Volatile compounds identified and analyzed by GC-MS during the study.

Author Contributions: Conceptualization: P.L., MD. and N.D.; Methodology: P.L., MD. and N.D.; Formal analysis: P.L.; Data curation: J.L., M.S., A.S., P.L., M.D. and N.D.; Writing—original draft preparation: P.L., M.D. and N.D.; Writing—review and editing: P.L., M.D., J.L., M.S., A.S. and N.D.; Supervision: M.D. and N.D.; Project administration: M.D. and N.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation under a PhD Grant MENRT.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank all the lab members for helpful discussions, particularly, Jean-Marie Laplace and Marina Crétenet for the selection of the bacterial strains used in this study. The authors are also grateful to Baptiste Delaunay for his help with the GC-MS injections of some samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tamang, J.P.; Cotter, P.D.; Endo, A.; Han, N.S.; Kort, R.; Liu, S.Q.; Mayo, B.; Westerik, N.; Hutkins, R. Fermented Foods in a Global Age: East Meets West. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 184–217. [CrossRef] [PubMed]
2. Gänzle, M.G. Lactic Metabolism Revisited: Metabolism of Lactic Acid Bacteria in Food Fermentations and Food Spoilage. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *2*, 106–117. [CrossRef]
3. Wang, J.-T.; Egidi, E.; Li, J.; Singh, B.K. Linking Microbial Diversity with Ecosystem Functioning through a Trait Framework. *J. Biosci.* **2019**, *5*, 109. [CrossRef]
4. Wolfe, B.E.; Dutton, R.J. Fermented Foods as Experimentally Tractable Microbial Ecosystems. *Cell* **2015**, *161*, 49–55. [CrossRef] [PubMed]
5. Belizário, J.E.; Faintuch, J. Microbiome and Gut Dysbiosis. *Exp. Suppl.* **2018**, *109*, 459–476. [CrossRef]
6. Tomasello, G.; Mazzola, M.; Leone, A.; Sinagra, E.; Zummo, G.; Farina, F.; Damiani, P.; Cappello, F.; Gerges Geagea, A.; Jurjus, A.; et al. Nutrition, Oxidative Stress and Intestinal Dysbiosis: Influence of Diet on Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech Repub.* **2016**, *160*, 461–466. [CrossRef]
7. Chevallereau, A.; Pons, B.J.; van Houte, S.; Westra, E.R. Interactions between Bacterial and Phage Communities in Natural Environments. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *20*, 49–62. [CrossRef]
8. Mills, S.; Shanahan, F.; Stanton, C.; Hill, C.; Coffey, A.; Ross, R.P. Movers and Shakers: Influence of Bacteriophages in Shaping the Mammalian Gut Microbiota. *Gut Microbes* **2013**, *4*, 4–16. [CrossRef]
9. Draper, L.A.; Ryan, F.J.; Dalmasso, M.; Casey, P.G.; McCann, A.; Velayudhan, V.; Ross, R.P.; Hill, C. Autochthonous Faecal Virome Transplantation (FVT) Reshapes the Murine Microbiome after Antibiotic Perturbation. *bioRxiv* **2019**. [CrossRef]
10. Deasy, T.; Mahony, J.; Neve, H.; Heller, K.J.; Van Sinderen, D. Isolation of a Virulent *Lactobacillus Brevis* Phage and Its Application in the Control of Beer Spoilage. *J. Food Prot.* **2011**, *74*, 2157–2161. [CrossRef]
11. LeLièvre, V.; Besnard, A.; Schlusselhuber, M.; Desmasures, N.; Dalmasso, M. Phages for Biocontrol in Foods: What Opportunities for *Salmonella* Sp. Control along the Dairy Food Chain? *Food Microbiol.* **2019**, *78*, 89–98. [CrossRef] [PubMed]
12. Mahony, J.; Van Sinderen, D. Current Taxonomy of Phages Infecting Lactic Acid Bacteria. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 7. [CrossRef] [PubMed]
13. Philippe, C.; Krupovic, M.; Jaomanjaka, F.; Claisse, O.; Petrel, M.; Le Marrec, C. Bacteriophage GC1, a Novel Tectivirus Infecting *Gluconobacter Cerinus*, an Acetic Acid Bacterium Associated with Wine-Making. *Viruses* **2018**, *10*, 39. [CrossRef]
14. Pietrysiak, E.; Smith, S.; Ganjyal, G.M. Food Safety Interventions to Control *Listeria Monocytogenes* in the Fresh Apple Packing Industry: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2019**, *18*, 1705–1726. [CrossRef]
15. Özcan, E.; Seven, M.; Şirin, B.; Çakır, T.; Nikerel, E.; Teusink, B.; Toksoy Öner, E. Dynamic Co-Culture Metabolic Models Reveal the Fermentation Dynamics, Metabolic Capacities and Interplays of Cheese Starter Cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **2021**, *118*, 223–237. [CrossRef] [PubMed]
16. Bonaïti, C.; Irlinger, F.; Spinnler, H.E.; Engel, E. An Iterative Sensory Procedure to Select Odor-Active Associations in Complex Consortia of Microorganisms: Application to the Construction of a Cheese Model. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 1671–1684. [CrossRef]
17. Imran, M.; Desmasures, N.; Vernoux, J.-P. From Undefined Red Smear Cheese Consortia to Minimal Model Communities Both Exhibiting Similar Anti-Listerial Activity on a Cheese-like Matrix. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 1095–1103. [CrossRef]
18. Vermeiren, L.; Devlieghere, F.; Debevere, J. Co-Culture Experiments Demonstrate the Usefulness of *Lactobacillus Sakei* 10A to Prolong the Shelf-Life of a Model Cooked Ham. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *108*, 68–77. [CrossRef]

19. Det-Udom, R.; Gilbert, C.; Liu, L.; Prakitchaiwattana, C.; Ellis, T.; Ledesma-Amaro, R. Towards Semi-Synthetic Microbial Communities: Enhancing Soy Sauce Fermentation Properties in *B. Subtilis* Co-Cultures. *Microb. Cell Fact.* **2019**, *18*, 101. [CrossRef]
20. Ma, Q.; Zhou, J.; Zhang, W.; Meng, X.; Sun, J.; Yuan, Y.-J. Integrated Proteomic and Metabolomic Analysis of an Artificial Microbial Community for Two-Step Production of Vitamin C. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26108. [CrossRef]
21. Zou, W.; Liu, L.; Chen, J. Structure, Mechanism and Regulation of an Artificial Microbial Ecosystem for Vitamin C Production. *Crit. Rev. Microbiol.* **2013**, *39*, 247–255. [CrossRef] [PubMed]
22. Sadoudi, M.; Tourdot-Maréchal, R.; Rousseaux, S.; Steyer, D.; Gallardo-Chacón, J.-J.; Ballester, J.; Vichi, S.; Guérin-Schneider, R.; Caixach, J.; Alexandre, H. Yeast-Yeast Interactions Revealed by Aromatic Profile Analysis of Sauvignon Blanc Wine Fermented by Single or Co-Culture of Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* Yeasts. *Food Microbiol.* **2012**, *32*, 243–253. [CrossRef] [PubMed]
23. Arslan-Tontul, S.; Erbas, M. Co-Culture Probiotic Fermentation of Protein-Enriched Cereal Medium (*Boza*). *J. Am. Coll. Nutr.* **2020**, *39*, 72–81. [CrossRef] [PubMed]
24. Cousin, F.J.; Le Guellec, R.; Schlusselhuber, M.; Dalmasso, M.; Laplace, J.-M.; Cretenet, M. Microorganisms in Fermented Apple Beverages: Current Knowledge and Future Directions. *Microorganisms* **2017**, *5*, 39. [CrossRef] [PubMed]
25. Misery, B.; Legendre, P.; Rue, O.; Bouchart, V.; Guichard, H.; Laplace, J.M.; Cretenet, M. Diversity and Dynamics of Bacterial and Fungal Communities in Cider for Distillation. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, *339*, 108987. [CrossRef] [PubMed]
26. Ledormand, P.; Desmasures, N.; Midoux, C.; Rué, O.; Dalmasso, M. Investigation of the Phageome and Prophages in French Cider, a Fermented Beverage. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1203. [CrossRef] [PubMed]
27. Ledormand, P.; Desmasures, N.; Bernay, B.; Goux, D.; Rué, O.; Midoux, C.; Monnet, C.; Dalmasso, M. Molecular Approaches to Uncover Phage-Lactic Acid Bacteria Interactions in a Model Community Simulating Fermented Beverages. *Food Microbiol.* **2022**, *107*, 104069. [CrossRef]
28. Haider, W.; Barillier, D.; Hayat, A.; Gaillard, J.-L.; Ledauphin, J. Rapid Quantification and Comparison of Major Volatile Compounds of Ciders from France (Normandy and Brittany) Using Microextraction by Packed Sorbent (MEPS). *Anal. Methods* **2014**, *6*, 1364–1376. [CrossRef]
29. Ledauphin, J.; Le Milbeau, C.; Barillier, D.; Hennequin, D. Differences in the Volatile Compositions of French Labeled Brandies (Armagnac, Calvados, Cognac, and Mirabelle) Using GC-MS and PLS-DA. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 7782–7793. [CrossRef]
30. Arndt, D.; Grant, J.R.; Marcu, A.; Sajed, T.; Pon, A.; Liang, Y.; Wishart, D.S. PHASTER: A better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W16–W21. [CrossRef]
31. D'Amore, T.; Di Taranto, A.; Berardi, G.; Vita, V.; Marchesani, G.; Chiaravalle, A.E.; Iammarino, M. Sulfites in Meat: Occurrence, Activity, Toxicity, Regulation, and Detection. A Comprehensive Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 2701–2720. [CrossRef] [PubMed]
32. Jin, K.; Jin, C.; Wu, Y. Synthetic Biology-Powered Microbial Co-Culture Strategy and Application of Bacterial Cellulose-Based Composite Materials. *Carbohydr. Polym.* **2022**, *283*, 119171. [CrossRef] [PubMed]
33. Lv, Y.; Jiang, Y.; Lu, J.; Gao, H.; Dong, W.; Zhou, J.; Zhang, W.; Xin, F.; Jiang, M. Comprehensive Evaluation for the One-Pot Biosynthesis of Butyl Acetate by Using Microbial Mono- and Co-Cultures. *Biotechnol. Biofuels* **2021**, *14*, 203. [CrossRef]
34. Che, S.; Men, Y. Synthetic Microbial Consortia for Biosynthesis and Biodegradation: Promises and Challenges. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *46*, 1343–1358. [CrossRef] [PubMed]
35. Hsu, B.B.; Gibson, T.E.; Yeliseyev, V.; Liu, Q.; Lyon, L.; Bry, L.; Silver, P.A.; Gerber, G.K. Dynamic Modulation of the Gut Microbiota and Metabolome by Bacteriophages in a Mouse Model. *Cell Host Microbe* **2019**, *25*, 803–814.e5. [CrossRef]
36. Ledormand, P.; Desmasures, N.; Dalmasso, M. Phage Community Involvement in Fermented Beverages: An Open Door to Technological Advances? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *61*, 2911–2920. [CrossRef]
37. Paillet, T.; Dugat-Bony, E. Bacteriophage Ecology of Fermented Foods: Anything New under the Sun? *Curr. Opin. Food Sci.* **2021**, *40*, 102–111. [CrossRef]
38. Lee, S.; Park, J.-H. Characteristics on Host Specificity, Infection, and Temperature Stability of *Weissella* Phages from Watery Kimchi. *Food Sci. Biotechnol.* **2021**, *30*, 843–851. [CrossRef]
39. Kong, S.; Park, J.-H. Effect of Bacteriophages on Viability and Growth of Co-Cultivated *Weissella* and *Leuconostoc* in Kimchi Fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *29*, 558–561. [CrossRef]
40. Somerville, V.; Berthoud, H.; Schmidt, R.S.; Bachmann, H.-P.; Meng, Y.H.; Fuchsmann, P.; von Ah, U.; Engel, P. Functional Strain Redundancy and Persistent Phage Infection in Swiss Hard Cheese Starter Cultures. *ISME J.* **2021**, *16*, 388–399. [CrossRef]
41. Picinelli Lobo, A.; Antón-Díaz, M.J.; Mangas Alonso, J.J.; Suárez Valles, B. Characterization of Spanish Ciders by Means of Chemical and Olfactometric Profiles and Chemometrics. *Food Chem.* **2016**, *213*, 505–513. [CrossRef] [PubMed]
42. Pires, E.J.; Teixeira, J.A.; Brányik, T.; Vicente, A.A. Yeast: The Soul of Beer's Aroma—A Review of Flavour-Active Esters and Higher Alcohols Produced by the Brewing Yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1937–1949. [CrossRef] [PubMed]
43. Marty-Teysset, C.; Lolkema, J.S.; Schmitt, P.; Diviès, C.; Konings, W.N. The Citrate Metabolic Pathway in *Leuconostoc Mesenteroides*: Expression, Amino Acid Synthesis, and Alpha-Ketocarboxylate Transport. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 6209–6215. [CrossRef] [PubMed]
44. Duru, I.C.; Laine, P.; Andreevskaya, M.; Paulin, L.; Kananen, S.; Tynkkynen, S.; Auvinen, P.; Smolander, O.-P. Metagenomic and Metatranscriptomic Analysis of the Microbial Community in Swiss-Type Maasdam Cheese during Ripening. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *281*, 10–22. [CrossRef]
45. Cavallini, N.; Savorani, F.; Bro, R.; Cocchi, M. A Metabolomic Approach to Beer Characterization. *Molecules* **2021**, *26*, 1472. [CrossRef]

46. Li, S.N.; Tang, S.H.; Ren, R.; Gong, J.X.; Chen, Y.M. Metabolomic Profile of Milk Fermented with *Streptococcus Thermophilus* Cocultured with *Bifidobacterium Animalis* Ssp. *Lactis*, *Lactiplantibacillus Plantarum*, or Both during Storage. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 8493–8505. [CrossRef]
47. Zhang, Q.; Wu, S.; Li, Y.; Liu, M.; Ni, K.; Yi, X.; Shi, Y.; Ma, L.; Willmitzer, L.; Ruan, J. Characterization of Three Different Classes of Non-Fermented Teas Using Untargeted Metabolomics. *Food Res. Int.* **2019**, *121*, 697–704. [CrossRef]
48. Simonin, S.; Roullier-Gall, C.; Ballester, J.; Schmitt-Kopplin, P.; Quintanilla-Casas, B.; Vichi, S.; Peyron, D.; Alexandre, H.; Tourdot-Maréchal, R. Bio-Protection as an Alternative to Sulphites: Impact on Chemical and Microbial Characteristics of Red Wines. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1308. [CrossRef]

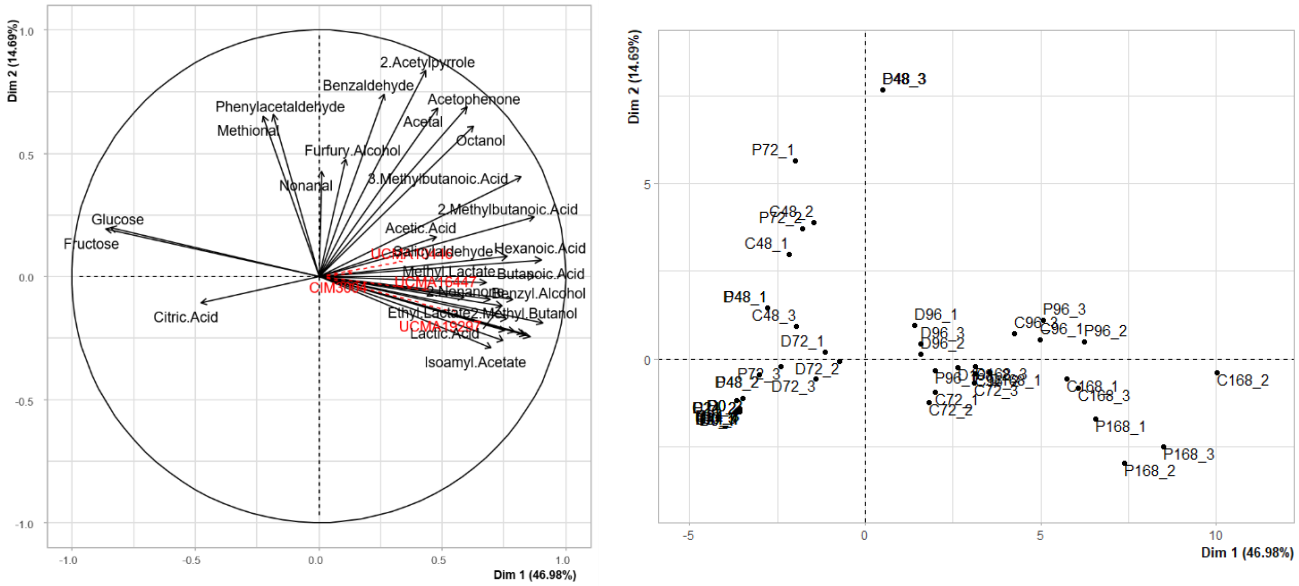


Figure S1: (A) Principal Component Analysis of the studied chemical compounds (black arrows) with illustrative variables representing the four strains of the model (red arrows). (B) Distribution of the samples in condition C (control), D (dysbiosis without phages) and P (dysbiosis with phages) for all times at 25°C. Samples are named as follows: Condition (C: control, D: dysbiosis without phages, P: dysbiosis with phages). Time point (0, 48h, 72h, 96h, 168h). Biological replicate (1, 2, 3) (e.g. C48_1 means Control at 48h, biological replicate 1).

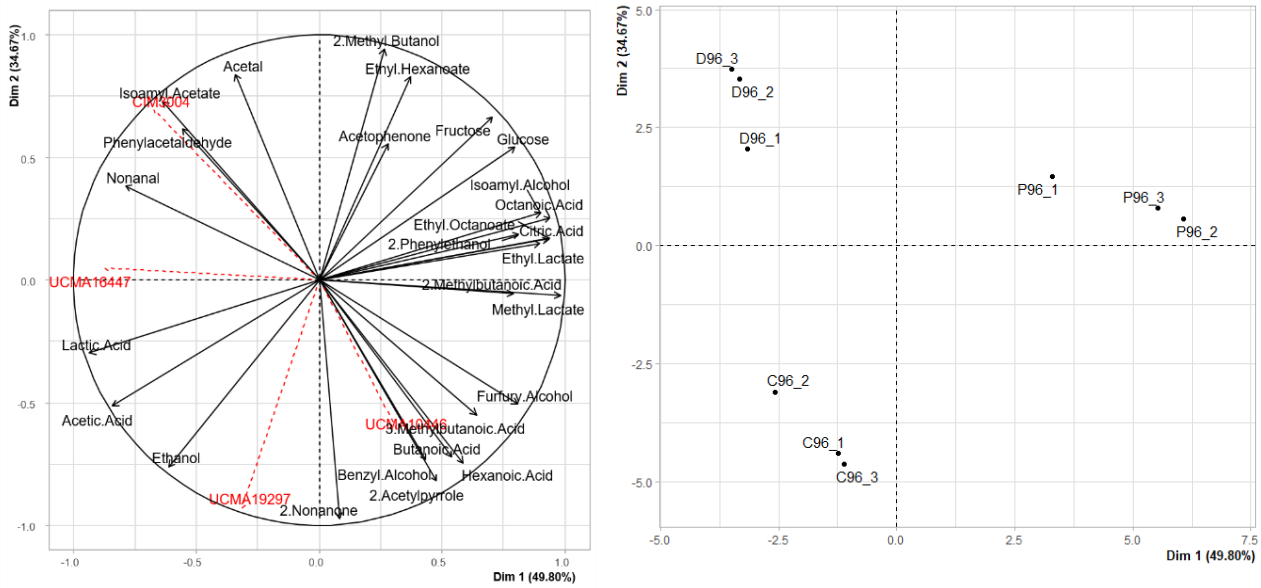


Figure S2: (A) Principal Component Analysis of the studied chemical compounds (black arrows) with illustrative variables representing the four strains of the model (red arrows). (B) Distribution of the samples in condition C (control), D (dysbiosis without phages) and P (dysbiosis with phages) at 96h for the experiment at 25°C. Samples are named as follows: Condition (C: control, D: dysbiosis without phages, P: dysbiosis with phages). Time point (0, 48h, 72h, 96h, 168h). Biological replicate (1, 2, 3) (e.g. C96_1 means Control at 96h, biological replicate 1).

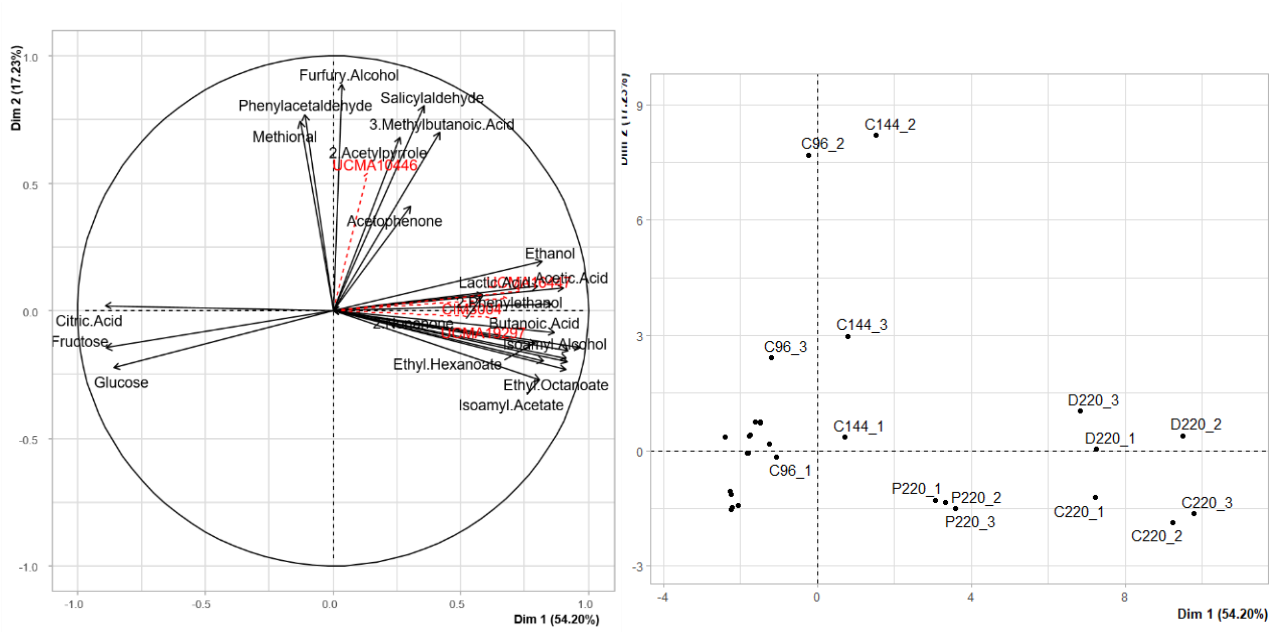


Figure S3: (A) Principal Component Analysis of the studied chemical compounds (black arrows) with illustrative variables representing the four strains of the model (red arrows). (B) Distribution of the samples in condition C (control), D (dysbiosis without phages) and P (dysbiosis with phages) for all times at 15°C. Samples are named as follows: Condition (C: control, D: dysbiosis without phages, P: dysbiosis with phages). Time point (0, 48h, 72h, 96h, 168h). Biological replicate (1, 2, 3) (e.g. C144_1 means Control at 144h, biological replicate 1).

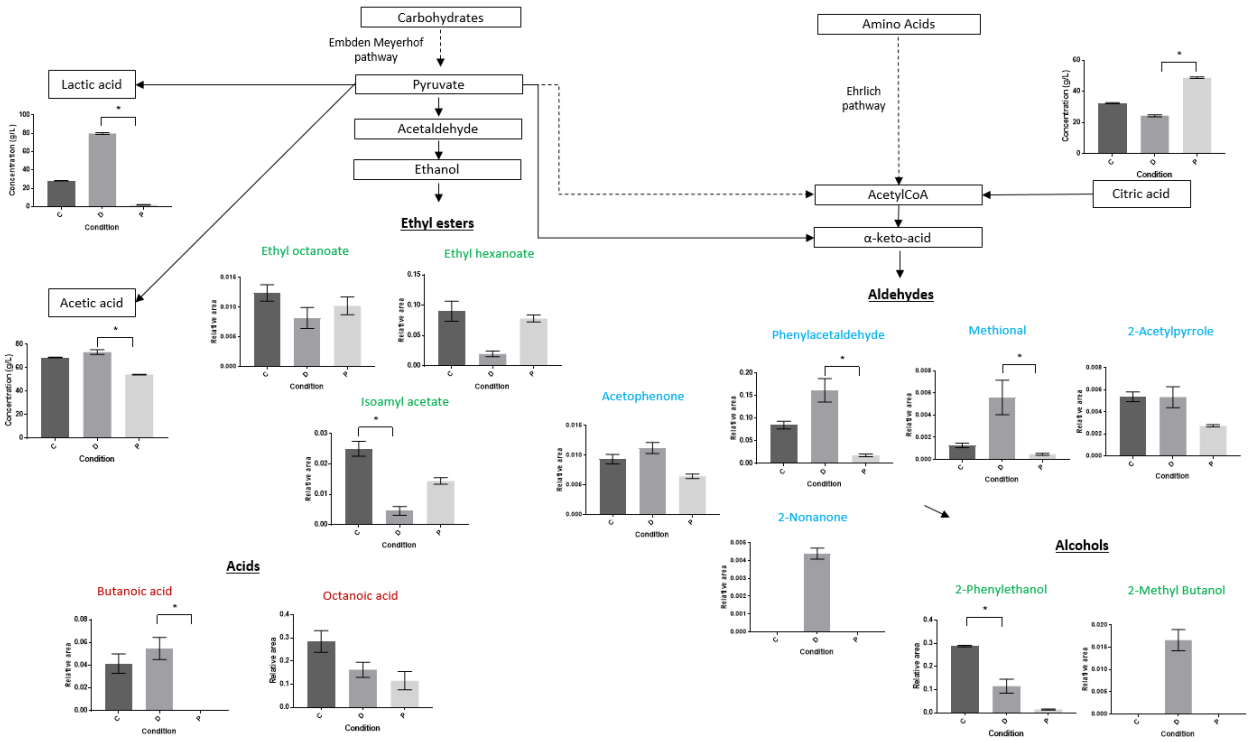


Figure S4: Principal compounds and hypothetical representation of the metabolic pathways potentially involved in the production/consumption of these compounds at 15°C between conditions C, D and P at 220h. Green compounds were principally associated to yeast activity, red compounds to LAB activity and blue compounds to yeast and/or LAB activity. Concentrations of lactic acid, acetic acid and citric acid were determined by HPLC and expressed in g/L. The other volatile compounds were analyzed by GC-MS and expressed with relative area (standardized with internal standards). Kruskal Wallis test was performed for each compound and multiple comparisons were performed using Dunn's procedure. A p-value ≤ 0.05 was considered significant (*).

Table S1: Kruskal Walis and Dunn's multiple comparison analysis results of microbial enumerations for the experiment at 25°C.

Bold: p-value < 0.05

***S. uvarum* UCMA 10446**				***L. mali* UCMA 16447**				***Ln. mesenteroides* CIM 3004**				***O. oeni* UCMA 19297**			
Time (h)	**Comparison**			**Time (h)**	**Comparison**			**Time (h)**	**Comparison**			**Time (h)**	**Comparison**		
	C vs D	**C vs P**	**D vs P**		**C vs D**	**C vs P**	**D vs P**		**C vs D**	**C vs P**	**D vs P**		**C vs D**	**C vs P**	**D vs P**
24	>0.99	>0.99	>0.99	24	>0.99	0.89	0.70	24	>0.99	0.30	0.89	24	>0.99	>0.99	0.33
48	0.41	**0.03**	0.89	48	0.22	0.08	>0.99	48	0.41	**0.03**	0.89	48	0.22	0.08	>0.99
72	0.41	**0.03**	0.89	72	0.54	**0.02**	0.54	72	0.54	**0.02**	0.54	72	0.41	**0.03**	0.89
96	**0.02**	0.54	0.54	96	0.54	**0.02**	0.54	96	0.54	0.54	**0.02**	96	**0.04**	0.30	>0.99
168	0.30	>0.99	0.05	168	>0.99	0.08	0.22	168	**0.02**	0.54	0.54	168	**0.02**	0.54	0.54

Table S2: Kruskal Walis and Dunn's multiple comparison analysis results of microbial enumeration for the experiment at 15°C.

Bold: p-value < 0.05

***S. uvarum* UCMA 10446**				***L. mali* UCMA 16447**				***Ln. mesenteroides* CIM 3004**				***O. oeni* UCMA 19297**			
Time (h)	**Comparison**			**Time (h)**	**Comparison**			**Time (h)**	**Comparison**			**Time (h)**	**Comparison**		
	C vs D	**C vs P**	**D vs P**		**C vs D**	**C vs P**	**D vs P**		**C vs D**	**C vs P**	**D vs P**		**C vs D**	**C vs P**	**D vs P**
72	>0.99	>0.99	>0.99	72	>0.99	>0.99	>0.99	72	>0.99	>0.99	>0.99	72	>0.99	>0.99	>0.99
96	**0.02**	0.54	0.54	96	0.08	0.22	>0.99	96	0.15	0.11	>0.99	96	0.22	0.08	>0.99
120	0.11	0.16	>0.99	120	0.07	0.22	>0.99	120	0.11	0.16	>0.99	120	0.22	0.08	>0.99
144	0.11	0.15	>0.99	144	0.05	0.30	>0.99	144	0.54	**0.02**	0.54	144	0.061	0.26	>0.99
168	0.26	0.18	>0.99	168	0.89	**0.03**	0.41	168	x	x	x	168	0.09	0.18	>0.99
220	>0.99	0.16	0.11	220	0.54	0.54	**0.02**	220	x	x	x	220	0.11	0.16	>0.99

Table S3: Volatile compounds identified and analyzed by GC-MS during the study.

Name	N° CAS	Retention Time	Comment
Acetal	105-57-7	11.35	
Isoamyl Alcohol	123-51-3	11.78	
2-Methyl Butanol	137-32-6	11.96	
4-Methylpentan-2-ol	108-11-2	12.97	Standard
Butanoic Acid	107-92-6	14.49	
Methyl Lactate	547-64-8	15.57	
3-Methylbutanoic Acid	503-74-2	17.26	
2-Methylbutanoic Acid	116-53-0	17.64	
Furfury Alcohol	98-00-0	17.69	
Hexanol	111-27-3	18.46	
Isoamyl Acetate	123-92-2	18.77	
Ethyl Lactate	97-64-3	19.39	
Methional	3268-49-3	20.17	
Benzaldehyde	100-52-7	22.59	
Hexanoic Acid	142-62-1	23.23	
Ethyl Hexanoate	123-66-0	23.94	
Salicylaldehyde	90-02-8	24.20	
Octanol	111-87-5	25.07	
Benzyl Alcohol	100-51-6	25.38	
Phenylacetaldehyde	122-78-1	25.74	
2-Acetylpyrrole	1072-83-9	26.38	
Acetophenone	98-86-2	26.56	
2-Nonanone	821-55-6	27.27	
Nonanal	124-19-6	27.76	
2-Phenylethanol	60-12-8	28.17	
Octanoic Acid	124-07-2	29.75	
Ethyl Octanoate	106-32-1	30.64	
Ethyl Undecanoate	627-90-7	38.85	Standard

2.3 Données complémentaires du WP2

2.3.1 Vérification de la présence de prophages inductibles dans les souches bactériennes du modèle

La présence de prophages inductibles dans les souches du modèle a pu être vérifiée par ajout de MC à des concentrations finales de 0,1 ou 1 µg/mL en début de phase exponentielle de croissance de chaque souche bactérienne, en milieu MRS à 30°C (**Figure 25**). Aucune des trois souches testées n'a montré de courbe caractéristique d'une lyse suite à l'induction d'un prophage (chute brutale de la DO), malgré un léger effet de la MC à une concentration de 1 µg/mL sur la croissance des trois souches. Ainsi, à travers ces tests, la présence de prophages inductibles ne semble pas être confirmée dans ces souches bactériennes, dans ces conditions d'analyse.

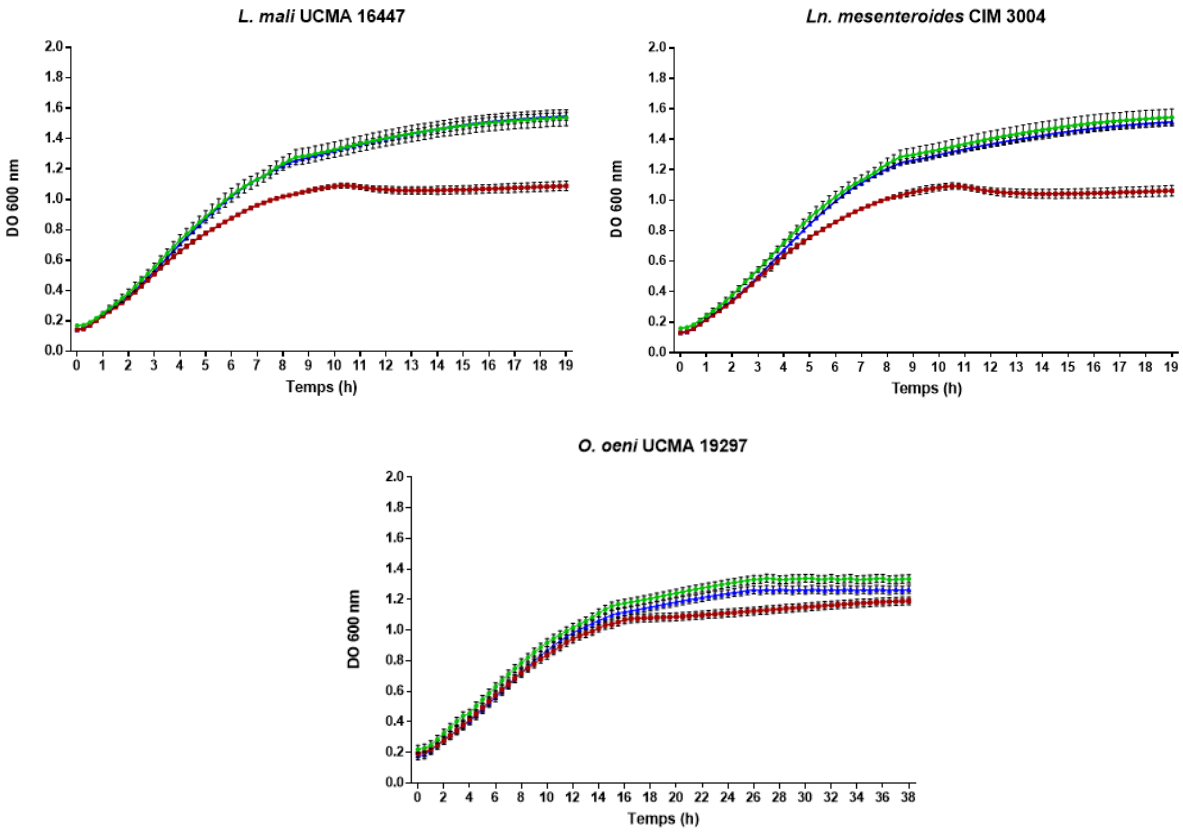


Figure 25 : Tests d'induction des souches bactériennes du modèle du WP2 à la mitomycine C (MC).

Légende : Courbes vertes : témoin négatif (sans MC). Courbes bleues : MC 0,1 µg/mL. Courbes rouges (MC 1 µg/mL).

2.3.2 Sélection du modèle de perturbation

Avant de choisir le phénomène présenté dans l'article ci-dessus, permettant de perturber les équilibres de la communauté microbienne, plusieurs agents ou conditions de perturbation ont été testés et sont présentés dans cette partie en complément d'information. L'objectif était de sélectionner le modèle de perturbation le mieux adapté à cette étude qui permettait de modifier les équilibres microbiens sans toutefois complètement éliminer une ou plusieurs souches.

Ainsi, plusieurs conditions ont été testées pour perturber le modèle (**Tableau 5** – Matériels & Méthodes) quand les concentrations microbiennes approchaient 10^4-10^5 UFC/mL, c'est-à-dire après 24 h de co-culture à 25°C. Premièrement, différentes concentrations d'éthanol ont été testées (5% - 8% - 10% et 15%) puisqu'il s'agit d'un composé majoritaire retrouvé dans les boissons fermentées alcoolisées (**Figure 26**).

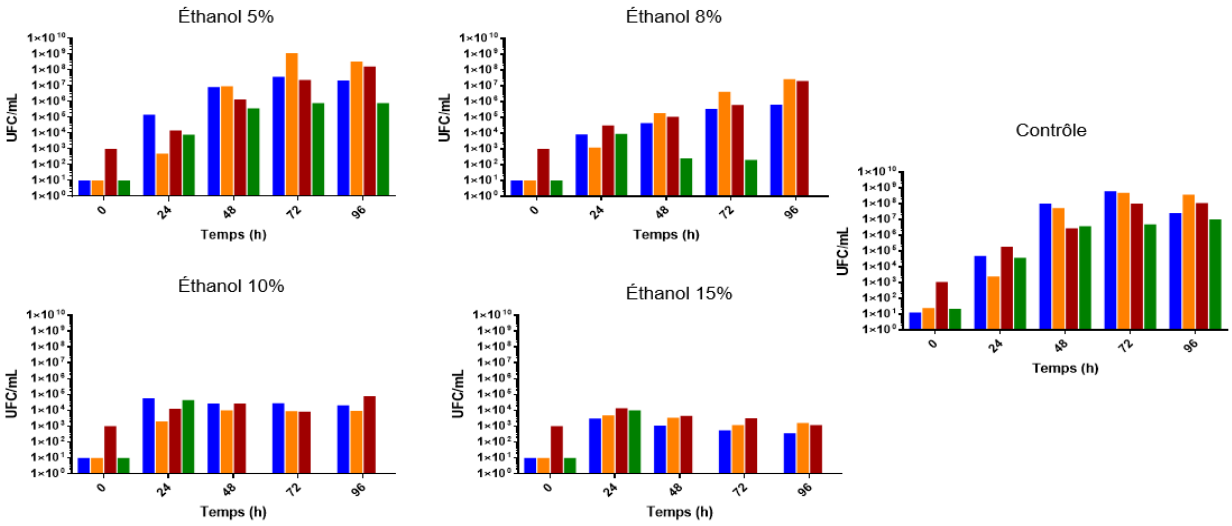


Figure 26 : Tests de perturbation avec différentes concentrations en éthanol ajoutées après 24 h de co-culture.
Légende : En bleu : *Leuconostoc mesenteroides* CIM 3004, ; en orange : *Liquorilactobacillus mali* UCMA 16447 ; en rouge : *Oenococcus oeni* UCMA 19297 ; en vert : *Saccharomyces uvarum* UCMA 10446.

Lorsque de l'éthanol était ajouté à une concentration finale de 5%, aucune perturbation du comportement de la communauté microbienne modèle n'a été observée par rapport à la condition témoin (**Figure 26**). Pour une concentration de 8% d'éthanol, un ralentissement de la croissance microbienne était observé. À partir de 48 h, la population de levure *S. uvarum* commençait à chuter (10^2 UFC/mL) et les souches bactériennes atteignaient des concentrations de 10^5-10^6 UFC/mL, plus faibles que dans la condition contrôle (10^7-10^8 UFC/mL). *S. uvarum* UCMA 10446 n'était plus détectable à 96 h (**Figure 26**). Pour les conditions à 10% et 15% d'éthanol, un effet bactériostatique sur les populations bactériennes a été observé, puisque les concentrations stagnaient autour de 10^4-10^3 UFC/mL tandis que la levure était totalement détruite (**Figure 26**). Ainsi, cet agent perturbateur n'a pas été retenu soit parce qu'il ne permettait pas de modifier les équilibres microbiens suffisamment, soit parce qu'il entrainait l'élimination d'une souche du modèle.

Le deuxième élément perturbateur testé était le sulfite de sodium (Na_2SO_3), de la famille des sulfites. Il est généralement utilisé comme agent protecteur des aliments, inhibant la croissance microbienne, ayant des propriétés antioxydantes et de stabilisation de couleur en industrie agroalimentaire. Selon la réglementation Européenne (N°1029/2011), la quantité maximale de sulfite de sodium autorisée dans les cidres et les poirés est de 200 mg/L. Ainsi, des concentrations allant de 50 mg/L à 400 mg/L ont été testées comme élément perturbateur. Pour les concentrations de 50, 100, 150 et 200 mg/L, aucun effet par rapport à la condition témoin n'a été observé (**Figure 27**). A partir de 250 mg/L, un effet microbistatique était observé autour de 10^3-10^4 UFC/mL pour toutes les souches (**Figure 27**). La propriété du sulfite de sodium inhibant la croissance microbienne se vérifiait pour des concentrations supérieures à 200 mg/L dans cette communauté microbienne modèle. Ainsi, malgré l'obtention d'une perturbation des concentrations, une perturbation des équilibres microbiens n'a pas été obtenue en utilisant cette gamme de concentration du sulfite de sodium.

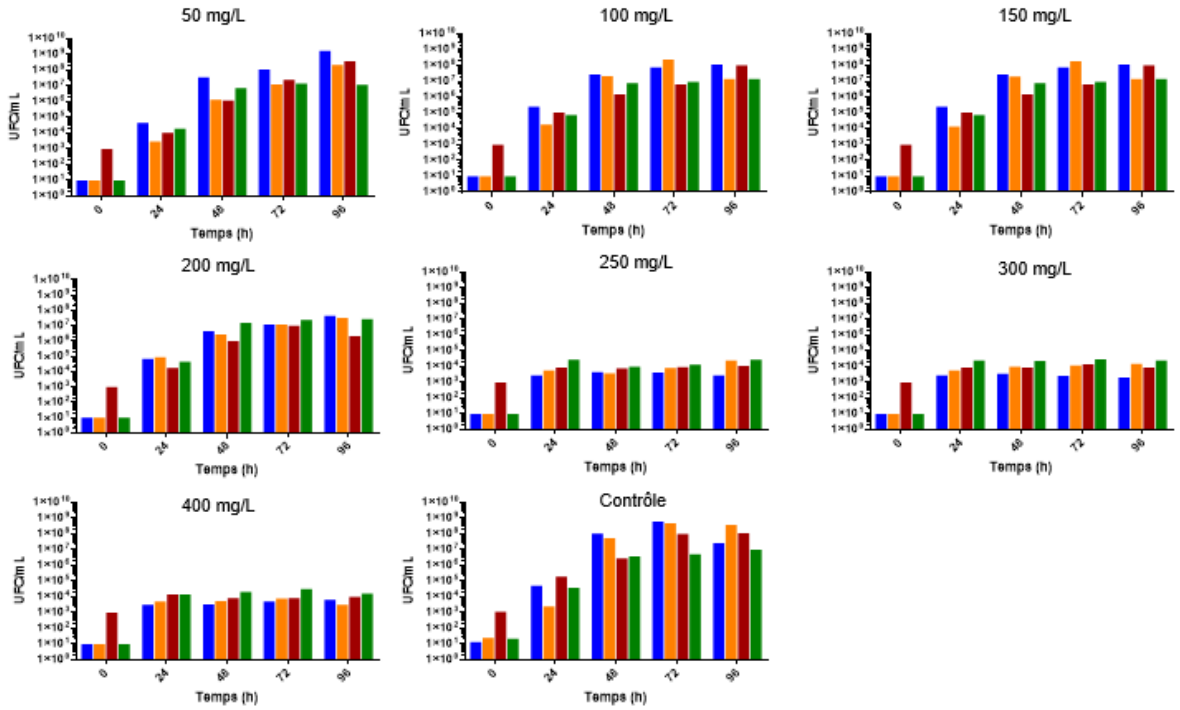


Figure 27 : Tests de perturbation des équilibres microbiens du modèle avec différentes concentrations en sulfite de sodium ajoutées après 24 h.
Ln. mesenteroides CIM3004 est représentée en bleu, *L. mali* UCMA 16447 en orange, *O. oeni* UCMA 19297 en rouge et *S. uvarum* UCMA 10446 en vert.

Aucun effet de perturbation pertinent n'a été observé pour différentes concentrations d'éthanol et de sulfite de sodium. Ainsi, des associations « cocktails » de ces deux composés ont été testées, d'une part 5% d'éthanol couplé à 150 mg/mL de sulfite de sodium et d'autre part, 8% d'éthanol couplé à 300 mg/mL de sulfite de sodium (**Figure 28**). Pour ces deux cocktails, une stabilisation des populations bactériennes était observée, autour de 10^6 UFC/mL pour la condition avec 5% d'éthanol et 150 mg/mL de sulfite de sodium, et de 10^5 UFC/mL pour la condition avec 8% d'éthanol et 300 mg/mL de sulfite de sodium. Dans les deux cas, seule une diminution du niveau de population de la levure *S. uvarum* a été constatée (**Figure 28**). En plus de ces deux cocktails, une levée de la pression provoquée par l'éthanol à 5% et le sulfite de sodium à 150 mg/L a été effectuée. À 48 h (24 h après l'ajout du cocktail), la communauté a été centrifugée et le surnageant remplacé par le surnageant d'une condition témoin (sans agent perturbateur), également incubée 48 h. Une reprise de la croissance microbienne était observée dès 72 h pour atteindre 10^6-10^7 UFC/mL (**Figure 28**). Ainsi, ces effets cocktails n'ont également pas permis d'obtenir l'effet de perturbation escompté pour toutes les souches microbiennes.

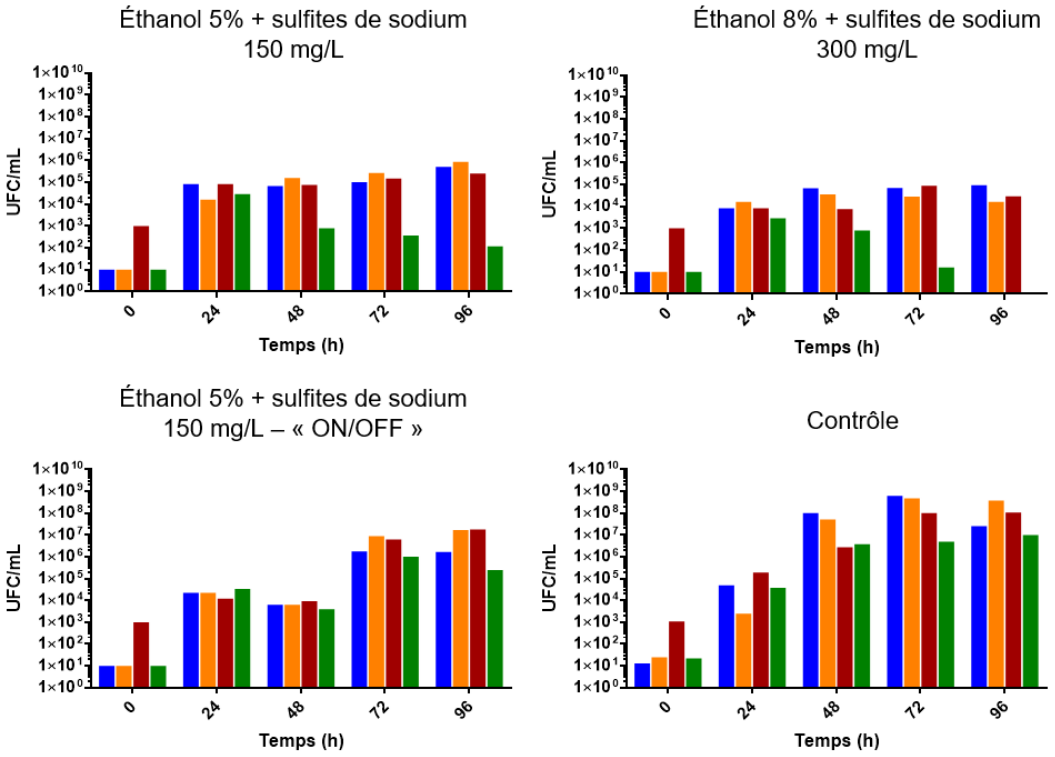


Figure 28 : Test d'effet cocktail avec différentes concentrations d'éthanol et de sulfite de sodium ajoutés à 24 h.
Ln. mesenteroides CIM3004 est représentée en bleu, *L. mali* UCMA 16447 en orange, *O. oeni* UCMA 19297 en rouge et *S. uvarum* UCMA 10446 en vert.

Compte tenu des résultats non concluants obtenus avec l'éthanol et le sulfite de sodium, composés retrouvés dans les boissons fermentées, des perturbations par choc thermique ont été testées. Ainsi, les températures de 40°C, 50°C et 60°C ont été testées, pendant 10 min pour les conditions à 40°C et 50°C et pendant 15 min pour la condition à 60°C, après 24 h de co-culture (**Figure 29**). Pour le choc thermique à 60°C, aucun microorganisme n'était plus détectable après 72 h, suggérant que le choc thermique était trop intense. Pour la condition à 50°C pendant 10 min, une chute des populations microbiennes a été observée par rapport à la condition contrôle. En effet, entre 24 h et 48 h, les souches *L. mali* UCMA 16447 et *Ln. mesenteroides* CIM 3004 passaient de 10^4-10^5 UFC/mL à 10^2-10^3 UFC/mL, tandis que les souches *O. oeni* UCMA 19297 et *S. uvarum* UCMA 10446 variaient de 10^5-10^4 UFC à 10^2-10^1 UFC/mL, respectivement (**Figure 29**). Ce déséquilibre persistait dans le temps puisqu'à partir de 72 h, *L. mali* UCMA 16447 et *Ln. mesenteroides* CIM 3004 prédominaient par rapport aux souches de *O. oeni* UCMA 19297 et *S. uvarum* UCMA 10446, avec des concentrations approchant les 10^7 UFC/mL contre 10^2-10^4 UFC/mL (**Figure 29**). Aucune perturbation n'a été observée pour le choc thermique à 40°C.

Au vu de ces résultats, la perturbation retenue pour la suite des expérimentations a été le choc thermique à 50°C pendant 10 min, impactant toutes les souches microbiennes.

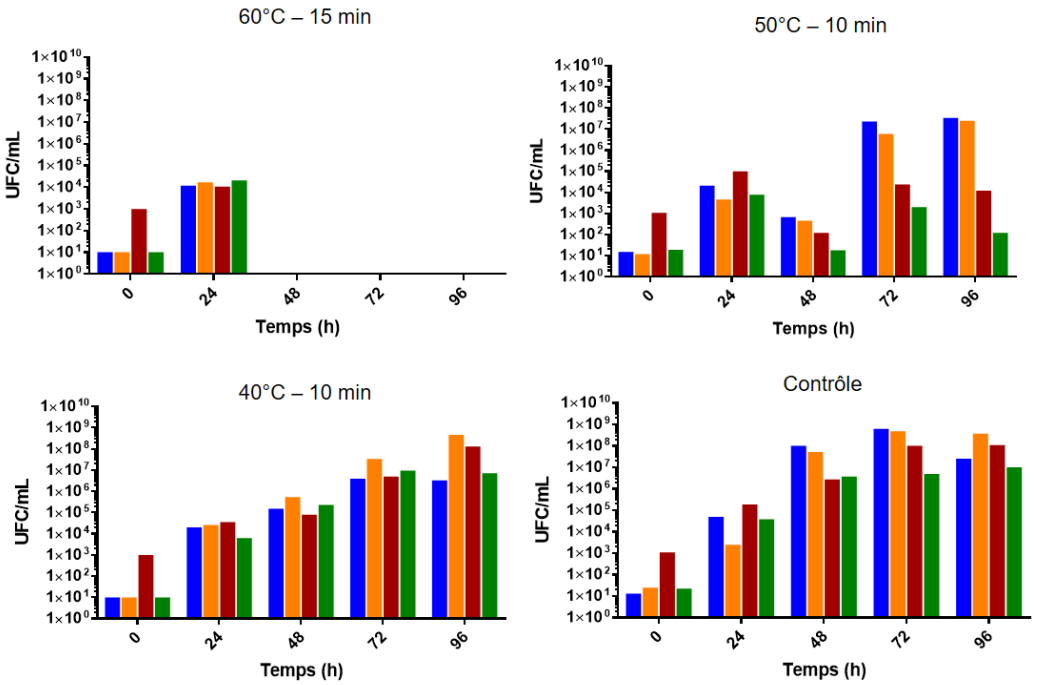


Figure 29 : Test d'effet de perturbation par choc thermique après 24 h.

Ln. mesenteroides CIM3004 est représentée en bleu, *L. mali* UCMA 16447 en orange, *O. oeni* UCMA 19297 en rouge et *S. uvarum* UCMA 10446 en vert.

2.3.3 Résultats dans le moût de pomme

En complément de la publication, des tests ont également été effectués dans du moût de pomme microfiltré ajusté à pH 5,5, afin de placer les souches dans un milieu plus proche du process cidricole, et donc affiner le modèle. La première constatation effectuée était que la souche *Ln. mesenteroides* CIM 3004 n'était plus détectable après 24 h, dans les trois conditions, malgré un ensemencement plus important qu'en milieu MRS (**Figure 30**). Cette observation peut vraisemblablement s'expliquer par le fait que *Ln. mesenteroides* CIM 3004 provienne de l'environnement laitier, et qu'elle est peu adaptée à l'environnement cidricole et par conséquent au moût. De 48 h à 168 h, *L. mali* UCMA 16447, *O. oeni* UCMA 19297 et *S. uvarum* UCMA 10446 atteignaient 10^8 UFC/mL dans la condition C, et restaient stables au cours de l'expérience. Pour les conditions D et P, les tendances étaient similaires entre elles puisqu'aucune différence significative n'a été observée tout le long de l'expérience pour chaque souche (p-value ≥ 0,5, **Tableau 7**). Les niveaux de population de *O. oeni* UCMA 19297 étaient significativement plus faibles dans la condition D comparée à la condition C à partir de 72 h, avec des niveaux autour de 10^6 UFC/mL (p-value = 0,02, **Tableau 7**). Aucune autre différence

significative n'était observée pour les autres souches (p-value ≥ 0,5, **Tableau 7**) (**Figure 30**). Les conditions C et P étaient également très proches entre elles, puisqu'aucune différence significative n'a été observée tout le long de l'expérience, excepté à 48 h pour *S. uvarum* UCMA 10446 et à 96 h pour *L. mali* UCMA 16447, qui étaient en proportion significativement plus faible dans la condition P par rapport à la condition C (p-value = 0,03 et p-value = 0,02, respectivement, **Tableau 7**) (**Figure 30**). Globalement, les trois conditions étaient donc assez proches au cours du temps, bien qu'après la perturbation, *L. mali* UCMA 16447 était généralement d'1 ou 2 $\log_{10}$ supérieur aux souches de *O. oeni* UCMA 19297 et de *S. uvarum* UCMA 10446.

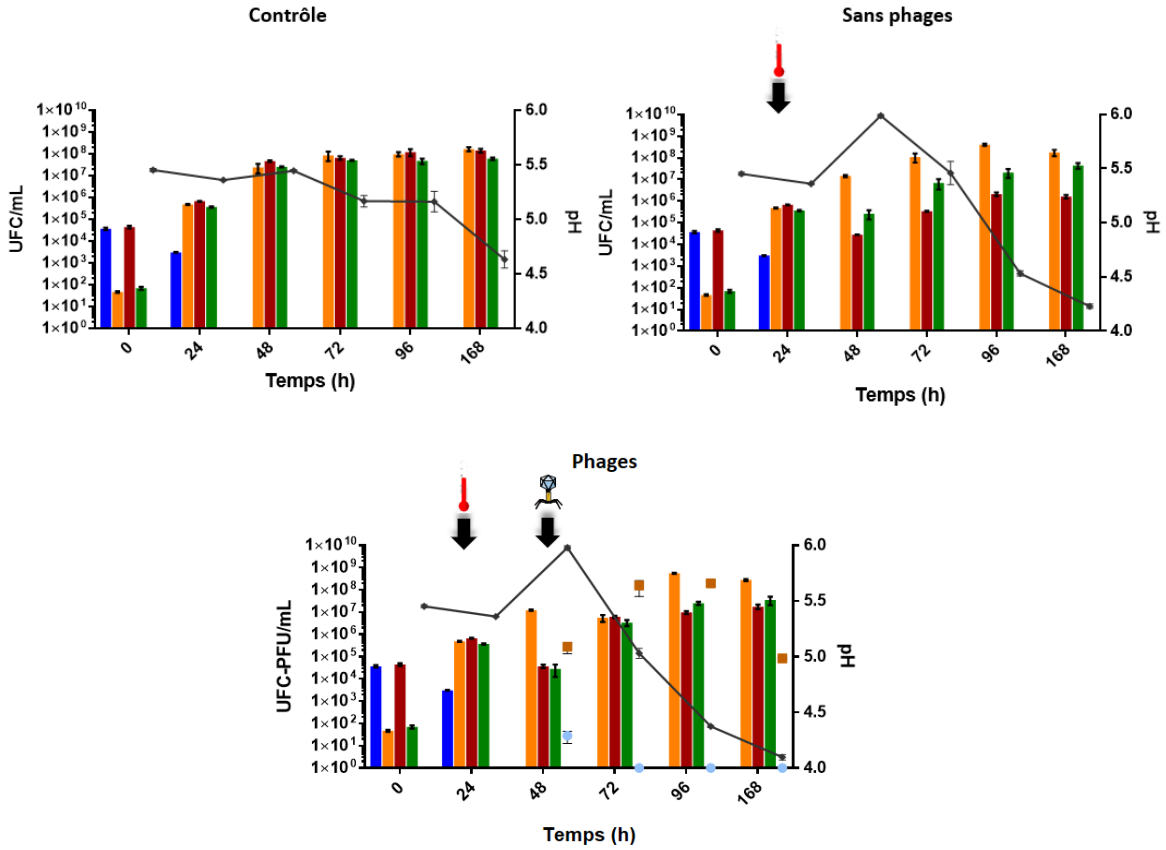


Figure 30 : Dynamique des populations microbiennes et du pH dans le modèle de communauté pour les trois conditions expérimentales (contrôle, perturbation sans phages et perturbation avec phages) à 25°C dans le moût de pomme.
Ln. mesenteroides CIM3004 est représentée en bleu, *L. mali* UCMA 16447 en orange, *O. oeni* UCMA 19297 en rouge et *S. uvarum* UCMA 10446 en vert. Le phage UCMA 21115 et le phage PLE001 sont représentés par des carrés orange et des cercles bleus, respectivement. Les flèches noires indiquent le choc thermique et l'ajout du phage au modèle. La courbe noire représente l'évolution du pH. Les valeurs sont issues de triplicats biologiques et les barres d'erreurs représentent les écarts types.

Tableau 7 : Analyses statistiques des dénombrements microbiens pour l'expérience en moût de pomme à 25°C. Tests de Kruskal Walis (seuil de significativité : p-value < 0.05)

	***S. uvarum* UCMA 10446**			***L. mali* UCMA 16447**			***Ln. mesenteroides* CIM 3004**			***O. oeni* UCMA 19297**		
Temps (h)	**Comparaison**			**Comparaison**			**Comparaison**			**Comparaison**		
	CvsD	**CvsP**	**DvsP**	**CvsD**	**CvsP**	**DvsP**	**CvsD**	**CvsP**	**DvsP**	**CvsD**	**CvsP**	**DvsP**
24	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
48	0,41	**0,03**	0,89	>0,99	0,70	0,89	>0,99	>0,99	>0,99	0,08	0,22	>0,99
72	0,22	0,08	>0,99	>0,99	0,16	0,11	>0,99	>0,99	>0,99	**0,02**	0,54	0,54
96	0,30	0,89	>0,99	0,53	**0,02**	0,53	>0,99	>0,99	>0,99	**0,02**	0,54	0,54
168	0,89	0,70	>0,99	>0,99	0,21	0,52	>0,99	>0,99	>0,99	**0,02**	0,54	0,54

Le phage PLE001 avait été ajouté à une très faible concentration de 10^1 UFP/mL et n'avait plus été détecté après 48 h (**Figure 30**). La population du phage UCMA 21115 avait elle augmenté au fil du temps pour atteindre 10^8 UFP/mL à 96 h, avant de diminuer à une concentration de 10^5 UFP/mL à 168 h. Cette diminution entre 96 h et 168 h pourrait s'expliquer par la perte d'infectiosité du phage UCMA 21115 en raison de la composition du moût, comme la forte teneur en polyphénols ou encore l'acidité du milieu. En effet, pour des valeurs de pH inférieures à pH 4,5, l'infectiosité du phage UCMA 21115 était diminuée en milieu MRS (publication n°3, figure S2, partie 3.2 de la thèse). Dans cette expérience, cela correspond au moment où le pH passait en dessous de 4,5 (entre 96 h et 168 h). En effet, le pH des conditions D et P était d'abord passé de 5,5 à 6,0 ± 0,03 à 48 h (24 h après la perturbation), avant de descendre à des valeurs de 4,2 ± 0,07 et 4,1 ± 0,05 à 168 h pour les conditions D et P, respectivement (**Figure 30**). Le pH de la condition C avait lui diminué au cours du temps, passant de 5,5 au début de l'expérience à 4,63 ± 0,15 à 168 h (**Figure 30**).

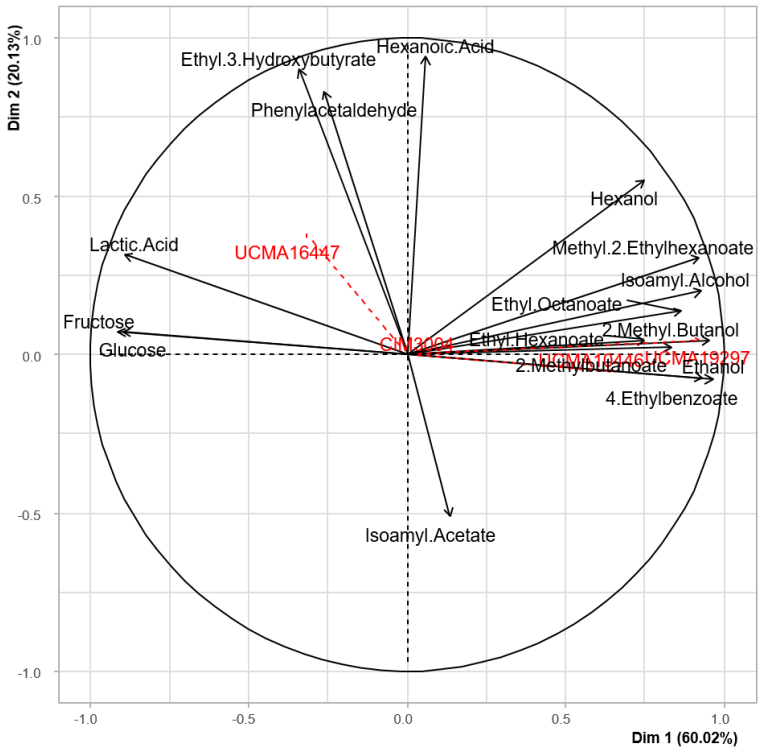
La concentration du phage UCMA 21115 retrouvée tout au long de l'expérience restait assez élevée (variant entre 10^5 et 10^8 UFP/mL) alors que la souche *L. mali* UCMA 16447 semblait peu affectée par la présence du phage, puisqu'elle était présente à des fortes concentrations (10^8 UFC/mL à 168 h). Ceci, comme pour l'expérience en milieu MRS (publication n°2, partie 2.2 de la thèse), pourrait s'expliquer par l'apparition rapide de résistance de *L. mali* UCMA 16447 à ce phage quel que soit le milieu dans lequel se trouve cette souche.

De la même façon que pour les expériences de la publication réalisées en MRS, une analyse en composantes principales a été effectuée pour le moût de pomme à 168 h (**Figure 31**). Au vu des faibles différences entre les conditions C, D et P pour les dénombrements microbiens, il a été décidé de ne faire les analyses d'HPLC et de GC-MS qu'au point final de l'expérience, c'est-à-dire à 168 h. A ce point d'analyse, les dimensions 1 et 2 représentaient 80,15% de la variance totale (60,02% et 20,13% pour les dimensions 1 et 2, respectivement) (**Figure 31**). Selon les critères utilisés (contribution ≥ 3 et $cos^2 \geq 0,5$ pour les dimensions 1 et 2), 16 variables ont été utilisées pour cette ACP.

La condition C était caractérisée par des plus fortes abondances en alcools (éthanol, hexanol, 2-methyl-butanol) et esters (4-ethyl-benzoate, ethyl-octanoate, methyl-2-ethyl-hexanoate) comparée aux conditions D et P (**Figure 31**). Les conditions D et P étaient caractérisées par des fortes concentrations en lactate, glucose et fructose, contrairement à la condition C (**Figure 31**). Ces différences s'expliquent vraisemblablement par une croissance, et donc une fermentation, plus rapide dans la condition C que dans les conditions D et P ayant subi la perturbation. Néanmoins, la condition P était elle caractérisée par des abondances plus importantes en composés comme le phenylacetaldehyde, l'acide hexanoïque ou l'ethyl-3-hydroxybutyrate pour les réplicats P168_1 et P168_2 alors que l'échantillon P168_3 plus était proche de la condition D (**Figure 31-B**).

Globalement, cette ACP a montré que la condition C se distinguait des conditions D et P, malgré le chevauchement de l'échantillon P168_3 avec les échantillons D. Elle a également permis de voir les différences entre les trois conditions, ce qui n'était pas possible avec l'analyse des dynamiques microbiennes, qui étaient globalement les mêmes entre les trois conditions (**Figure 30**).

A.



B.

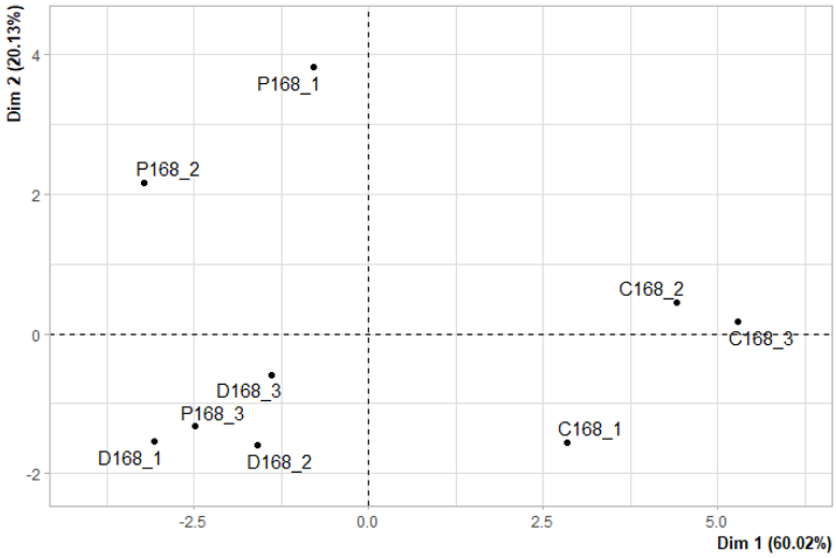


Figure 31 : (A) Analyse en Composantes Principales des composés étudiés (flèches noires) avec les variables illustratives représentant les quatre souches du modèle (flèches rouges). (B) Distribution des échantillons en condition C (contrôle), D (perturbation sans phages) et P (perturbation et phages) à 168 h pour l'expérience à 25°C en moût de pomme.

Les échantillons sont nommés comme suit : Condition (C : contrôle, D : perturbation sans phages, P : perturbation et phages). Point de temps (168h). Réplicat biologique (1, 2, 3) (par exemple, C168_1 signifie Contrôle à 168h, réplicat biologique 1).

En résumé, la transposition du modèle de communauté microbienne en moût de pomme s'est heurtée principalement à la difficulté de cultiver tous les microorganisms dans des conditions optimales, en particulier pour la souche *Ln. mesenteroides* CIM 3004 provenant de l'environnement laitier. Les dynamiques microbiennes de la communauté étaient très similaires entre les trois conditions, avec une légère domination de *L. mali* UCMA 16447 après la perturbation, et aucun effet observable des phages dans ces conditions. Quelques différences ont pu être mises en avant concernant la signature métabolique des différentes conditions testées, avec la condition témoin (C) légèrement différente des conditions sans phages (D) et avec phages (P). Afin d'avoir des réponses plus précises dans la matrice cidricole, l'utilisation de souches microbiennes ainsi que de phages exclusivement issus du cidre, ou de son environnement, permettrait d'avoir une communauté modèle plus représentative, avec cependant la difficulté de pouvoir les isoler. Au-delà de ces résultats, et d'un point de vue écologique, la question du rôle effectif des phages lytiques dans cette boisson fermentée, et dans d'autres matrices de ce type, se pose. En effet, comme décrit précédemment dans le volet 1, le cidre est un réservoir très pauvre en phages lytiques, et leur action semble limitée au sein d'une communauté microbienne modèle en moût de pomme. D'autres études de ce type devront être menées pour clarifier cette question.

2.4 Faits marquants du WP2

- A 25°C en milieu MRS, la présence de phages contribue au retour à l'équilibre de la communauté microbienne modèle après perturbation.

- A 15°C en milieu MRS, la présence de phages amplifie le phénomène de déséquilibre provoqué par la perturbation.

- L'implication des phages dans le moût de pomme reste à être mieux caractérisée, bien que leur action semble limitée.

- La présence de phages impacte le métabolisme de la communauté modèle.

- Le rôle des phages influence le déroulement des étapes de fermentation et le profil en COVs de la matrice, il nécessite donc d'être pris en compte dans les études concernant les produits fermentés.

3. Etude de la réponse transcriptomique et protéomique d'une souche bactérienne, à une infection par un phage lytique au sein d'une communauté modèle

3.1 Présentation et résumé de la publication n°3

Le dernier volet de ce travail de thèse était de s'intéresser à la réponse moléculaire d'une souche bactérienne, plus particulièrement au niveau du transcriptome et du protéome, à une infection par un phage lytique. En effet, les interactions phages-bactéries sont assez peu décrites dans la littérature au niveau moléculaire, et la majorité des études s'intéressent au comportement de bactéries pathogènes comme *Enterococcus faecalis* (Chatterjee *et al.*, 2019) ou encore *Pseudomonas aeruginosa* (Zhao *et al.*, 2016) pendant l'infection phagique. Dans les aliments fermentés, seules quelques études transcriptomiques et protéomiques sont recensées et concernent principalement le ferment d'intérêt technologique *Lactococcus lactis* (Ainsworth *et al.*, 2013; Lemay *et al.*, 2019). Ces interactions phages-bactéries méritent néanmoins d'être prises en compte pour mieux connaitre les mécanismes qui ont lieu dans les aliments et les boissons fermentés. De plus, actuellement, les approches pour étudier les interactions phages-bactéries sont essentiellement basées sur des modèles ne tenant compte que du couple phage-hôte seul, négligeant ainsi la place des communautés microbiennes constituant les écosystèmes. L'originalité de cette étude se trouvait dans le fait que cette interaction phage-bactérie se passait au contact d'une communauté bactérienne, afin de créer des conditions susceptibles de favoriser les interactions entre les souches, pour mimer ce qui peut se produire dans une boisson fermentée telle que le cidre.

Comme décrit précédemment pour le volet n°1, la première partie de cette étude, en parallèle de l'étude du phageome, a porté sur la recherche de phages dans des échantillons de cidre. Un phage lytique a été isolé d'un échantillon de cidre en cours de fermentation, le phage UCMA 21115 ciblant la souche bactérienne *Liquorilactobacillus mali* UCMA 16447, elle-même issue du cidre. Le phage UCMA 21115 a donc dans un premier temps été caractérisé puis utilisé pour l'étude transcriptomique et protéomique. Il s'agit d'un siphophage appartenant à la classe des *Caudauviricetes* avec un génome de 27915 paires de bases et qui semble très proche de phages ciblant le genre *Leuconostoc*, en particulier le phage phiLNTR3 (99.45% d'identité). L'infection de la souche hôte *L. mali* UCMA 16447 par ce phage a été caractérisée, montrant que la lyse complète de la souche cible arrivait après 240 minutes d'infection. La survie à des

pH allant de 3,0 à 5,5 a également été suivie et a montré que le phage était sensible à des pH inférieurs à 4,0 et stable au-dessus de cette valeur.

Afin de créer des conditions susceptibles de favoriser les interactions entre souches bactériennes, quatre souches retrouvées dans le cidre appartenant à la famille des *Lactobacillaceae* ont été sélectionnées pour constituer la communauté modèle. Pour étudier le couple phage UCMA 21115 - *L. mali* UCMA 16447, en contact avec la communauté modèle, le couple phage-bactérie a été placé dans un tube de dialyse permettant le passage de petites molécules, mais tout en l'isolant des autres bactéries de la communauté. Les prélèvements ont été effectués dans la phase précoce de l'infection à T0, 15 et 60 minutes pour la condition témoin et la condition infectée (P), sans tenir compte ici de la phase d'adsorption. Dans le but d'étudier l'impact moléculaire de l'infection phagique sur la souche *L. mali* UCMA 16447 au sein d'une communauté modèle, des études globales de protéomique et de transcriptomique ont été effectuées par spectrométrie de masse et par RNA-seq (séquençage du transcriptome), respectivement. Les deux conditions ont ainsi été comparées entre elles.

Après 15 minutes, 122 gènes étaient significativement différentiellement exprimés entre la condition témoin et la condition infectée (fold-change > 2 et < 0,5, en valeurs absolues ; p-value < 0,05) alors que 215 gènes l'étaient après 60 minutes. La majorité des gènes dérégulés ont été décrits comme étant impliqués dans la traduction, la motilité cellulaire, la transduction des signaux et dans le métabolisme des glucides. Globalement, les gènes codant pour les fonctions cellulaires, telles que le métabolisme des glucides, la traduction, la motilité cellulaire et la transduction des signaux, étaient réprimés tandis que les gènes impliqués dans le métabolisme des nucléotides et dans le contrôle de l'intégrité de l'ADN étaient induits en condition infectée. Une des fonctions les plus impactées par l'infection phagique était la motilité cellulaire. En effet, plus de 26 gènes impliqués dans la synthèse et l'assemblage du flagelle, comme les gènes *fliE, fliR, flgB, flgD* ou *fliS* ont été réprimés, et des gènes impliqués dans la motricié des flagelles comme les gènes *motA* ou *motB* ont également été réprimés. L'infection phagique a aussi mis en évidence la répression de certains gènes impliqués dans le métabolisme des glucides, et plus particulièrement dans la glycolyse. Des gènes codant pour des enzymes comme la phosphofructokinase (*pfk*), la glycéraldehyde 3-phosphage déshydrogénase (*gpdh*), la phosphoglycérate kinase (*pgk*), la phosphoglycérate mutase (*pgm*) et la triose phosphate isomérase (*tpi*) ont tous été réprimés pendant l'infection. A contrario, le gène codant pour la lactate deshydrogénase (*ldh*) était induit lors de la phase infectieuse.

Par ailleurs, l'analyse transcriptomique a révélé que de nombreux gènes impliqués dans la réplication et la synthèse de l'ADN, comme pour la synthèse des purines et des pyrimidines étaient induits pendant l'infection. Des gènes codant pour des enzymes nécessaires à la réplication de l'ADN, comme l'ADN polymérase (*polA*) et la gyrase (*gyrA*) étaient également induits. Enfin, des gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse à différents stress, comme les protéines chaperonnes GroES, Gros EL et DnaJ (*groES*, *grosEL*, *dnaJ*) ont également été induites pendant l'infection.

En parallèle, l'analyse protéomique a révélé une différence de production significative (fold-change > 2 et p-value < 0,05) pour 229 protéines entre les conditions à T0 et T60 en condition infectée (T60P), dont 227 d'entre elles sur-produites par rapport à la condition témoin. Après 60 minutes, 28 protéines étaient différentiellement produites entre les conditions témoins et infectées (T60 vs T60P), dont 27 plus produites et 1 seule moins abondante. La seule protéine retrouvée en plus faible abondance correspondait à la flagelline, une protéine associée au flagelle et donc, à la motilité cellulaire, confirmant ainsi les résultats de l'analyse transcriptomique. Enfin, la condition infectée a eu un impact sur des protéines retrouvées en plus forte abondance impliquées dans divers métabolismes (glucides, acides nucléiques, énergie) et dans des fonctions importantes (traduction, réplication et réparation de l'ADN). De plus, des analyses protéomiques ont également été effectuées sur les bactéries de la communauté afin d'identifier de potentiels changements au niveau du protéome de la communauté. Aucune différence entre la condition contrôle et la condition infectée n'a pu être mise en évidence avec ce type d'analyse.

Finalement, cette étude a permis de démontrer que l'infection phagique perturbait fortement la cellule bactérienne, tant au niveau du transcriptome que du protéome. Elle a également montré que l'infection phagique ne semblait pas perturber, au niveau protéique et à ces temps d'infection, les autres bactéries de la communauté. Il est également souligné que des études notamment de métatranscriptomique pourraient être réalisées afin d'observer plus précisément ce phénomène.

Les résultats de ce travail ont été valorisés par une communication orale lors du « weblactic » en avril 2021, une communication orale lors des journées de l'école doctorale normande, biologie intégrative, santé et environnements (EDnBISE), en mai 2021 et une communication orale au congrès de la Société Française de Microbiologie en septembre 2021.

Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique, publié dans le journal « *Food Microbiology* ».

3.2 Publication n°3

Molecular approaches to uncover phage-lactic acid bacteria interactions in a model community simulating fermented beverages.

Pierre Ledormand, Nathalie Desmasures, Benoit Bernay, Didier Goux, Oliver Rué, Cédric Midoux, Christophe Monnet, Marion Dalmasso

Food Microbiology **2022**, 104069

doi.org/10.1016/j.fm.2022.104069

Food Microbiology 107 (2022) 104069

Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Molecular approaches to uncover phage-lactic acid bacteria interactions in a model community simulating fermented beverages

Pierre Ledormand [a], Nathalie Desmasures [a], Benoit Bernay [b], Didier Goux [c], Oliver Rué [d,e], Cédric Midoux [d,e,f], Christophe Monnet [g], Marion Dalmasso [a,*]

[a] Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, 14000, Caen, France
[b] Normandie Univ, UNICAEN, SFR ICORE, Proteogen Platform, 14000, Caen, France
[c] Normandie Univ, UNICAEN, SF ICORE 4206, CMAbio3, F-14032 Caen, France
[d] Université Paris-Saclay, INRAE, MaIAGE, 78350, Jouy-en-Josas, France
[e] Université Paris-Saclay, INRAE, BioinfOmics, MIGALE Bioinformatics Facility, 78350 Jouy-en-Josas, France
[f] Université Paris-Saclay, INRAE, PROSE, 92761 Antony, France
[g] Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR SayFood, 91120, Palaiseau, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Phage
Fermented food
Fermented beverage
Microbial interactions
Cider

ABSTRACT

Food microbial diversity and fluxes during the fermentation processes are well studied whereas phages-bacteria interactions are still poorly described in the literature. This is especially true in fermented beverages, and especially in cider, which is an alcoholic fermented apple beverage. The transcriptomic and proteomic responses of the lactic acid bacterium (LAB) *Liquorilactobacillus mali* UCMA 16447 to a lytic infection by phage UCMA 21115, both isolated from cider, were investigated, in order to get a better understanding of phages-bacteria interactions in such fermented beverage. During phage infection, 122 and 215 genes were differentially expressed in *L. mali* UCMA 16447 strain at T_{15} and T_{60} respectively, when compared to the uninfected condition. The same trends were confirmed by the proteomic study, with a total of 28 differentially expressed proteins found at T_{60}. Overall, genes encoding cellular functions, such as carbohydrate metabolism, translation, and signal transduction, were downregulated, while genes involved in nucleotide metabolism and in the control of DNA integrity were upregulated in response to phage infection. This work also highlighted that phage infection repressed many genes involved in bacterial cell motility, and affected glycolysis.

1. Introduction

The diversity of bacteriophage (phage) communities, known as phageomes and to a larger extent as viromes, in fermented foods and beverages is poorly described, as reviewed by Ledormand et al. (2020). If the occurrence of phages in such environments has been demonstrated decades ago, the data which illustrate their impact on mixed communities and their ecological roles are scarce when compared to other microbial ecosystems (Paillet and Dugat-Bony, 2021). Phages are often studied for their negative impact on bacteria with technological interests like starter cultures, while they also play a major role as drivers of microbial communities (Mills et al., 2013). The behaviour of their bacterial hosts during phage infection has been reported in a few studies. This is especially true for a few potentially pathogenic bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* (Chevallereau et al., 2016; Lavigne et al., 2013; Zhao et al., 2016), *Yersinia enterocolitica* (Leskinen et al., 2016), and *Enterococcus faecalis* (Chatterjee et al., 2019), whose the transcriptomic response during phage infection was evaluated.

Lactic acid bacteria (LAB) are of great importance in the making and preservation of fermented foods and beverages. Knowledge about phages-LAB interactions remains to be developed. Some studies focusing on the response of the well-known dairy starter species *Lactococcus lactis* during phage infection have been carried out at the transcriptomic and the proteomic levels (Fallico et al., 2011; Ainsworth et al., 2013; Lemay et al., 2019, 2020). Apart from these data on *Lc. lactis*, little is known about the mechanisms of phages-LAB interactions in fermented foods and beverages. Cider, which is an alcoholic fermented apple beverage, is a typical example of a 'black box' ecosystem when it comes to phages-LAB interactions within the microbial communities throughout the fermentation process. Cider microbiota has the particularity to be

* Corresponding author. UR 4651 ABTE, Esplanade de la Paix, 14032, Caen cedex 05, France.
E-mail address: marion.dalmasso@unicaen.fr (M. Dalmasso).

https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104069
Received 29 September 2021; Received in revised form 12 April 2022; Accepted 6 June 2022
Available online 9 June 2022
0740-0020/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

less diverse than in other fermented foods, due to harsh physico-chemical conditions related in part to the low pH and the presence of ethanol (Misery et al., 2021). Yeasts and LAB are the two types of microorganisms that contribute to the fermentation process of cider. Yeasts include *Saccharomyces* (*S. cerevisiae, S. uvarum)* and non–*Saccharomyces* (*Hanseniaspora*, *Candida*) genera, and are responsible for the alcoholic fermentation (Misery et al., 2021). The malolactic fermentation (MLF) is performed by LAB from *Oenococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp. and other *Lactobacillaceae* genera (members of the former *Lactobacillus* genus) (Cousin et al., 2017). Among these LAB, *Liquorilactobacillus mali* is a species which is commonly isolated from apple juice and cider. *L. mali* cells are Gram positive rods (0.6 μm × 1.8–4.2 μm), catalase positive, homofermentative, potential biogenic amine productive and motile (Carr and Davies, 1970; Coton et al., 2010; Cousin et al., 2015; Neville et al., 2012). To date no phage targeting *L. mali* is known.

More generally, the diversity of phages in cider has not been described yet, and much less how phage predation could influence cider fermentation (Ledormand et al., 2020). Deciphering the role of phages in cider microbial communities would contribute to get a better understanding of the microbial dynamics involved in fermentation processes. The aim of the present study was to assess the interactions between phage UCMA 21115 and its LAB host strain, *L. mali* UCMA 16447, both originating from cider, by means of transcriptomic and proteomic methods.

2. Materials & methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Five strains, *Liquorilactobacillus mali* UCMA 16447 strain, *L. mali* UCMA 19420 strain, *Secundilactobacillus collinoides* UCMA 16566 strain, *S. collinoides* UCMA 20009 strain, and *Lactobacillaceae* sp. *nov.* UCMA 15818 strain (unpublished data), were used in this study. They were from the UCMA collection (Université de Caen Microbiologie Alimentaire, Caen, France) and all originated from cider. Strains were routinely aerobically grown in de Man Rogosa & Sharpe (MRS; Difco) broth adjusted to pH 5.5, supplemented with 5 g/L of fructose and 0.5 g/L of cysteine, and incubated at 30 °C for 24 h.

2.2. Phage isolation, propagation and titration

Phage UCMA 21115 was isolated from a traditional French cider sample collected in the Normandy region (France). Its isolation and propagation were performed against the *L. mali* UCMA 16447 strain. Phage isolation was performed with an enrichment step where 1 mL of cider was added to a 10 mL-culture of *L. mali* UCMA 16447 at the exponential growth phase, and incubated overnight at 30 °C. The phage enrichment in MRS medium was centrifuged at 4700×*g* for 20 min and filtered sterile using 0.45 μm filters, and stored at 4 °C. Phage isolation and propagation were carried out using the classical double layer plate technique using MRS agar 0.5% (w/v) supplemented with 10 mM $CaCl_2$ and 10 mM $MgSO_4$, and incubated at 30 °C for 24 h to allow the formation of plaques. Phage titration was expressed as plaque-forming units per mL (PFU/mL).

2.3. Electron microscopic analysis

Phage lysates (10^9 PFU/mL) were purified on a caesium chloride gradient by ultracentrifugation (Dalmasso et al., 2016). The phage phase was then collected and dialyzed in phage buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5; 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$) overnight at 4 °C. The phages were then observed with the transmission electron microscope JEOL 1011 (accelerating voltage of 80 kV), after a negative staining with uranyl acetate (1.5%).

2.4. Adsorption rate of phage UCMA 21115

Phage UCMA 21115 was added to *L. mali* UCMA 16447 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 and incubated at 30 °C for 30 min. Every 5 min, 2 mL were collected and filtered through a 0.45 μm filter in order to assess the phage titer in the supernatant by counting the plaques using the double layer agar method. The adsorption rate was calculated with the formula $(N_0\text{-}N_t/N_0) \times 100$ where N_0 represents the phage titer used before the co-incubation, and N_t the phage titer at time t in the supernatant after filtration (Feng et al., 2020). The amount rate of non-adsorbed phages compared to the amount of phages for the infection is represented with the standard deviations of three independent experiments.

2.5. One-step-growth experiments (OSGC)

The OSCG was performed as described by Jaomanjaka et al. (2016), in triplicate. Briefly, the *L. mali* UCMA 16447 strain was cultured until an OD_{600nm} value of 0.2, and 1 mL was centrifuged at 10,000×*g* for 2 min. The pellet was re-suspended in 1 mL of phage UCMA 21115 lysate in order to yield a MOI of 0.1, and was then incubated for 30 min at 30 °C to allow phage adsorption. The sample was centrifuged at 10, 000×*g* for 2 min to eliminate unabsorbed phages. The pellet was then diluted (10^{-3}) in MRS broth and incubated at 30 °C. Some samples were collected every 30 min, filtered sterile with 0.45 μm filters, and enumerated using the double layer plate count agar method. The burst size, the latency and rise phases of phage UCMA 21115 were estimated. The OSCG is presented with the standard deviations of three independent experiments.

2.6. DNA extraction, genome sequencing and genome analysis

Phage DNA was extracted as described by Dalmasso et al. (2012) after phage fraction recovering issued from an ultracentrifugation at 35, 000×*g* for 3 h on a caesium chloride gradient. Whole phage genome sequencing was performed on an Illumina sequencer producing paired-end reads 2 × 150 bases in length. Reads were assembled into a contig using Unicycler (Wick et al., 2017). An *in sillico* genome analysis was performed using RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) for ORFs and putative proteins prediction (Aziz et al., 2008). The genome of phage UCMA 21115 is available under the accession number: ON117153.

2.7. Constitution of a LAB model community for studying phage-bacteria interactions

The five LAB strains were grown separately overnight in MRS broth at 30 °C as precultures. One litre of fresh MRS broth was inoculated with 10 mL of each of the four strains making up the model community (i.e. UCMA 19420, UCMA 16566, UCMA 20009, and UCMA 15818 strains), and incubated at 30 °C until an OD_{600nm} value of 0.2. In the same way, 500 mL of MRS broth were inoculated with 5 mL of *L. mali* UCMA 16447 strain as preculture. Once the *L. mali* UCMA 16447 culture had reached an $OD_{600\ nm}$ value of 0.2, it was divided into two fractions: one fraction was infected by phage UCMA 21115 at a MOI of 0.1, and the other was not infected, and used as a growth control. The two fractions were immediately placed into cellulose dialysis tubes (MWCO 12000–14,000, ROTH) (Saraoui et al., 2013), and immersed into the growth medium inoculated with the synthetic bacterial community. Dialysis tubing was made to contain *L. mali* UCMA 16447 strain but allows the exchange of solutes with the synthetic bacterial community. Incubation was carried out at 30 °C. The samples from the dialysis tubes were taken at 0, 15 and 60 min after phage infection corresponding to the early infection phase (10 and 30 mL for RNA and protein extractions, respectively). The cells were harvested by centrifugation at 4700×*g* for 10 min and cell pellets were stored at −80 °C prior to RNA and protein extraction. Three

independent biological replicates per growth condition were performed, which represented a total of 15 samples (3 replicates at T0, 3 replicates at T15 with and without phages, and 3 replicates at T60 with and without phages). At T0 and T60, 30 mL of the model community were also sampled for protein extraction.

2.8. RNA extraction

The pellets were re-suspended in 500 μL of TE buffer (0.01M Tris pH 7.5; 0.01M EDTA) and the cells were lysed at 6000×*g* at 4 °C with a Precellys® (Bertin Technologie, France) using a mix of glass beads (1.5 mm, Dutsher, France) and zirconium beads (0.5 and 0.1 mm, Dutsher, France). Total RNA extraction was performed with TRIzol Reagent (Fisher Scientific, Illkirch, France) and chloroform/isoamyl alcohol (24:1) (Sigma Aldrich, USA) separation. RNA was then purified using Direct-Zol RNA Miniprep (ZymoResaerch, Irvinie, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, and RNA integrity was checked on a denaturing agarose gel as described by Aranda et al. (2012). RNA quantification and qualification was performed using a Nano TECAN spectrophotometer (Life Science, Switzerland).

2.9. cDNA synthesis, RNA-Seq, reads mapping and data analyses

rRNA depletion (Fastselect kit, Qiagen), cDNA library construction and RNA-Seq sequencing were carried out at Genewiz, Inc. facilities (South Plainfield, NJ, USA). RNA sequencing was performed on an Illumina sequencer, producing paired-end reads of 2 × 150 bases in length. In order to eliminate Illumina adaptors from sequencing, FastP processor (Chen et al., 2018) was used before checking the quality of sequencing data with FastQC v.0.11.8 (de Sena Brandine and Smith, 2019). The reads were mapped against the genome of *L. mali* UCMA 16447 (Bioproject PRJNA727965) strain using Bowtie 2 (Langmead and Salzberg, 2012) with a minimal fragment size of 50 pb and counted using HTSeq v.0.9.1 processor (Anders et al., 2015). Reads matching with coding DNA sequences (CDS) were retrieved from the raw data set for subsequent analyses. The data were filtered to eliminate the genes displaying an average of less than 10 reads per sample for all data (15 samples). The statistical analysis of RNA-Seq data was performed using SARTools DESeq2 tool v.1.7.3 (Varet et al., 2016) with default settings. Gene transcripts with an adjusted p-value ($p < 0.05$) and a fold change of ≥ 2 and ≤ 0.5 (in absolute values) were considered to be differentially expressed between different conditions. The functional annotation of the transcripts was done using the Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (KEGG).

The RNA-Seq data used in this study are available in NCBI SRA repository, under the reference number PRJNA804221.

2.10. Protein extraction

The cell pellets were re-suspended in 2 mL of wash buffer (50 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM PMSF), lysed at 6000×*g* with a Precellys® (Bertin Technologie, France) using a mix of glass beads (1.5 mm) and zirconium beads (0.5 and 0.1 mm), and centrifuged at 10,000×*g* for 10 min at 4 °C. The supernatant was recovered and the proteins were subsequently precipitated with four volumes of precipitation buffer (80% of acetone, 20% of 50 mM TrisHCl pH 8.0), and incubated for 1h at −80 °C, then overnight at −20 °C. The tubes were centrifuged at 13,000×*g* for 10 min at 4 °C. The supernatant was removed, and the pellets were dried for 30 min under a chemical hood. Finally, the proteins were re-suspended in a protein buffer (50 mM TrisHCl pH 8.0, 5% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 100 mM NaCl), and quantified using the Bradford method (Bradford, 1976). The proteins were prepared from three independent biological replicates.

2.11. Mass-spectrometry analysis

Protein preparation and nLCMS analysis were performed as previously described (Aubourg et al., 2020). Before post-process, the samples were analysed using the Preview software (ProteinMetrics) in order to estimate the quality of the tryptic digestion and predict any post-translational modifications. The result presented below, is used for the "bank research/identification" part. The fragmentation pattern was used to determine the sequence of the peptide. Database searching was performed using the Peaks X+ software. A homemade database composed of *L. mali* UCMA 16447, *L. mali* UCMA 19420, *S. collinoides* UCMA 16566, *S. collinoides* UCMA 20009 and strain UCMA 15818, was used. The variable modifications allowed were as follows: Nterm-acetylation, methionine oxidation, Deamidation (NQ). In addition, C-Propionoamide was set as fix modification. "Trypsin" was selected as Specific. Mass accuracy was set to 30 ppm and 0.05 Da for MS and MS/MS mode, respectively. The data were filtered according to a FDR of 1%.

2.12. Identification of differentially expressed proteins

To quantify the relative levels of protein abundance between the different groups, the samples were analysed using the label-free quantification feature of the PEAKS X+ software. The features of the same peptides from all replicates of each sample were aligned through the retention time alignment algorithms. The mass error tolerance was set at 30 ppm, Ion Mobility Tolerance (1/k0) at 0.05 and the retention time tolerance at 7 min. The normalization factors of the samples were obtained by the total ion current (TIC) of each sample. The quantification of the protein abundance level was calculated using the sum area of the top three unique peptides. A 1.5-fold increase in relative abundance and a Peak significance ≥15 using ANOVA as significance method were used to determine the enriched proteins.

3. Results

3.1. Characterization of phage UCMA 21115

Phage UCMA 21115 was isolated from a French cider sample, and infected *L. mali* UCMA 16447 strain. This phage has a small-isometric head and a long non-contractile tail, which indicates that it belongs to the *Siphoviridae* family of the *Caudovirales* order (Fig. 1). The head diameter was 60.18 nm ± 3 nm (n = 3) and the tail length was 223.68 nm ± 5 nm (n = 3). The lytic activity of phage UCMA 21115 was assessed in MRS broth pH 5.5 at different MOI values (1, 0.1 and 0.01) by performing OD_{600nm} measurements (Fig. S1). Phage UCMA 21115 lysed its hosts in 4 h at a MOI of 1. A lytic activity was observed up to a MOI of 0.01 (Fig. S1). As it was isolated from cider, which is an acidic

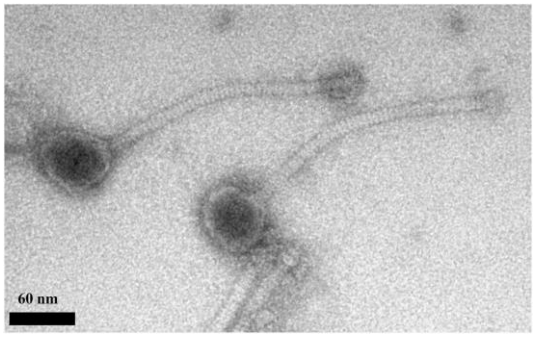


Fig. 1. Transmission electron micrographs of phage UCMA 21115.

fermented beverage, phage UCMA 21115 was also checked for its ability to resist to acidic pH values ranging from pH 3.0 to pH 5.5 (Fig. S2). Phage UCMA 21115 showed a strong resistance at pH values above 4.0 (Fig. S2). Phage UCMA 21115 targeted only *L. mali* UCMA 16447 strain among the 120 tested LAB strains (including strains of *Leuconostoc* sp., *Oenococcus* sp., *Pediococcus* sp. and *Lactobacillaceae* members of the former *Lactobacillus* genus) (data not shown).

3.2. Kinetics profile of phage UCMA 21115

To establish the binding affinity of phage UCMA 21115 to its host strain *L. mali* UCMA 16447, the phage adsorption to the bacterial cells was estimated during an incubation period of 30 min. After 5 min, nearly 80% of the phage particles adsorbed to the bacterial cells (Fig. 2A). After 20 min, more than 95% of the phage particles were attached to the host cells.

To better understand the population dynamics of phage UCMA 21115, a one-step growth curve (OSGC) experiment was performed in the presence of *L. mali* UCMA 16447 strain at a MOI of 0.1. The latent period lasted approximatively 150 min, after 30 min of adsorption (T_0 is after 30 min of adsorption), before reaching the plateau phase after 240 min (Fig. 2B). The burst size, which is the number of particles being released per cell, was of about 22 ± 2 phages produced per host cell.

3.3. Genome analysis of phage UCMA 21115

Phage UCMA 21115 has a genome of 27,915 bp with a G + C content of 36.3%. A total of 42 open reading frames (ORFs) were predicted from the genome with no tRNA found (Table S1). Among the 42 ORFs, 21 were predicted on the forward strand, 21 on the reverse orientation, and 7 out of the 42 ORFs were assigned to a predicted function by RAST. The strictly lytic activity was confirmed since no module associated with lysogeny was found inside the genome. The predicted functions found inside the genome were in relation to packaging (terminase subunit), replication (DNA polymerase subunit, DNA primase), structure protein (tail protein, phage protein) and lysis (hydrolase, lysin) (Table S1). The genome was also BLAST against the NCBI virus database to identify the most related phages. Phage UCMA 21115 was close to *Leuconostoc* phages, particularly phage P974 (accession number MN552147.1, identity = 99.65%, coverage = 99%) and phage phiLNTR3 (accession number KC013029.1, identity = 99.45%, coverage = 99%).

3.4. Global overview of the transcriptional response of L. mali UCMA 16447 when infected by phage UCMA 21115

In order to study the impact of the lytic phage UCMA 21115 on *L. mali* UCMA 16447 strain, a transcriptomic approach based on RNA-Seq was followed. As the first minutes after a stress are crucial for bacterial survival, three time points were chosen after phage infection: 0, 15 and 60 min (the adsorption time was not taken into account here). The gene levels of expression in cells subjected to phage infection were compared to uninfected cells.

About 115 millions of sequencing reads were generated for all conditions, and the number of reads per sample varied from 4.4×10^6 to 1×10^7 (Fig. S3).

Read counts were established for each CDS available on the reference genome. The threshold for a comparative classification of gene expression was set to 2-fold with $p < 0.05$ being considered as a significant differentially expressed gene. This fold-change corresponds to a change that is higher than 2 or lower than 0.5 in absolute values. Table 1 presents the number of up or down regulated genes for each comparison. When comparing the infected conditions (P) to the control experiment, a total of 122 genes were differentially expressed (DE) after 15 min (T15 vs T15P). This number almost doubled after 60 min, with 215 DE genes (T60 vs T60P). It appeared that translation, cell motility, signal transduction and carbohydrates metabolism were the most affected KEGG functional categories of genes that were repressed (Fig. 3). After 15 min of phage infection, 10, 8 and 7 genes involved in translation, cell

Table 1
Number of down- or up-regulated genes for each comparison, fold change >2 and <0.5, p-value < 0.05.

Comparison	Level	Number of genes
T0 vs T15	up	0
	down	0
T0 vs T15P	up	45
	down	67
T15 vs T15P	up	36
	down	86
T0 vs T60	up	0
	down	1
T0 vs T60P	up	103
	down	147
T60 vs T60P	up	92
	down	123
T15 vs T60	up	0
	down	0
T15 vs T60P	up	95
	down	167
T15P vs T60	up	43
	down	42

T0 correspond to samples taken just before the infection with phage UCMA 21115. T15 and T60 refers to 15 and 60 min after T0, respectively. P means that it is the infected condition.

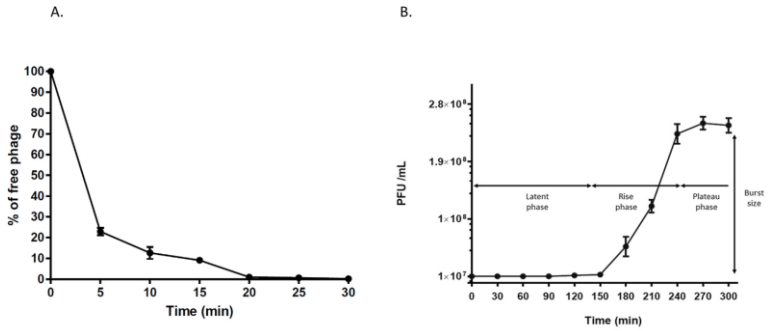


Fig. 2. Adsorption and one step growth curve of phage UCMA 21115 with *L. mali* UCMA 16447 in MRS broth at 30 °C. **A.** Adsorption of phage UCMA 21115 on *L. mali* 16,447 during 30 min. **B.** One step growth curve of phage UCMA 21115 with *L. mali* UCMA 16447 during 300 min, where T0 is after 30 min of adsorption. Three independent experiments were carried out for each experiment and error bars indicate standard deviation.

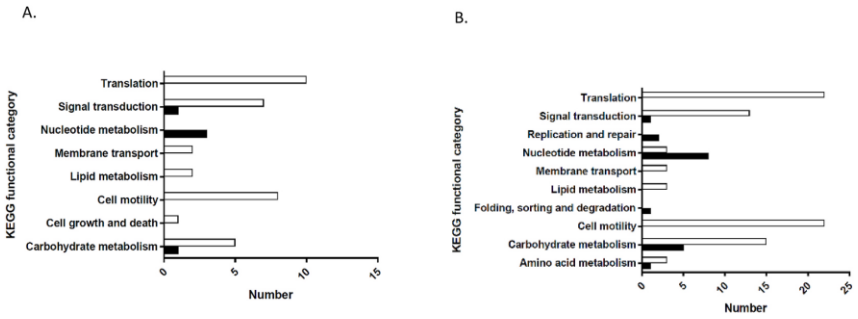


Fig. 3. Overview of the major functions of *L. mali* UCMA 16447 impacted during infection by phage UCMA 21115 at two time points by RNA-Seq analysis. Bar graph displaying differentially expressed genes of *L. mali* UCMA 16447 during the infection by the phage UCMA 21115 at 15 (**A**) and 60 (**B**) minutes, respectively. Black bars indicate genes with an induced expression and white bars genes with a repressed expression in comparison to uninfected condition at the same time.

motility and signal transduction, respectively, were repressed (Fig. 3A). After 60 min of infection, the same categories were affected, with an increase in the number of DE genes, and especially in repressed genes. For example, 22 genes involved in cell motility, 22 involved in translation, 15 involved in signal transduction and 15 involved in carbohydrates metabolism were repressed (Fig. 3B). The number of induced genes after 60 min of infection increased in the same functional categories than after 15 min, with 10 and 5 genes induced in the nucleotide metabolism and in the carbohydrates metabolism, respectively (Fig. 3B). Three genes involved in amino acid metabolism, replication and repair or folding, and sorting and degradation were also induced (Fig. 3B).

3.5. Identification of the induced and repressed genes of L. mali UCMA 16447 during phage infection

All the functions impacted by phage infection are depicted on Fig. 4.

3.5.1. Drastic modifications of cell motility and chemotaxis during phage infection

Cellular motility was one of the main repressed function during phage infection. After 60 min, 26 genes were repressed encoding proteins for flagellar assembly such as basal body components (*fliE*; fold change of 0.46; *fliR;* fold change of 0.41), hook (*flgB;* fold change of 0.29; *flgD;* fold change of 0.31), and filament (*fliS;* fold change of 0.13) (Table S2). In addition to cell motility, 11 genes involved in chemotaxis belonging to the signal transduction category were repressed. Among these genes involved in chemotaxis for the regulation of the flagellar system, a methyl-accepting chemotaxis protein (MCP) (fold change of 0.15) and genes encoding for two-component systems like *cheA*, *cheB* and *cheW* (fold change of 0.27; 0.17 and 0.18, respectively) were repressed (Table S2). Genes encoding in the stator of the system (*MotA;* fold change of 0.13, and *MotB;* fold change of 0.18) were also repressed (Table S2).

3.5.2. Modification of the expression of translation-coding genes during phage infection

The cellular translation was also repressed as evidenced by the downregulation of many of the genes coding for ribosomal subunits. More than 20 of these genes were repressed after 60 min of infection (fold change between 0.23 and 0.49) (Table S2). On the opposite, the genes involved in the synthesis of amino acids like glycine, serine and threonine (homoserine deshydrogenase; fold change of 2.11) (Table S2) were overexpressed during the infection.

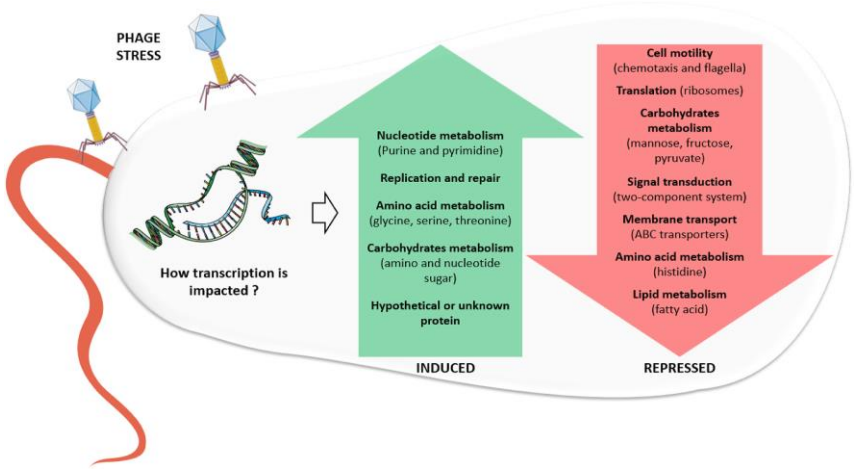


Fig. 4. Simplified summary of principal functions with a level of expression induced (green) or repressed (red) in the transcriptomic study. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

3.5.3. Large induction of functions for DNA replication during infection

The machinery necessary for the replication and the synthesis of the phage genome was induced. Genes encoding the biosynthesis of purines and pyrimidines were more expressed in the infected condition than in the uninfected condition. For example, the ribonucleoside-diphosphate reductase (*rNDP*; fold change of 3.82) and the orotidine-5′-phosphate decarboxylase (*pyrF*; fold change of 2.07) genes were induced (Table S2). Genes coding for enzymes essential to DNA replication, like DNA polymerase (*DNApol* subunit gamma; fold change of 5.86) and DNA gyrase subunit A (*gyrA*; fold change 2.18) (Table S2), were overexpressed. Another gene coding for an enzyme which is probably involved in the recombination of DNA was also overexpressed (*RecR*; fold change of 3.12) (Table S2).

3.5.4. Inhibition of the glycolysis pathway during phage infection

Another gene functional class affected by phage infection was the metabolism of carbohydrates. The phosphotransferase system (PTS) involved in the mannose uptake was repressed during the infection (fold change of 0.40) (Fig. 5 & Table S2). Several genes coding for enzymes involved in the Embden-Meyerhof pathway (glycolysis) were repressed (Table S2). It was the case for the phosphofructokinase gene (*pfk;* fold change of 0.42), the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene

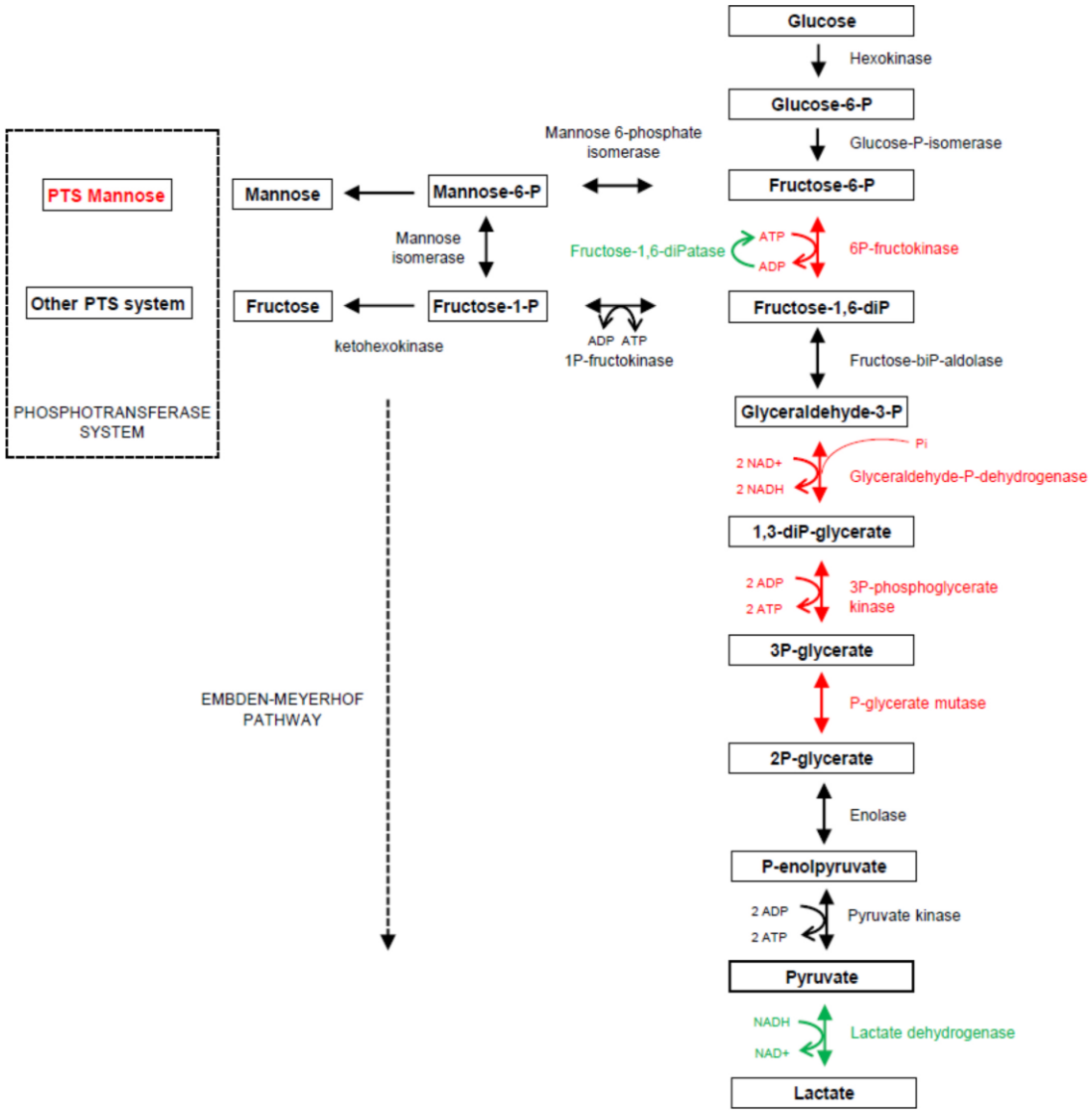


Fig. 5. Embden-Meyerhof pathway of *L. mali* UCMA 16447 strain during infection by phage UCMA 21115, adapted from Muller et al. (2015). Genes impacted during the infection by phage UCMA 21115: repressed genes are mentioned in red and induced genes in green. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

(*gpdh;* fold change of 0.43), the phosphoglycerate kinase gene (*pgk;* fold change of 0.38), the phosphoglycerate mutase gene (*pgm;* fold change of 0.49) and the triose phosphate isomerase gene (*tpi;* fold change of 0.42) (Fig. 5). Conversely, the D-lactate dehydrogenase coding gene (*ldh;* fold change of 2.52) was highly induced during phage infection (Fig. 5), suggesting an impact on the lactate metabolism. The overexpression of the fructose 1,6 biphosphatase coding gene (*fbp*; fold change of 3.99) (Fig. 5), which has an antagonistic activity to PFK, comes to reinforce the idea of an inhibition of the glycolysis pathway. Other genes encoding enzymes involved in carbohydrate metabolism were differentially expressed like the malate dehydrogenase gene (*mdh*; 2.80 fold) and the acetate kinase gene (*ack*; fold change of 0.47).

3.5.5. Other functions affected by phage infection

The genes involved in lipid metabolism, and more specifically in fatty acid biosynthesis, like the acetyl-CoA biotin carboxylase gene (*accC*; fold change of 0.32), the oxoacyl reductase gene (*fabG*; fold change of 0.35) and the hydroxyacyl dehydratase gene (*hcd*; fold change of 0.40) (Table S2) were repressed during phage infection.

Genes coding for membrane transporters like the ATP-binding cassette (ABC), the phosphate transport system ATP-binding protein (fold change of 0.46) and the energy transport system ATP-binding protein (fold change of 0.46) were downregulated, hence demonstrating a decline in nutrient uptakes from the cell environment (Table S2).

Genes encoding stress response proteins like chaperones GroES, GroEL (*groES*; *groEL;* fold change of 2.34 and 2.69, respectively) and DnaJ (*dnaJ*; fold change of 2.10) were induced during phage infection (Table S2). The largest group of induced genes encoded hypothetical proteins and proteins of unknown function.

As *L. mali* UCMA 16447 strain was part of a four-strain model community closely related at the genus level, the existence of possible signal exchanges during phage infection were also sought at the transcriptomic level in *L. mali* UCMA 16447 strain. No evidence of this phenomenon were found.

3.6. Changes in the proteome of L. mali UCMA 16447 strain during phage infection

In addition to the RNA-Seq analysis, a proteomic approach to identify the major proteins impacted by phage infection was carried out. Comparisons were made for *L. mali* UCMA 16447 strain between T0 and after 60 min with phage (T60P) and without phage (T60), and between T60 and T60P. It appeared that 229 proteins were differentially expressed between T0 and T60P (Fig. S4), and 227 of them were over-expressed at T60P. When comparing the proteomes at T60 and T60P (Fig. 6), 28 proteins were differentially expressed, and only one was under-expressed. The energy production and conversion category counted 5 DE proteins, followed by carbohydrate transport and metabolism, nucleotide transport and metabolism, and replication, recombination and repair, and translation (3 DE proteins for each category).

3.6.1. Confirmation of motility repression at the proteome level

The only protein that was less abundant during phage infection was the flagellin protein (fold change of −1.17) (Table S3). This observation followed the same pattern as RNA-Seq data analysis, indicating the repression of cell motility during phage infection.

3.6.2. Overproduction of DNA replication associated proteins during phage infection

An increase in purine biosynthesis-related proteins during phage infection was observed. For example, the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (fold change of 1.48), an enzyme involved in this function was more present in the infected condition (Table S3). Proteins involved in nucleotide metabolism (D-amino acyl-tRNA deacylase, cytidylate kinase, and deoxyguanosine kinase; fold change of 1.69, 1.68 and 1.87, respectively) (Table S3) and in the replication and repair of DNA (DNA polymerase III, Sak2, and ribonucleoside diphosphate reductase; fold change of 1.65, 5.96 and 3.20, respectively) (Table S3) were more abundant in the infected condition than without phages, thus confirming the transcriptomic results.

3.6.3. Other proteins

Other DE proteins, especially the proteins involved in amino-acid transport and metabolism, were also identified. The tRNA adenine-methyltransferase, involved in amino acid biosynthesis, and a proline iminopeptidase, involved in the release of amino acids (fold change of 2.53 and 1.34, respectively) (Table S3), were more abundant in the phage infection condition than in the control condition. A universal stress protein not clearly identified was more abundant during phage infection than in the control condition (fold change of 1.77) (Table S3).

Overall, all these proteomic results followed similar patterns as the results obtained with the transcriptomic approach, with the exception of the L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase, that has a catalytic activity close to the phosphofructokinase and the triose phosphate isomerase (fold change of 1.71 and 1.18, respectively) (Table S3). Indeed, these

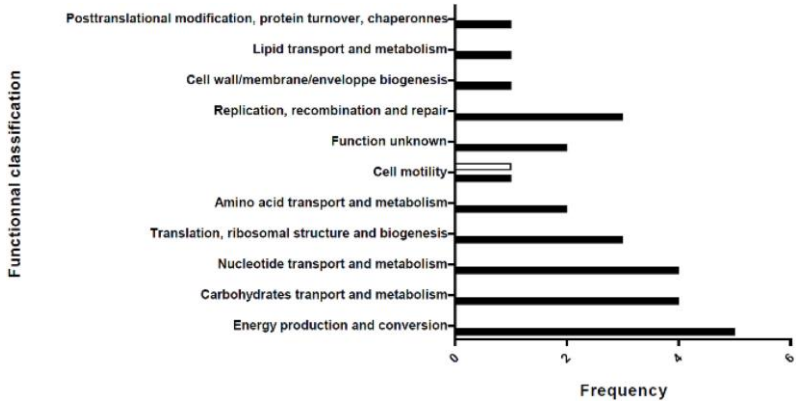


Fig. 6. Number of differentially expressed proteins according to their functional classification during phage infection after 60 min of infection. Comparison between T60 (60 min without phage) and T60P (60 min after phage infection). Black bars indicate proteins overexpressed and white bars proteins under expressed compared to uninfected condition.

proteins were more abundant with the proteomic approach whereas their encoding genes were repressed with the transcriptomic method.

In parallel with these comparisons, a proteomic study was performed on the proteome of the synthetic bacterial community, *i.e.* on *L. mali* UCMA 19420, *S. collinoides* UCMA 16566, *S. collinoides* UCMA 20009 and *L.* sp. nov UCMA 15818. No differences were found between the conditions with and without phages (data not shown).

4. Discussion

Exploring the response of a food bacterium to phage infection is essential to understand what happens at the population level, and more generally at the community level during fermentation processes. Phage-LAB interactions in fermented foods are poorly described using omics methods compared to phage-pathogenic bacteria interactions. In this context, phage UCMA 21115, the first lytic phage isolated from cider, was isolated and characterized. It targeted *L. mali* UCMA 16447 strain, also originating from cider. Phage UCMA 21115 belongs to the *Siphoviridae* family like other phages isolated from fermented foods and beverages. For example, phage Vinitor targeting *O. oeni* (Philippe et al., 2021), phage Φ1-A4 targeting *Ln.* mesenteroides (Lu et al., 2010), phage TP901-1 targeting *Lactococcus lactis* (Mahony et al., 2016) and phage ATCCB targeting *Levilactobacillus brevis* (Feyereisen et al., 2019) all belong to the *Siphoviridae* family. Phage UCMA 21115 has a genome of 27,915 bp, which is smaller than other *Lactobacillus Siphoviridae* like, for example, *L. plantarum* phage ATCC8014 displaying a 38,002 bp genome (Briggiler Marcó et al., 2019) and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phage PMBT4 displaying a 31,399 bp genome (Sprotte et al., 2022). Phage UCMA 21115 was closer to *Leuconostoc* phages like phiLNTR3 (99.45% of identity) isolated from dairy products, than to other *Lactobacillus* phages (Kot et al., 2014). The lytic potential of phage UCMA 21115 was characterized. The replication rate of a phage is proportional to the growth rate of the bacterial strain. Thus, cell lysis appears more or less quickly depending on the bacterial species and strain, and depending on the phage and its MOI. For example, it appeared after 24 h for *O. oeni* IOEB S 277 strain during infection by phage Φ OE33PA (Jaomanjaka et al., 2016), and after 120 min for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 strain during infection by phage BPSELC-1 (Li et al., 2020). In the current study, the complete lysis *of L. mali* UCMA 16447 strain by phage UCMA 21115 occurred after 240 min.

Phage UCMA 21115 was then used in a model of infection of *L. mali* UCMA 16447 strain in order to comprehensively investigate the transcriptional and proteomic response of the host strain to phage infection, when placed within a bacterial community. To date, the classical approaches to investigate phage-host interactions, particularly using transcriptomic and proteomic methods, are based on single phage-strain couple models, as it was the case, for example, in the transcriptomic study of *Lc. lactis* UC509.9 strain and phages Tuc2009 and c2 (Ainsworth et al., 2013). In the current study, placing *L. mali* UCMA 16447 strain in dialysis tubing (Saraoui et al., 2013) immersed into a model community of four strains belonging to the *Lactobacillaceae* family was intended to create conditions that possibly favour interactions between strains. In artificial co-cultures, many positive interactions may occur, as reviewed by Canon et al. (2020). For example, co-cultivation promotes interactions like commensalism, cooperation, mutualism or syntrophy to enhance bacterial fitness or substrate utilization. In co-cultivation, a wide variety of molecules can be exchanged, like extracellular enzyme sharing, cross-feeding or quorum sensing signalling molecules. No differentially expressed proteins were found in the model community whether *L. mali* UCMA 16447 strain was infected or not. This may be the result of proteins being the last level of cell expression. Furthermore, the 60 min of the experiment may not be extended enough to observe significant differences in protein expression at the community level, if any. Studying the metatranscriptomic response of the community could be more informative in future works (Monnet et al., 2016).

The transcriptomic and proteomic results of *L. mali* UCMA 16447 response to phage infection tended to follow the same patterns with a few discrepancies that can be explained by the time span for protein expression regulation being longer than for transcription regulation. For example, more than 20 genes were downregulated in the cell motility functional category with RNA-Seq study whereas only two proteins were retrieved and differentially expressed for this functional category with the proteomic approach. Such differences between transcriptomic and proteomic results are often observed (Dalmasso et al., 2012).

As in other phage-bacteria transcriptomic studies, the current work showed that the genes involved in DNA replication, transcription, nucleotide metabolism and amino acid biogenesis were overexpressed to allow phage replication and virion synthesis (Ainsworth et al., 2013; Danis-Wlodarczyk et al., 2018; Lavysh et al., 2017; Leskinen et al., 2016; Zhao et al., 2016). Translation was another repressed function during phage infection, suggesting that phage infection led to a decline in the translation of bacterial proteins. On the opposite, genes and proteins involved in the metabolism of amino acids like glycine, serine and threonine were overexpressed during the infection, presumably useful for the assembly of phage elements or as an additional energy source. All these main metabolic functions are usually affected by stress conditions as reported in other works, and especially for the members of the former *Lactobacillus* genus (actual members of the *Lactobacillaceae* family) (Angelis et al., 2016). The major overexpressed proteins during a phage infection globally belonged to categories associated to DNA replication, nucleotide metabolism and the production of energy as has been shown for *Salmonella* (Weintraub et al., 2019). In the present work, other DE proteins involved in signal transduction and cell envelope were also found differentially expressed in a study of *Lc. lactis* (Lemay et al., 2019). Namely, the proteins involved in the multiplication of phage particles were retrieved as the most abundant ones.

The expression level of the genes involved in the carbohydrate metabolism was also modified during the infection. The *pfk*, *gpdh*, *pgk* and *pgm* genes were repressed during infection, thus suggesting an inhibition of the Embden-Meyerhof pathway (glycolysis) while the *ldh* gene was overexpressed. The overexpression of the *ldh* gene was also observed during the phage infection of a *Lc. lactis* strain, and the authors speculated that the NAD^+ formed during the transformation of pyruvate to lactate served to the glycolysis pathway (Ainsworth et al., 2013). Yet, in our study we showed that the glycolysis enzymes were repressed, and thus that glycolysis is likely to be severely impacted, and most probably slowed down. A previous work on a *Vibrio* phage showed that NAD^+ was necessary to phage DNA replication and that the phage had a pathway of NAD^+ salvage (Lee et al., 2017a). In the current work, it might put forward the hypothesis that a mechanism of inhibition of glycolysis combined with a high activity of the lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase (during the conversion of oxaloacetate into malate) is triggered by phage UCMA 21115 in order to spare NAD^+, as has been described in another study conducted in *Vibrio* phages (Lee et al., 2017b).

Cell motility was another major function affected by phage infection in *L. mali* UCMA 16447 strain. Some genera and species belonging to the former *Lactobacillus* genus are motile, and *L. mali* is one of them (Cousin et al., 2015; Neville et al., 2012). The flagellar system of *L. mali* UCMA 16447 strain was repressed during the infection. Several assumptions can be made to explain this phenomenon, but remain speculative at this stage of the study. Some phage receptors are located on bacterial flagella, as has been shown in previous works on *Campylobacter jejuni* (Baldvinsson et al., 2014), *Salmonella* (Baldvinsson et al., 2014; Choi et al., 2013), and *Erwinia* phages (Evans et al., 2010). Some mechanisms may be triggered in *L. mali* UCMA 16447 strain to reduce flagella production to thwart the infection, if phage infection is related to the flagellum receptor in the current study. In the same way, it has been shown for *Agrobacterium* sp. (Gonzalez et al., 2018) that phage transfer to a receptor on the cell membrane requires motility. The repression of the motility system in *L. mali* UCMA 16447 strain could perhaps contribute to a defence-like mechanism to prevent or, at least, to slow down the

infection, and thus to resist to phage attack. If the mechanisms that led to the down-regulation of the genes encoding motility are still unknown, it is also possible to assume that this phage-driven phenomenon helps the phage in save energy for its replication within its host. The flagellar system is energy-consuming and its down-regulation would consequently be of benefit to the phage as suggested by a previous work where a similar regulation of the flagellar system was observed in *Bacillus thuringiensis* during phage infection (Wu et al., 2014).

5. Conclusion

In conclusion, this study made it possible to describe for the first time the transcriptomic and proteomic response of a LAB isolated from a fermented beverage (cider) to phage infection within a bacterial community model. This study has revealed a fairly large disturbance in the cell metabolism at the transcriptomic and proteomic levels, with specific responses to phage infection. Some impacts on the host response were observed in different functional categories like in cell motility and in the carbohydrate, amino acid and nucleotide metabolisms. Gaining knowledge of host response to phage infection is crucial to better understand and even control microbial equilibria throughout fermentation processes. A better understanding of phage-bacteria interactions in fermented foods is crucial in order to continue to providing consumers with sustainable products.

Declaration of competing interest

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Acknowledgements

This work was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation under a PhD Grant MENRT. The authors would like to thank all the lab members for helpful discussions, and particularly Prof Jean-Marie Laplace and Dr Marina Cretenet for the selection of the bacterial strains used in this study. We are grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAE, 2020. Migale bioinformatics Facility, https://doi.org/10.15454/1.5572390655343293E12) for providing computing and storage resources.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104069.

References

Ainsworth, S., Zomer, A., Mahony, J., Sinderen, D. van, 2013. Lytic infection of *Lactococcus lactis* by bacteriophages Tuc2009 and c2 triggers alternative transcriptional host responses. Appl. Environ. Microbiol. 79, 4786–4798. https://doi.org/10.1128/AEM.01197-13.

Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W., 2015. HTSeq–a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinforma. Oxf. Engl. 31, 166–169. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638.

Angelis, M.D., Calasso, M., Cavallo, N., Cagno, R.D., Gobbetti, M., 2016. Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*. Proteomics 16, 946–962. https://doi.org/10.1002/pmic.201500117.

Aranda, P.S., LaJoie, D.M., Jorcyk, C.L., 2012. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. Electrophoresis 33, 366–369. https://doi.org/10.1002/elps.201100335.

Aubourg, M., Dhalluin, A., Gravey, F., Pottier, M., Thomy, N., Bernay, B., Goux, D., Martineau, M., Giard, J.-C., 2020. Phenotypic and proteomic approaches of the response to iron-limited condition in *Staphylococcus lugdunensis*. BMC Microbiol. 20, 328. https://doi.org/10.1186/s12866-020-02016-x.

Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O., 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genom. 9, 75. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75.

Baldvinsson, S.B., Sørensen, M.C.H., Vegge, C.S., Clokie, M.R.J., Brøndsted, L., 2014. *Campylobacter jejuni* motility is required for infection of the flagellotropic bacteriophage F341. Appl. Environ. Microbiol. 80, 7096–7106. https://doi.org/10.1128/AEM.02057-14.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Briggiler Marcó, M.B., Quiberoni, A., Suárez, V., 2019. Virulence of *Leuconostoc* phages: influence of stress conditions associated to dairy processes on their host-phage interactions. Int. J. Food Microbiol. 303, 26–31. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.008.

Canon, F., Nidelet, T., Guédon, E., Thierry, A., Gagnaire, V., 2020. Understanding the mechanisms of positive microbial interactions that benefit lactic acid bacteria Co-cultures. Front. Microbiol. 11, 2088. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02088.

Carr, J.G., Davies, P.A., 1970. Homofermentative *Lactobacilli* of Ciders including *Lactobacillus mali* nov. spec. J. Appl. Bacteriol. 33, 768–774. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1970.tb02261.x.

Chatterjee, A., Willett, J., Nguyen, U.T., Monogue, B., Palmer, K.L., Dunny, G.M., Duerkop, B.A., 2019. Parallel genomics uncover novel enterococcal-bacteriophage interactions. bioRxiv, 858506. https://doi.org/10.1128/mBio.03120-19.

Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., Gu, J., 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinforma. Oxf. Engl. 34, i884–i890. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560.

Chevallereau, A., Blasdel, B.G., Smet, J.D., Monot, M., Zimmermann, M., Kogadeeva, M., Sauer, U., Jorth, P., Whiteley, M., Debarbieux, L., Lavigne, R., 2016. Next-generation "-omics" approaches reveal a massive alteration of host RNA metabolism during bacteriophage infection of *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Genet. 12, e1006134 https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006134.

Choi, Y., Shin, H., Lee, J.-H., Ryu, S., 2013. Identification and characterization of a novel flagellum-dependent *Salmonella*-infecting bacteriophage, iEPS5. Appl. Environ. Microbiol. 79, 4829–4837. https://doi.org/10.1128/AEM.00706-13.

Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Coton, E., 2010. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. Food Microbiol. 27, 1078–1085. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.012.

Cousin, F.J., Le Guellec, R., Schlusselhuber, M., Dalmasso, M., Laplace, J.-M., Cretenet, M., 2017. Microorganisms in fermented apple beverages: current knowledge and future directions. Microorganisms 5, 39. https://doi.org/10.3390/microorganisms5030039.

Cousin, F.J., Lynch, S.M., Harris, H.M.B., McCann, A., Lynch, D.B., Neville, B.A., Irisawa, T., Okada, S., Endo, A., O'Toole, P.W., 2015. Detection and genomic characterization of motility in *Lactobacillus curvatus* : confirmation of motility in a species outside the *Lactobacillus salivarius* clade. Appl. Environ. Microbiol. 81, 1297–1308. https://doi.org/10.1128/AEM.03594-14.

Dalmasso, M., Aubert, J., Briard-Bion, V., Chuat, V., Deutsch, S.-M., Even, S., Falentin, H., Jan, G., Jardin, J., Maillard, M.-B., Parayre, S., Piot, M., Tanskanen, J., Thierry, A., 2012. A temporal -omic study of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1T adaptation strategies in conditions mimicking cheese ripening in the cold. PLoS One 7, e29083. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029083.

Dalmasso, M., Strain, R., Neve, H., Franz, C.M.A.P., Cousin, F.J., Ross, R.P., Hill, C., 2016. Three new *Escherichia coli* phages from the human gut show promising potential for phage therapy. PLoS One 11, e0156773. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156773.

Danis-Wlodarczyk, K., Blasdel, B.G., Jang, H.B., Vandenheuvel, D., Noben, J.-P., Drulis-Kawa, Z., Lavigne, R., 2018. Genomic, transcriptomic, and structural analysis of pseudomonas virus PA5oct highlights the molecular complexity among jumbo phages. bioRxiv, 406421. https://doi.org/10.1101/406421.

de Sena Brandine, G., Smith, A.D., 2019. Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. F1000Research 8, 1874. https://doi.org/10.12688/f1000research.21142.2.

Evans, T.J., Trauner, A., Komitopoulou, E., Salmond, G.P.C., 2010. Exploitation of a new flagellatropic phage of *Erwinia* for positive selection of bacterial mutants attenuated in plant virulence: towards phage therapy. J. Appl. Microbiol. 108, 676–685. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04462.x.

Fallico, V., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., McAuliffe, O., 2011. Genetic response to bacteriophage infection in *Lactococcus lactis* reveals a four-strand approach involving induction of membrane stress proteins, d-alanylation of the cell wall, maintenance of proton motive force, and energy conservation. J. Virol. 85, 12032–12042. https://doi.org/10.1128/JVI.00275-11.

Feng, T., Leptihn, S., Dong, K., Loh, B., Zhang, Y., Li, M., Guo, X., Cui, Z., 2020. Characterisation of bacteriophage JD419, a staphylococcal phage with an unusual morphology and broad host range. bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2020.11.09.370866, 11.09.3708662020.

Feyereisen, M., Mahony, J., Lugli, G.A., Ventura, M., Neve, H., Franz, C.M., Noben, J.-P., O'Sullivan, T., Sinderen, D. van, 2019. Isolation and characterization of *Lactobacillus brevis* phages. Viruses 11, 393. https://doi.org/10.3390/v11050393.

Gonzalez, F., Helm, R.F., Broadway, K.M., Scharf, B.E., 2018. More than rotating flagella: lipopolysaccharide as a secondary receptor for flagellotropic phage 7-7-1. J. Bacteriol. 200. https://doi.org/10.1128/JB.00363-18.

Jaomanjaka, F., Claisse, O., Blanche-Barbat, M., Petrel, M., Ballestra, P., Le Marrec, C., 2016. Characterization of a new virulent phage infecting the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. Food Microbiol. 54, 167–177. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.016.

Kot, W., Neve, H., Heller, K.J., Vogensen, F.K., 2014. Bacteriophages of *Leuconostoc, Oenococcus*, and *weissella*. Front. Microbiol. 5 https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00186.

Langmead, B, Salzberg, SL, 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods 9 (4), 357–359. https://doi.org/10.1038/nmeth.1923. PMID: 22388286; PMCID: PMC3322381.

Lavigne, R., Lecoutere, E., Wagemans, J., Cenens, W., Aertsen, A., Schoofs, L., Landuyt, B., Paeshuyse, J., Scheer, M., Schobert, M., Ceyssens, P.-J., 2013. A multifaceted study of *Pseudomonas aeruginosa* shutdown by virulent podovirus LUZ19. mBio 4. https://doi.org/10.1128/mBio.00061-13.

Lavysh, D., Sokolova, M., Slashcheva, M., Förstner, K.U., Severinov, K., 2017. Transcription profiling of *Bacillus subtilis* cells infected with AR9, a giant phage encoding two multisubunit RNA polymerases. mBio 8. https://doi.org/10.1128/mBio.02041-16.

Ledormand, P., Desmasures, N., Dalmasso, M., 2020. Phage community involvement in fermented beverages: an open door to technological advances? Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1–10. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1790497.

Lee, J.Y., Li, Z., Miller, E.S., 2017a. Vibrio phage KVP40 encodes a functional NAD+ salvage pathway. J. Bacteriol. 199 https://doi.org/10.1128/JB.00855-16.

Lee, J.Y., Li, Z., Miller, E.S., 2017b. Vibrio phage KVP40 encodes a functional NAD+ salvage pathway. J. Bacteriol. 199 https://doi.org/10.1128/JB.00855-16.

Lemay, M.-L., Maaß, S., Otto, A., Hamel, J., Plante, P.-L., Rousseau, G.M., Tremblay, D. M., Shi, R., Corbeil, J., Gagné, S.M., Becher, D., Moineau, S., 2020. A lactococcal phage protein promotes viral propagation and alters the host proteomic response during infection. Viruses 12, 797. https://doi.org/10.3390/v12080797.

Lemay, M.-L., Otto, A., Maaß, S., Plate, K., Becher, D., Moineau, S., 2019. Investigating *Lactococcus lactis* MG1363 response to phage p2 infection at the proteome level*[S]. Mol. Cell. Proteomics 18, 704–714. https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001135.

Leskinen, K., Blasdel, B., Lavigne, R., Skurnik, M., 2016. RNA-sequencing reveals the progression of phage-host interactions between φR1-37 and *Yersinia enterocolitica*. Viruses 8, 111. https://doi.org/10.3390/v8040111.

Li, P., Xianjun, X., Zhang, Xiuzhong, Tu, Z., Gu, J., Zhang, A., 2020. Characterization and whole-genome sequencing of broad-host-range *Salmonella*-specific bacteriophages for bio-control. Microb. Pathog. 104119. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104119.

Lu, Z., Altermann, E., Breidt, F., Kozyavkin, S., 2010. Sequence analysis of *Leuconostoc mesenteroides* bacteriophage Φ1-A4 isolated from an industrial vegetable fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1955–1966. https://doi.org/10.1128/AEM.02126-09.

Mahony, J., Stockdale, S.R., Collins, B., Spinelli, S., Douillard, F.P., Cambillau, C., Sinderen, D. van, 2016. *Lactococcus lactis* phage TP901–1 as a model for *Siphoviridae* virion assembly. Bacteriophage 6, e1123795. https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1123795.

Mills, S., Shanahan, F., Stanton, C., Hill, C., Coffey, A., Ross, R.P., 2013. Movers and shakers: influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota. Gut Microb. 4, 4–16. https://doi.org/10.4161/gmic.22371.

Misery, B., Legendre, P., Rue, O., Bouchart, V., Guichard, H., Laplace, J.M., Cretenet, M., 2021. Diversity and dynamics of bacterial and fungal communities in cider for distillation. Int. J. Food Microbiol. 339, 108987 https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108987.

Monnet, C., Dugat-Bony, E., Swennen, D., Beckerich, J.-M., Irlinger, F., Fraud, S., Bonnarme, P., 2016. Investigation of the activity of the microorganisms in a reblochon-style cheese by metatranscriptomic analysis. Front. Microbiol. 7 https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00536.

Muller, C., Cacaci, M., Sauvageot, N., Sanguinetti, M., Rattei, T., Eder, T., Giard, J.-C., Kalinowski, J., Hain, T., Hartke, A., 2015. The intraperitoneal transcriptome of the opportunistic pathogen *Enterococcus faecalis* in mice. PLoS One 10, e0126143. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126143.

Neville, B.A., Forde, B.M., Claesson, M.J., Darby, T., Coghlan, A., Nally, K., Ross, R.P., O'Toole, P.W., 2012. Characterization of pro-inflammatory flagellin proteins produced by *Lactobacillus ruminis* and related motile *lactobacilli*. PLoS One 7, e40592. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040592.

Paillet, T., Dugat-Bony, E., 2021. Bacteriophage ecology of fermented foods: anything new under the sun? Curr. Opin. Food Sci. 40, 102–111. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.03.007.

Philippe, C., Chaïb, A., Jaomanjaka, F., Claisse, O., Lucas, P.M., Samot, J., Cambillau, C., Le Marrec, C., 2021. Characterization of the first virulent phage infecting *Oenococcus oeni*, the queen of the cellars. Front. Microbiol. 11 https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.596541.

Saraoui, T., Parayre, S., Guernec, G., Loux, V., Montfort, J., Cam, A., Boudry, G., Jan, G., Falentin, H., 2013. A unique in vivo experimental approach reveals metabolic adaptation of the probiotic *Propionibacterium freudenreichii* to the colon environment. BMC Genom. 14, 911. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-911.

Sprotte, S., Fagbemigun, O., Brinks, E., Cho, G.-S., Casey, E., Oguntoyinbo, F.A., Neve, H., Mahony, J., van Sinderen, D., Franz, C.M.A.P., 2022. Novel *Siphoviridae* phage PMBT4 belonging to the group b *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages. Virus Res. 308, 198635. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198635.

Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.-Y., Dillies, M.-A., 2016. SARTools: a DESeq2- and EdgeR-based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq data. PLoS One 11, e0157022. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157022.

Weintraub, S.T., Redzuan, N.H.M., Barton, M.K., Amin, N.A., Desmond, M.I., Adams, L. E., Ali, B., Pardo, S., Molleur, D., Wu, W., Newcomb, W.W., Osier, M.V., Black, L.W., Steven, A.C., Thomas, J.A., 2019. Global proteomic profiling of *Salmonella* infection by a giant phage. J. Virol. 93, 17. https://doi.org/10.1128/JVI.01833-18.

Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., Holt, K.E., 2017. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput. Biol. 13, e1005595 https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595.

Wu, D., Yuan, Y., Liu, P., Wu, Y., Gao, M., 2014. Cellular responses in *Bacillus thuringiensis* CS33 during bacteriophage BtCS33 infection. J. Proteonomics 101, 192–204. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.016.

Zhao, X., Chen, C., Shen, W., Huang, G., Le, S., Lu, S., Li, M., Zhao, Y., Wang, J., Rao, X., 2016. Global transcriptomic analysis of interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and bacteriophage PaP3. Sci. Rep. 6, 19237 https://doi.org/10.1038/srep19237.

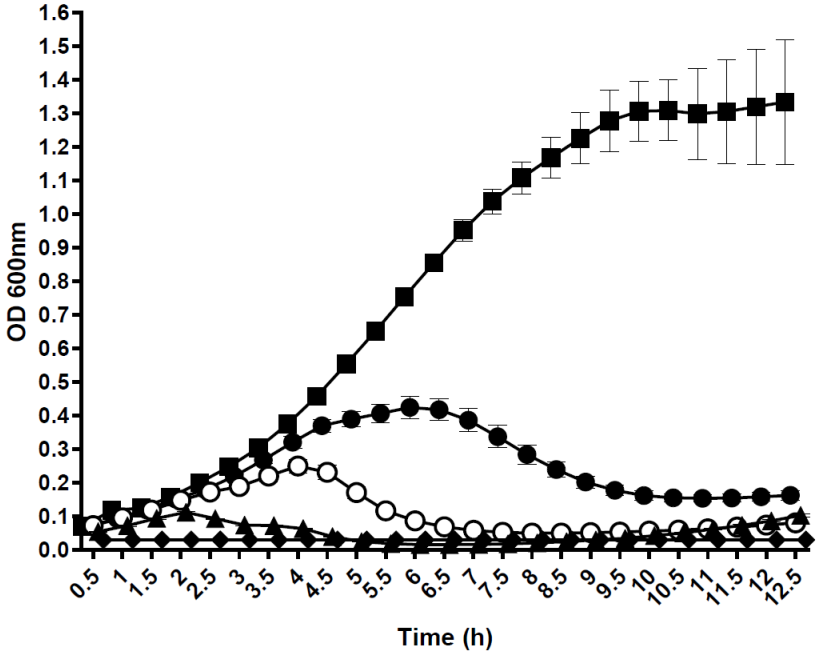


Figure S1: **Lysis curves of phage UCMA 21115 on *L. mali* UCMA 16447 strain in MRS broth at 30°C.** Growth tests were performed in 96-well microplates using *L. mali* UCMA 16447 culture with an OD600nm value of 0.2 at different MOI of phage UCMA 21115: 1 (closed triangle), 0.1 (open circle) and 0.01 (closed circle). OD was measured with a Nano TECAN spectrophotometer (Life Science, Switzerland). The non-infected culture (positive growth control) is represented in closed square and the MRS broth in closed lozenge. Three independent experiments were carried out and error bars indicate standard deviation.

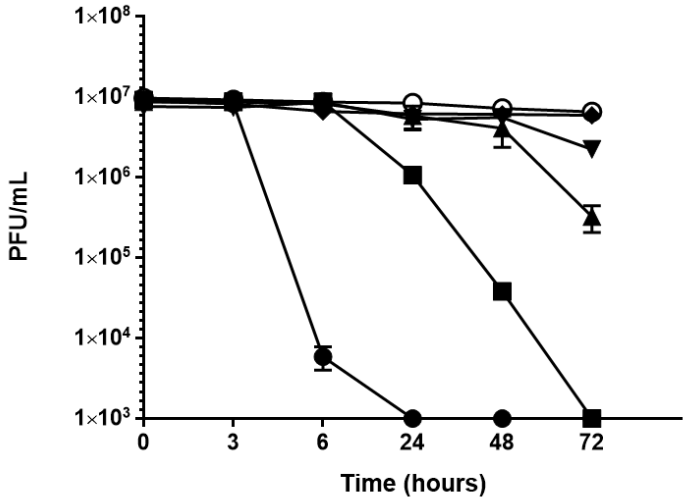


Figure S2: Survival of phage UCMA 21115 in MRS broth at acidic pH values during 72 h at 20°C (room temperature). Phage UCMA 21115 was tested for its susceptibility to acid range pH in MRS broth. Curves represent the level of surviving phage populations at pH 3.0 (closed circles), pH 3.5 (closed square), pH 4.0 (closed triangle), pH 4.5 (closed inverse triangle), pH 5.0 (closed lozenge) and pH 5.5 (open circle). Three independent experiments were carried out and error bars indicate standard deviation.

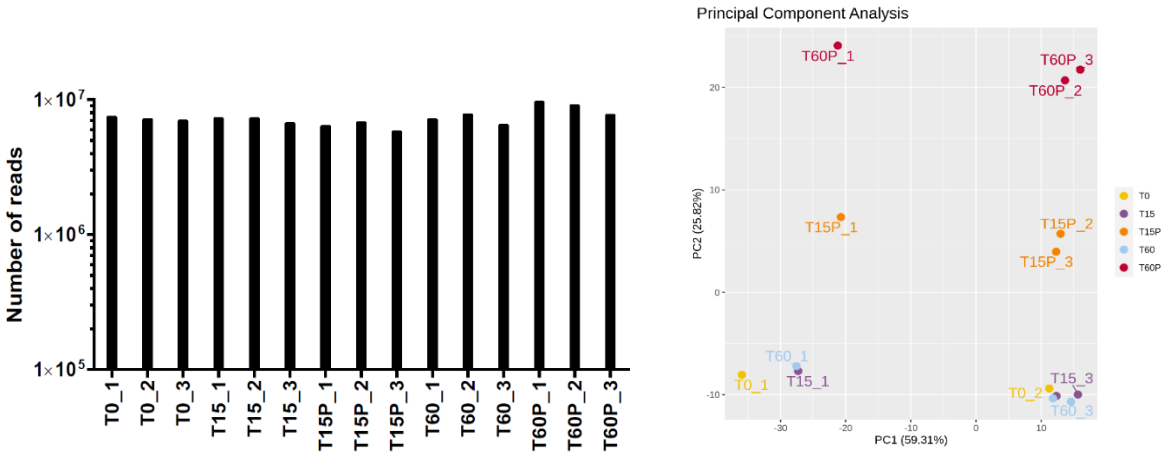


Figure S3: Global analysis of the RNA-Seq data from *L. mali* UCMA 16447 strain with and without phage UCMA 21115 at T0, T15 and T60 min. A. Total number of RNA-Seq reads per sample. **B.** Principal Component Analysis (PCA) of the different conditions used in this study. Three independent biological experiments were carried out per sample. T0 correspond to samples taken just before the infection with phage UCMA 21115. T15 and T15P samples correspond to 15 minutes after T0 (control and infected conditions, respectively). T60 and T60P samples correspond to 60 minutes after T0 (control and infected conditions, respectively).

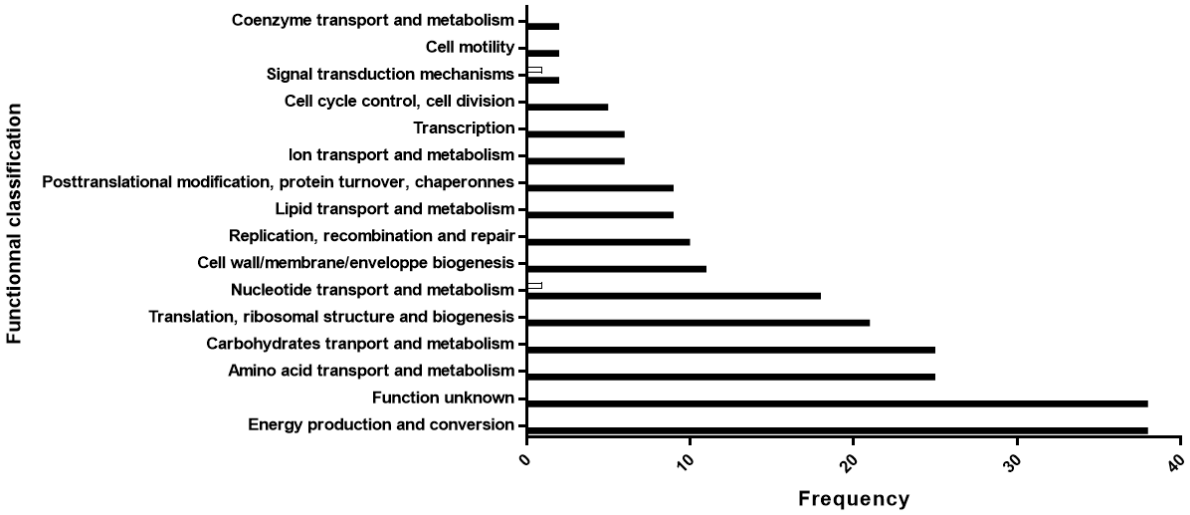


Figure S4: Number of differentially expressed proteins according to their functional classification during phage infection after 60 minutes of infection. Comparison between T0 (control) and T60P (60 min after phage infection). Black bars indicate proteins overexpressed and white bars proteins under expressed compare to uninfected condition.

3.3 Faits marquants du WP3

- Le phage isolé du cidre est un siphophage de la classe des *Caudauviricetes*, avec un génome proche de celui de certains phages ciblant l'espèce *Leuconostoc*, et cible la souche *L. mali* UCMA 16447.

- L'infection phagique provoque une importante perturbation de la bactérie infectée par le phage, tant au niveau du transcriptome que du protéome.

- Les fonctions les plus touchées pendant l'infection phagique sont le métabolisme des glucides, la motilité cellulaire, la traduction, la transduction des signaux, le métabolisme des nucléotides et le contrôle de l'intégrité de l'ADN.

- L'infection phagique ne provoque pas de changement au niveau du protéome des autres bactéries de la communauté modèle.

DISCUSSION GÉNÉRALE

1. Etude de la diversité en phages et prophages du cidre

La diversité microbienne, et plus particulièrement bactérienne et fongique, associée aux aliments fermentés est très étudiée depuis des années. En revanche, la diversité virale et plus spécifiquement phagique l'est beaucoup moins. En effet, très peu d'études relatent l'implication des phages dans les aliments fermentés, et encore moins dans les boissons fermentées, bien qu'ils soient connus pour jouer un rôle important dans les fluctuations et l'établissement des microbiotes d'autres environnements (Mills *et al*., 2013). Ainsi, le projet de cette thèse, articulé autour de trois grands axes, visait à apporter de nouvelles connaissances sur la diversité, la place et l'implication des phages dans les boissons fermentées, en prenant comme modèle d'étude une boisson fermentée à fort intérêt économique en Normandie : le cidre.

Dans le but d'étudier la diversité des communautés de phages par une approche métagénomique, différents échantillons de cidre ont été prélevés. Une cuve provenant d'un producteur industriel et une cuve provenant d'un producteur artisanal de la région ont été échantillonnées pendant le premier mois de fermentation. Les résultats ont montré que l'extraction de l'ADN des particules phagique était particulièrement délicate en utilisant des méthodes déjà décrites pour d'autres matrices, comme pour les fèces (Shkoporov *et al*., 2018) ou le fromage (Dugat-Bony *et al*., 2020). Ces méthodes ont aussi été adaptées pour tenir compte des contraintes de la matrice cidricole, comme avec l'utilisation de différents tampons pour l'extraction des acides nucléiques, ou avec l'utilisation méthodes de concentration des particules phagiques (filtration tangentielle, flocculation), sans grande amélioration. Avec ces méthodes, il a ainsi été déterminé qu'en dessous de concentrations en phages de 10^7 UFP/mL, il était difficile d'obtenir des quantités d'ADN suffisantes pour des études de type métagénomique. Ces résultats ont donc montré une très faible occurrence en phages lytiques dans les échantillons de cidre.

La matrice cidricole apparaît comme une matrice assez hostile, par ses fortes concentrations en polyphénols, pouvant même provoquer l'apparition de troubles lorsqu'ils sont oxydés (Millet *et al*., 2019), par son acidité importante ou encore la présence d'éthanol. Ainsi, compte-tenu des conditions rencontrées dans le cidre, l'extraction des acides nucléiques viraux a été rendue encore plus compliquée. En effet, le cidre s'est avéré être une matrice délicate à filtrer, quelles que soient les conditions de filtration testées, avec un colmatage important des différents types de filtres utilisés. L'utilisation de modèles de filtration couplés à des pompes plus puissantes et efficaces comme celles utilisées dans le domaine industriel pour

la filtration des moûts de pomme ou de raisin, pourrait être une solution pour concentrer de plus gros volumes de cidre et espérer augmenter la quantité de particules virales récupérées.

Il est également important de noter qu'au cours de cette thèse, les techniques utilisées pour extraire les particules phagiques mettaient de côté les phages à ARN, cette piste reste donc à être explorée dans de futurs projets, même si a priori la proportion de phages à ARN semble assez faible et qu'ils semblent plus délicats à étudier comparés aux phages à ADN dans l'ensemble des écosystèmes (Callanan *et al.*, 2018*;* Zeigler Allen *et al*., 2017). Ainsi, au regard de ces résultats, il est donc apparu que le cidre, et probablement d'autres boissons fermentées de ce type, n'étaient pas des réservoirs abondants en phages lytiques bien que ces derniers soient présents en assez grande quantité dans d'autres écosystèmes alimentaires comme, par exemple, dans le fromage (Dugat-Bony *et al*., 2020) ou dans le kimchi, le chou et les crevettes fermentées (Park *et al*., 2011 ; Jung *et al*., 2018). Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'un seul bactériophage lytique ait été isolé du cidre pendant ces travaux de thèse. En effet, au cours de ce projet, plus de 120 échantillons d'origine cidricole (cidres, moûts ou pommes fraîchement broyées) provenant de plusieurs producteurs normands ont été utilisés pour la recherche de phages. Un seul phage lytique a été isolé de ces échantillons en ciblant plus de 160 souches bactériennes appartenant aux genres *Lactobacillus sensu lato*, *Oenococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Zymomonas* sp., *Acetobacter* sp., et *Gluconobacter* sp., toutes d'origine cidricole. Ainsi, la présence de phages lytiques dans le cidre semble très limitée et la question de leur rôle écologique dans la matrice cidricole reste en suspens. Une observation sur des temps de fermentation plus longs, comme pour les cidres de distillation qui peuvent aller jusqu'à 20 semaines de fermentation, pourrait permettre d'avoir une image plus complète de l'impact écologique des phages sur la matrice cidricole. De plus, dans les cidres de distillation, la présence de bactéries lactiques est plus importante que dans les cidres de consommation en fin de fermentation (Misery *et al*., 2021), et l'impact des phages sur les LAB pourrait être mieux évalué. Cet impact des phages dans des cidres destinés à la distillation reste donc à être exploré. En effet, la destruction de certaines LAB par des phages pourrait favoriser l'émergence de bactéries d'altération entrainant des défauts comme *S. collinoides*, néfastes pour la production de spiritueux comme le Calvados, ou comme *Z. mobilis*, par sa forte production d'éthanol. Ainsi, étudier le lien entre des cidres ayant des défauts de production et la potentielle présence de phages sont des pistes qui demandent à être creusées.

Au cours de ces recherches, et face au constat d'une faible occurrence des phages lytiques dans le cidre, l'hypothèse de la prédominance du mode tempéré s'est avérée plus que probable. Ainsi, en parallèle de l'étude du phageome lytique, les prophages ont été recherchés et suivis dans les deux cuves en cours de fermentation, toujours par une approche de métagénomique. Il s'est avéré que les prophages étaient plus présents dans les données issues de la cuve du producteur industriel que dans celles de la cuve du producteur artisanal, malgré une faible proportion de prophages complets identifiés dans les deux jeux de données. En effet, 1174 prophages putatifs ont été identifiés et seulement deux prophages complets ont été retrouvés. Ce résultat peut vraisemblablement s'expliquer par le fait que seulement des traces ou vestiges de prophages soient présents dans les génomes bactériens, pour des raisons encore inconnues. Ces résultats semblent indiquer que le mode de vie tempéré des bactériophages est plus important dans le cidre que le mode de vie lytique, bien qu'il reste aussi en assez faible proportion. Cette observation a également été faite dans des cuves destinées à la production de vin, où des prophages ont largement été retrouvés au sein de génomes de souche d'*O. oeni* (Chaïb *et al*., 2022). L'induction des prophages les UV ou la mitomycine C pourrait être réalisée afin d'augmenter la quantité de phages libres dans le cidre, comme ce qui a déjà été réalisé pour des souches bactériennes comme des espèces *B. subtilis* (Abraha *et al*., 2022), *Lc. lactis* (Oliveira *et al*., 2017) ou encore du genre *Bifidobacterium* sp. (Mavrich *et al*., 2018) dans d'autres études portant sur les prophages. Cette induction des prophages pourrait également permettre de vérifier l'occurrence des prophages complets inductibles dans le cidre, mais nécessiterait un isolement préalable des souches porteuses des prophages complets au sein de leur génome. De plus, un autre obstacle pourrait être rencontré, à savoir l'absence de lyse de la bactérie cible du fait de la ré-intégration du génome phagique dans le chromosome bactérien. Un grand nombre de bactéries hébergent des prophages ou des portions de prophages au sein de leur génome, comme cela a été identifié chez *O. oeni* par exemple. Ainsi, une des perspectives à donner à ce travail pourrait être d'isoler et de caractériser la présence de prophages au sein de génomes de souches d'intérêt cidricole, pour ensuite étudier leur impact sur le métabolisme ou la fitness des souches bactériennes qui les hébergent, comme ce qui a commencé à être effectué pour *O. oeni* dans le vin (poster Amel Chaïb, « impact de la lysogénie sur la physiologie de levains malolactiques », 23ème Colloque du Club des Bactéries Lactiques, 2022, Rennes, France). Bien qu'il n'existe pas un levain d'intérêt pour la fillière cidricole, comme c'est le cas d'*O. oeni* dans le vin, l'impact de la présence de prophages sur des souches bactériennes d'intérêt cidricole, permettrait de clarifier la place et l'implication des prophages,

à la fois sur le métabolisme des souches d'intérêt mais aussi sur la signature métabolique du cidre et des produits dérivés qui en découlent.

Même si la présence de phages lytiques apparaît limitée dans le cidre, un phage (UCMA 21115) a tout de même été isolé. Afin d'explorer la place et l'implication des phages au sein des communautés microbiennes, ce phage a été utilisé dans un modèle de communauté inspirée du cidre.

2. Implication des phages dans un modèle de communauté microbienne

Le cidre et probablement d'autres produits fermentés de ce type, ne semblent pas être des réservoirs abondants en phages lytiques libres, mais la présence et l'influence de ces derniers ne peut être négligée, car bien qu'ils soient probablement rares, l'impact sur le produit pourrait être important. Un modèle de communauté microbienne inspirée du cidre a été construit pour étudier l'impact des phages sur les équilibres microbiens dans un système alimentaire.

Il a été démontré dans quelques écosystèmes que les bactériophages peuvent jouer un rôle essentiel sur la dynamique des populations bactériennes et sur le métabolisme qui en découle. Ce travail a été construit en s'inspirant majoritairement des conclusions de deux études. La première étude a montré que l'administration du virome autochtone permettait un ré-équilibrage des populations microbiennes après un traitement antibiotique ayant entrainé une dysbiose du microbiote intestinal de souris (Draper *et al*., 2019). La deuxième étude montrait que les phages avaient à la fois un impact sur les dynamiques des populations microbiennes mais aussi sur le métabolisme qui en résultait, chez des souris gnotobiotiques colonisées par des bactéries du microbiote intestinal humain (Hsu *et al*., 2019). Ainsi, l'objectif de cette partie de mes travaux de thèse était d'observer le rôle et l'implication des phages sur la dynamique et le métabolisme d'une communauté microbienne inspirée du cidre. Il a été choisi de le faire suite à une perturbation de la communauté microbienne afin de voir l'effet des phages sur les dynamiques microbiennes en découlant. Le modèle de communauté a été construit avec quatre souches microbiennes (*L. mali* UCMA 16447, *Ln. mesenteroides* CIM 3004, *O. oeni* UCMA 19297 et *S. uvarum* UCMA 10446) appartenant aux genres et espèces microbiens fréquemment retrouvés dans la matrice cidricole ainsi qu'avec deux phages ciblant deux bactéries du modèle. Le phage UCMA 21115 ciblant *L. mali* UCMA 16447 a logiquement été utilisé pour cette étude car il s'agissait du seul bactériophage lytique isolé du cidre lors de cette thèse. Cependant, afin

d'étudier l'impact des phages sur un modèle de communauté, il a été décidé d'utiliser un autre couple phage-bactérie pour compléter le modèle. Ainsi, compte tenu de la très faible disponibilité en phages lytiques provenant de l'environnement cidricole, un phage lytique ciblant une espèce retrouvée dans le cidre, *Ln. mesenteroides*, a été commandé auprès de la collection CIMIL du CNIEL avec sa souche hôte, tous deux issus d'un environnement laitier. Un phage ciblant l'espèce *O. oeni* devait également faire partie du modèle, mais ce dernier n'a jamais pu être obtenu auprès de la collection Félix d'Hérelle (Université Laval, Canada).

Une partie importante de cette étude a été de sélectionner le moyen de perturbation de la communauté microbienne et ses conditions d'application. L'objectif premier était de perturber les équilibres microbiens sans éradiquer totalement une population microbienne, pour ensuite observer l'effet des bactériophages sur la dynamique des populations microbiennes et sur la signature métabolique de la communauté. La première intention de ce travail était de sélectionner une perturbation ou un stress qui puisse être rencontré dans les aliments fermentés, comme le sulfite de sodium, qui est très souvent utilisé dans le domaine agroalimentaire comme conservateur (D'Amore *et al*., 2020; Taylor *et al*., 1986). Ce type de stress n'a pas révélé l'effet escompté puisqu'il n'y avait pas d'impact à des concentrations inférieures à 200 mg/L alors qu'au-delà de cette valeur, un effet microbistatique était observé, démontrant bien que cette substance tend à maintenir des niveaux de populations stables, ce qui est effectivement recherché pour un conservateur alimentaire afin de prolonger la durée de vie des aliments. Dans les boissons fermentées alcoolisées, la production d'éthanol est majoritairement issue de la transformation des sucres en alcool par les levures (Vamvakas and Kapolos, 2020). En fonction de la concentration en éthanol, l'effet sur les microorganismes peut être plus ou moins marqué. En effet, au vu de la faible teneur en éthanol dans les différents cidres de consommation, il a été décidé de tester différentes concentrations afin de voir si ces dernières pouvaient perturber les équilibres microbiens du modèle. En dessous de 8% d'éthanol, aucun effet n'a été observé, tandis qu'au-delà, cette teneur était néfaste, particulièrement pour la souche levurienne utilisée dans le modèle. Ceci peut en partie s'expliquer par le fait que la levure est elle-même issue du cidre, dont la teneur en éthanol dépasse rarement 5%, tandis qu'une souche levurienne de l'environnement vinicole pourra être adaptée à des concentrations plus importantes en éthanol. Des effets cocktails combinant le sulfite de sodium et l'éthanol ont également été testés, ne révélant pas l'effet escompté. Notre choix s'est donc porté vers un stress abiotique, par traitement thermique à 50°C pendant 10 minutes, qui a permis de perturber les différentes

populations microbiennes sans pour autant éradiquer totalement une population. La nature de ce stress n'est bien évidemment pas représentative de ce qui peut se dérouler lors de l'élaboration du cidre par les différents producteurs. En effet, les cuves utilisées pour la fermentation du cidre se trouvent généralement à température ambiante sur une période allant d'octobre à mars (Cousin *et al*., 2017). Cependant, contrairement au vin, la température de ces cuves n'est pas régulée et est sujette aux variations de température de l'environnement extérieur. Ainsi, en se basant sur le fait qu'il s'agissait de la première étude de ce type et qu'il s'agissait d'un modèle ne cherchant pas à mimer les conditions réelles mais à permettre l'observation de changements au sein de la communauté microbienne et de l'influence des phages, il a été décidé de retenir ce type de stress provoquant la perturbation recherchée. D'autres types de perturbations abiotiques pourraient éventuellement être envisagés et testés dans de futures expérimentations, comme l'ajout de polyphénols ou d'antibiotiques, mais également une perturbation d'origine biotique par l'introduction d'une souche bactérienne d'un genre bactérien indésirable pour la production cidricole, comme *Zymomonas* sp. produisant de fortes quantités d'éthanol ou encore *Acetobacter* sp., produisant de l'acide acétique (Coton *et al*., 2006; Trček *et al*., 2016). Ces dernières options pourraient permettre de se rapprocher de ce qui se passe dans certaines cuves de cidre impropres à la consommation, et les phages pourraient avoir un rôle important à jouer dans cette situation.

Durant cette étude, le traitement thermique a entrainé la domination de la souche *L. mali* UCMA 16447 et de la souche *Ln. mesenteroides* CIM 3004, peut importe la température étudiée pour les communautés sans phages (D). La présence de phages, elle, a eu des effets différents en fonction de la température d'incubation appliquée au modèle, en milieu MRS. En effet, à 25°C, les communautés témoin (C) et avec phages (P) montraient des tendances similaires, d'une part au niveau de leurs dynamiques de populations microbiennes, et d'autre part au niveau de leurs signatures métaboliques. Les phages, en réduisant le niveau des populations majoritaires comme la souche *Ln. mesenteroides* CIM 3004 par exemple, restaurent l'équilibre de la communauté. À une température de 15°C, l'effet était différent puisque la souche de *Ln. mesenteroides* CIM 3004 était indétectable après l'ajout des phages. Ainsi, la communauté et la signature métabolique de la communauté P étaient impactés, avec une perturbation amplifiée par la présence de phages. Des essais ont également été effectués dans du moût de pomme microfiltré, utilisé dans les mêmes conditions que le milieu MRS afin d'observer le comportement de cette communauté microbienne modèle ayant subi une perturbation et en présence de phages. Rapidement, ce milieu est apparu plus difficile à exploiter que le milieu

MRS, en raison de la difficulté à faire pousser certaines souches bactériennes, en particulier la souche de *Ln. mesenteroides* CIM 3004 provenant de l'environnement laitier. En effet, même avec un ensemencement assez fort au début de l'expérimentation, cette dernière ne parvenait pas à s'implanter au sein de la communauté, entrainant par conséquent un biais dans l'analyse par comparaison aux expériences en milieu MRS. Ceci a abouti à un comportement similaire des différentes conditions C, D et P au niveau des dynamiques microbiennes. Quelques différences ont pu être observées au niveau de la signature métabolique, montrant que les conditions sans phages (D) et avec phages (P) étaient relativement proches entre elles par comparaison à la condition témoin (C). Ces quelques différences étaient plutôt dues à l'effet de la perturbation et à un retard de croissance des microorganismes. En effet, les fortes teneurs en glucose et en fructose de ces deux conditions (D et P) participaient fortement à la formation de l'ACP, par rapport aux autres composés. Il est tout de même intéressant de noter que ces deux conditions présentaient de plus fortes concentrations en lactate que la condition témoin (C). Dans de futurs projets, il pourrait être intéressant de construire un milieu synthétique s'inspirant de la composition du cidre, ou un milieu intermédiaire en utilisant du moût de pomme couplé à du milieu MRS, afin de faciliter la croissance des microorganismes non issus de l'environnement cidricole. L'utilisation de microorganismes exclusivement issus de l'environnement cidricole serait également intéressant à mettre en œuvre.

Le suivi des populations microbiennes dans les différents modèles s'est fait par méthode cultivable, une alternative à ce travail aurait pû être d'utiliser une méthode de PCR quantitative spécifique de chaque souche microbienne, comme cela a déjà été fait pour des co-cultures d'*E. coli* (Liu *et al*., 2017). L'inconvénient de cette méthode réside dans le fait qu'elle ne différencie pas les populations vivantes des populations mortes. Une solution pourrait être d'utiliser des techniques permettant de détecter des microorganismes vivants avec par exemple des molécules comme l'éthidium monazide ou le propidium monoazide, en parallèle des techniques culturales (Reyneke *et al*., 2017; Wang and Mustapha, 2010; Waso *et al*., 2019). Ces méthodes permettraient également de détecter les populations viables non-cultivable (VBNC), même si ces dernières semblent avoir une activité métabolique limitée lorsqu'elles sont dans cet état physiologique (Yoon and Lee, 2020). L'activité métabolique du modèle mis en œuvre dans cette thèse a été suivie par HPLC et par GC-MS afin d'identifier les principaux composés. Cette analyse a permis de mettre en évidence que la présence de phages impacte la signature métabolique de la communauté microbienne, avec un effet température-dépendant comme ce qui avait observé au niveau de la dynamique des populations microbiennes. Afin

d'avoir un aperçu plus précis de tous les métabolites impliqués et impactés par la présence de phages, des analyses de métabolomique semblent être intéressantes pour de futurs projets. En effet, ce genre d'étude a déjà été entrepris sur du lait ou même sur du thé afin de caractériser précisément les métabolites présents dans ces produits alimentaires (Li *et al*., 2021; Zhang *et al*., 2019). Ces approches de métabolomique pourraient être couplées à des études de métatranscriptomique afin de déterminer quel microorganisme est impliqué dans la production d'un ou plusieurs métabolites. Ce type d'étude a déjà été mené dans le fromage (Duru *et al*., 2018; Lessard *et al*., 2014; Monnet *et al*., 2016), ou encore dans le kimchi (Jung *et al*., 2013), permettant de mettre en évidence l'implication de microorganismes dans différentes voies métaboliques. Par exemple, dans le kimchi, il a été montré que *Ln. mesenteroides* était l'espèce bactérienne la plus active durant les premiers jours de fermentation, et que des gènes impliqués dans le métabolisme des sucres étaient sur-exprimés. Ce type d'étude renseigne sur la globalité des gènes induits ou réprimés dans les conditions d'analyses testées, cependant, afin de cibler plus précisément des voies métaboliques d'intérêt, un suivi par RT-qPCR pourrait être envisagé sur les différents transcrits d'intérêt de chaque souche. En effet, par exemple, le suivi de la FML était compliqué à étudier au cours de ces travaux de thèse à travers l'analyse HPLC puisque les temps de rétention de l'acide malique et du fructose étaient confondus, l'acide malique étant largement masqué par la forte teneur en fructose des échantillons testés, rendant ainsi difficile l'interprétation de la FML. Ainsi, s'intéresser à l'activité des gènes responsables de la FML, comme le gène codant pour l'enzyme malolactique chez *O. oeni* par exemple, pourrait permettre d'avoir une idée de l'activité de la FML au sein des différents échantillons ainsi que des souches impliquées. Des dosages enzymatiques pourraient également être envisagés pour quantifier l'acide malique au cours de l'expérimentation, mais cela ne renseignerait pas sur le microorganisme impliqué dans cette FML. Ce type d'expérimentation menée en présence et en absence de phages permettrait d'avoir des informations sur l'implication directe ou indirecte des phages sur certaines fonctions d'intérêt.

Au cours de ces travaux, bien que le phage UCMA 21115 ait été caractérisé comme lytique, dans toutes les conditions testées, il est apparu que la souche bactérienne ciblée, *L. mali* UCMA 16447, était très peu impactée par la présence de ce phage, malgré les fortes concentrations en phages retrouvées (généralement supérieures à 10^8 UFP/mL). Ce phénomène a déjà été observé pour des phages ciblant *Streptococcus* sp., dans des cultures destinées à la fabrication d'un fromage Suisse à pâte dure (Somerville *et al*., 2021). Dans cette étude, les bactéries cibles et les phages persistaient à des concentrations élevées, ceci malgré la présence

de nombreuses séquences CRISPR au sein des génomes bactériens correspondant au génome du phage, montrant donc que ces phages pouvaient échapper à ce système de défense bactérien. Dans cette étude, la persistance des phages ainsi que les fortes concentrations de la bactérie cible *L. mali* UCMA 16447 ne peuvent s'expliquer par ce phénomène puisqu'aucune séquence codant pour des protéines associées à un système CRISPR n'a été identifiée dans son génome. Bien que le phage ait été caractérisé comme lytique, cette observation peut être corrélée avec le fait qu'une reprise de croissance de *L. mali* UCMA 16447 était rapidement observée après la lyse de la bactérie durant les suivis de croissance, probablement dûe à l'apparition rapide d'une résistance de la bactérie au phage. Ceci suggère donc qu'un autre mécanisme, non identifié au cours de cette thèse, est impliqué dans la persistance de *L. mali* UCMA 16447, malgré les fortes concentrations de phage en fin de suivi de la communauté. Par exemple, chez une souche de *Lactobacillus helveticus* résistante au phage ΦLh56, il a été démontré que des modifications des protéines de paroi ainsi qu'une surexpression importante des gènes des systèmes de R-M étaient à l'origine de la résistance à l'infection phagique (Zago *et al*., 2017). Ce type d'observation reste à être étudiée plus en détail dans d'éventuels futurs projets.

Les alternatives et les perspectives à ce travail sont donc multiples, et transposables à d'autres matrices alimentaires. En effet, il pourrait être possible de construire un modèle plus complexe représentant plus spécifiquement les conditions cidricoles, avec un nombre plus important de souches provenant du cidre, ce qui permettrait de limiter la difficulté de croissance de certaines d'entre elles dans le moût de pomme. L'utilisation d'un nombre plus important de souches pourrait également permettre de visualiser des dynamiques microbiennes différentes, en particulier après le stress provoqué. En effet, dans le modèle développé, la perturbation a engendré de manière involontaire, la dominance des deux souches bactériennes cibles des phages. Ainsi, voir l'effet des phages sur des populations sous-dominantes permettrait d'avoir des informations supplémentaires sur leur rôle écologique, puisqu'il semble également y avoir un impact sur les autres microorganismes non ciblés par les phages. En revanche, comme identifié dans la première partie de ce travail, au vu de la faible occurrence en phages lytiques au sein de la matrice cidricole, il semblerait que ce ne soit pas la matrice la plus appropriée pour ce genre d'étude. L'utilisation de modèles alimentaires plus complexes et plus riches en phages lytiques comme le fromage, semblerait être une alternative intéressante à étudier, afin de voir l'impact des phages sur un écosystème alimentaire et sur le produit fini. Cependant, cette boisson, avec son environnement qui semble défavorable aux phages, soulève des questions d'ordre écologique sur les relations phages-bactéries qu'il sera nécessaire d'éclaircir. Étudier

par exemple ce qu'il se passe en fonction de différentes concentrations en polyphénols et à différents pH permettrait de mettre en lumière le rôle possible joué par ces variables, même si cela nécessiterait, encore une fois, plus de couples phages-bactéries d'origine cidricole.

Les phages, même en faible quantité, participent aux dynamiques microbiennes et au métabolisme de l'écosystème auquel ils sont associés. Afin de visualiser plus précisément quels mécanismes sont mis en jeu, une étude moléculaire de la réponse bactérienne à une infection phagique, au sein d'une communauté, a été entreprise en utilisant le phage UCMA 21115 isolé du cidre pendant cette thèse.

3. Impacts moléculaires d'une infection phagique dans un modèle de communauté

La dernière partie de ce travail de thèse était axée sur la réponse moléculaire d'une bactérie lactique du cidre, entourée d'une communauté bactérienne, à une infection phagique. En effet, très peu d'études sont focalisées sur l'impact d'une infection phagique sur des bactéries lactiques, et encore moins en tenant compte des éventuelles interactions qu'il pourrait y avoir avec d'autres bactéries de l'écosystème dont elles font partie. L'objectif était donc de caractériser avec des approches de transcriptomique et de protéomique, la réponse de la bactérie hôte à l'infection par son phage, en la plaçant au sein d'une communauté bactérienne. En parallèle du premier axe de la thèse, le choix s'est logiquement porté sur le couple *L. mali* UCMA 16447 et son phage UCMA 21115. La constitution de la communauté entourant la bactérie infectée a été réalisée en utilisant des souches bactériennes déjà séquencées pour faciliter les analyses, mais l'objectif était aussi de sélectionner des bactéries relativement proches, c'est-à-dire appartenant à la même famille (ancien genre *Lactobacillus*), pour favoriser les possibles échanges de molécules par exemple. Afin de mimer l'environnement du cidre tout en isolant le couple phage-bactérie d'intérêt pour les expériences, une approche originale utilisant des boudins de dialyse permettant la diffusion de petites molécules a été utilisée (Saraoui *et al*., 2013).

Cette étude a révélé que la bactérie infectée était particulièrement perturbée et dérégulée pendant l'infection phagique. Les fonctions comme le métabolisme et la motilité cellulaire semblaient les plus touchées pendant l'infection. En revanche, aucune différence n'a été observée sur les bactéries de la communauté (hors boudins de dialyse) avec l'analyse protéomique. En effet, l'infection de la bactérie *L. mali* UCMA 16447 par le phage UCMA

21115 dans le tube de dialyse, n'a pas permis de mettre en évidence un changement de comportement de la communauté au niveau protéique. Les protéines sont le dernier maillon de la chaine biologique, la régulation de leur expression est donc plus lente à être observée. Des analyses de métatranscriptomique sur les bactéries de la communauté pourraient être intéressantes à mettre en œuvre afin de visualiser un potentiel impact de l'infection phagique d'une autre bactérie sur la communauté. L'observation de la réponse de gènes impliqués dans le stress ou dans le quorum sensing pourrait être intéressante. Toujours dans cette optique, cibler certains de ces gènes en utilisant la RT-qPCR pourrait permettre de comprendre l'éventuelle communication bactérienne et de voir quelle bactérie est la plus réceptrice aux signaux potentiellement envoyés par la bactérie infectée.

L'analyse transcriptomique a permis de mettre en évidence les principales fonctions impactées par l'infection phagique. Parmi elles, le métabolisme des sucres, montrant que la glycolyse était sous régulée alors que la lactate deshydrogénase était induite. Aucune différence entre la condition témoin et la condition infectée n'a pu être observée en termes de concentration en lactate après analyse par HPLC. Des analyses sur des temps d'infection plus importants permettraient peut-être de mieux mettre en évidence ce phénomène de différence de concentration en lactate. *L. mali* fait partie du groupe des bactéries lactiques identifiées comme mobiles (Cousin *et al*., 2015; Neville *et al*., 2012). L'analyse transcriptomique et protéomique a également permis de mettre en évidence que la motilité cellulaire était inhibée pendant l'infection phagique. En effet, un grand nombre de gènes en lien avec cette motilité cellulaire, en particulier ceux codant pour la production et le fonctionnement des flagelles étaient réprimés au cours de l'infection. Le flagelle peut être un récepteur de phages. Cela a été démontré chez plusieurs espèces bactériennes comme *Campylobacter jejuni* (Baldvinsson *et al*., 2014) ou *Salmonella* sp. (Choi *et al*., 2013). Afin de mettre en évidence cette intéraction entre le phage et le potentiel récepteur flagellaire chez *L. mali* UCMA16447, des expériences de mutagénèse sur des gènes codant pour le flagelle pourraient être réalisées dans de futurs travaux en suivant l'évolution de l'infection entre la souche sauvage et la souche mutante. L'utilisation d'une méthode comme la MicroScale Thermophoresis (MST) pourrait également être envisagée. En effet, la MST permet de mettre en évidence les interactions entre les protéines, entre l'ADN ou l'ARN et les protéines ou encore entre les protéines membranaires et d'autres protéines ou petites molécules (Huang and Zhang, 2021; Jerabek-Willemsen *et al*., 2011). Ainsi, utiliser ce genre d'approche pourrait permettre de mettre en évidence les interactions entre un phage et son récepteur, ce qui, à notre connaissance, n'a jamais été démontré chez *L. mali*.

L'occurrence et la diversité des phages lytiques dans le cidre est plus limitée que la diversité des prophages. Cependant, même en faible quantité, la présence de phages peut avoir un impact important à la fois sur la bactérie infectée mais également sur le métabolisme d'une communauté modèle. Ce travail souligne donc l'importance d'étudier les phages dans les matrices alimentaires fermentées puisqu'ils peuvent, de manière directe ou indirecte, influencer la qualité du produit fini.

PERSPECTIVES

Des pistes de travail ont été proposées dans la partie précédente de la thèse « discussion générale », quelques-unes d'entre elles seront développées plus en détail dans cette partie « perspectives ».

De nombreux développements ont déjà été mis en œuvre pour l'exploration de la diversité du phageome lytique et des prophages dans différents échantillons de cidre au cours de cette thèse. La principale perspective à ce volet de la thèse consisterait à concentrer de plus grands volumes de cidre en collaboration avec des entreprises cidricoles ayant des installations propices à ce type de manipulation. Pour ce faire, se rapprocher d'organisations nationales comme l'Interprofession des Appelations Cidricoles (IDAC) pourrait permettre d'avoir accès à ce type de matériel pour aller plus loin dans l'exploitation du phageome lytique du cidre.

L'organisation des prophages au sein de l'espèce *O. oeni* provenant du vin est bien décrite, montrant que ces derniers sont généralement intégrés au niveau de six sites d'insertion spécifiques du chromosome (Claisse *et al*., 2021 ; Jaomanjaka *et al*., 2013). Dans le cidre, d'autres souches du genre *Oenococcus* sont retrouvées, comme les espèces *O. sicerae*, *O. alcoholitolerans* ou *O. kitharae*, et il pourrait être intéressant d'observer si les sites d'insertion des prophages sont similaires à ceux retrouvés chez *O. oeni* dans le vin. Pour ce faire, il faudrait réaliser une campagne de prélèvement et d'isolement de souches d'*Oenococcus* dans différents échantillons de cidre. Ces souches isolées, devront être caractérisées et séquencées afin de savoir de quelle espèce il s'agit. Les génomes étant disponibles, la recherche de prophages en leur sein permettra d'identifier leur occurrence et leur position dans le chromosome bactérien, et ces données pourront être comparées à celles obtenues pour *O. oeni* dans le vin. Ce type d'étude pourrait ne pas se limiter au genre *Oenococcus* mais également s'étendre à d'autres genres bactériens retrouvés dans le cidre, afin d'identifier précisément la position des prophages au sein des génomes bactériens de souches provenant de l'environnement cidricole.

Une piste de travail à mettre en œuvre autour du rôle des phages dans un modèle de communauté microbienne inspirée du cidre ayant subi une perturbation, apparait selon moi, comme vraiment complémentaire aux données obtenues pendant cette thèse, la métatranscriptomique. Cette technique permet de mettre en évidence l'ensemble du transcriptome, donc les gènes et les fonctions exprimées, à un instant donné par tous les microorganismes d'un échantillon. Ainsi, en complément des analyses sur les dynamiques microbiennes et le métabolisme, cela permettrait probablement de relier la production de

certains composés à une ou plusieurs souches microbiennes, et de voir si les phages impactent directement ou indirectement certaines voies métaboliques, en comparant les trois conditions. La première étape consisterait à séquencer et annoter les génomes des souches pour lesquelles ces données ne sont pas encore disponibles, à savoir les souches *Ln. mesenteroides* CIM 3004, *O. oeni* UCMA 19297 et *S. uvarum* UCMA 10446. Le modèle devrait être le même que celui déjà utilisé, à savoir avec les souches *L. mali* UCMA 16447, *Ln. mesenteroides* CIM 3004, *O. oeni* UCMA 19297 et *S. uvarum* UCMA 10446, dans les mêmes conditions d'inoculation (10^1 UFC/mL pour *L. mali* UCMA 16447, *Ln. mesenteroides* CIM 3004, *S. uvarum* UCMA 10446 et 10^3 UFC/mL pour *O. oeni* UCMA 19297), dans le milieu MRS, à 25°C et 15°C et avec les mêmes conditions de perturbation des équilibres (50°C, 10 min) lorsque les populations microbiennes atteignent ≈10^5 UFC/mL. Les prélèvements devront être effectués toutes les 24 h mais pourront aller au-delà de 168 h et 220 h pour avoir une richesse métabolique encore plus importante. Ceci pourrait aussi être réalisé dans des fermenteurs dans une autre étude pour observer ce qu'il se passe lorsque le milieu n'est pas appauvri et sans carences nutritionnelles pour les différents microorganismes. À partir de ces prélèvements, les analyses seraient réalisées de la même façon que pendant la thèse, à savoir par dénombrements microbiens sur gélose MRS-X-Gal et YGC pour l'analyse des dynamiques microbiennes et par analyses HPLC et GC-MS pour la signature métabolique du modèle. Afin d'identifier de plus grandes quantités de molécules, utiliser l'appareil GC/UPLC-HRMS (Gaz Chromatography/Ultra Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry) actuellement en cours de mise au point au sein de l'UR ABTE, pourrait être une solution supplémentaire. En complément, l'ARN total des microorganismes devra être extrait à chaque temps de prélèvement puis déplété des ARN ribosomiques avant le séquençage pour l'étude du transcriptome du modèle.

Après le séquençage, les reads correspondants aux CDS des quatre microorganismes du modèle devront être sélectionnés puis traités statistiquement afin de connaitre leur niveau d'expression entre chaque condition. Ces analyses permettront d'avoir un aperçu global des gènes et des grandes fonctions qui sont impactés chez chaque microorganisme entre les différentes conditions. En fonction des résultats, il faudrait ensuite se focaliser sur une catégorie fonctionnelle tel que le métabolisme et regarder à quelle voie métabolique est associé le gène ou la protéine codée par ce gène. Ceci permettrait probablement d'identifier des voies métaboliques (surexprimées ou réprimées) parmi les quatre microorganismes, et de suivre leur évolution dans le temps entre chaque condition. Cela pourrait ainsi permettre d'aller plus loin

dans la compréhension et l'explication des différences observées entre chaque condition concernant la signature métabolique du modèle.

En fonction des observations effectuées, et particulièrement lorsque l'analyse métatranscriptomique ne renseigne pas suffisamment sur l'activité d'un gène, il pourrait aussi être intéressant de cibler certains gènes d'intérêt métabolique par RT-qPCR sur les ARN totaux extraits. Pour ce faire, il faudrait créer des amorces spécifiques de ce gène d'intérêt pour chaque souche microbienne avant de faire la RT-qPCR. Par exemple, cela pourrait être le cas pour le gène codant l'enzyme malolactique (*mle*) chez *O. oeni* afin de suivre l'activité de la FML ou pour le gène codant pour la lactate deshydrogènase (*ldh*) chez *L. mali*, afin de suivre la production d'acide lactique de chaque souche au cours du temps.

Dans ce travail de thèse, il est aussi apparu que la motilité cellulaire était largement réprimée pendant l'infection de *L. mali* UCMA 16447 par le siphophage UCMA 21115. Les flagelles sont assez rares chez les bactéries lactiques, ainsi selon moi, il apparait intéressant de démontrer que le récepteur d'un phage pourrait être le flagelle de *L. mali*. Ainsi, utiliser des souches mutées pour certains gènes de la structure flagellaire (corps basal, crochet, filament) de *L. mali* UCMA 16447 pourrait permettre de mettre en évidence de phénomène. Certains gènes réprimés au cours de l'infection, comme *fliE, fliR, flgB, flgD* ou *fliS* pourraient être ciblés et utilisés comme gènes d'intérêt pour les expériences de mutagénèse. Ensuite, la comparaison de l'efficacité de l'infection entre la souche sauvage et la souche mutée (dépourvue de flagelle) permettraient de mettre en évidence si le flagelle est un récepteur de ce phage. Ce type d'approche pourrait aussi être couplé à de la microscopie confocale à fluorescence et à de la microscopie électronique à transmission afin d'observer plus en détail ce phénomène, comme cela a déjà été réalisé chez *Campylobacter jejuni* par exemple (Baldvinsson *et al*., 2014).

CONCLUSION

Les écosystèmes alimentaires restent, pour grande partie, une « boîte noire » dans laquelle les interactions microbiennes, et en particulier le rôle des phages, sont difficiles à étudier. Ce travail de thèse a néanmoins permis d'apporter de nouvelles connaissances sur les communautés de phages dans une boisson fermentée de la région Normandie : le cidre. Ces travaux ont soulevé la question du rôle écologique joué par les phages dans le cidre, et peut-être plus largement dans les boissons fermentées, au vu de leur faible occurrence dans le cidre. En outre, ces travaux de recherche ont souligné le rôle important des phages sur les dynamiques microbiennes et le métabolisme de communautés microbiennes modèles. Cette thèse a également mis en évidence d'importantes perturbations cellulaires provoquées par une infection phagique chez une souche de l'espèce *Liquorilactobacillus mali*.

Ce travail de thèse s'inscrit pleinement dans les axes stratégiques de recherche de l'équipe MALIM, qui visent à comprendre comment se structure le microbiote des aliments et quelles sont les interactions au sein des matrices d'intérêt alimentaire. Le développement des méthodes et les résultats obtenus au cours de ce projet ont pleinement contribué à l'émergence et au renforcement de la thématique « phages » de l'équipe MALIM, offrant de nouvelles perspectives pour la poursuite de ces travaux à l'avenir.

En effet, de nombreuses questions restent en suspens concernant l'influence des phages sur les populations microbiennes du cidre, et plus largement dans d'autres matrices alimentaires. Pourquoi, malgré des niveaux de bactéries assez élevés, cette boisson ne présente pas une diversité phagique plus importante ? Les conditions physico-chimiques complexes du cidre peuvent-elles, à elles seules, être responsables de cette faible proportion en phages ? Est-il possible que des phénomènes d'infections phagiques éphémères, ponctuels, tels qu'observés dans les océans (blooms) par exemple, prennent place également dans ce type de boisson fermentée, et soient, par conséquent, moins facilement détectables par les approches classiques mises en œuvre pour étudier ces écosystèmes ? Est-ce que la lysogénie est le mode dominant de présence des phages dans ce type de matrice, hypothèse que les travaux sur les prophages de souches du vin laissent peut-être d'ailleurs envisager aussi pour le cidre ?

Ces éléments sont donc encore à explorer afin de mieux comprendre l'influence des communautés de phages sur les écosystèmes microbiens alimentaires, et même possiblement leur rôle dans les processus fermentaires et la qualité des produits finis. En tant qu'acteurs à part entière des microbiotes alimentaires, jusqu'à quel point les communautés des phages contribuent-elles à la production d'aliments sûrs et durables ?

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

~ A ~

Abdelsattar, A.S., Dawooud, A., Rezk, N., Makky, S., Safwat, A., Richards, P.J., El-Shibiny, A., 2021. How to Train Your Phage: The Recent Efforts in Phage Training. Biologics 1, 70–88. https://doi.org/10.3390/biologics1020005

Abedon, S.T., Thomas-Abedon, C., 2010. Phage therapy pharmacology. Current Pharmaceutical Biotechnology 11, 28–47. https://doi.org/10.2174/138920110790725410

Abraha, H.B., Choi, Y., Hyun, W., Lee, J.-W., Kang, H.S., So, M.S., Shin, D., Jung, J.-H., Sbhatu, D.B., Kim, K.-P., 2022. Prevalence, Diversity and UV-Light Inducibility Potential of Prophages in *Bacillus subtilis* and Their Possible Roles in Host Properties. Viruses 14, 483. https://doi.org/10.3390/v14030483

Ackermann, H.-W., 2011. The first phage electron micrographs. Bacteriophage 1, 225–227. https://doi.org/10.4161/bact.1.4.17280

Ackermann, H.-W., Prangishvili, D., 2012. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. Archives of Virology 157, 1843–1849. https://doi.org/10.1007/s00705-012-1383-y

Adams, M.H., 1959. Bacteriophages. Citeseer.

Agnolucci, M., Tirelli, A., Cocolin, L., Toffanin, A., 2017. *Brettanomyces bruxellensis* yeasts: impact on wine and winemaking. World Journal of Microbiology and Biotechnology 33, 180. https://doi.org/10.1007/s11274-017-2345-z

Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S.T., Nisa, M., Ahmad, H., Afreen, A., 2013. Kefir and Health: A Contemporary Perspective. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 53, 422–434. https://doi.org/10.1080/10408398.2010.540360

Ainsworth, S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Courtin, P., Guerardel, Y., Mahony, J., Grard, T., Cambillau, C., Chapot-Chartier, M.-P., van Sinderen, D., 2014. Differences in lactococcal cell wall polysaccharide structure are major determining factors in bacteriophage sensitivity. mBio 5, e00880-00814. https://doi.org/10.1128/mBio.00880-14

Ainsworth, S., Zomer, A., Mahony, J., Sinderen, D. van, 2013. Lytic Infection of *Lactococcus lactis* by Bacteriophages Tuc2009 and c2 Triggers Alternative Transcriptional Host Responses. Applied and Environmental Microbiology 79, 4786–4798. https://doi.org/10.1128/AEM.01197-13

Al-Shayeb, B., Sachdeva, R., Chen, L.-X., Ward, F., Munk, P., Devoto, A., Castelle, C.J., Olm, M.R., Bouma-Gregson, K., Amano, Y., He, C., Méheust, R., Brooks, B., Thomas, A., Lavy, A., Matheus-Carnevali, P., Sun, C., Goltsman, D.S.A., Borton, M.A., Sharrar, A., Jaffe, A.L., Nelson, T.C., Kantor, R., Keren, R., Lane, K.R., Farag, I.F., Lei, S., Finstad, K., Amundson, R., Anantharaman, K., Zhou, J., Probst, A.J., Power, M.E., Tringe, S.G., Li, W.-J., Wrighton, K., Harrison, S., Morowitz, M., Relman, D.A., Doudna, J.A., Lehours, A.-C., Warren, L., Cate, J.H.D., Santini, J.M., Banfield, J.F., 2020. Clades of huge phages from across Earth's ecosystems. Nature 1–7. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2007-4

Amitai, G., Sorek, R., 2016. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. Nature Reviews Microbiology 14, 67–76. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.14

Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W., 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics 31, 166–169. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638

Aranda, P.S., LaJoie, D.M., Jorcyk, C.L., 2012. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. Electrophoresis 33, 366–369. https://doi.org/10.1002/elps.201100335

Arber, W., 1966. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli* 9. Host-controlled modification of bacteriophage fd. Journal of Molecular Biology 20, 483–496. https://doi.org/10.1016/0022-2836(66)90004-0

Arıkan, M., Mitchell, A.L., Finn, R.D., Gürel, F., 2020. Microbial composition of Kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. Journal of Food Science 85, 455–464. https://doi.org/10.1111/1750-3841.14992

Atanasiu, C., Su, T.-J., Sturrock, S.S., Dryden, D.T.F., 2002. Interaction of the ocr gene 0.3 protein of bacteriophage T7 with EcoKI restriction/modification enzyme. Nucleic Acids Research 30, 3936–3944. https://doi.org/10.1093/nar/gkf518

Aubourg, M., Dhalluin, A., Gravey, F., Pottier, M., Thomy, N., Bernay, B., Goux, D., Martineau, M., Giard, J.-C., 2020. Phenotypic and proteomic approaches of the response to iron-limited condition in *Staphylococcus lugdunensis*. BMC Microbiology 20, 328. https://doi.org/10.1186/s12866-020-02016-x

~ B ~

Balcázar, J.L., 2018. How do bacteriophages promote antibiotic resistance in the environment? Clinical Microbiology and Infection 24, 447–449. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.010

Baldvinsson, S.B., Sørensen, M.C.H., Vegge, C.S., Clokie, M.R.J., Brøndsted, L., 2014. *Campylobacter jejuni* Motility Is Required for Infection of the Flagellotropic Bacteriophage F341. Applied and Environmental Microbiology 80, 7096–7106. https://doi.org/10.1128/AEM.02057-14

Balmaseda, A., Bordons, A., Reguant, C., Bautista-Gallego, J., 2018. Non-*Saccharomyces* in Wine: Effect Upon *Oenococcus oeni* and Malolactic Fermentation. Frontiers in Microbiology 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00534

Bamforth, C.W., 2017. Progress in Brewing Science and Beer Production. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering 8, 161–176. https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060816-101450

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P., 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 315, 1709–1712. https://doi.org/10.1126/science.1138140

Barrón-Rodríguez, R.J., Rojas-Anaya, E., Ayala-Sumuano, J.T., Romero-Espinosa, J.Á.I., Vázquez-Pérez, J.A., Cortés-Cruz, M., García-Espinosa, G., Loza-Rubio, E., 2021. Swine virome on rural backyard farms in Mexico: communities with different abundances of animal viruses and phages. Archives of Virology 166, 475–489. https://doi.org/10.1007/s00705-020-04894-y

Bartowsky, E.J., 2017. *Oenococcus oeni* and the genomic era. FEMS Microbiology Reviews 41, S84–S94. https://doi.org/10.1093/femsre/fux034

Bartowsky, E.J., 2005. *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. Australian Journal of Grape and Wine Research 11, 174–187. https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00286.x

Bauduin, R., Le Quere, J.-M., Coton, E., Primault, J., 2006. Factors leading to the expression of “framboisé” in French ciders. LWT - Food Science and Technology, European Symposium on Apple Processing 39, 966–971. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.02.014

Bell, S.-J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. Australian Journal of Grape and Wine Research 11, 242–295. https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x

Berbegal, C., Borruso, L., Fragasso, M., Tufariello, M., Russo, P., Brusetti, L., Spano, G., Capozzi, V., 2019. A Metagenomic-Based Approach for the Characterization of Bacterial Diversity Associated with Spontaneous Malolactic Fermentations in Wine. International Journal of Molecular Sciences 20, 3980. https://doi.org/10.3390/ijms20163980

Bernheim, A., Sorek, R., 2020. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. Nature Reviews Microbiology 18, 113–119. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0278-2

Billaud, M., Lamy-Besnier, Q., Lossouarn, J., Moncaut, E., Dion, M.B., Moineau, S., Traoré, F., Le Chatelier, E., Denis, C., Estelle, J., Achard, C., Zemb, O., Petit, M.-A., 2021. Analysis of viromes and microbiomes from pig fecal samples reveals that phages and prophages rarely carry antibiotic resistance genes. ISME Communications 1, 1–10. https://doi.org/10.1038/s43705-021-00054-8

Bingham, R., Ekunwe, S.I., Falk, S., Snyder, L., Kleanthous, C., 2000. The major head protein of bacteriophage T4 binds specifically to elongation factor Tu. Journal of Biological Chemistry 275, 23219–23226. https://doi.org/10.1074/jbc.M002546200

Binnenkade, L., Teichmann, L., Thormann, K.M., 2014. Iron triggers λSo prophage induction and release of extracellular DNA in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. Applied and Environmental Microbiology 80, 5304–5316. https://doi.org/10.1128/AEM.01480-14

Blower, T.R., Evans, T.J., Przybilski, R., Fineran, P.C., Salmond, G.P.C., 2012. Viral Evasion of a Bacterial Suicide System by RNA–Based Molecular Mimicry Enables Infectious Altruism. PLOS Genetics 8, e1003023. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003023

Bokulich, N.A., Bamforth, C.W., 2013. The Microbiology of Malting and Brewing. Microbiology and Molecular Biology Reviews 77, 157–172. https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-12

Bondy-Denomy, J., Pawluk, A., Maxwell, K.L., Davidson, A.R., 2013. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. Nature 493, 429–432. https://doi.org/10.1038/nature11723

Borrel, G., Colombet, J., Robin, A., Lehours, A.-C., Prangishvili, D., Sime-Ngando, T., 2012. Unexpected and novel putative viruses in the sediments of a deep-dark permanently anoxic freshwater habitat. The ISME Journal 6, 2119–2127. https://doi.org/10.1038/ismej.2012.49

Bossi, L., Fuentes, J.A., Mora, G., Figueroa-Bossi, N., 2003. Prophage contribution to bacterial population dynamics. Journal of Bacteriology 185, 6467–6471. https://doi.org/10.1128/JB.185.21.6467-6471.2003

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Breitbart, M., Rohwer, F., 2005. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? Trends in microbiology 13, 278–284. https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.04.003

Breyton, C., Flayhan, A., Gabel, F., Lethier, M., Durand, G., Boulanger, P., Chami, M., Ebel, C., 2013. Assessing the conformational changes of pb5, the receptor-binding protein of phage T5, upon binding to its *Escherichia coli* receptor FhuA. Journal of Biological Chemistry 288, 30763–30772. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.501536

Brum, J.R., Ignacio-Espinoza, J.C., Roux, S., Doulcier, G., Acinas, S.G., Alberti, A., Chaffron, S., Cruaud, C., de Vargas, C., Gasol, J.M., Gorsky, G., Gregory, A.C., Guidi, L., Hingamp, P., Iudicone, D., Not, F., Ogata, H., Pesant, S., Poulos, B.T., Schwenck, S.M., Speich, S., Dimier, C., Kandels-Lewis, S., Picheral, M., Searson, S., Tara Oceans Coordinators, Bork, P., Bowler, C., Sunagawa, S., Wincker, P., Karsenti, E., Sullivan, M.B., 2015. Ocean plankton. Patterns and ecological drivers of ocean viral communities. Science 348, 1261498. https://doi.org/10.1126/science.1261498

Buron, N., Coton, M., Desmarais, C., Ledauphin, J., Guichard, H., Barillier, D., Coton, E., 2011. Screening of representative cider yeasts and bacteria for volatile phenol-production ability. Food Microbiology 28, 1243–1251. https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.05.001

~ C ~

Cabranes, C., Mangas, J.J., Blanco, D., 1997. Selection and biochemical characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains isolated from Spanish cider. Journal of the Institute of Brewing 103, 165–169. https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1997.tb00945.x

Calero-Cáceres, W., Ye, M., Balcázar, J.L., 2019. Bacteriophages as Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance. Trends in Microbiology 27, 570–577. https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.02.008

Callanan, J., Stockdale, S.R., Shkoporov, A., Draper, L.A., Ross, R.P., Hill, C., 2018. RNA Phage Biology in a Metagenomic Era. Viruses 10, 386. https://doi.org/10.3390/v10070386

Cao, J., Zhang, Y., Dai, M., Xu, J., Chen, L., Zhang, F., Zhao, N., Wang, J., 2020. Profiling of Human Gut Virome with Oxford Nanopore Technology. bioRxiv 2020.02.03.933077. https://doi.org/10.1101/2020.02.03.933077

Carr, J.G., Davies, P.A., 1970. Homofermentative Lactobacilli of Ciders including *Lactobacillus mali* nov. spec. Journal of Applied Bacteriology 33, 768–774. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1970.tb02261.x

Carrolo, M., Frias, M.J., Pinto, F.R., Melo-Cristino, J., Ramirez, M., 2010. Prophage spontaneous activation promotes DNA release enhancing biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. PLoS One 5, e15678. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015678

Chaïb, A., Claisse, O., Delbarre, E., Bosviel, J., Le Marrec, C., 2022. Assessment of the lysogenic status in the lactic acid bacterium *O. oeni* during the spontaneous malolactic fermentation of red wines. Food Microbiology 103, 103947. https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103947

Chatterjee, A., Willett, J., Nguyen, U.T., Monogue, B., Palmer, K.L., Dunny, G.M., Duerkop, B.A., 2019. Parallel genomics uncover novel enterococcal-bacteriophage interactions. bioRxiv 858506. https://doi.org/10.1128/mBio.03120-19

Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., Gu, J., 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics 34, i884–i890. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560

Chen, X., Wei, Y., Ji, X., 2021. Research progress of prophages. Yi Chuan 43, 240–248. https://doi.org/10.16288/j.yczz.20-355

Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Nan, B., Liu, Y., Wang, Z., 2015. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. International Dairy Journal 43, 15–21. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.10.004

Choi, Y., Shin, H., Lee, J.-H., Ryu, S., 2013. Identification and Characterization of a Novel Flagellum-Dependent *Salmonella*-Infecting Bacteriophage, iEPS5. Applied and Environmental Microbiology 79, 4829–4837. https://doi.org/10.1128/AEM.00706-13

Claisse, O., Chaïb, A., Jaomanjaka, F., Philippe, C., Barchi, Y., Lucas, P.M., Le Marrec, C., 2021. Distribution of Prophages in the *Oenococcus oeni* Species. Microorganisms 9, 856. https://doi.org/10.3390/microorganisms9040856

Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2001. Primers and a specific DNA probe for detecting lactic acid bacteria producing 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol in spoiled ciders. Journal of Food Protection 64, 833–837. https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.6.833

Clavijo-Coppens, F., Ginet, N., Cesbron, S., Briand, M., Jacques, M.-A., Ansaldi, M., 2021. Novel Virulent Bacteriophages Infecting Mediterranean Isolates of the Plant Pest *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas albilineans*. Viruses 13, 725. https://doi.org/10.3390/v13050725

Clokie, M.R., Millard, A.D., Letarov, A.V., Heaphy, S., 2011. Phages in nature. Bacteriophage 1, 31–45. https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942

Cohen, D., Melamed, S., Millman, A., Shulman, G., Oppenheimer-Shaanan, Y., Kacen, A., Doron, S., Amitai, G., Sorek, R., 2019. Cyclic GMP-AMP signalling protects bacteria against viral infection. Nature 574, 691–695. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1605-5

Colombo, S., Arioli, S., Gargari, G., Neri, E., Della Scala, G., Mora, D., 2018. Characterization of airborne viromes in cheese production plants. Journal of Applied Microbiology 125, 1444–1454. https://doi.org/10.1111/jam.14046

Cornuault, J.K., Moncaut, E., Loux, V., Mathieu, A., Sokol, H., Petit, M.-A., De Paepe, M., 2019. The enemy from within: a prophage of *Roseburia intestinalis* systematically turns lytic in the mouse gut, driving bacterial adaptation by CRISPR spacer acquisition. bioRxiv 575076. https://doi.org/10.1038/s41396-019-0566-x

Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., Sohier, D., 2006. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. International Journal of Food Microbiology 108, 130–135. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.016

Coton, M., Laplace, J.-M., Auffray, Y., Coton, E., 2006. Polyphasic study of *Zymomonas mobilis* strains revealing the existence of a novel subspecies *Z. mobilis* subsp. *francensis* subsp. nov., isolated from French cider. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 121–125. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63732-0

Coton, M., Laplace, J.M., Coton, E., 2005. *Zymomonas mobilis* subspecies identification by amplified ribosomal DNA restriction analysis. Letters in Applied Microbiology 40, 152–157. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01652.x

Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloumme-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G., Coton, E., 2017. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. FEMS Microbiology Ecology 93. https://doi.org/10.1093/femsec/fix048

Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Coton, E., 2010. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. Food Microbiology 27, 1078–1085. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.012

Cousin, F.J., Le Guellec, R., Chagnot, C., Goux, D., Dalmasso, M., Laplace, J.-M., Cretenet, M., 2019a. *Oenococcus sicerae* sp. nov., isolated from French cider. Systematic and Applied Microbiology 42, 302–308. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.12.006

Cousin, F.J., Le Guellec, R., Chuat, V., Dalmasso, M., Laplace, J.-M., Cretenet, M., 2019b. Multiplex PCR for rapid identification of major lactic acid bacteria genera in cider and other fermented foods. International Journal of Food Microbiology 291, 17–24. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.004

Cousin, F.J., Le Guellec, R., Schlusselhuber, M., Dalmasso, M., Laplace, J.-M., Cretenet, M., 2017. Microorganisms in Fermented Apple Beverages: Current Knowledge and Future Directions. Microorganisms 5, 39. https://doi.org/10.3390/microorganisms5030039

Cousin, F.J., Lynch, S.M., Harris, H.M.B., McCann, A., Lynch, D.B., Neville, B.A., Irisawa, T., Okada, S., Endo, A., O'Toole, P.W., 2015. Detection and Genomic Characterization of Motility in *Lactobacillus curvatus*: Confirmation of Motility in a Species outside the *Lactobacillus salivarius* Clade. Applied and Environmental Microbiology 81, 1297–1308. https://doi.org/10.1128/AEM.03594-14

Craig, N.L., Roberts, J.W., 1980. *E. coli* recA protein-directed cleavage of phage lambda repressor requires polynucleotide. Nature 283, 26–30. https://doi.org/10.1038/283026a0

Cristobal-Cueto, P., García-Quintanilla, A., Esteban, J., García-Quintanilla, M., 2021. Phages in Food Industry Biocontrol and Bioremediation. Antibiotics 10, 786. https://doi.org/10.3390/antibiotics10070786

~ D ~

D'Amore, T., Di Taranto, A., Berardi, G., Vita, V., Marchesani, G., Chiaravalle, A.E., Iammarino, M., 2020. Sulfites in meat: Occurrence, activity, toxicity, regulation, and detection. A comprehensive review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 19, 2701–2720. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12607

De Paepe, M., Hutinet, G., Son, O., Amarir-Bouhram, J., Schbath, S., Petit, M.-A., 2014. Temperate Phages Acquire DNA from Defective Prophages by Relaxed Homologous Recombination: The Role of Rad52-Like Recombinases. PLoS Genetics 10, e1004181. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004181

de Sena Brandine, G., Smith, A.D., 2019. Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. F1000Res 8, 1874. https://doi.org/10.12688/f1000research.21142.2

Desiere, F., Lucchini, S., Canchaya, C., Ventura, M., Brüssow, H., 2002. Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 82, 79–91. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2029-8_5

Det-Udom, R., Gilbert, C., Liu, L., Prakitchaiwattana, C., Ellis, T., Ledesma-Amaro, R., 2019. Towards semi-synthetic microbial communities: enhancing soy sauce fermentation properties in *B. subtilis* co-cultures. Microbial Cell Factories 18, 101. https://doi.org/10.1186/s12934-019-1149-2

Deveau, H., Garneau, J.E., Moineau, S., 2010. CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. Annual Review of Microbiology 64, 475–493. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134123

D'Herelle, F., 2007. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. Research in Microbiology 158, 553–554. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.07.005

D'Herelle, F., 1931. Bacteriophage as a Treatment in Acute Medical and Surgical Infections. Bull N Y Academic Medicine 7, 329–348.

Diaz, P.I., Valm, A.M., 2020. Microbial Interactions in Oral Communities Mediate Emergent Biofilm Properties. Journal of Dental Research 99, 18–25. https://doi.org/10.1177/0022034519880157

Dillingham, M.S., Kowalczykowski, S.C., 2008. RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. Microbiology and Molecular Biology Reviews 72, 642–671. https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-08

Doria, F., Napoli, C., Costantini, A., Berta, G., Saiz, J.-C., Garcia-Moruno, E., 2013. Development of a New Method for Detection and Identification of *Oenococcus oeni* Bacteriophages Based on Endolysin Gene Sequence and Randomly Amplified Polymorphic DNA. Applied and Environmental Microbiology 79, 4799–4805. https://doi.org/10.1128/AEM.01307-13

Draper, L.A., Ryan, F.J., Dalmasso, M., Casey, P.G., McCann, A., Velayudhan, V., Ross, R.P., Hill, C., 2019. Autochthonous faecal virome transplantation (FVT) reshapes the murine microbiome after antibiotic perturbation. bioRxiv 591099. https://doi.org/10.1101/591099

Duckworth, D.H., 1976. "Who discovered bacteriophage?". Bacteriol Rev 40, 793–802.

Dufour, N., Clermont, O., La Combe, B., Messika, J., Dion, S., Khanna, V., Denamur, E., Ricard, J.-D., Debarbieux, L., ColoColi group, 2016. Bacteriophage LM33_P1, a fast-acting weapon against the pandemic ST131-O25b:H4 *Escherichia coli* clonal complex. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 71, 3072–3080. https://doi.org/10.1093/jac/dkw253

Dugat-Bony, E., Lossouarn, J., De Paepe, M., Sarthou, A.-S., Fedala, Y., Petit, M.-A., Chaillou, S., 2020. Viral metagenomic analysis of the cheese surface: A comparative study of rapid procedures for extracting viral particles. Food microbiology 85, 103278. https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103278

Dunne, M., Rupf, B., Tala, M., Qabrati, X., Ernst, P., Shen, Y., Sumrall, E., Heeb, L., Plückthun, A., Loessner, M.J., Kilcher, S., 2019. Reprogramming Bacteriophage Host Range through Structure-Guided Design of Chimeric Receptor Binding Proteins. Cell Reports 29, 1336-1350.e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.062

Duru, I.C., Laine, P., Andreevskaya, M., Paulin, L., Kananen, S., Tynkkynen, S., Auvinen, P., Smolander, O.-P., 2018. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the microbial community in Swiss-type Maasdam cheese during ripening. International Journal of Food Microbiology 281, 10–22. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.017

~ E ~

Ellis, E.L., Delbrück, M., 1939. THE GROWTH OF BACTERIOPHAGE. Journal of General Physiology 22, 365–384. https://doi.org/10.1085/jgp.22.3.365

Evseev, P.V., Lukianova, A.A., Shneider, M.M., Korzhenkov, A.A., Bugaeva, E.N., Kabanova, A.P., Miroshnikov, K.K., Kulikov, E.E., Toshchakov, S.V., Ignatov, A.N., Miroshnikov, K.A., 2020. Origin and Evolution of Studiervirinae Bacteriophages Infecting *Pectobacterium*: Horizontal Transfer Assists Adaptation to New Niches. Microorganisms 8, E1707. https://doi.org/10.3390/microorganisms8111707

~ F ~

Fauconnier, A., 2019. Phage Therapy Regulation: From Night to Dawn. Viruses 11, 352. https://doi.org/10.3390/v11040352

Feng, T., Leptihn, S., Dong, K., Loh, B., Zhang, Y., Li, M., Guo, X., Cui, Z., 2020. Characterisation of bacteriophage JD419, a Staphylococcal phage with an unusual morphology and broad host range. bioRxiv 2020.11.09.370866. https://doi.org/10.1101/2020.11.09.370866

Fernandes, M.A., Verstraete, S.G., Phan, T.G., Deng, X., Stekol, E., LaMere, B., Lynch, S.V., Heyman, M.B., Delwart, E., 2019. Enteric Virome and Bacterial Microbiota in Children With Ulcerative Colitis and Crohn Disease. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 68, 30–36. https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002140

Feyereisen, M., Mahony, J., Lugli, G.A., Ventura, M., Neve, H., Franz, C.M.A.P., Noben, J.-P., O'Sullivan, T., van Sinderen, D., 2019. Isolation and Characterization of *Lactobacillus brevis* Phages. Viruses 11, 393. https://doi.org/10.3390/v11050393

Fitzgerald, C.B., Shkoporov, A.N., Upadrasta, A., Khokhlova, E.V., Ross, R.P., Hill, C., 2021. Probing the "Dark Matter" of the Human Gut Phageome: Culture Assisted Metagenomics Enables Rapid Discovery and Host-Linking for Novel Bacteriophages. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 11, 616918. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.616918

Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P., 1984. Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines. Applied and Environmental Microbiology 48, 1034–1038. https://doi.org/10.1128/aem.48.5.1034-1038.1984

Fu, N., Wu, J., Lv, L., He, J., Jiang, S., 2015. Anti-foot-and-mouth disease virus effects of Chinese herbal kombucha *in vivo*. Braz. Journal of Microbiology 46, 1245–1255. https://doi.org/10.1590/S1517-838246420140701

~ G ~

G-Alegría, E., López, I., Ruiz, J.I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., Ruiz-Larrea, F., 2004. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. FEMS Microbiology Letters 230, 53–61. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00854-1

Galtier, M., De Sordi, L., Maura, D., Arachchi, H., Volant, S., Dillies, M.-A., Debarbieux, L., 2016. Bacteriophages to reduce gut carriage of antibiotic resistant uropathogens with low impact on microbiota composition. Environmental Microbiology 18, 2237–2245. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13284

Gänzle, M.G., 2015. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. Current Opinion in Food Science, Food Microbiology • Functional Foods and Nutrition 2, 106–117. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001

Garai, G., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Moreno-Arribas, M.V., 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. Letters in Applied Microbiology 45, 473–478. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02207.x

García-Aljaro, C., Muñoz-Berbel, X., Jenkins, A.T.A., Blanch, A.R., Muñoz, F.X., 2008. Surface plasmon resonance assay for real-time monitoring of somatic coliphages in wastewaters. Applied in Environmental Microbiology 74, 4054–4058. https://doi.org/10.1128/AEM.02806-07

García-Aljaro, C., Muñoz-Berbel, X., Muñoz, F.J., 2009. On-chip impedimetric detection of bacteriophages in dairy samples. Biosensors and Bioelectronics 24, 1712–1716. https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.08.047

Ge, H., Hu, M., Zhao, G., Du, Y., Xu, N., Chen, X., Jiao, X., 2020. The "fighting wisdom and bravery" of tailed phage and host in the process of adsorption. Microbiological Research 230, 126344. https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126344

Goerke, C., Wirtz, C., Flückiger, U., Wolz, C., 2006. Extensive phage dynamics in *Staphylococcus aureus* contributes to adaptation to the human host during infection. Molecular Microbiology 61, 1673–1685. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05354.x

Goldfarb, T., Sberro, H., Weinstock, E., Cohen, O., Doron, S., Charpak-Amikam, Y., Afik, S., Ofir, G., Sorek, R., 2015. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. The EMBO Journal 34, 169–183. https://doi.org/10.15252/embj.201489455

Göller, P.C., Elsener, T., Lorgé, D., Radulovic, N., Bernardi, V., Naumann, A., Amri, N., Khatchatourova, E., Coutinho, F.H., Loessner, M.J., Gómez-Sanz, E., 2021. Multi-species host range of staphylococcal phages isolated from wastewater. Nature Communication 12, 6965. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27037-6

Gorbalenya, A.E., Krupovic, M., Mushegian, A., Kropinski, A.M., Siddell, S.G., Varsani, A., Adams, M.J., Davison, A.J., Dutilh, B.E., Harrach, B., Harrison, R.L., Junglen, S., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Lefkowitz, E.J., Nibert, M.L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Simmonds, P., Walker, P.J., Zerbini, F.M., Kuhn, J.H., International Committee on Taxonomy of Viruses Executive Committee, 2020. The new scope of virus taxonomy: partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. Nature Microbiology 5, 668–674. https://doi.org/10.1038/s41564-020-0709-x

Gordeeva, J., Morozova, N., Sierro, N., Isaev, A., Sinkunas, T., Tsvetkova, K., Matlashov, M., Truncaitė, L., Morgan, R.D., Ivanov, N.V., Siksnys, V., Zeng, L., Severinov, K., 2019. BREX system of Escherichia coli distinguishes self from non-self by methylation of a specific DNA site. Nucleic Acids Research 47, 253–265. https://doi.org/10.1093/nar/gky1125

Graça, A., Santo, D., Esteves, E., Nunes, C., Abadias, M., Quintas, C., 2015. Evaluation of microbial quality and yeast diversity in fresh-cut apple. Food Microbiology 51, 179–185. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.003

Guichard, H., Poupard, P., Legoahec, L., Millet, M., Bauduin, R., Le Quéré, J.-M., 2019. *Brettanomyces anomalus*, a double drawback for cider aroma. LWT 102, 214–222. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.033

Guo, J., Yue, T., Yuan, Y., 2019. Impact of polyphenols on the headspace concentration of aroma compounds in apple cider. Journal of the Science of Food and Agriculture 99, 1635–1642. https://doi.org/10.1002/jsfa.9345

~ H ~

Haider, W., Barillier, D., Hayat, A., Gaillard, J.-L., Ledauphin, J., 2014. Rapid quantification and comparison of major volatile compounds of ciders from France (Normandy and Brittany) using microextraction by packed sorbent (MEPS). Analytics Methods 6, 1364–1376. https://doi.org/10.1039/C3AY41385C

Hamida, R.S., Shami, A., Ali, M.A., Almohawes, Z.N., Mohammed, A.E., Bin-Meferij, M.M., 2021. Kefir: A protective dietary supplementation against viral infection. Biomedicine and Pharmacotherapy 133, 110974. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110974

Hankin, E., 1896. The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. Annales Institut Pasteur 511–523. https://doi.org/10.4161/bact.1.3.16736

Hanlon, G.W., Denyer, S.P., Olliff, C.J., Ibrahim, L.J., 2001. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Applied and Environmental Microbiology 67, 2746–2753. https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2746-2753.2001

Hatfull, G.F., Cresawn, S.G., Hendrix, R.W., 2008. Comparative genomics of the mycobacteriophages: Insights into bacteriophage evolution. Research in Microbiology 159, 332–339. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.04.008

Heinrichs, M.E., Tebbe, D.A., Wemheuer, B., Niggemann, J., Engelen, B., 2020. Impact of Viral Lysis on the Composition of Bacterial Communities and Dissolved Organic Matter in Deep-Sea Sediments. Viruses 12, E922. https://doi.org/10.3390/v12090922

Hershey, A.D., Chase, M., 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. The Journal of general physiology 36, 39–56. https://doi.org/10.1085/jgp.36.1.39

Hjelmsø, M.H., Hellmér, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Lukjancenko, O., Seidel, M., Elsässer, D., Aarestrup, F.M., Löfström, C., Bofill-Mas, S., Abril, J.F., Girones, R., Schultz, A.C., 2017. Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. PLoS One 12, e0170199. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170199

Hsu, B.B., Gibson, T.E., Yeliseyev, V., Liu, Q., Lyon, L., Bry, L., Silver, P.A., Gerber, G.K., 2019. Dynamic Modulation of the Gut Microbiota and Metabolome by Bacteriophages in a Mouse Model. Cell Host & Microbe 25, 803-814.e5. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.05.001

Huang, L., Zhang, C., 2021. Microscale Thermophoresis (MST) to Detect the Interaction Between Purified Protein and Small Molecule. Methods in Molecular Biology 2213, 187–193. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0954-5_17

~ J ~

Jäckel, C., Hammerl, J.A., Rau, J., Hertwig, S., 2017. A multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of *Campylobacter* phages. PLOS ONE 12, e0190240. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190240

Jamet, A., Touchon, M., Ribeiro-Gonçalves, B., Carriço, J.A., Charbit, A., Nassif, X., Ramirez, M., Rocha, E.P.C., 2017. A widespread family of polymorphic toxins encoded by temperate phages. BMC Biology 15, 75. https://doi.org/10.1186/s12915-017-0415-1

Jaomanjaka, F., Ballestra, P., Dols-lafargue, M., Le Marrec, C., 2013. Expanding the diversity of oenococcal bacteriophages: insights into a novel group based on the integrase sequence. International Journal of Food Microbiology 166, 331–340. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.032

Jaomanjaka, F., Claisse, O., Blanche-Barbat, M., Petrel, M., Ballestra, P., Le Marrec, C., 2016. Characterization of a new virulent phage infecting the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. Food Microbiology 54, 167–177. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.016

Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C.J., Braun, D., Baaske, P., Duhr, S., 2011. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. ASSAY and Drug Development Technologies 9, 342–353. https://doi.org/10.1089/adt.2011.0380

Jia, N., Patel, D.J., 2021. Structure-based functional mechanisms and biotechnology applications of anti-CRISPR proteins. Nature Reviews Molecular Cell Biology 22, 563–579. https://doi.org/10.1038/s41580-021-00371-9

John, S.G., Mendez, C.B., Deng, L., Poulos, B., Kauffman, A.K.M., Kern, S., Brum, J., Polz, M.F., Boyle, E.A., Sullivan, M.B., 2011. A simple and efficient method for concentration of ocean viruses by chemical flocculation. Environmental Microbiology Reports 3, 195–202. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00208.x

Jung, I.S., Lovitt, R.W., 2010. A comparative study of an intensive malolactic transformation of cider using *Lactobacillus brevis* and *Oenococcus oeni* in a membrane bioreactor. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 37, 727–740. https://doi.org/10.1007/s10295-010-0716-7

Jung, J.Y., Lee, S.H., Jin, H.M., Hahn, Y., Madsen, E.L., Jeon, C.O., 2013. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation. International Journal of Food Microbiology 163, 171–179. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.022

Jung, M. J., Kim, M. S., Yun, J. H., Lee, J. Y., Kim, P. S., Lee, H. W., Ha, J. H., Roh, S. W., & Bae, J. W. 2018. Viral community predicts the geographical origin of fermented vegetable foods more precisely than bacterial community. Food microbiology, 76, 319–327. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.010

Jung, M. J., Kim, J., Lee, S. H., Whon, T. W., Sung, H., Bae, J. W., Choi, Y. E., & Roh, S. W. 2022. Role of combinated lactic acid bacteria in bacterial, viral, and metabolite dynamics during fermentation of vegetable food, kimchi. Food Research International 157, 111261. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111261

~ K ~

Kapp, J.M., Sumner, W., 2019. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. Annals of Epidemiology 30, 66–70. https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.11.001

Kasajima, I., Sasaki, K., Tanaka, Y., Terakawa, T., Ohtsubo, N., 2013. Large-scale extraction of pure DNA from mature leaves of Cyclamen persicum Mill. and other recalcitrant plants with alkaline polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). Scientia Horticulturae 164, 65–72. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.011

Keller, S.E., Chirtel, S.J., Merker, R.I., Taylor, K.T., Tan, H.L., Miller, A.J., 2004. Influence of fruit variety, harvest technique, quality sorting, and storage on the native microflora of unpasteurized apple cider. Journal of Food Protection 67, 2240–2247. https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.10.2240

Kelly, D., O'Sullivan, O., Mills, S., McAuliffe, O., Ross, R.P., Neve, H., Coffey, A., 2012. Genome sequence of the phage clP1, which infects the beer spoilage bacterium *Pediococcus damnosus*. Gene 504, 53–63. https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.085

Kęsik-Szeloch, A., Drulis-Kawa, Z., Weber-Dąbrowska, B., Kassner, J., Majkowska-Skrobek, G., Augustyniak, D., Lusiak-Szelachowska, M., Zaczek, M., Górski, A., Kropinski, A.M., 2013. Characterising the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. Virology Journal 10, 100. https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-100

Khan, M.S., Pande, T., van de Ven, T.G.M., 2015. Qualitative and quantitative detection of T7 bacteriophages using paper based sandwich ELISA. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 132, 264–270. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.05.028

Kieft, K., Anantharaman, K., n.d. Deciphering Active Prophages from Metagenomes. mSystems 0, e00084-22. https://doi.org/10.1128/msystems.00084-22

Kieft, K., Zhou, Z., Anantharaman, K., 2020. VIBRANT: automated recovery, annotation and curation of microbial viruses, and evaluation of viral community function from genomic sequences. Microbiome 8, 90. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00867-0

Klenner, J., Kohl, C., Dabrowski, P.W., Nitsche, A., 2017. Comparing Viral Metagenomic Extraction Methods. Current Issues in Molecular Biology 24, 59–70. https://doi.org/10.21775/cimb.024.059

Knecht, L.E., Veljkovic, M., Fieseler, L., 2020. Diversity and Function of Phage Encoded Depolymerases. Frontiers in Microbiology 10, 2949. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02949

Koonin, E.V., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., 2017. Evolutionary Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria. Annual Review of Microbiology 71, 233–261. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093830

Koskella, B., Brockhurst, M.A., 2014. Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. FEMS Microbiology Reviews 38, 916–931. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12072

Kronheim, S., Daniel-Ivad, M., Duan, Z., Hwang, S., Wong, A.I., Mantel, I., Nodwell, J.R., Maxwell, K.L., 2018. A chemical defence against phage infection. Nature 564, 283–286. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0767-x

Kropinski, A.M., 2018. Practical Advice on the One-Step Growth Curve. Methods in Molecular Biology 1681, 41–47. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9_3

Kropinski, A.M., Mazzocco, A., Waddell, T.E., Lingohr, E., Johnson, R.P., 2009. Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay, in: Clokie, M.R.J., Kropinski, A.M. (Eds.), Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, Methods in Molecular Biology™. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 69–76. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., Yarrow, D., 2001. Three new species of *Candida* from apple cider: *C. anglica, C. cidri* and *C. pomicola*. Antonie Van Leeuwenhoek 80, 237–244. https://doi.org/10.1023/a:1013070206109

~ L ~

Labonté, J.M., Swan, B.K., Poulos, B., Luo, H., Koren, S., Hallam, S.J., Sullivan, M.B., Woyke, T., Eric Wommack, K., Stepanauskas, R., 2015. Single-cell genomics-based analysis of virus–host interactions in marine surface bacterioplankton. ISME Journal 9, 2386–2399. https://doi.org/10.1038/ismej.2015.48

Lamont, I., Brumby, A.M., Egan, J.B., 1989. UV induction of coliphage 186: prophage induction as an SOS function. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A 86, 5492–5496. https://doi.org/10.1073/pnas.86.14.5492

Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods 9, 357–359. https://doi.org/10.1038/nmeth.1923

Ledauphin, J., Le Milbeau, C., Barillier, D., Hennequin, D., 2010. Differences in the Volatile Compositions of French Labeled Brandies (Armagnac, Calvados, Cognac, and Mirabelle) Using GC-MS and PLS-DA. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 7782–7793. https://doi.org/10.1021/jf9045667

Ledormand, P., Desmasures, N., Midoux, C., Rué, O., Dalmasso, M., 2022. Investigation of the Phageome and Prophages in French Cider, a Fermented Beverage. Microorganisms 10, 1203. https://doi.org/10.3390/microorganisms10061203

Lemay, M.-L., Otto, A., Maaß, S., Plate, K., Becher, D., Moineau, S., 2019. Investigating *Lactococcus lactis* MG1363 Response to Phage p2 Infection at the Proteome Level*[S]. Molecular & Cellular Proteomics 18, 704–714. https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001135

Lessard, M.-H., Viel, C., Boyle, B., St-Gelais, D., Labrie, S., 2014. Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. BMC Genomics 15, 235. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-235

Li, N., Huang, Y., Li, W., Xu, S., 2022. Virome Analysis Reveals Diverse and Divergent RNA Viruses in Wild Insect Pollinators in Beijing, China. Viruses 14, 227. https://doi.org/10.3390/v14020227

Li, P., Xianjun, X., Xiuzhong Zhang, Tu, Z., Gu, J., Zhang, A., 2020. Characterization and Whole-Genome Sequencing of Broad-host-range *Salmonella*-specific Bacteriophages for Bio-control. Microbial Pathogenesis 104119. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104119

Li, S.N., Tang, S.H., Ren, R., Gong, J.X., Chen, Y.M., 2021. Metabolomic profile of milk fermented with *Streptococcus thermophilus* cocultured with *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, or both during storage. Journal of Dairy Science 104, 8493–8505. https://doi.org/10.3168/jds.2021-20270

Li, W., Godzik, A., 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics 22, 1658–1659. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158

Liang, G., Zhao, C., Zhang, H., Mattei, L., Sherrill-Mix, S., Bittinger, K., Kessler, L.R., Wu, G.D., Baldassano, R.N., DeRusso, P., Ford, E., Elovitz, M.A., Kelly, M.S., Patel, M.Z., Mazhani, T., Gerber, J.S., Kelly, A., Zemel, B.S., Bushman, F.D., 2020. Step-wise assembly of the neonatal virome modulated by breastfeeding. Nature 581, 470–474. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2192-1

Licznerska, K., Nejman-Faleńczyk, B., Bloch, S., Dydecka, A., Topka, G., Gąsior, T., Węgrzyn, A., Węgrzyn, G., 2016. Oxidative Stress in Shiga Toxin Production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2016, 3578368. https://doi.org/10.1155/2016/3578368

Lim, E.S., Zhou, Y., Zhao, G., Bauer, I.K., Droit, L., Ndao, I.M., Warner, B.B., Tarr, P.I., Wang, D., Holtz, L.R., 2015. Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. Nature Medicine 21, 1228–1234. https://doi.org/10.1038/nm.3950

Liu, F., Wu, W., Tran-Gyamfi, M.B., Jaryenneh, J.D., Zhuang, X., Davis, R.W., 2017. Bioconversion of distillers' grains hydrolysates to advanced biofuels by an *Escherichia coli* co-culture. Microbial Cell Factories 16, 192. https://doi.org/10.1186/s12934-017-0804-8

Loc-Carrillo, C., Abedon, S.T., 2011. Pros and cons of phage therapy. Bacteriophage 1, 111–114. https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590

Loenen, W.A., Murray, N.E., 1986. Modification enhancement by the restriction alleviation protein (Ral) of bacteriophage lambda. Journal of Molecular Biology 190, 11–22. https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90071-9

Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine, in: Konings, W.N., Kuipers, O.P., In 't Veld, J.H.J.H. (Eds.), Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, 19–23 September 1999, Veldhoven, The Netherlands. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 317–331. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2027-4_16

Lonvaud-Funel, Renouf, Strehaiano, 2010. Microbiologie du vin : bases fondamentales et applications, Lavoisier. ed.

Lorentzen, M.P., Campbell-Sills, H., Jorgensen, T.S., Nielsen, T.K., Coton, M., Coton, E., Hansen, L., Lucas, P.M., 2019. Expanding the biodiversity of *Oenococcus oeni* through comparative genomics of apple cider and kombucha strains. BMC genomics 20, 330. https://doi.org/10.1186/s12864-019-5692-3

Luria, S.E., Anderson, T.F., 1942. The Identification and Characterization of Bacteriophages with the Electron Microscope. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A 28, 127-130.1. https://doi.org/10.1073/pnas.28.4.127

Ly-Chatain, M.H., Durand, L., Rigobello, V., Vera, A., Demarigny, Y., 2011. Direct Quantitative Detection and Identification of Lactococcal Bacteriophages from Milk and Whey by Real-Time PCR: Application for the Detection of Lactococcal Bacteriophages in Goat's Raw Milk Whey in France. International Journal of Microbiology 2011, e594369. https://doi.org/10.1155/2011/594369

Lynch, K.M., Wilkinson, S., Daenen, L., Arendt, E.K., 2021. An update on water kefir: Microbiology, composition and production. International Journal of Food Microbiology 345, 109128. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128

~ M ~

Ma, Y., Marais, A., Lefebvre, M., Theil, S., Svanella-Dumas, L., Faure, C., Candresse, T., 2019. Phytovirome Analysis of Wild Plant Populations: Comparison of Double-Stranded RNA and Virion-Associated Nucleic Acid Metagenomic Approaches. Journal of Virology 94, e01462-19. https://doi.org/10.1128/JVI.01462-19

Ma, Y., You, X., Mai, G., Tokuyasu, T., Liu, C., 2018. A human gut phage catalog correlates the gut phageome with type 2 diabetes. Microbiome 6, 24. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0410-y

Maghsoodi, A., Chatterjee, A., Andricioaei, I., Perkins, N.C., 2019. How the phage T4 injection machinery works including energetics, forces, and dynamic pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A 116, 25097–25105. https://doi.org/10.1073/pnas.1909298116

Mahdavi, S., Sadeghi, M., Shokri, R., Sadegh, B., 2022. The Role of Bacteriophages as Important Reservoirs of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Genes in Azerbaijan Hospitals. Microbial Drug Resistance https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0163

Mahony, J., Frantzen, C., Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Theodorou, I., Kelleher, P., Chapot-Chartier, M.-P., Cambillau, C., Holo, H., van Sinderen, D., 2020. The CWPS Rubik's cube: Linking diversity of cell wall polysaccharide structures with the encoded biosynthetic machinery of selected *Lactococcus lactis* strains. Molecular Microbiology 114, 582–596. https://doi.org/10.1111/mmi.14561

Mahony, J., McGrath, S., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., 2008. Identification and characterization of lactococcal-prophage-carried superinfection exclusion genes. Applied and Environmental Microbiology 74, 6206–6215. https://doi.org/10.1128/AEM.01053-08

Mahony, J., van Sinderen, D., 2022. Virome studies of food production systems: time for 'farm to fork' analyses. Current Opinion in Biotechnology 73, 22–27. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.06.014

Manrique, P., Bolduc, B., Walk, S.T., Oost, J. van der, Vos, W.M. de, Young, M.J., 2016. Healthy human gut phageome. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A 113, 10400–10405. https://doi.org/10.1073/pnas.1601060113

Marsh, A.J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P., Cotter, P.D., 2014. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. Food Microbiology 38, 171–178. https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003

Marsh, A.J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P., Cotter, P.D., 2013. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. FEMS Microbiology Letters 348, 79–85. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12248

Marston, M.F., Pierciey, F.J., Shepard, A., Gearin, G., Qi, J., Yandava, C., Schuster, S.C., Henn, M.R., Martiny, J.B.H., 2012. Rapid diversification of coevolving marine *Synechococcus* and a virus. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A 109, 4544–4549. https://doi.org/10.1073/pnas.1120310109

Martínez-Puchol, S., Rusiñol, M., Fernández-Cassi, X., Timoneda, N., Itarte, M., Andrés, C., Antón, A., Abril, J.F., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2020. Characterisation of the sewage virome: comparison of NGS tools and occurrence of significant pathogens. Sciences of the Total Environment 713, 136604. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136604

Maske, B.L., de Melo Pereira, G.V., da Silva Vale, A., Marques Souza, D.S., De Dea Lindner, J., Soccol, C.R., 2021. Viruses in fermented foods: are they good or bad? Two sides of the same coin. Food Microbiology 98, 103794. https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103794

Mavrich, T.N., Casey, E., Oliveira, J., Bottacini, F., James, K., Franz, C.M.A.P., Lugli, G.A., Neve, H., Ventura, M., Hatfull, G.F., Mahony, J., van Sinderen, D., 2018. Characterization and induction of prophages in human gut-associated *Bifidobacterium* hosts. Scientific Reports 8, 12772. https://doi.org/10.1038/s41598-018-31181-3

May, A., Narayanan, S., Alcock, J., Varsani, A., Maley, C., Aktipis, A., 2019. Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. PeerJ 7. https://doi.org/10.7717/peerj.7565

Menzel, P., Ng, K.L., Krogh, A., 2016. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. Nature Communications 7, 11257. https://doi.org/10.1038/ncomms11257

Middelboe, M., Holmfeldt, K., Riemann, L., Nybroe, O., Haaber, J., 2009. Bacteriophages drive strain diversification in a marine *Flavobacterium*: implications for phage resistance and physiological properties. Environmental Microbiology 11, 1971–1982. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01920.x

Miller, R.V., Ripp, S.A., 2002. Chapter 8 - Pseudolysogeny: A Bacteriophage Strategy for Increasing Longevity in situ, in: Syvanen, M., Kado, C.I. (Eds.), Horizontal Gene Transfer (Second Edition). Academic Press, London, pp. 81–91. https://doi.org/10.1016/B978-012680126-2/50011-6

Millet, M., Poupard, P., Guilois-Dubois, S., Zanchi, D., Guyot, S., 2019. Self-aggregation of oxidized procyanidins contributes to the formation of heat-reversible haze in apple-based liqueur wine. Food Chemistry 276, 797–805. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.171

Mills, S., Shanahan, F., Stanton, C., Hill, C., Coffey, A., Ross, R.P., 2013. Movers and shakers: influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota. Gut microbes 4, 4–16. https://doi.org/10.4161/gmic.22371

Minot, S., Sinha, R., Chen, J., Li, H., Keilbaugh, S.A., Wu, G.D., Lewis, J.D., Bushman, F.D., 2011. The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet. Genome Research 21, 1616–1625. https://doi.org/10.1101/gr.122705.111

Mirzaei, M.K., Maurice, C.F., 2017. Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. Nature Review in Microbiology 15, 397–408. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.30

Misery, B., Legendre, P., Rue, O., Bouchart, V., Guichard, H., Laplace, JM., Cretenet, M., 2021. Diversity and dynamics of bacterial and fungal communities in cider for distillation. International Journal of Food Microbiology 339, 108987. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108987

Moller, A.G., Lindsay, J.A., Read, T.D., 2019. Determinants of Phage Host Range in *Staphylococcus* Species. Applied and Environmental Microbiology 85, e00209-19. https://doi.org/10.1128/AEM.00209-19

Monk, A. b., Rees, C. d., Barrow, P., Hagens, S., Harper, D. r., 2010. Bacteriophage applications: where are we now? Letters in Applied Microbiology 51, 363–369. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02916.x

Monnet, C., Dugat-Bony, E., Swennen, D., Beckerich, J.-M., Irlinger, F., Fraud, S., Bonnarme, P., 2016. Investigation of the Activity of the Microorganisms in a Reblochon-Style Cheese by Metatranscriptomic Analysis. Frontiers in Microbiology 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00536

Morrissey, W.F., Davenport, B., Querol, A., Dobson, A.D.W., 2004. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. Journal of Applied Microbiology 97, 647–655. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02354.x

~ N ~

Nantel-Fortier, N., Gauthier, M., L'Homme, Y., Fravalo, P., Brassard, J., 2021. Treatments of porcine fecal samples affect high-throughput virome sequencing results. Journal of Virological Methods 289, 114045. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114045

Neville, B.A., Forde, B.M., Claesson, M.J., Darby, T., Coghlan, A., Nally, K., Ross, R.P., O'Toole, P.W., 2012. Characterization of Pro-Inflammatory Flagellin Proteins Produced by *Lactobacillus ruminis* and Related Motile *Lactobacilli*. PLOS ONE 7, e40592. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040592

Nordström, K., Forsgren, A., 1974. Effect of protein A on adsorption of bacteriophages to *Staphylococcus aureus*. Journal of Virology 14, 198–202. https://doi.org/10.1128/JVI.14.2.198-202.1974

Norman, J.M., Handley, S.A., Baldridge, M.T., Droit, L., Liu, C.Y., Keller, B.C., Kambal, A., Monaco, C.L., Zhao, G., Fleshner, P., 2015. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. Cell 160, 447–460. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002

Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., Pevzner, P.A., 2017. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. Genome Research 27, 824–834. https://doi.org/10.1101/gr.213959.116

~ O ~

Ofir, G., Melamed, S., Sberro, H., Mukamel, Z., Silverman, S., Yaakov, G., Doron, S., Sorek, R., 2018. DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. Nature Microbiology 3, 90–98. https://doi.org/10.1038/s41564-017-0051-0

Oliveira, J., Mahony, J., Hanemaaijer, L., Kouwen, T.R.H.M., Neve, H., MacSharry, J., van Sinderen, D., 2017. Detecting *Lactococcus lactis* Prophages by Mitomycin C-Mediated Induction Coupled to Flow Cytometry Analysis. Frontiers in Microbiology 8, 1343. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01343

Oliveira, P.H., Touchon, M., Rocha, E.P.C., 2014. The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts. Nucleic Acids Research 42, 10618–10631. https://doi.org/10.1093/nar/gku734

Otsuka, Y., Yonesaki, T., 2012. Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnlA toxins. Molecular Microbiology 83, 669–681. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.07975.x

Özcan, E., Seven, M., Şirin, B., Çakır, T., Nikerel, E., Teusink, B., Toksoy Öner, E., 2021. Dynamic co-culture metabolic models reveal the fermentation dynamics, metabolic capacities and interplays of cheese starter cultures. Biotechnology and Bioengineering 118, 223–237. https://doi.org/10.1002/bit.27565

~ P ~

Paepe, M.D., Tournier, L., Moncaut, E., Son, O., Langella, P., Petit, M.-A., 2016. Carriage of λ Latent Virus Is Costly for Its Bacterial Host due to Frequent Reactivation in Monoxenic Mouse Intestine. PLOS Genetics 12, e1005861. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005861

Paillet, T., Dugat-Bony, E., 2021. Bacteriophage ecology of fermented foods: anything new under the sun? Current Opinion in Food Science 40, 102–111. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.03.007

Park, E. J., Kim, K. H., Abell, G. C., Kim, M. S., Roh, S. W., & Bae, J. W. 2011. Metagenomic analysis of the viral communities in fermented foods. Applied and environmental microbiology, 77(4), 1284–1291. https://doi.org/10.1128/AEM.01859-10

Patterson, E., Ryan, P.M., Cryan, J.F., Dinan, T.G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., 2016. Gut microbiota, obesity and diabetes. Postgraduate Medical Journal 92, 286–300. https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2015-133285

Payne, R.J., Phil, D., Jansen, V.A., 2000. Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. Clinical Pharmacology & Therapeutics 68, 225–230. https://doi.org/10.1067/mcp.2000.109520

Pei, Z., Sadiq, F.A., Han, X., Zhao, J., Zhang, H., Ross, R.P., Lu, W., Chen, W., 2021. Comprehensive Scanning of Prophages in *Lactobacillus*: Distribution, Diversity, Antibiotic Resistance Genes, and Linkages with CRISPR-Cas Systems. mSystems e0121120. https://doi.org/10.1128/mSystems.01211-20

Peluzio, M. do C.G., Dias, M. de M.E., Martinez, J.A., Milagro, F.I., 2021. Kefir and Intestinal Microbiota Modulation: Implications in Human Health. Frontiers in Nutrition 8, 638740. https://doi.org/10.3389/fnut.2021.638740

Penner, M., Morad, I., Snyder, L., Kaufmann, G., 1995. Phage T4-coded Stp: double-edged effector of coupled DNA and tRNA-restriction systems. Journal of Molecular Biology 249, 857–868. https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0343

Philippe, C., Chaïb, A., Jaomanjaka, F., Claisse, O., Lucas, P.M., Samot, J., Cambillau, C., Le Marrec, C., 2021. Characterization of the First Virulent Phage Infecting *Oenococcus oeni*, the Queen of the Cellars. Frontiers in Microbiology. 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.596541

Philippe, C., Chaïb, A., Jaomanjaka, F., Cluzet, S., Lagarde, A., Ballestra, P., Decendit, A., Petrel, M., Claisse, O., Goulet, A., Cambillau, C., Le Marrec, C., 2020. Wine Phenolic Compounds Differently Affect the Host-Killing Activity of Two Lytic Bacteriophages Infecting the Lactic Acid Bacterium *Oenococcus oeni*. Viruses 12, 1316. https://doi.org/10.3390/v12111316

Philippe, C., Krupovic, M., Jaomanjaka, F., Claisse, O., Petrel, M., Le Marrec, C., 2018. Bacteriophage GC1, a novel tectivirus infecting *Gluconobacter cerinus*, an acetic acid bacterium associated with wine-making. Viruses 10, 39. https://doi.org/10.3390/v10010039

Pietilä, M.K., Demina, T.A., Atanasova, N.S., Oksanen, H.M., Bamford, D.H., 2014. Archaeal viruses and bacteriophages: comparisons and contrasts. Trends in Microbiology 22, 334–344. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.007

Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, A.C., 2015. Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. Frontiers in Microbiology 6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00905

Pittet, V., Morrow, K., Ziola, B., 2011. Ethanol Tolerance of Lactic Acid Bacteria, Including Relevance of the Exopolysaccharide Gene Gtf. Journal of the American Society of Brewing Chemists 69, 57–61. https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2011-0124-01

Pourcel, C., Midoux, C., Vergnaud, G., Latino, L., 2017. A carrier state is established in Pseudomonas aeruginosa by phage LeviOr01, a newly isolated ssRNA levivirus. Journal of General Virology 98, 2181–2189. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000883

Prado, M.R., Blandón, L.M., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., Castro, G.R., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C.R., 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. Frontiers in Microbiology 6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01177

Puertas, A.I., Arahal, D.R., Ibarburu, I., Elizaquível, P., Aznar, R., Dueñas, M.T., 2014. *Lactobacillus sicerae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from Spanish natural cider. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64, 2949–2955. https://doi.org/10.1099/ijs.0.059980-0

~ Q ~

Qi, Y., Liu, D., Yu, H., Zhang, G., Fan, M., 2020. Identification and Characterization of the Small Heat Shock Protein Hsp20 from *Oenococcus oeni* SD-2a. Current Microbiology 77, 3595–3602. https://doi.org/10.1007/s00284-020-02168-z

~ R ~

Rajagopala, S.V., Bakhoum, N.G., Pakala, S.B., Shilts, M.H., Rosas-Salazar, C., Mai, A., Boone, H.H., McHenry, R., Yooseph, S., Halasa, N., Das, S.R., 2021. Metatranscriptomics to characterize respiratory virome, microbiome, and host response directly from clinical samples. Cell Reports Methods 1, 100091. https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100091

Rajnovic, D., Mas, J., 2020. Fluorometric detection of phages in liquid media: Application to turbid samples. Analytica Chimica Acta 1111, 23–30. https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.016

Rather, M.A., Gupta, K., Bardhan, P., Borah, M., Sarkar, A., Eldiehy, K.S.H., Bhuyan, S., Mandal, M., 2021. Microbial biofilm: A matter of grave concern for human health and food industry. Journal of Basic Microbiology 61, 380–395. https://doi.org/10.1002/jobm.202000678

Raya, R.R., H'bert, E.M., 2009. Isolation of Phage via Induction of Lysogens, in: Clokie, M.R.J., Kropinski, A.M. (Eds.), Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, Methods in Molecular Biology™. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 23–32. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_3

Reva, O.N., Zaets, I.E., Ovcharenko, L.P., Kukharenko, O.E., Shpylova, S.P., Podolich, O.V., de Vera, J.-P., Kozyrovska, N.O., 2015. Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments. AMB Express 5, 35. https://doi.org/10.1186/s13568-015-0124-5

Reyneke, B., Ndlovu, T., Khan, S., Khan, W., 2017. Comparison of EMA-, PMA- and DNase qPCR for the determination of microbial cell viability. Applied Microbiology and Biotechnology 101, 7371–7383. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8471-6

Rodríguez-Saavedra, M., González de Llano, D., Moreno-Arribas, M.V., 2020. Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: Microbiological quality and food safety. Food Research International 138, 109762. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109762

Rosend, J., Kaleda, A., Kuldjärv, R., Arju, G., Nisamedtinov, I., 2020. The Effect of Apple Juice Concentration on Cider Fermentation and Properties of the Final Product. Foods 9, E1401. https://doi.org/10.3390/foods9101401

Rosend, J., Kuldjärv, R., Rosenvald, S., Paalme, T., 2019. The effects of apple variety, ripening stage, and yeast strain on the volatile composition of apple cider. Heliyon 5, e01953. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01953

Rostøl, J.T., Marraffini, L., 2019. (Ph)ighting Phages: How Bacteria Resist Their Parasites. Cell Host Microbe 25, 184–194. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.009

Roux, S., Brum, J.R., Dutilh, B.E., Sunagawa, S., Duhaime, M.B., Loy, A., Poulos, B.T., Solonenko, N., Lara, E., Poulain, J., Pesant, S., Kandels-Lewis, S., Dimier, C., Picheral, M., Searson, S., Cruaud, C., Alberti, A., Duarte, C.M., Gasol, J.M., Vaqué, D., Tara Oceans Coordinators, Bork, P., Acinas, S.G., Wincker, P., Sullivan, M.B., 2016. Ecogenomics and potential biogeochemical impacts of globally abundant ocean viruses. Nature 537, 689–693. https://doi.org/10.1038/nature19366

~ S ~

Salih, A.G., Drilleau, J.F., Cavin, F.F., Divies, C., Bourgeois, C.M., 1988. A Survey of Microbiological Aspects of Cider Making. Journal of the Institute of Brewing 94, 5–8. https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1988.tb04545.x

Sánchez, A., Coton, M., Coton, E., Herrero, M., García, L.A., Díaz, M., 2012. Prevalent lactic acid bacteria in cider cellars and efficiency of *Oenococcus oeni* strains. Food Microbiology 32, 32–37. https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.008

Sánchez, A., de Revel, G., Antalick, G., Herrero, M., García, L.A., Díaz, M., 2014. Influence of controlled inoculation of malolactic fermentation on the sensory properties of industrial cider. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 41, 853–867. https://doi.org/10.1007/s10295-014-1402-y

Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M., Smith, M., 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. Nature 265, 687–695. https://doi.org/10.1038/265687a0

Saraoui, T., Parayre, S., Guernec, G., Loux, V., Montfort, J., Cam, A., Boudry, G., Jan, G., Falentin, H., 2013. A unique in vivo experimental approach reveals metabolic adaptation of the probiotic *Propionibacterium freudenreichii* to the colon environment. BMC Genomics 14, 911. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-911

Sausset, R., Petit, M.A., Gaboriau-Routhiau, V., De Paepe, M., 2020. New insights into intestinal phages. Mucosal Immunology 13, 205–215. https://doi.org/10.1038/s41385-019-0250-5

Sauvageot, N., Muller, C., Hartke, A., Auffray, Y., Laplace, J.-M., 2002. Characterisation of the diol dehydratase pdu operon of *Lactobacillus collinoides*. FEMS Microbiology Letters 209, 69–74. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11111.x

Scanlan, P.D., Hall, A.R., Blackshields, G., Friman, V.-P., Davis, M.R., Goldberg, J.B., Buckling, A., 2015. Coevolution with Bacteriophages Drives Genome-Wide Host Evolution and Constrains the Acquisition of Abiotic-Beneficial Mutations. Molecular Biology and Evolution 32, 1425–1435. https://doi.org/10.1093/molbev/msv032

Secor, P.R., Sweere, J.M., Michaels, L.A., Malkovskiy, A.V., Lazzareschi, D., Katznelson, E., Rajadas, J., Birnbaum, M.E., Arrigoni, A., Braun, K.R., Evanko, S.P., Stevens, D.A., Kaminsky, W., Singh, P.K., Parks, W.C., Bollyky, P.L., 2015. Filamentous Bacteriophage Promote Biofilm Assembly and Function. Cell Host Microbe 18, 549–559. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.013

Seed, K.D., Yen, M., Shapiro, B.J., Hilaire, I.J., Charles, R.C., Teng, J.E., Ivers, L.C., Boncy, J., Harris, J.B., Camilli, A., 2014. Evolutionary consequences of intra-patient phage predation on microbial populations. eLife 3, e03497. https://doi.org/10.7554/eLife.03497

Serra Colomer, M., Funch, B., Forster, J., 2019. The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. Current Opinion in Biotechnology, Food Biotechnology • Plant Biotechnology 56, 30–35. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.009

Seth, R.K., Maqsood, R., Mondal, A., Bose, D., Kimono, D., Holland, L.A., Janulewicz Lloyd, P., Klimas, N., Horner, R.D., Sullivan, K., Lim, E.S., Chatterjee, S., 2019. Gut DNA Virome Diversity and Its Association with Host Bacteria Regulate Inflammatory Phenotype and Neuronal Immunotoxicity in Experimental Gulf War Illness. Viruses 11, 968. https://doi.org/10.3390/v11100968

Shade, A., McManus, P.S., Handelsman, J., 2013. Unexpected diversity during community succession in the apple flower microbiome. MBio 4. https://doi.org/10.1128/mBio.00602-12

Sharifi, M., Moridnia, A., Mortazavi, D., Salehi, M., Bagheri, M., Sheikhi, A., 2017. Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. Medical Oncology 34, 183. https://doi.org/10.1007/s12032-017-1044-9

Shkoporov, A.N., Clooney, A.G., Sutton, T.D.S., Ryan, F.J., Daly, K.M., Nolan, J.A., McDonnell, S.A., Khokhlova, E.V., Draper, L.A., Forde, A., Guerin, E., Velayudhan, V., Ross, R.P., Hill, C., 2019. The Human Gut Virome Is Highly Diverse, Stable, and Individual Specific. Cell Host Microbe 26, 527-541.e5. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.09.009

Shkoporov, A.N., Hill, C., 2019. Bacteriophages of the Human Gut: The "Known Unknown" of the Microbiome. Cell Host & Microbe 25, 195–209. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.017

Shkoporov, A.N., Ryan, F.J., Draper, L.A., Forde, A., Stockdale, S.R., Daly, K.M., McDonnell, S.A., Nolan, J.A., Sutton, T.D.S., Dalmasso, M., McCann, A., Ross, R.P., Hill, C., 2018. Reproducible protocols for metagenomic analysis of human faecal phageomes. Microbiome 6, 68. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0446-z

Snopek, L., Mlcek, J., Sochorova, L., Baron, M., Hlavacova, I., Jurikova, T., Kizek, R., Sedlackova, E., Sochor, J., 2018. Contribution of Red Wine Consumption to Human Health Protection. Molecules 23, E1684. https://doi.org/10.3390/molecules23071684

Somerville, V., Berthoud, H., Schmidt, R.S., Bachmann, H.-P., Meng, Y.H., Fuchsmann, P., von Ah, U., Engel, P., 2021. Functional strain redundancy and persistent phage infection in Swiss hard cheese starter cultures. ISME Journal 16, 388–399. https://doi.org/10.1038/s41396-021-01071-0

Song, S., Guo, Y., Kim, J.-S., Wang, X., Wood, T.K., 2019. Phages Mediate Bacterial Self-Recognition. Cell Reports 27, 737-749.e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.070

Sorensen, J.W., Zinke, L.A., ter Horst, A.M., Santos-Medellín, C., Schroeder, A., Emerson, J.B., 2021. DNase Treatment Improves Viral Enrichment in Agricultural Soil Viromes. mSystems 6, e00614-21. https://doi.org/10.1128/mSystems.00614-21

Spriewald, S., Stadler, E., Hense, B.A., Münch, P.C., McHardy, A.C., Weiss, A.S., Obeng, N., Müller, J., Stecher, B., 2020. Evolutionary Stabilization of Cooperative Toxin Production through a Bacterium-Plasmid-Phage Interplay. mBio 11, e00912-20. https://doi.org/10.1128/mBio.00912-20

Stalin, N., Srinivasan, P., 2017. Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. Veterinary Microbiology 207, 83–96. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.006

Stanczak-Mrozek, K.I., Manne, A., Knight, G.M., Gould, K., Witney, A.A., Lindsay, J.A., 2015. Within-host diversity of MRSA antimicrobial resistances. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 70, 2191–2198. https://doi.org/10.1093/jac/dkv119

Stanley, S.Y., Borges, A.L., Chen, K.-H., Swaney, D.L., Krogan, N.J., Bondy-Denomy, J., Davidson, A.R., 2019. Anti-CRISPR-Associated Proteins Are Crucial Repressors of Anti-CRISPR Transcription. Cell 178, 1452-1464.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.046

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J.G., 2001. Bacteriophage therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45, 649–659. https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001

Sun, C.L., Barrangou, R., Thomas, B.C., Horvath, P., Fremaux, C., Banfield, J.F., 2013. Phage mutations in response to CRISPR diversification in a bacterial population. Environmental Microbiology 15, 463–470. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02879.x

Sun, Z., Liu, W., Bao, Q., Zhang, J., Hou, Q., Kwok, L., Sun, T., Zhang, H., 2014. Investigation of bacterial and fungal diversity in tarag using high-throughput sequencing. Journal of Dairy Science 97, 6085–6096. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8360

Suttle, C.A., Fuhrman, J.A., 2010. Enumeration of virus particles in aquatic or sediment samples by epifluorescence microscopy. Manual of aquatic viral ecology. ASLO 145–153. https://doi.org/10.17504/protocols.io.dpy5pv

~ T ~

Takeda, Y., Folkmanis, A., Echols, H., 1977. Cro regulatory protein specified by bacteriophage lambda. Structure, DNA-binding, and repression of RNA synthesis. Journal of Biological Chemistry 252, 6177–6183. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40047-0

Tamang, J.P., Cotter, P.D., Endo, A., Han, N.S., Kort, R., Liu, S.Q., Mayo, B., Westerik, N., Hutkins, R., 2020. Fermented foods in a global age: East meets West. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 19, 184–217. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12520

Tan, D., Hansen, M.F., de Carvalho, L.N., Røder, H.L., Burmølle, M., Middelboe, M., Svenningsen, S.L., 2020. High cell densities favor lysogeny: induction of an H20 prophage is repressed by quorum sensing and enhances biofilm formation in *Vibrio anguillarum*. ISME Journal 14, 1731–1742. https://doi.org/10.1038/s41396-020-0641-3

Taylor, S.L., Higley, N.A., Bush, R.K., 1986. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. Advances in Food Research 30, 1–76. https://doi.org/10.1016/s0065-2628(08)60347-x

Tenorio-Salgado, S., Castelán-Sánchez, H.G., Dávila-Ramos, S., Huerta-Saquero, A., Rodríguez-Morales, S., Merino-Pérez, E., Roa de la Fuente, L.F., Solis-Pereira, S.E., Pérez-Rueda, E., Lizama-Uc, G., 2021. Metagenomic analysis and antimicrobial activity of two fermented milk kefir samples. MicrobiologyOpen 10, e1183. https://doi.org/10.1002/mbo3.1183

Thurber, R.V., Haynes, M., Breitbart, M., Wegley, L., Rohwer, F., 2009. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. Nature Protocols 4, 470–483. https://doi.org/10.1038/nprot.2009.10

Tock, M.R., Dryden, D.T.F., 2005. The biology of restriction and anti-restriction. Current Opinion in Microbiology 8, 466–472. https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.003

Tofalo, R., Battistelli, N., Perpetuini, G., Valbonetti, L., Rossetti, A.P., Perla, C., Zulli, C., Arfelli, G., 2021. *Oenococcus oeni* Lifestyle Modulates Wine Volatilome and Malolactic Fermentation Outcome. Frontiers in Microbiology 12, 2735. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.736789

Townsend, E.M., Kelly, L., Muscatt, G., Box, J.D., Hargraves, N., Lilley, D., Jameson, E., 2021. The Human Gut Phageome: Origins and Roles in the Human Gut Microbiome. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 11. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.643214

Trček, J., Mahnič, A., Rupnik, M., 2016. Diversity of the microbiota involved in wine and organic apple cider submerged vinegar production as revealed by DHPLC analysis and next-generation sequencing. International Journal of Food Microbiology 223, 57–62. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.007

Turner, D., Kropinski, A.M., Adriaenssens, E.M., 2021. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. Viruses 13, 506. https://doi.org/10.3390/v13030506

Twort, F.W., 1915. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. The Lancet 186, 1241–1243. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)20383-3

Tyakht, A., Kopeliovich, A., Klimenko, N., Efimova, D., Dovidchenko, N., Odintsova, V., Kleimenov, M., Toshchakov, S., Popova, A., Khomyakova, M., Merkel, A., 2021. Characteristics of bacterial and yeast microbiomes in spontaneous and mixed-fermentation beer and cider. Food Microbiology 94, 103658. https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103658

~ V ~

Valles, B.S., Bedriñana, R.P., Tascón, N.F., Simón, A.Q., Madrera, R.R., 2007. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. Food Microbiology 24, 25–31. https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.001

Vamvakas, S.-S., Kapolos, J., 2020. Factors affecting yeast ethanol tolerance and fermentation efficiency. World Journal of Microbiology and Biotechnology 36, 114. https://doi.org/10.1007/s11274-020-02881-8

Van Valen, L., 1977. The Red Queen. The American Naturalist 111, 809–810. https://doi.org/10.1086/283213

Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.-Y., Dillies, M.-A., 2016. SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. PLOS ONE 11, e0157022. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157022

Vīna, I., Semjonovs, P., Linde, R., Deniņa, I., 2014. Current Evidence on Physiological Activity and Expected Health Effects of Kombucha Fermented Beverage. Journal of Medicinal Food 17, 179–188. https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0031

Volkin, E., Astrachan, L., 1956. Phosphorus incorporation in *Escherichia coli* ribonucleic acid after infection with bacteriophage T2. Virology 2, 149–161. https://doi.org/10.1016/0042-6822(56)90016-2

~ W ~

Wadhwa, D., 2020. Design Principles of Lambda's Lysis/Lysogeny Decision vis-a-vis Multiplicity of Infection. bioRxiv 146308. https://doi.org/10.1101/146308

Wang, L., Chen, S., Xu, T., Taghizadeh, K., Wishnok, J.S., Zhou, X., You, D., Deng, Z., Dedon, P.C., 2007. Phosphorothioation of DNA in bacteria by dnd genes. Nature Chemical Biology 3, 709–710. https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.39

Wang, L., Mustapha, A., 2010. EMA-Real-Time PCR as a Reliable Method for Detection of Viable *Salmonella* in Chicken and Eggs. Journal of Food Science 75, M134–M139. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01525.x

Waso, M., Khan, S., Khan, W., 2019. Assessment of predatory bacteria and prey interactions using culture-based methods and EMA-qPCR. Microbiological Research 228, 126305. https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126305

Wendling, C.C., Refardt, D., Hall, A.R., 2021. Fitness benefits to bacteria of carrying prophages and prophage-encoded antibiotic-resistance genes peak in different environments. Evolution 75, 515–528. https://doi.org/10.1111/evo.14153

Wicklund, T., Skottheim, E.R., Remberg, S.F., 2020. Various factors affect product properties in apple cider production. International Journal of Food Studies 9. https://doi.org/10.7455/ijfs/9.SI.2020.a7

Wittebole, X., Roock, S.D., Opal, S.M., 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. Virulence 5, 226–235. https://doi.org/10.4161/viru.25991

Wolfe, B.E., Dutton, R.J., 2015. Fermented Foods as Experimentally Tractable Microbial Ecosystems. Cell 161, 49–55. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.034

Wu, Y., Cai, P., Jing, X., Niu, X., Ji, D., Ashry, N.M., Gao, C., Huang, Q., 2019. Soil biofilm formation enhances microbial community diversity and metabolic activity. Environment International 132, 105116. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105116

Wu, Z., Zhang, Y., Xu, X., Ahmed, T., Yang, Y., Loh, B., Leptihn, S., Yan, C., Chen, J., Li, B., 2021. The Holin-Endolysin Lysis System of the OP2-Like Phage X2 Infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Viruses 13, 1949. https://doi.org/10.3390/v13101949

~ X ~

Xu, Z., Walker, M.E., Zhang, J., Gardner, J.M., Sumby, K.M., Jiranek, V., 2021. Exploring the diversity of bacteriophage specific to *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus* spp and their role in wine production. Applied Microbiology and Biotechnology 105, 8575–8592. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11509-2

~ Y ~

Ye, M., Yue, T., Yuan, Y., 2014. Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider. Journal of the Science of Food and Agriculture 94, 2951–2957. https://doi.org/10.1002/jsfa.6639

Yoon, J.-H., Lee, S.-Y., 2020. Characteristics of viable-but-nonculturable Vibrio parahaemolyticus induced by nutrient-deficiency at cold temperature. Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition 60, 1302–1320. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1570076

Yuan, Y., Gao, M., 2017. Jumbo Bacteriophages: An Overview. Frontiers in Microbiology 8, 403. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00403

~ Z ~

Zago, M., Orrù, L., Rossetti, L., Lamontanara, A., Fornasari, M. E., Bonvini, B., Meucci, A., Carminati, D., Cattivelli, L., & Giraffa, G. (2017). Survey on the phage resistance mechanisms displayed by a dairy *Lactobacillus helveticus* strain. Food Microbiology, 66, 110–116. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.014

Zaleski, P., Wojciechowski, M., Piekarowicz, A., 2005. The role of Dam methylation in phase variation of *Haemophilus influenzae* genes involved in defence against phage infection. Microbiology (Reading) 151, 3361–3369. https://doi.org/10.1099/mic.0.28184-0

Zanirati, D.F., Abatemarco, M., Sandes, S.H. de C., Nicoli, J.R., Nunes, Á.C., Neumann, E., 2015. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. Anaerobe 32, 70–76. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.007

Zeigler Allen, L., McCrow, J.P., Ininbergs, K., Dupont, C.L., Badger, J.H., Hoffman, J.M., Ekman, M., Allen, A.E., Bergman, B., Venter, J.C., 2017. The Baltic Sea Virome: Diversity and Transcriptional Activity of DNA and RNA Viruses. mSystems 2, e00125-16. https://doi.org/10.1128/mSystems.00125-16

Zhang, F., Zuo, T., Yeoh, Y.K., Cheng, F.W.T., Liu, Q., Tang, W., Cheung, K.C.Y., Yang, K., Cheung, C.P., Mo, C.C., Hui, M., Chan, F.K.L., Li, C.-K., Chan, P.K.S., Ng, S.C., 2021. Longitudinal dynamics of gut bacteriome, mycobiome and virome after fecal microbiota transplantation in graft-versus-host disease. Nature Communications 12, 65. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20240-x

Zhang, H.-T., Wang, H., Wu, H.-S., Zeng, J., Yang, Y., 2021. Comparison of viromes in vaginal secretion from pregnant women with and without vaginitis. Virology Journal 18, 11. https://doi.org/10.1186/s12985-020-01482-z

Zhang, Q., Wu, S., Li, Y., Liu, M., Ni, K., Yi, X., Shi, Y., Ma, L., Willmitzer, L., Ruan, J., 2019. Characterization of three different classes of non-fermented teas using untargeted metabolomics. Food Research International 121, 697–704. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.042

Zhao, X., Chen, C., Shen, W., Huang, G., Le, S., Lu, S., Li, M., Zhao, Y., Wang, J., Rao, X., 2016. Global transcriptomic analysis of interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and bacteriophage PaP3. Scientific reports 6, 19237. https://doi.org/10.1038/srep19237

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S. 2020, 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 70, 2782–2858. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107

Zhong, Z.-P., Tian, F., Roux, S., Gazitúa, M.C., Solonenko, N.E., Li, Y.-F., Davis, M.E., Van Etten, J.L., Mosley-Thompson, E., Rich, V.I., Sullivan, M.B., Thompson, L.G., 2021. Glacier ice archives nearly 15,000-year-old microbes and phages. Microbiome 9, 160. https://doi.org/10.1186/s40168-021-01106-w

ANNEXES

Publications scientifiques :

Ledormand P, Desmasures N, Dalmasso M, Phage Community Involvement in Fermented Beverages: An Open Door to Technological Advances? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2020**, 1–10. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1790497.

Ledormand P, Desmasures N, Midoux C, Rué O, Dalmasso M, Investigation of the Phageome and Prophages in French Cider, a Fermented Beverage. *Microorganisms* **2022**, 10, 1203. https://doi.org/10.3390/microorganisms10061203.

Ledormand P, Desmasures N, Bernay B, Goux D, Rué O, Midoux C, Monnet C, Dalmasso M, Molecular approaches to uncover phage-lactic acid bacteria interactions in a model community simulating fermented beverages. *Food Microbiology* **2022**, 104069. https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104069.

Ledormand P, Desmasures N, Schlusselhuber M, Sesboüé A, Ledauphin J, Dalmasso M, Phages shape microbial dynamics and metabolism of a model community mimicking cider, a fermented beverage. *Viruses* **2022**, 14, 2283. https://doi.org/10.3390/v14102283.

Communications orales :

- **Communication orale lors du Weblactic de la SFM, 01/04/2021, *distanciel*.**

Réponse transcriptomique d'une souche de *Liquorilactobacillus mali* du cidre, à une infection par un phage lytique.

Pierre Ledormand, Nathalie Desmasures, Christophe Monnet, Marion Dalmasso.

- **Communication orale lors des journées de l'école doctorale nBISE, 17/05/2021, *distanciel.***

Response of a *Liquorilactobacillus mali* strain from cider to a lytic phage infection.

Pierre Ledormand, Nathalie Desmasures, Benoît Bernay, Christophe Monnet, Marion Dalmasso

- **Communication orale lors du 16ème congrès national MICROBES de la Société Française de Microbiologie, 22/09/2021, Nantes.**

Réponse transcriptomique et protéomique d'une souche de *Liquorilactobacillus mali* du cidre, à une infection par un phage lytique.

Pierre Ledormand, Nathalie Desmasures, Benoît Bernay, Olivier Rué, Cédric Midoux, Christophe Monnet, Marion Dalmasso.

- **Communication orale lors du 23ème colloque national du Club des Bactéries Lactiques, 09/06/2022, Rennes.**

Rôle des phages sur la dynamique et le métabolisme d'une communauté microbienne modèle inspirée du cidre.

Pierre Ledormand, Nathalie Desmasures, Margot Schlusselhuber, André Sesboüé, Jérôme Ledauphin, Marion Dalmasso.

- **Communication orale lors du 27ème congrès international FoodMicro2022, 28/08/2022, Athènes (évènement hybride).**

Impact of phages on the dynamics and metabolism of a model microbial community inspired from a fermented beverage

Pierre Ledormand, Nathalie Desmasures, Margot Schlusselhuber, André Sesboüé, Jérôme Ledauphin, Marion Dalmasso.

- **Communication orale lors de la journée scientifique de la Fédération de Recherche Régionale « Sécurité Sanitaire, Bien-être et aliments Durables », 21/06/2022 (*distanciel*)**

Rôle des phages sur la dynamique et le métabolisme d'une communauté microbienne modèle inspirée du cidre.

Pierre Ledormand, Nathalie Desmasures, Margot Schlusselhuber, André Sesboüé, Jérôme Ledauphin, Marion Dalmasso.

Communications affichées :

- **Poster lors du 13ème congrès international Lactic Acid Bacteria, 23/08/2021, Egmond aan Zee, Pays Bas, *distanciel* – Annexe 2.**

Bacteriophage ecology of cider, an alcoholic fermented beverage: phages, are you there?

Pierre Ledormand, Nathalie Desmasures, Didier Goux, Cédric Midoux, Olivier Rué, Marion Dalmasso.

- **Poster lors du 16ème congrès national MICROBES de la Société Française de Microbiologie, 22/09/2021, Nantes – Annexe 3.**

Le cidre est une matrice délicate pour l'étude des bactériophages et des phageomes.

Pierre Ledormand, Nathalie Desmasures, Céline Caillard, Erwan Renard, Didier Goux, Cédric Midoux, Olivier Rué, Marion Dalmasso.

Médiation scientifique :

- **Présentation orale pour le module « journée scientifique » à l'IUT de Caen (1ère année de Génie Biologique), 12/05/2021, Caen.**

Interactions bactériophages-bactéries au sein des communautés microbiennes des aliments fermentés.

Pierre Ledormand, Nathalie Desmasures, Marion Dalmasso

Encadrement de stagiaires :

2020 :

- Encadrement d'une stagiaire de 2ème année de BTS Bioanalyses et contrôles, 8 semaines, Morgane Duvivier.

2021 :

- Encadrement d'une stagiaire de 3ème année d'école d'ingénieur École Supérieure d'Ingénieurs en Agroalimentaire de Bretagne atlantique (ESIAB) avec option Master 2 Recherche, 6 mois, Sarah Sacoman.

Missions d'enseignement :

- 35 h de TP de Microbiologie générale en Licence 2ème année de biologie (UFR Sciences, Caen, 2021).
- 24 h de TP de Biologie Moléculaire en 2ème année d'école d'ingénieur agroalimentaire (ESIX Normandie, Caen, 2021)
- 42 h de TP de Microbiologie générale en 2ème année de DUT Génie Chimique option Génie des Procédés (IUT Grand Ouest Normandie, Caen, 2021-2022).

Formations doctorales :

- Rechercher l'information (3 h)
- Initiation à la bibliométrie et à l'Open Science (6 h)
- ZOTERO : outil libre pour gérer ses ressources numériques (6 h)
- Mener sa thèse comme un projet (12 h)
- Créer des figures et illustrations pour des articles : logiciel GIMP (6 h)
- Développer son réseau professionnel (3,5 h)
- Les enjeux du changement climatique (6 h)
- Intégrité scientifique (4 h)
- Intelligence économique (6 h)
- Structure et fonctionnement de l'enseignement supérieur et de la recherche (3 h)
- Formation aux missions d'enseignement organisée par l'ESPE de Caen (30 h)
- Séquençage haut débit (6 h)
- Formation RNA-Seq sur galaxy (20 h)

Annexe 1 : Souches microbiennes utilisées au cours de ces travaux de thèse.

Identifiant	Autre nom	Genre	Espèce
UCMA 15488		*Acetobacter*	*malorum*
UCMA 16846		*Acetobacter*	*malorum*
UCMA 14337		*Gluconobacter*	*wancherniae*
UCMA 14338		*Gluconobacter*	*wancherniae*
UCMA 14353		*Gluconobacter*	*cerinus*
UCMA 14425		*Gluconobacter*	*cerevisiae*
UCMA 14529		*Gluconobacter*	*cerevisiae*
UCMA 14604		*Gluconobacter*	*oxydans*
UCMA 15216		*Gluconobacter*	*wancherniae*
UCMA 15501		*Gluconobacter*	*oxydans*
UCMA 15717		*Gluconobacter*	*oxydans*
UCMA 15725		*Gluconobacter*	*cerevisiae*
UCMA 15731		*Gluconobacter*	*oxydans*
UCMA 15761		*Gluconobacter*	*cerevisiae*
UCMA 16335		*Gluconobacter*	*oxydans*
UCMA 16344		*Gluconobacter*	*oxydans*
UCMA 16537		*Gluconobacter*	*oxydans*
UCMA 16546		*Gluconobacter*	*oxydans*
UCMA 16551		*Gluconobacter*	*oxydans*
UCMA 16560		*Gluconobacter*	*oxydans*
UCMA 16838		*Gluconobacter*	*cerevisiae*
UCMA 17039		*Gluconobacter*	*cerevisiae*
UCMA 10433		*Gluconobacter*	*cerevisiae*
UCMA 15818^{T}		*Lactobacillus*	*sp. nov*
UCMA 14831		*Lactobacillus*	*sp. nov*
UCMA 16260		*Lactobacillus*	*sp. nov*
UCMA 16306		*Lactobacillus*	*sp. nov*
UCMA 16502		*Lactobacillus*	*sp. nov*

UCMA 20768		*Lactobacillus*	*sp. nov*
UCMA 21074^{T}	*DSM 14421^{T}*	*Lentilactobacillus*	*diolivorans*
UCMA 16955		*Lentilactobacillus*	*diolivorans*
UCMA 20150		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20411		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20456		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20685		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20153		*Leuconostoc*	*pseudomesenteroides*
UCMA 20421		*Leuconostoc*	*pseudomesenteroides*
UCMA 20148		*Leuconostoc*	*suionicum*
UCMA 20687		*Leuconostoc*	*suionicum*
UCMA 20149^{T}		*Leuconostoc*	*sp. nov*
UCMA 20151		*Leuconostoc*	*sp. nov*
UCMA 18693		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 18697		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 18792		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 18828		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 18959		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 18961		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 19109		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 19110		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20403		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20416		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20454		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20678		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20679		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20758		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 19072		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 19391		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20555		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20561		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20576		*Leuconostoc*	*mesenteroides*

UCMA 20577		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20580		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20585		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20635		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20639		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20645		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20680		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20683		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20684		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20685		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20686		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20723		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 20757		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
CIM 3004		*Leuconostoc*	*mesenteroides*
UCMA 21083^{T}	*DSM 20054^{T}*	*Levilactobacillus*	*brevis*
UCMA 20661		*Levilactobacillus*	*brevis*
UCMA 21076^{T}	*DSM 20444^{T}*	*Liquorilactobacillus*	*mali*
UCMA 14707		*Liquorilactobacillus*	*mali*
UCMA 16065		*Liquorilactobacillus*	*mali*
UCMA 16316		*Liquorilactobacillus*	*mali*
UCMA 16447		*Liquorilactobacillus*	*mali*
UCMA 16501		*Liquorilactobacillus*	*mali*
UCMA 19420		*Liquorilactobacillus*	*mali*
UCMA 20677		*Liquorilactobacillus*	*mali*
UCMA 20728		*Liquorilactobacillus*	*mali*
UCMA 20759		*Liquorilactobacillus*	*mali*
UCMA 18216^{T}	*DSM 20252^{T}*	*Oenococcus*	*oeni*
UCMA 14597		*Oenococcus*	*oeni*
UCMA 15129		*Oenococcus*	*oeni*
UCMA 16505		*Oenococcus*	*oeni*
UCMA 19297		*Oenococcus*	*oeni*
UCMA 20063		*Oenococcus*	*oeni*

UCMA 20674		*Oenococcus*	*oeni*
UCMA 20777		*Oenococcus*	*oeni*
UCMA 16435^{T}		*Oenococcus*	*sp. nov*
UCMA 17063		*Oenococcus*	*sp. nov*
UCMA 14587		*Oenococcus*	*sp. nov*
UCMA 17292		*Oenococcus*	*sp. nov*
UCMA 19310		*Oenococcus*	*sp. nov*
UCMA 19266		*Oenococcus*	*sp. nov*
UCMA 20782		*Oenococcus*	*sp. nov*
UCMA 20779		*Oenococcus*	*sp. nov*
UCMA 15228^{T}	*DSM 107163^{T}*	*Oenococcus*	*sicerae*
UCMA 17102		*Oenococcus*	*sicerae*
UCMA 20140^{T}	*LMG 27599*	*Oenococcus*	*alcoholitolerans*
UCMA 20141^{T}	*DSM 17330^{T}*	*Oenococcus*	*kitaharae*
UCMA 20020		*Oenococcus*	*N.I*
UCMA 18829		*Oenococcus*	*N.I*
UCMA 18850		*Oenococcus*	*N.I*
UCMA 19755		*Oenococcus*	*N.I*
UCMA 19756		*Oenococcus*	*N.I*
UCMA 20050		*Oenococcus*	*N.I*
UCMA 20120		*Oenococcus*	*N.I*
UCMA 20121		*Oenococcus*	*N.I*
UCMA 20707		*Oenococcus*	*N.I*
UCMA 20721		*Oenococcus*	*N.I*
UCMA 15901		*Pediococcus*	*parvalus*
UCMA 14901		*Pediococcus*	*parvalus*
UCMA 16233		*Pediococcus*	*parvalus*
UCMA 16604		*Pediococcus*	*parvalus*
UCMA 17298		*Pediococcus*	*parvalus*
UCMA 20689		*Pediococcus*	*parvalus*
UCMA 15387		*Pediococcus*	*ethanolidurans*
UCMA 16461		*Pediococcus*	*ethanolidurans*

UCMA 16580		*Pediococcus*	*ethanolidurans*
UCMA 16790		*Pediococcus*	*ethanolidurans*
UCMA 16859		*Pediococcus*	*ethanolidurans*
UCMA 16791		*Pediococcus*	*ethanolidurans*
UCMA 21082^{T}	*DSM 20285^{T}*	*Pediococcus*	*inopinatus*
UCMA 20583		*Pediococcus*	*inopinatus*
UCMA 20788		*Pediococcus*	*inopinatus*
UCMA 20790		*Pediococcus*	*inopinatus*
UCMA 21115		*Phage*	
PLE01		*Phage*	
UCMA 10446		*Saccharomyces*	*uvarum*
UCMA 19727		*Saccharomyces*	*cerevisiae*
UCMA 12998^{T}	*DSM 20515^{T}*	*Secundilactobacillus*	*collinoides*
LMG 18850		*Secundilactobacillus*	*collinoides*
UCMA 14464		*Secundilactobacillus*	*collinoides*
UCMA 15355		*Secundilactobacillus*	*collinoides*
UCMA 15777		*Secundilactobacillus*	*collinoides*
UCMA 16566		*Secundilactobacillus*	*collinoides*
UCMA 19204		*Secundilactobacillus*	*collinoides*
UCMA 19400		*Secundilactobacillus*	*collinoides*
UCMA 19759		*Secundilactobacillus*	*collinoides*
UCMA 19813		*Secundilactobacillus*	*collinoides*
UCMA 20009		*Secundilactobacillus*	*collinoides*
UCMA 20072		*Secundilactobacillus*	*collinoides*
UCMA 20075		*Secundilactobacillus*	*collinoides*
UCMA 14622		*Zymomonas*	*mobilis*
UCMA 14699		*Zymomonas*	*mobilis*
UCMA 14727		*Zymomonas*	*mobilis*
UCMA 15007		*Zymomonas*	*mobilis*
UCMA 15436		*Zymomonas*	*mobilis*
UCMA 16243		*Zymomonas*	*mobilis*
UCMA 16277		*Zymomonas*	*mobilis*

UCMA 13000	*Zymomonas*	*mobilis*
UCMA 19734	*Zymomonas*	*mobilis*
UCMA 19729	*Zymomonas*	*mobilis*
UCMA 14105	*Zymomonas*	*mobilis*
UCMA 20756	*Zymomonas*	*mobilis*

N.I : Non identifié

Annexe 2 : Poster présenté au 13ème symposium des LAB.

Bacteriophage ecology of cider, an alcoholic fermented beverage: phages, are you there?

Pierre LEDORMAND[1], Nathalie DESMASURES[1], Didier GOUX[2], Cédric MIDOUX[3 4 5], Olivier RUE[3 4], Marion DALMASSO[1]

[1]Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, 14000, Caen, France ; [2]Normandie Univ, UNICAEN, SF ICORE 4206, CMAbio3, F-14032 Caen, France ; [3]Université Paris-Saclay, INRAE, MaIAGE, 78350, Jouy-en-Josas, France ; [4]Université Paris-Saclay, INRAE, BioinfOmics, MIGALE Bioinformatics Facility, 78350 Jouy-en-Josas, France ; [5]Université Paris-Saclay, INRAE, PROSE, 92761 Antony, France

13th LAB Symposium, August 2021

INTRODUCTION

If phages communities (viromes or phageomes) are starting to be well described in several environments like in the gut and in soil, a critical lack of data exists regarding phageomes in fermented foods[1]. To date, only three studies describing the phageomes in Asian fermented foods (kimchi, sauerkrauts and fermented shrimps)[2,3], and in a French cheese (Epoisse)[4] are available, and none about fermented beverages. Cider is an alcoholic fermented apple beverage which fermentation is performed by yeast and lactic acid bacteria (LAB). The diversity of the phages in cider is unknown. In the current study, the diversity of the lytic and the temperate (prophages) phageomes were investigated throughout the fermentation process of cider.

OBJECTIVES

- ☑ To explore the lytic phageome diversity of cider
- ☑ To investigate the temperate phageome (prophages) of cider

LYTIC PHAGEOME

120 cider samples

Culture-dependant approach:

Isolation of lytic phages against LAB from cider

METHOD:

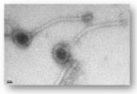
Double layer agar plate (6 well plates) against 145 LAB strains isolated from cider:

- 54 *Lactobacillaceae* (former *Lactobacillus* genus),
- 44 *Leuconostoc* sp.,
- 30 *Oenococcus* sp.,
- 17 *Pediococcus* sp.

RESULTS:

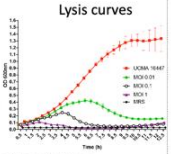
One lytic *Siphoviridae* phage against *Liquorilactobacillus mali* UCMA 16447 strain among all the tested samples.

Phage UCMA 21115

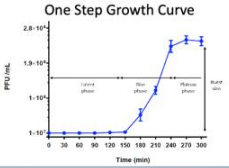


TEM, CMABio[3]

Lysis curves



One Step Growth Curve



Culture-independant method:

Metagenomic approach

METHOD:

Phage DNA extraction

Development of buffers for phage DNA extraction

- PVPP buffers[5]
- Phage lysis buffers

Concentration methods

Tangential Flow Filtration (TFF)[6]

Floculation $FeCl_3$[7]

RESULTS:

No phage DNA extracted

No phage DNA extracted

No lytic phage isolated

No phage DNA extracted

No lytic phage isolated

TEMPERATE PHAGEOME

METHOD: **Total DNA extraction and shotgun sequencing for prophage investigation**

Cider fermentation process

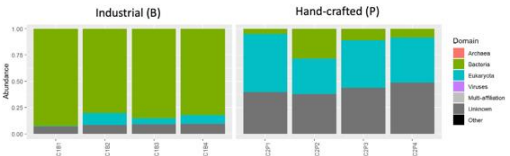
Apple collection → Grinding → Pressing → Apple must → Fermentation → Cider

4 sampling times during the fermentation process:

Producer B (Industrial) Day (sample)	Sugar concentration in cider (kg/m³)	Producer P (Hand-crafted) Day (sample)
0 (C1B1)	1060	1056 0 (C2P1)
7 (C1B2)	1056	1049 12 (C2P2)
14 (C1B3)	1048	1040 25 (C2P3)
27 (C1B4)	1036	1036 36 (C2P4)

RESULTS:

Microbial composition of tanks



Sequence assembly and taxonomic assignments were performed with metaSPADES and kaiju against nr_euk, respectively.

234 million reads, 1 186 544 contigs

103 549 reads affiliated to virus sequences (< 1%)

Phage prediction using VIBRANT[8] software:

2447 contigs of putative phages

7 % lytic phages

93% prophages

Only 5 contigs identified with a « high quality level » (3 lytic, 2 temperate)

→ Low occurrence of lytic phages and prophages in cider.

CONCLUSION

The diversity of the lytic phageome in cider seems very poor as only one lytic *Siphoviridae* phage (UCMA 21115 targeting *L. mali* UCMA 16447 strain) was isolated from 120 cider samples. No lytic phageome DNA could be recovered whatever the method used (several extraction buffers, TFF, flocculation), confirming the probable low occurrence of lytic phages in such a fermented beverage. The temperate phageome also seemed to be very poor in this harsh matrix (low pH, presence of ethanol, sulfites, polyphenols, etc.) as revealed by the shotgun sequencing method.

HIGHLIGHTS

- ☑ First study exploring the diversity of phageomes (lytic and temperate) in a fermented beverage.
- ☑ New knowledge about phageomes in foods.
- ☑ Better understanding of the fermentation processes to guaranteeing the production of safe and sustainable foods.

REFERENCES

[1] Ledormand et al., (2020). Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 1-10.
[2] Park et al., (2011). Appl. Environ. Microbiol. 77, 1284-1291
[3] Jung et al., (2018). Food Microbiol. 76, 319-327
[4] Dugat-Bony et al., (2019). Food Microbiol. 85, 103278
[5] Kasajima et al., (2013). Scientia Horticulturae. 164, 65-72.
[6] Cai et al., (2015). PLoS-One. 10, e0136741.
[7] John et al., (2011). Environ. Microbiol. Reports. 3, 195-202.
[8] Kieft et al., (2020). Microbiome. 8, 1-23.

Contacts:
pierre.ledormand@unicaen.fr
marion.dalmasso@unicaen.fr
nathalie.desmasures@unicaen.fr

Annexe 3 : Poster présenté au 16ème congrès de la SFM.

Le cidre est une matrice délicate pour l'étude des bactériophages et des phageomes

Pierre LEDORMAND[1], Nathalie DESMASURES[1], Céline CAILLARD[1], Erwan RENARD[1], Didier GOUX[2], Cédric MIDOUX[3 4 5], Olivier RUE[3 4], Marion DALMASSO[1]

[1]Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, 14000, Caen, France ; [2]Normandie Univ, UNICAEN, SF ICORE 4206, CMAbio3, F-14032 Caen, France ; [3]Université Paris-Saclay, INRAE, MaIAGE, 78350, Jouy-en-Josas, France ; [4]Université Paris-Saclay, INRAE, BioinfOmics, MIGALE Bioinformatics Facility, 78350 Jouy-en-Josas, France ; [5]Université Paris-Saclay, INRAE, PROSE, 92761 Antony, France

16ème Congrès National de la SFM – Septembre 2021 - Nantes

INTRODUCTION

Les données sur les communautés de phages (phageomes) sont rares mais ces dernières commencent à être étudiées comme dans l'intestin ou le sol. En revanche un cruel manque de données existe sur les phageomes dans les aliments fermentés[1]. A ce jour, seulement trois études décrivant les phageomes dans des aliments fermentés asiatiques (kimchi, choucroute et crevettes fermentées)[2,3], et dans un fromage français (Epoisse)[4] sont disponibles, et aucune sur les boissons fermentées. Le cidre est une boisson alcoolisée obtenue à partir de la fermentation de jus de pomme par des levures et des bactéries lactiques (LAB). La diversité des phages dans le cidre est inconnue. Dans cette étude, la diversité des phageomes lytiques et tempérés (prophages) a été étudiée pendant le processus de fermentation du cidre.

OBJECTIFS

- Explorer la diversité du phageome lytique du cidre
- Explorer la diversité du phageome tempéré (prophages) du cidre

PHAGEOME LYTIQUE

120 échantillons de cidre

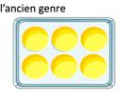
Approche culturale:

Isolement de phages lytiques contre des bactéries lactiques du cidre

METHODE:

Agar double couche (plaques 6 puits) contre 145 souches de LAB isolées du cidre:

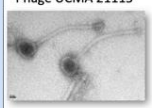
- 54 *Lactobacillaceae* (issues de l'ancien genre *Lactobacillus*),
- 44 *Leuconostoc* sp.,
- 30 *Oenococcus* sp.,
- 17 *Pediococcus* sp.



RESULTATS:

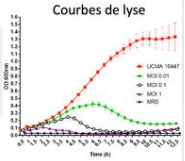
Un seul phage lytique (*Siphoviridae)* ciblant la souche *Liquorilactobacillus mali* UCMA 16447 isolé parmi tous les échantillons de cidre testés.

Phage UCMA 21115

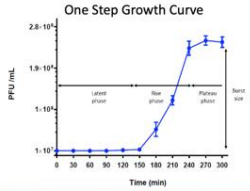


MET, CMABio[3]

Courbes de lyse



One Step Growth Curve



Approche non culturale

Approche par métagénomique

METHODE:

Extraction d'ADN de phage

Développement de tampons pour l'extraction d'ADN phagique

- Tampons PVPP[5]
- Tampons de lyse des phages

Méthodes de concentration

Filtration tangentielle[6]

Floculation $FeCl_3$[7]

RESULTATS:

Pas d'ADN phagique extrait

Pas d'ADN phagique extrait

Aucun phage lytique isolé

Pas d'ADN phagique extrait

Aucun phage lytique isolé

PHAGEOME TEMPÉRÉ

MÉTHODE: **Extraction de l'ADN total et séquençage shotgun pour la recherche de prophages**

Procédé d'élaboration du cidre

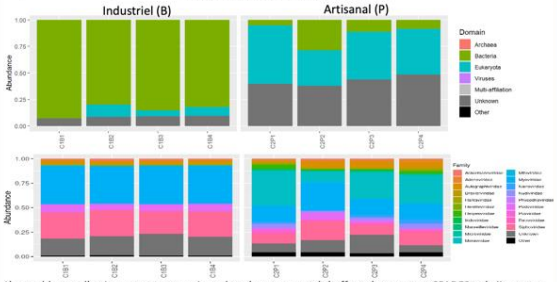
Collecte des pommes → Broyage → Pressage → Moût → Fermentation → Cidre

4 temps d'échantillonnage pendant le procédé de fermentation

Producteur B (Industriel)	Taux de sucre du cidre (kg/m³)	Producteur P (Artisanal)
Jour (échantillon)		Jour (échantillon)
0 (C1B1)	1060	1056 0 (C2P1)
7 (C1B2)	1056	1049 12 (C2P2)
14 (C1B3)	1048	1040 25 (C2P3)
27 (C1B4)	1036	1036 36 (C2P4)

RÉSULTATS:

Composition microbienne des cuves



L'assemblage et l'assignement taxonomique des séquences ont été effectués avec metaSPADES et kaiju contre nr_euk, respectivement.

234 millions de reads, 1 186 544 contigs

103 549 reads affiliés à des sequences virales (< 1%)

Prédiction des phages avec le logiciel VIBRANT[8] :

2447 contigs de phages putatifs

7 % phages lytiques — 93% prophages

Seulement 5 contigs identifiés avec un « haut niveau de qualité » (3 lytiques, 2 tempérés)

→ Faible occurrence de phages lytiques et de prophages dans le cidre.

CONCLUSION

La diversité du phageome lytique du cidre semble très faible puisqu'un seul phage lytique *Siphoviridae* (UCMA 21115 ciblant la souche de *L. mali* UCMA 16447) a été isolé parmi les 120 échantillons de cidre testés. Les différentes méthodes utilisées pour extraire l'ADN du phageome lytique ont échoué (tampons d'extractions, filtration tangentielle, floculation), confirmant la faible présence probable de phages lytiques dans ce type de boissons fermentées. Le phageome tempéré semblait également peu diversifié comme l'a révélé la recherche de prophages par métagénomique dans cette matrice délicate (pH faible, présence d'éthanol, de sulfites, de polyphénols, etc.). La présences de séquences virales incomplètes est à souligner, indiquant la possible présence antérieur des phages dans cet écosystème.

FAITS MARQUANTS

- Première étude explorant la diversité des phageomes (lytiques et tempérés) dans une boisson fermentée.
- Nouvelles connaissances des phageomes dans les aliments.
- Meilleure compréhension du procédé de fermentation pour continuer la production d'aliments sûrs et durables.

REFERENCES

[1] Ledormand et al., (2020). Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 1-10.
[2] Park et al., (2011). Appl. Environ. Microbiol. 77, 1284-1291
[3] Jung et al., (2018). Food Microbiol. 76, 319-327
[4] Dugat-Bony et al., (2019). Food Microbiol. 85, 103278
[5] Kasajima et al., (2013). Scientia Horticulturae. 164, 65-72.
[6] Cai et al., (2015). PLoS-One. 10, e0136741.
[7] John et al., (2011). Environ. Microbiol. Reports. 3, 195-202.
[8] Kieft et al., (2020). Microbiome. 8, 1-23.

Contacts:
pierre.ledormand@unicaen.fr
marion.dalmasso@unicaen.fr
nathalie.desmasures@unicaen.fr

Diversité des bactériophages et interactions au sein des communautés microbiennes de matrices cidricoles.

Résumé

Les bactériophages (phages) sont les virus spécifiques des bactéries, naturellement présents partout où il y a présence de leur hôte sur Terre. Ils sont suspectés de jouer un rôle important dans la construction, l'équilibre et les fluctuations des populations microbiennes des différents écosystèmes auxquels ils sont associés. Cependant, les connaissances sur les communautés de phages lytiques (phageomes) ainsi que les mécanismes d'interactions avec les populations microbiennes dans les boissons et aliments fermentés font défaut. Ceci est particulièrement vrai concernant le cidre, une boisson alcoolisée obtenue par fermentation de jus de pomme, importante pour l'économie de la région Normandie. Ce projet de thèse était divisé en trois grands objectifs. Le premier visait à explorer la diversité des phages du cidre, le deuxième à observer le rôle des phages dans les boissons fermentées en se basant sur un modèle de communauté microbienne inspirée du cidre, et le troisième à étudier les interactions phages-hôte à travers la réponse moléculaire d'une souche bactérienne à une infection phagique. Pour répondre au premier objectif, deux cuves de cidre de deux producteurs, un industriel et un artisanal, ont été suivies au cours du premier mois de fermentation. Il s'est avéré que l'occurrence en phages lytiques était très faible, puisqu'aucune méthode testée n'a permis de mettre en évidence le phageome et qu'un seul siphophage lytique (UCMA 21115), ciblant la souche *Liquorilactobacillus mali* UCMA 16447, a été isolé des échantillons analysés. Il a été montré que les prophages (phages intégrés aux génomes bactériens) semblaient plus abondants, car 1174 prophages putatifs, dont deux complets, ont été identifiés *in sillico*. Concernant le deuxième objectif, l'exploration du rôle des phages dans un modèle de communauté microbienne inspirée du cidre ayant subi une perturbation, s'est déroulée à 25°C et 15°C. Ce modèle était composé de quatre souches microbiennes (*Saccharomyces uvarum* UCMA 10446, *Oenococcus oeni* UCMA 19297, *Leuconostoc mesenteroides* CIM 3004 et *L. mali* UCMA 16447) et de deux phages ciblant la souche *L. mali* UCMA 16447 et la souche *Ln. mesenteroides* CIM 3004. Les phages avaient un effet dépendant de la température. Ils contribuaient au retour à l'équilibre de la communauté à 25°C, tandis qu'ils amplifiaient le déséquilibre du modèle à 15°C, tant au niveau des dynamiques microbiennes que du métabolisme. Enfin, les interactions phages-hôte ont été étudiées à travers la réponse moléculaire de la souche *L. mali* UCMA 16447 infectée par son siphophage lytique UCMA 21115 et entourée d'une communauté. L'infection provoquait une importante perturbation cellulaire, et des fonctions comme le métabolisme des glucides ou la motilité étaient fortement impactées. Ces travaux soulignent l'importance d'étudier les phages dans les matrices alimentaires fermentées puisqu'ils peuvent probablement, de manière directe ou indirecte, influencer la qualité du produit fini en modulant les populations microbiennes qui s'y trouvent.

Mots clés : bactériophages ; boisson fermentée ; cidre ; phageome ; prophages ; communauté microbienne modèle ; phage-hôte interactions

Bacteriophage diversity and interactions in microbial communities of cider matrices.

Abstract

Bacteriophages (phages) are viruses infecting bacteria, and can be found wherever their hosts are present on Earth. They are suspected of playing an important role in the construction, balance and fluctuations of microbial populations in the various ecosystems to which they are associated. Knowledge about lytic phage communities (phageomes) as well as their mechanisms of interactions with the microbial populations in fermented foods and beverages is much more scarce. This is particularly true for cider, an alcoholic apple-fermented beverage, of economic importance for the Normandy region. This PhD project was divided into three main objectives. The first one was to explore the phage diversity of cider, the second one to observe the role of phages in fermented beverages based on a cider-inspired microbial community model, and the third one to study phage-host interactions through the molecular response of a bacterial strain to phage infection. To achieve the first objective, two cider tanks from two producers, one industrial and one artisanal, were monitored during the first month of fermentation. The occurrence of lytic phages was very low, as no method permitted to bring to light the lytic phageome, and only one lytic siphophage (UCMA 21115), targeting the *Liquorilactobacillus mali* UCMA 16447 strain, was isolated from the samples. Prophages (phages integrated inside bacterial genomes) appeared to be more abundant, as 1,174 putative prophages, including two complete prophages, were identified *in sillico*. Concerning the second objective, the exploration of the role of phages in a model microbial community, inspired from cider, was carried out at 25°C and 15°C, after a disturbance phenomenon. The model community was composed of four microbial strains (*Saccharomyces uvarum* UCMA 10446, *Oenococcus oeni* UCMA 19297, *Leuconostoc mesenteroides* CIM 3004 and *L. mali* UCMA 16447) and two phages targeting the *L. mali* UCMA 16447 and *Ln. mesenteroides* CIM 3004 strains. The phages had a temperature-dependent effect. They contributed to the return of the community to equilibrium at 25°C, while they amplified the imbalance of the model at 15°C, both in terms of microbial dynamics and metabolism. Finally, phage-host interactions were studied through the molecular response of the *L. mali* UCMA 16447 strain infected with its lytic siphophage UCMA 21115, and surrounded by a community. This work showed that the infection caused a significant cellular disruption, and that functions such as carbohydrate metabolism and cell motility were strongly impacted. This work highlights the importance of studying phages in fermented food matrices as they possibly can, directly or indirectly, influence the quality of the final products by modulating the food microbial communities.

Key words: bacteriophages; fermented beverage; cider; phageome; prophages; model microbial community; phage-host interactions