



**HAL**  
open science

# Déterminants génétiques de la résistance bactérienne aux bactériophages au cours d'une phagothérapie pulmonaire expérimentale

Baptiste Gaborieau

► **To cite this version:**

Baptiste Gaborieau. Déterminants génétiques de la résistance bactérienne aux bactériophages au cours d'une phagothérapie pulmonaire expérimentale. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5160 . tel-04622396

**HAL Id: tel-04622396**

**<https://theses.hal.science/tel-04622396>**

Submitted on 24 Jun 2024

**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.



Université Paris Cité

**Ecole doctorale 562 Bio Sorbonne Paris Cité**

***Département Infectiologie Microbiologie***

Infection, Anti-microbien, Modélisation, Évolution (U1137)

Microbiologie Intégrative et Moléculaire (UMR6047) -Equipe Bactériophage, Bactérie, Hôte

# **Déterminants génétiques de la résistance bactérienne aux bactériophages au cours d'une phagothérapie pulmonaire expérimentale**

Par Baptiste GABORIEAU

Thèse de doctorat de Microbiologie

Dirigée par Laurent DEBARBIEUX  
Et par Jean-Damien RICARD

Présentée et soutenue publiquement le 14 octobre 2022, devant un jury composé de :

Rozenne LE BERRE	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier	Université de Bretagne Occidentale	Rapporteuse
Yok-Ai QUE	Associate Professor-Senior Physician	Université de Berne (Suisse)	Rapporteur
France MENTRE	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier	Université Paris Cité	Examinatrice et Présidente du Jury
Olaya RENDUELES GARCIA	Chargée de Recherche HDR	Sorbonne Université	Examinatrice
Sylvain MOINEAU	Full Professor	Université Laval (Canada)	Examinateur
Laurent DEBARBIEUX	Directeur de recherche	Institut Pasteur de Paris	co-Directeur de thèse
Jean-Damien RICARD	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier	Université Paris Cité	Directeur de thèse



## Titre

Déterminants génétiques de la résistance bactérienne aux bactériophages au cours d'une phagothérapie pulmonaire expérimentale.

## Résumé

La résistance aux antibiotiques est une menace mondiale pour la santé publique. Malgré les plans de lutte contre l'antibiorésistance, la multirésistance ne cesse de progresser et expose à un risque accru d'impasse thérapeutique en médecine humaine. Elle est devenue particulièrement préoccupante au cours des infections associées aux soins à *Escherichia coli*, et notamment dans le contexte de la réanimation au cours des pneumonies acquises sous ventilation mécanique. Parmi les alternatives à l'antibiothérapie, l'utilisation thérapeutique de bactériophage est une solution prometteuse et efficace. Cependant, la phagothérapie est mise au défi par l'émergence rapide de bactéries développant une résistance aux bactériophages. Les mécanismes de résistance ont pour la plupart été identifiés et étudiés *in vitro*, tandis que la résistance émergente au cours des traitements de phagothérapie reste mal caractérisée.

Ce travail se propose de caractériser sur le plan génomique la résistance bactérienne aux bactériophages au cours d'un traitement par phage dans un modèle murin expérimental de pneumonie aiguë à *E. coli*. Dans un travail de pharmacométrie et de modélisation de la phagothérapie pulmonaire, nous avons mis en évidence plusieurs facteurs clés pour le succès du traitement par phage. En couplant un outil d'imagerie *in vivo* pour suivre longitudinalement les animaux dans le temps avec un modèle mathématique, nous avons caractérisé l'interaction entre bactériophages et bactéries lors du traitement, par une dose unique du phage virulent 536\_P1, d'une pneumonie murine induite par la souche *E. coli* 536. Le modèle a mis en évidence plusieurs paramètres clés pour l'efficacité thérapeutique des bactériophages, et surtout, souligne le rôle critique d'une population bactérienne réfractaire, comprenant les bactéries inaccessibles aux phages et/ou les bactéries résistantes aux bactériophages.

Nous avons ensuite caractérisé sur le plan phénotypique et génomique les clones résistants au bactériophage dans ce même modèle, en comparaison de ceux émergeant au cours d'une culture *in vitro* en milieu liquide. Nous avons identifié une convergence mutationnelle des deux conditions vers des gènes impliqués dans la biosynthèse d'un composant de la paroi cellulaire (LPS ou capsule K15). Alors que les mutations liées au LPS étaient associées à une perte quasi-totale de virulence, les mutants de la capsule K15 restaient aussi virulents que la souche sauvage. Enfin, certains clones résistants aux phages devenaient sensibles à d'autres bactériophages incapables d'infecter la souche sauvage, suggérant que les cocktails de bactériophages n'ont pas nécessairement besoin d'inclure uniquement des bactériophages, tous capables d'infecter la souche pathogène ciblée.

Enfin, nous avons réalisé une caractérisation phénotypique et génomique d'une banque représentative d'une centaine de phages, isolés sur plus de 35 souches d'*E. coli*, et testée sur une collection de 370 souches représentatives du genre *Escherichia*. Les bactéries étaient globalement résistantes à l'infection par les phages. Le spectre d'hôtes des bactériophages était corrélé à leur proximité génomique. La phylogénie bactérienne ne semblait pas être le déterminant principal du spectre d'hôte au niveau intra-espèce, suggérant un rôle des systèmes de défense et du transfert horizontal de gènes.

Ces travaux soulignent l'importance de la résistance bactérienne au bactériophage au cours d'une phagothérapie comme facteur critique d'échec thérapeutique, notamment selon le mécanisme de résistance. Une grande attention devrait être accordée à ces mécanismes au cours de la constitution de cocktails thérapeutiques de phages, notamment chez des patients présentant d'autres facteurs d'échec du traitement (immunodépression, biofilm).

**Mots-clés** Bactériophage, *Escherichia coli*, Phagothérapie, Résistance, Pneumonie

## Title

Genetic determinants of bacterial resistance to bacteriophages during experimental pulmonary phage therapy.

## Abstract

Antibiotic resistance is a global threat to public health. Despite national action plans for combating antibiotic-resistant bacteria, multi-drug resistance is constantly growing and exposes to an increased risk of therapeutic impasse in human medicine. It has become of particular concern during healthcare-associated infections with *Escherichia coli*, particularly in ventilator-associated pneumonia in intensive care. Among the alternatives to antibiotic therapy, the therapeutic use of bacteriophages is a promising and effective solution. However, phage therapy is challenged by the rapid emergence of bacteria developing resistance to bacteriophages. The mechanisms of resistance have mostly been identified and studied *in vitro*, while emerging resistance during phage therapy treatments remains poorly characterized.

This work aims to characterize genetic bacterial resistance to bacteriophages during a phage treatment in an experimental mouse model of acute *E. coli* pneumonia. In a pharmacometrics and modeling study of pulmonary phage therapy, we have highlighted several success factors for treatment efficacy. By coupling an *in vivo* imaging tool to longitudinally follow animals over time with a mathematical model, we characterized the interaction between phages and bacteria during the treatment, with a single dose of the virulent phage 536\_P1, of a murine pneumonia induced by the *E. coli* strain 536. The model highlighted several key parameters for the therapeutic efficacy of phages, and importantly emphasizes the critical role of a refractory population of bacteria that include bacteria inaccessible to phages and/or bacteria resistant to phages.

We then performed a phenotypic and genomic characterization of the phage-resistant clones from this model, compared to those emerging in a liquid *in vitro* culture. We identified a mutational convergence of the two conditions towards genes involved in the biosynthesis of cell wall components (LPS or K15 capsule). While LPS-related mutations were associated with an almost total loss of virulence, the mutants in the K15 capsule remained as virulent as the wild type strain. Finally, some phage-resistant clones became susceptible to other phages unable to infect the wild type strain, suggesting that phage cocktails do not necessarily need to include only phages, all capable of infecting the targeted pathogenic strain.

Finally, we carried out a phenotypic and genomic characterization of a representative bank of a hundred phages, isolated from more than 35 strains of *E. coli*, and tested on a collection of 370 strains representative of the genus *Escherichia*. The bacteria were generally resistant to phage infection. The host spectrum of phages was correlated with their genomic proximity. Bacterial phylogeny does not appear to be the main determinant of the host spectrum at the intraspecies level, suggesting a role for defense systems and horizontal gene transfer.

This work highlights the importance of bacterial resistance to the bacteriophage during phage therapy as a critical factor in treatment failure, according to the resistance mechanisms. Great attention to these mechanisms should be paid during the constitution of therapeutic cocktails of phages, especially in patients with other factors of treatment failure (immunosuppression, biofilm).

**Keywords** Bacteriophage, *Escherichia coli*, Phage-therapy, Resistance, Pneumonia

# Remerciements

Mes remerciements s'adressent en premier lieu aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse. Je remercie Rozenn Le Berre et Yok-Ai Que pour avoir accepté le travail exigeant de rapporter ce manuscrit, ainsi que Olaya Rendueles-Garcia et Sylvain Moineau pour son examen. Merci à France Mentré d'avoir accepté de présider ce jury.

Je voudrais remercier énormément mes directeurs de thèse, Laurent Debarbieux et Jean-Damien Ricard, pour leur mentorat au cours de ces années. Merci Laurent pour m'avoir communiqué ta passion des bactériophages, et pour avoir construit une équipe toujours chaleureuse et soudée, une constante malgré ses multiples mutations. Merci Jean-Damien pour ton soutien dans ma vie professionnelle, et pour ton accompagnement dans mes projets passés et futurs, à la fois en recherche et en médecine. Merci à tous les deux pour votre temps investi et votre confiance, pour m'avoir confié en toute liberté la conduction de projets qui me tenaient à cœur et l'encadrement d'étudiants.

Je remercie chaleureusement Erick Denamur, directeur de l'unité IAME, pour son accueil ainsi que pour son intérêt pour mon travail. Merci Erik pour tes retours critiques et tes conseils. Merci également à l'ensemble (et ils sont très nombreux) des membres d'IAME avec qui j'ai partagé ces dernières années, qu'ils soient partis ou encore présents. Merci particulièrement à Olivier Clermont, Mélanie Magnan, Benoit Gâcher pour leur expertise du séquençage. Merci à Françoise Chau pour son incommensurable aide logistique qui a grandement facilité ma vie. Merci à Myriam Berthet. Une pensée particulière pour Claire, Khan et tous mes autres compagnons de master.

Je remercie Sandrine Adiba pour m'avoir initié à l'approvisionnement des amibes : je n'en demeure pas moins persuadé qu'elles sont bien exigeantes !

Un grand merci aux hippies du marais pour m'avoir fait découvrir un autre aspect de la recherche scientifique : vous êtes l'incarnation de la Science ouverte et collaborative (et avec l'exploit faire passer ça pour une grande récréation). Un très grand merci à Aude pour ton enthousiasme débordant et ton optimisme ; merci à Héloïse et Florian pour pour votre aide et pour tous ces moments, de notre bureau privé de Bichat à l'*open space* du marais : vous êtes les fondations solides de cette équipe ; merci à Helena, Ernest, Jean et Vincent ; merci à tous les autres membres du MDMLabs qui ont tous, à divers degrés, participé au projet Coli.

Je ne peux évidemment oublier de remercier mes compagnons de route au cours de cette année à Pasteur. Et en premier lieu, merci à Raphaëlle qui m'a initié, formé, aidé au cours de mon master 2, toujours dans la bonne humeur. Merci à mes premiers compagnons de bureaux : Mathieu pour nos discussions scientifiques mais souvent non scientifiques, et Rokhaya pour la joie apportée (tu nous manqueras toujours). Merci au duo du Muppet Show de l'autre côté du mur : Quentin et Lorenzo pour tous ces bons moments. Merci à mes compagnons de bureau actuels : Sofia, et Quentin : nos conversations et tes pitreries me

manqueront. Merci Devon pour ta bonne humeur. Merci à Thierry d'avoir apporté un peu de sagesse (et d'ordre) dans tout ça. Je n'oublie pas les derniers arrivés Xavière, Céline et Fannie, ainsi que tous ceux partis mais qui appartiennent à cette grande famille : Marta, Luisa, Nicolas, Marie. Et bien entendu merci à Ana.

Une pensée particulière pour Tanguy, Juliette et Inès : trois personnalités très différentes, à qui j'espère avoir transmis mes connaissances (et un peu de mon caractère obsessionnel).

Mes remerciements vont également à ma famille et mes proches. A mes parents, à Emilie, Thomas et Julie, pour votre soutien depuis toujours, qui m'a permis d'en arriver là où j'en suis aujourd'hui ; mais aussi à mes grands-parents et oncle et tantes : tous ensemble vous m'avez appris la valeur d'une famille. Merci à Audrey, Basile, Simon, Florent, Géraldine et Alexandre : 15 ans d'aventures déjà par-delà les frontières ! A ma CHIC team, qui s'agrandit de plus en plus : Elodie, Julia et Lucille. Enfin je remercie Fanny et Christopher : ma deuxième famille qui est toujours là pour moi dans les bons comme les mauvais moments.

Je dédie cette thèse à Clara, Henri, Lily et Sacha.

# SOMMAIRE

SOMMAIRE .....	1
LISTE DES FIGURES .....	3
ABREVIATIONS.....	5
AVANT-PROPOS .....	7
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION.....	11
1. La résistance aux antibiotiques : une menace mondiale pour la santé humaine .....	13
a. L'antibiorésistance menace les progrès médicaux réalisés au XX <sup>ème</sup> siècle .....	13
b. L'antibiorésistance constitue une menace d'envergure mondiale .....	14
c. Espèces bactériennes et sites infectieux : un impact variable .....	15
d. L'antibiorésistance dans les infections respiratoires à <i>Escherichia coli</i> : un problème de santé publique .....	17
e. Nouveaux paradigmes et alternatives thérapeutiques .....	20
2. Phagothérapie et bactériophages.....	22
a. Découverte des bactériophages : une histoire liée à leur potentiel thérapeutique.....	22
b. Phagothérapie : un regain d'intérêt lié à la crise de l'antibiorésistance.....	23
c. Caractéristiques désirées chez les bactériophages utilisés en thérapeutique.....	24
d. Classification des bactériophages .....	24
e. Cycles infectieux des bactériophages.....	29
3. <i>Escherichia</i> : un modèle écologique et pathogénique .....	33
a. Plasticité génomique : un avantage clé dans l'adaptation .....	34
b. Diversité des structures membranaires .....	36
c. Diversité du genre <i>Escherichia</i> : phylogénie, clonalité, pathotype .....	39
d. Niches écologiques : du commensalisme à la pathogénie : des incroyables capacités d'adaptation	40
e. <i>Escherichia</i> : le micro-organisme modèle.....	42
4. Interactions bactériophage-bactérie .....	44
a. Mécanismes bactériens de résistance aux bactériophages.....	44
b. Dynamiques évolutives bactériophage-bactérie hôte.....	49
c. La résistance aux bactériophages émergeant au cours de la phagothérapie : état de l'art et questions.....	56
Bibliographie de l'introduction.....	59
OBJECTIFS ET PLAN DE THESE .....	71
CHAPITRE 2 - LA RESISTANCE BACTERIENNE AU BACTERIOPHAGE THERAPEUTIQUE : UN FACTEUR D'ECHEC DU TRAITEMENT .....	73
CHAPITRE 3 - ETUDES DES MECANISMES DE RESISTANCE AUX BACTERIOPHAGES AU COURS D'UNE PHAGOTHERAPIE PULMONAIRE .....	105



<b>CHAPITRE 4 - SPECTRE D'HOTES DES BACTERIOPHAGES : DETERMINANTS GENOMIQUES BACTERIENS ET VIRAUX ....</b>	<b>139</b>
<b>CHAPITRE 5 - DISCUSSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE .....</b>	<b>175</b>
<b>1. Résistance bactérienne au bactériophage : leçons pour la phagothérapie. ....</b>	<b>177</b>
<b>a. La résistance comme facteur d'échec thérapeutique.....</b>	<b>177</b>
<b>b. La résistance comme stratégie thérapeutique.....</b>	<b>180</b>
<b>2. Prédire les dynamiques évolutives : enjeux et limites.....</b>	<b>182</b>
<b>3. Des connaissances au service d'une médecine personnalisée .....</b>	<b>183</b>
<b>4. Perspectives : vers des modèles complexes permettant leur généralisation .....</b>	<b>187</b>
<b>Bibliographie de la discussion.....</b>	<b>189</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>195</b>

# LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. GAIN D'ESPERANCE DE VIE ATTRIBUEE A L'UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES ENTRE 1945 ET 1990 .....	13
FIGURE 2. MORTALITE DIRECTEMENT ATTRIBUABLE ET MORTALITE ASSOCIEE A LA RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIMICROBIENS PAR REGION EN 2019. ....	14
FIGURE 3. MORTALITE DIRECTEMENT ATTRIBUABLE ET ASSOCIEE A L'ANTIBIORESISTANCE PAR AGENT PATHOGENE EN 2019.....	16
FIGURE 4. PROGRESSION DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES PAR RAPPORT A L'ANNEE DE REFERENCE 2005 DANS L'UE/EEE. ...	17
FIGURE 5. NOMBRE D'INFECTIONS ET TAUX D'ANTIBIORESISTANCE SELON LE SITE INFECTIEUX ET L'ESPECE BACTERIENNE EN FRANCE EN 2016.....	18
FIGURE 6. POURCENTAGES DES ESPECES BACTERIENNES ET DU TAUX D'ANTIBIORESISTANCE DES ENTEROBACTERIES DANS LES PAVM EN REANIMATION EN FRANCE EN 2017 .....	19
FIGURE 7. PIPELINE DES PROJETS PRECLINIQUES DEVELOPPANT DES STRATEGIES ANTIBACTERIENNES EN 2019 DANS LE MONDE. ....	21
FIGURE 8. CHRONOLOGIE DES DECOUVERTES MAJEURES DANS LA RECHERCHE SUR LES BACTERIOPHAGES .....	23
FIGURE 9. CLASSIFICATION DES BACTERIOPHAGES BASEE SUR LA MORPHOLOGIE ET LE TYPE DE GENOME .....	25
FIGURE 10. STRUCTURES MORPHOLOGIQUES DES TROIS PRINCIPALES FAMILLES DE L'ANCIEN ORDRE DES CAUDOVIRALES. ....	26
FIGURE 11. REPRESENTATION DU RESEAU BIPARTIE DES CAUDOVIRALES SELON LEUR GENOME ET LEURS GENES HOMOLOGUES. ....	27
FIGURE 12. CLASSIFICATION 2022 ICTV DES VIRUS APPARTENANT A LA CLASSE DES CAUDOVIRICETES.....	28
FIGURE 13. RECEPTEURS DES BACTERIOPHAGES AU NIVEAU DE LA MEMBRANE EXTERNE DES BACTERIES.....	30
FIGURE 14. DIFFERENTS CYCLES INFECTIEUX POUVANT ETRE ADOPTES PAR LES BACTERIOPHAGES .....	32
FIGURE 15. DIVERSITE ECOLOGIQUE DE L'ESPECE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	33
FIGURE 16. DIVERSITE GENOMIQUE DE L'ESPECE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	34
FIGURE 17. PRINCIPAUX MECANISMES DU TRANSFERT HORIZONTAL DE GENES, A L'ORIGINE DE LA PLASTICITE DU GENOME CHEZ <i>ESCHERICHIA COLI</i> . ....	35
FIGURE 18. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS COMPOSANTS ET DE LA STRUCTURE DE LA PAROI MEMBRANAIRE D' <i>E. COLI</i> . ....	36
FIGURE 19. ORGANISATION DE L'OPERON WAA ET STRUCTURE HYPOTHETIQUE MOLECULAIRE SELON LE TYPE DE LPS .....	37
FIGURE 20. ORGANISATION DU LOCUS CAPSULAIRE ET STRUCTURE PROTEIQUE DE BIOSYNTHESE DES CPS SELON LE GROUPE CAPSULAIRE .....	38
FIGURE 21. CLASSIFICATION DES SOUCHES D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> SELON LA NICHE ECOLOGIQUE ET LE PATHOTYPE. ....	39
FIGURE 22. ELEMENTS GENETIQUES MOBILES CONTRIBUANT FORTEMENT A L'EVOLUTION VERS LA VIRULENCE .....	41
FIGURE 23. CARACTERISTIQUES GENETIQUES DES EXPEC ET DU PATHOVAR DANS LES PAVM.....	42
FIGURE 24. ILOTS DE PATHOGENICITE ET FACTEURS DE VIRULENCES ARBORES DANS LE GENOME DE LA SOUCHE <i>E. COLI</i> 536 .....	43
FIGURE 25. STRATEGIES BACTERIENNES EMPECHANT L'ADSORPTION DU BACTERIOPHAGE A SA SURFACE .....	45
FIGURE 26 TROIS GRANDS TYPES DE MECANISMES DE DEFENSE ANTIVIRALE DES BACTERIES CIBLANT LES ETAPES DU CYCLE POST-INJECTION DE L'ACIDE NUCLEIQUE DU BACTERIOPHAGE .....	47
FIGURE 27. DEUX MODELES DE DYNAMIQUE DE COEVOLUTION ENTRE UN BACTERIOPHAGE VIRULENT ET SON HOTE BACTERIEN : LA COURSES AUX ARMEMENTS OU LA SELECTION FLUCTANTE DYNAMIQUE. ....	50
FIGURE 28. RESEAU DES INTERACTIONS POSSIBLES BACTERIOPHAGE-BACTERIE MENANT SOIT A LA LYSE DE LA CELLULE BACTERIENNE, SOIT A SA SURVIE. ....	52
FIGURE 29. LE CONCEPT DE LA SYNERGIE IMMUNOPHAGE .....	54
FIGURE 30. LE MICROBIOME RESPIRATOIRE CHEZ L'INDIVIDU SAIN .....	55
FIGURE 31. DEUX PARADIGMES COMPLEMENTAIRES DE PHAGOTHERAPIE : LA PHAGOTHERAPIE PERSONNALISEE ET L'APPROCHE UNIVERSELLE.....	184
FIGURE 32. COMPLEXITE POTENTIELLE D'UN MODELE DE PHAGOTHERAPIE PRENANT PLEINEMENT EN COMPTE LES INTERACTIONS HOTE-PATHOGENE-BACTERIOPHAGE .....	186



## ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
AUC	<i>Aera under the curve</i>
BLSE	$\beta$ -lactamase à spectre étendu
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DNase	Désoxyribonucléase
EOP	<i>Efficiency of plating</i>
EPC	Entérobactérie productrice de carbapénémase
ExPEC	<i>Extra-intestinal pathogenic Escherichia coli</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GBD	<i>Global Burden of Diseases</i>
HGT	<i>Horizontal gene transfer</i>
IAS	Infection associée aux soins
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LR	<i>Logistic regression</i>
MCA	Multiple correspondence analysis
MGE	<i>Mobile genetic element</i>
MGR	<i>Maximum growth rate</i>
MLST	Multilocus sequence typing
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OD	<i>Optical density</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAI	<i>Pathogenicity associated island</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

PAVM	Pneumonies acquises sous ventilation mécanique
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFU	<i>Plaques forming unit</i>
RBP	<i>Receptor Binding Protein</i>
RefSeq	<i>NCBI Reference Sequence Database</i>
RF	<i>Random forest</i>
RM	<i>Restriction-Modification system</i>
RNAse	Ribonucléase
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
SIE	<i>Superinfection exclusion system</i>
SPF	Santé Publique France
ST	<i>Sequence Type</i>
UE/EEE	Union Européenne/Espace Economique Européen
WT	<i>Wild-type</i>

## AVANT-PROPOS

---

La résistance aux antimicrobiens est la capacité d'une bactérie à continuer de croître malgré la présence d'un antibiotique. On distingue les bactéries qui sont naturellement résistantes à certains antimicrobiens (résistance intrinsèque), des bactéries sensibles qui deviennent résistantes à la suite d'une adaptation par changement génétique (résistance acquise). La résistance à un antimicrobien constitue une adaptation de la bactérie à son environnement. Ainsi, toute utilisation d'un antimicrobien induit une pression de sélection sur une population bactérienne qui doit s'adapter pour contrer l'effet de l'agent antimicrobien, au risque, à défaut, de s'éteindre.

---

En tant que médecin, mon parcours professionnel m'a conduit par une série de heureux hasards, de rencontres marquantes et de choix réfléchis, à exercer dans les services de réanimation. Peut-on trouver deux disciplines plus éloignées que la réanimation, un sprint pour déjouer les règles de la biologie au bénéfice du patient, et la recherche en microbiologie, un marathon pour comprendre le monde merveilleux du vivant infiniment petit ?

Les patients hospitalisés dans les services de réanimation sont exposés à un risque élevé de développer des infections associées aux soins (IAS). Autant que la pathologie critique ayant conduit à leur admission, ces infections pèsent lourdement sur leur pronostic et sur la durée de leur séjour hospitalier. La pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) est l'infection nosocomiale la plus grave et la plus fréquente. Les mesures de prévention sont efficaces pour réduire leur incidence : par la diminution des sources de contamination (hygiène des mains des soignants, diminution de la colonisation oropharyngée, réduction du reflux gastro-œsophagien par la position demi-assise), par la réduction du flux de colonisation bactérienne (gonflement d'un ballonnet trachéal) et par la limitation de la durée de ventilation mécanique. Mais en dépit de ces recommandations, la mise en place et le maintien d'une sonde d'intubation orotrachéale, assurant un continuum entre les flores oro-pharyngée, oro-digestive, cutanée d'une part, et le parenchyme pulmonaire d'autre part, aboutit inéluctablement au développement de PAVM.

*Escherichia coli* est devenu un pathogène majeur dans les IAS, et notamment les PAVM. Les souches du phylogroupe B2 sont plus fréquemment impliquées dans les PAVM, grâce à un excellent potentiel adaptatif à l'environnement respiratoire. Elles sont à la fois plus virulentes et plus résistantes aux antibiotiques, avec notamment un développement continu de la multirésistance et de la résistance à des antibiotiques réservés à l'usage hospitalier pour le traitement des infections les plus sévères ou les plus difficiles.

Face à l'antibiorésistance, le seul développement de nouveaux antibiotiques n'est pas suffisant. Des changements de paradigmes et des alternatives thérapeutiques sont développées pour enrayer l'une des plus graves crises écologiques mondiales, menaçant les santés humaine et animale, la sécurité alimentaire planétaire et le développement des sociétés. L'une de ces solutions repose sur l'utilisation thérapeutique des bactériophages, stratégie antibactérienne appelée phagothérapie.

Deux questions fondamentales se posent lors de l'utilisation d'un bactériophage en tant qu'agent antibactérien. Comment sélectionner le meilleur bactériophage thérapeutique ? Et comment s'assurer qu'il reste efficace tout au long du traitement ? Ces questions recourent des concepts biologiques communs, portant sur les interactions entre le bactériophage et la bactérie : les mécanismes de résistance bactérienne au bactériophage, et leurs dynamiques de coévolution au cours du temps. Je présente ici comment, à travers deux axes, nous avons étudié ces interactions bactériophage-bactérie dans une perspective de phagothérapie pulmonaire à l'aide du modèle *E. coli* : par une approche écologique, pour comprendre l'importance relative des déterminants du spectre d'hôtes d'un bactériophage, et par une approche thérapeutique pour caractériser les dynamiques de la phago-résistance au cours d'un traitement par bactériophage.

Le lecteur trouvera en introduction (chapitre 1) une synthèse des connaissances portant sur la crise de l'antibiorésistance, illustrée de chiffres récents sur l'ampleur du problème ; sur la phagothérapie et les notions fondamentales de la biologie des bactériophages, nécessaires à la compréhension du sujet ; et sur la pertinence de l'utilisation du modèle *E. coli*. Il y trouvera également une revue récente de la littérature portant sur la résistance bactérienne aux bactériophages au cours de la phagothérapie, qui fera prochainement l'objet d'une publication (manuscrit en annexe). Cette introduction n'a pas pour but d'être exhaustive mais de donner au lecteur, qu'il soit spécialiste d'un des sujets ou non, les clés pour appréhender les données des travaux scientifiques exposés dans la suite de ce manuscrit.

Ces travaux sont présentés sous la forme de trois chapitres. Ils sont les fruits de quatre années de travail expérimental, d'analyse, et de discussion scientifique.

Dans le chapitre 2, je présente une étude, publiée récemment dans *Cell Reports*, qui souligne les facteurs de réussite d'un traitement par bactériophage, en particulier le contrôle des populations bactériennes résistantes au bactériophage thérapeutique, grâce à une approche combinant des données *in vitro* et *in vivo* dans un modèle mathématique *in silico*. Cette étude a été le sujet principal de la thèse de Raphaëlle Delattre, soutenue le 14/02/2022, intitulée « Etude pharmacométrique expérimentale en phagothérapie : dernière étape avant le redéploiement ? » Ces travaux seront brièvement abordés, du fait de ma participation partielle à l'acquisition des données expérimentales. Cependant, des résultats fondamentaux en découlent et sont directement reliés à la deuxième étude.

Dans le chapitre 3, je présente une étude portant sur les mécanismes de résistance au bactériophage thérapeutique dans le même modèle de pneumonie murine à *E. coli*. Nous y décrivons un parallèle des mécanismes génomiques de résistance bactérienne aux

bactériophages entre des conditions *in vitro* et *in vivo*, mais pas de leur coût sur la virulence bactérienne. Ces résultats ont été soumis pour publication dans la revue mBio.

Enfin le chapitre 4 présente les résultats préliminaires d'une étude, combinant des données phénotypiques et des données génomiques, évaluant les déterminants du spectre d'hôtes d'une collection d'une centaine de bactériophages virulents à l'échelle du genre *Escherichia*. Les résultats présentés ici ne sont que partiels et seront complétés dans les mois à venir avant publication.

L'ensemble de ces résultats sont discutés dans le chapitre 5 qui inclus des perspectives de recherche dans la continuité de ces travaux.

Enfin, ces travaux sont le fruit de collaborations ancienne ou récente avec diverses collègues de trois laboratoires aux expertises complémentaires. La Science en 2022 se crée et se vit de façon collaborative et ouverte.





# **CHAPITRE 1**

-

# **INTRODUCTION**



## 1. La résistance aux antibiotiques : une menace mondiale pour la santé humaine

Depuis leur découverte en 1925, les antibiotiques sont l'un des plus puissants agents connus pour lutter contre les bactéries. Leur utilisation a révolutionné la santé humaine, permettant efficacement de traiter ou de prévenir les infections bactériennes. Bien que précocement soulevé dès 1945 par Alexander Flemming, le problème de l'antibiorésistance est devenu progressivement un des plus gros défis du XXI<sup>ème</sup> siècle.

### a. L'antibiorésistance menace les progrès médicaux réalisés au XX<sup>ème</sup> siècle

L'antibiothérapie a considérablement amélioré le pronostic des infections bactériennes dans la population générale. Entre 1925 et 1960, deux tiers du gain d'espérance de vie (10 ans sur 15) sont dus au recul de la mortalité infectieuse, en grande partie liée au déploiement de l'antibiothérapie (figure 1). Deuxième cause de mortalité avant 1950 en France, les infections bactériennes ne sont aujourd'hui responsables que de 2 % des décès (1). L'antibiothérapie a également permis de diminuer considérablement le risque d'infection du site opératoire (jusqu'à 25% selon le type de chirurgie) (2). Elle a enfin amélioré l'espérance de vie de personnes dont le système immunitaire est affaibli de façon innée, de façon acquise (chimiothérapies, immunosuppresseurs) (3) ou en lien avec des pathologies chroniques (diabétiques, dialysés). L'antibiorésistance compromet à la fois la capacité à soigner les infections courantes et les progrès récents réalisés dans les soins de santé comme les chirurgies prothétiques, les greffes d'organes, les thérapies anti-cancéreuses ou des maladies auto-immunes. Ainsi, la médecine se trouve progressivement désarmée dans la lutte contre des infections causées par des bactéries multirésistantes et fait face à un nombre croissant d'impasses thérapeutiques (4). La résistance aux antibiotiques constitue donc une menace à court et moyen terme pour la santé humaine.

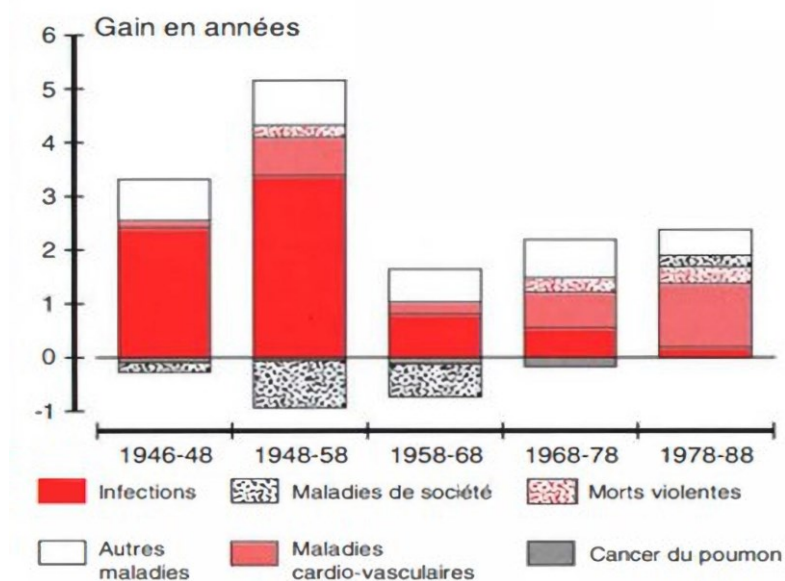
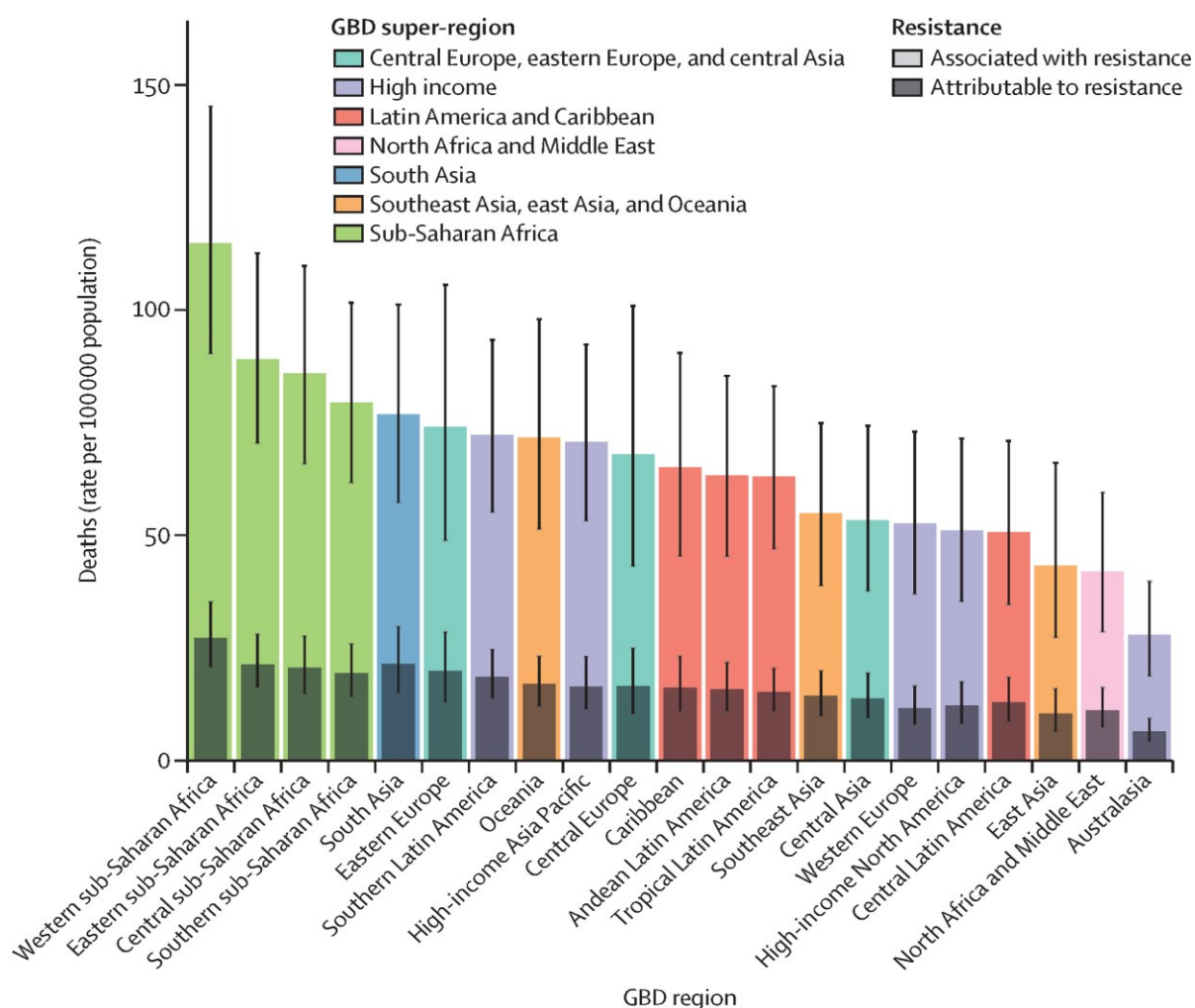


Figure 1. Gain d'espérance de vie attribuée à l'utilisation des antibiotiques (en rouge) entre 1945 et 1990.

Source : Meslé et al. L'évolution de la mortalité par cause : les différentes facettes de la transition épidémiologique. 1997 (1)

## b. L'antibiorésistance constitue une menace d'envergure mondiale

Une analyse inédite de l'impact mondial de la résistance aux antibiotiques estime que les infections liées à des bactéries résistantes aux antibiotiques ont joué un rôle dans le décès de 4,95 millions de personnes dans le monde en 2019. L'antibiorésistance est elle-même directement responsable de 1,27 million de décès (figure 2). Il s'agit de la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires et les cancers, selon la classification *Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study (GBD)* (niveau 2) (5).



**Figure 2. Mortalité directement attribuable et mortalité associée à la résistance bactérienne aux antimicrobiens par région et par superrégion GBD, en 2019.** *GBD: Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study.* Source: Murray et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. 2022 (5)

Si elles impactent plus sévèrement les pays des régions avec l'indice de développement humain le plus faible (Afrique sub-saharienne et Asie du Sud), les infections à bactéries multirésistantes n'épargnent pas les pays les plus développés. Aux Etats-Unis, l'antibiorésistance était responsable de plus de 35 000 décès en 2017 (4). Au sein de l'Union Européenne et de l'Espace Economique Européen (UE/EEE), la résistance aux antibiotiques était déjà responsable en 2007 d'environ 25 000 décès et de 2,5 millions de jours d'hospitalisation supplémentaires (6). Le nombre de décès attribués à l'antibiorésistance a

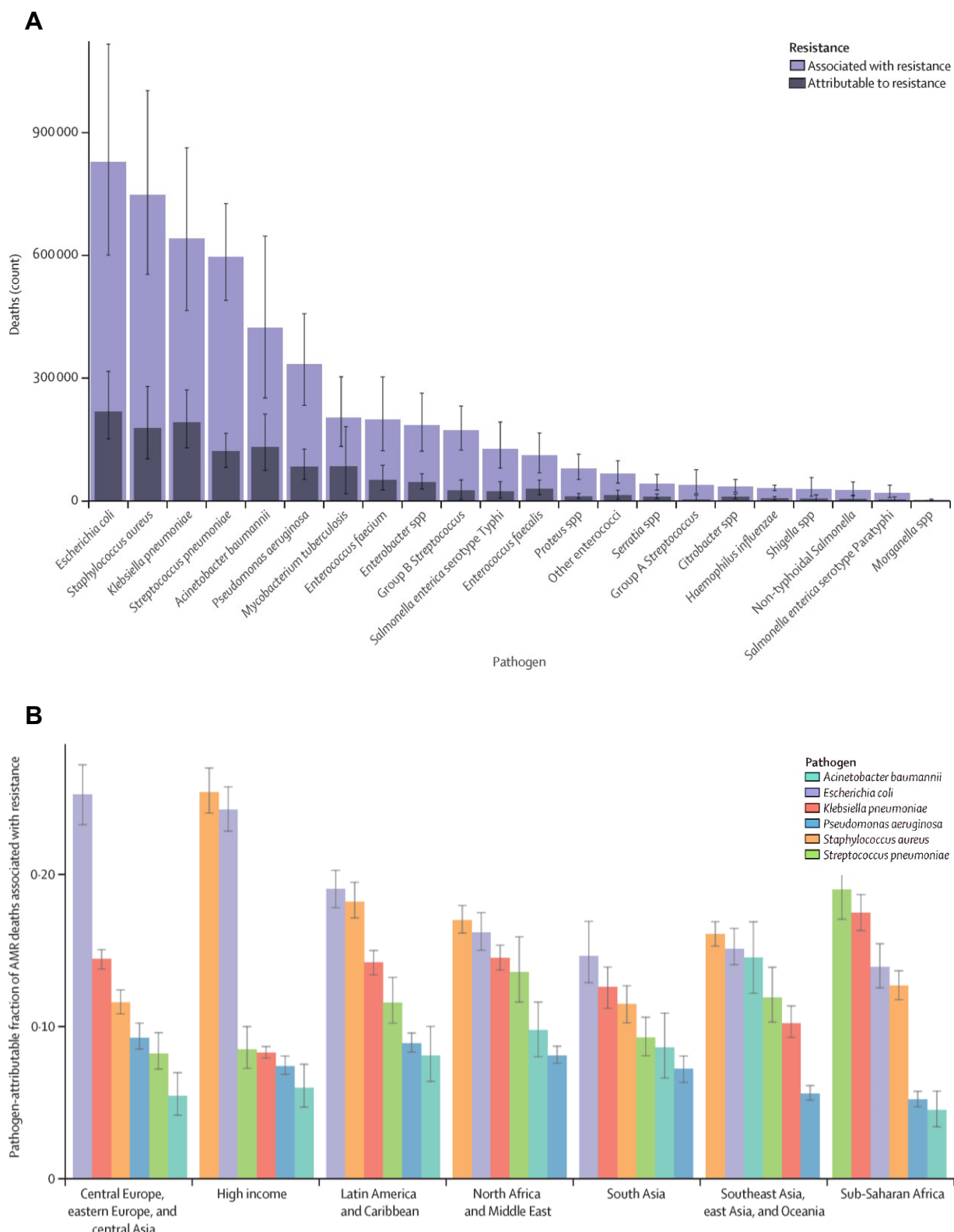
depuis été multiplié par 2,4 (7). Santé Publique France estimait en 2012 la prévalence annuelle à 158 000 infections à bactéries multirésistantes, entraînant 12 500 décès en France (8). Outre l'impact majeur sur la mortalité, l'antibiorésistance augmente fortement la morbidité liée aux infections : délai de guérison accru, augmentation de la durée de séjour hospitalier et altération *in fine* de la qualité de vie des patients. Elle nécessite également de recourir à des antibiotiques de seconde ligne, de troisième ligne, voire de recours.

### c. Espèces bactériennes et sites infectieux : un impact variable

La résistance aux antibiotiques est particulièrement préoccupante pour six espèces bactériennes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*, (mais aussi à moindre degré pour *Enterococcus faecium*). Ces bactéries représentent plus de 70% de la mortalité directe induite par l'antibiorésistance (929 000 décès annuels) (figure 3A). Cependant, même si une forte disparité régionale est observée, les infections résistantes à *E. coli* constituent la première cause (ou co-première avec *S. aureus*) de mortalité associée à l'antibiorésistance, quels que soient les pays, à l'exception de ceux d'Afrique sub-saharienne (figure 3B) (5). Dans les pays de l'UE/EEE, l'antibiorésistance concernait en 2020 majoritairement les espèces *E. coli* (41,3 %), loin devant *S. aureus* (21,9 %) et *K. pneumoniae* (11,9 %) (9).

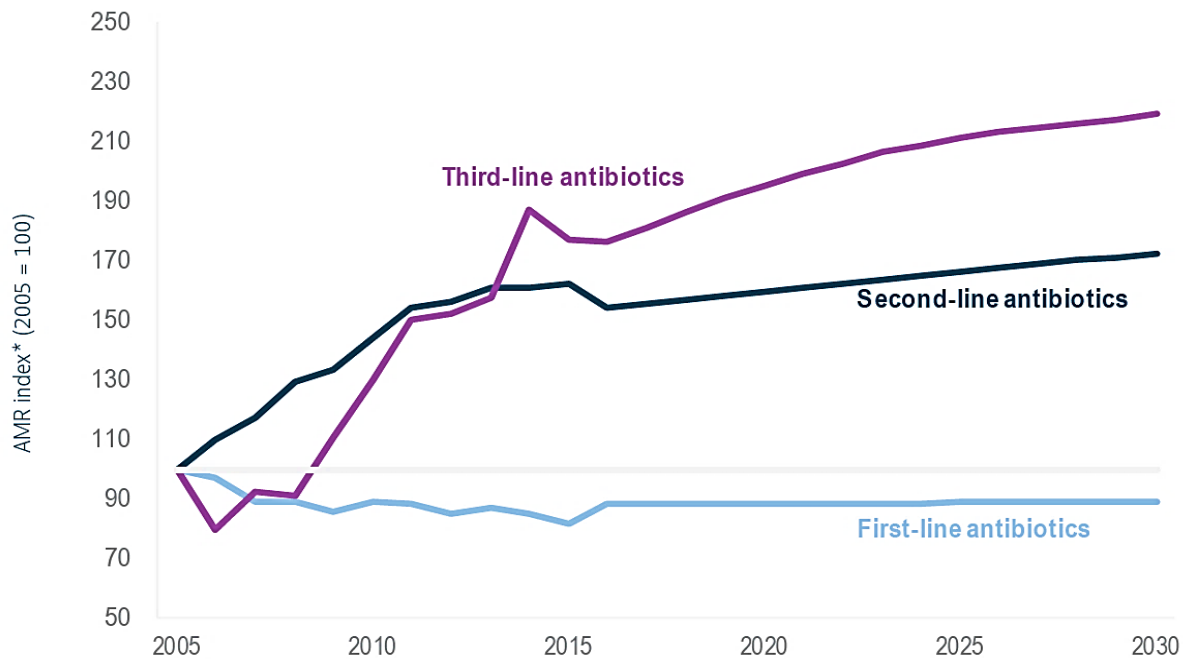
La résistance aux classes d'antibiotiques de première ou de seconde ligne pour le traitement empirique des infections graves représentait 55% de la mortalité attribuable à l'antibiorésistance chez *E. coli* pour les  $\beta$ -lactamines, 25% pour les fluoroquinolones et 5% pour les aminoglycosides (5). Au sein de l'UE/EEE en 2020, plus de la moitié (54%) des souches d'*E. coli* était résistante à au moins un antibiotique d'après le réseau de surveillance EARS-Net. La prévalence de la résistance des souches d'*E. coli* y étaient particulièrement élevée pour les antibiotiques de première intention (55% pour l'aminopénicilline ; 24% pour les fluoroquinolones), importante pour ceux de deuxième intention (15% pour les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) ; 11% pour les aminoglycosides) et rare (0,2%) mais en augmentation pour les carbapénèmes, seuls antibiotiques de recours devant les souches présentant une résistance combinée aux précédentes classes et qui représentent un plus de 5% des isolats (9). La résistance des entérobactéries à ces antibiotiques devrait continuer de croître dans les années à venir (figure 4) (10).

Par ailleurs, trois principaux groupes d'infections représentent à eux seuls plus de 75% de la mortalité mondiale directement attribuable à l'antibiorésistance : les infections respiratoires basses (400 000 décès, 31%), les bactériémies (370 000 décès, 29%), et les infections intra-abdominales (210 000 décès, 17%) (5).



**Figure 3. Mortalité directement attribuable et associée à l'antibiorésistance par agent pathogène au niveau mondial (A) et par région (B) en 2019.**

Source: Murray et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. 2022 (5)



**Figure 4. Progression de la résistance aux antibiotiques** de première ligne (mécilline pour *S. aureus*), de seconde ligne (C3G pour *E. coli* et *K. pneumoniae* ; FQ pour *E.coli*) et de troisième ligne (carbapénèmes pour *K. pneumoniae*) par rapport à l'année de référence 2005 dans l'UE/EEE. AMR index: anti-microbial resistance index. Source : OCDE. Stemming the Superbug Tide: Just a Few Dollars More. 2018 (10)

#### **d. L'antibiorésistance dans les infections respiratoires à Escherichia coli : un problème de santé publique**

##### *i. Infections respiratoires associées aux soins*

*E. coli* était l'agent pathogène le plus souvent documenté, et les infections respiratoires basses le type d'infection le plus fréquemment pris en charge à l'hôpital, en France en 2016. Le taux d'antibiorésistance dans ces deux cas était autour de 12%, proche du taux de résistance moyen, tout site confondu ou toute bactérie confondu (figure 5) (11). L'implication de *E. coli* dans des infections respiratoires multirésistantes associées aux soins n'est donc pas une surprise. *E. coli* représentait ainsi la troisième cause de pneumonie bactérienne en 2018 dans l'hexagone (13 à 14% des isolats). L'antibiorésistance y était préoccupante avec plus de 10% de souches productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendue (BLSE), et un peu moins de 2‰ d'entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC) (12).



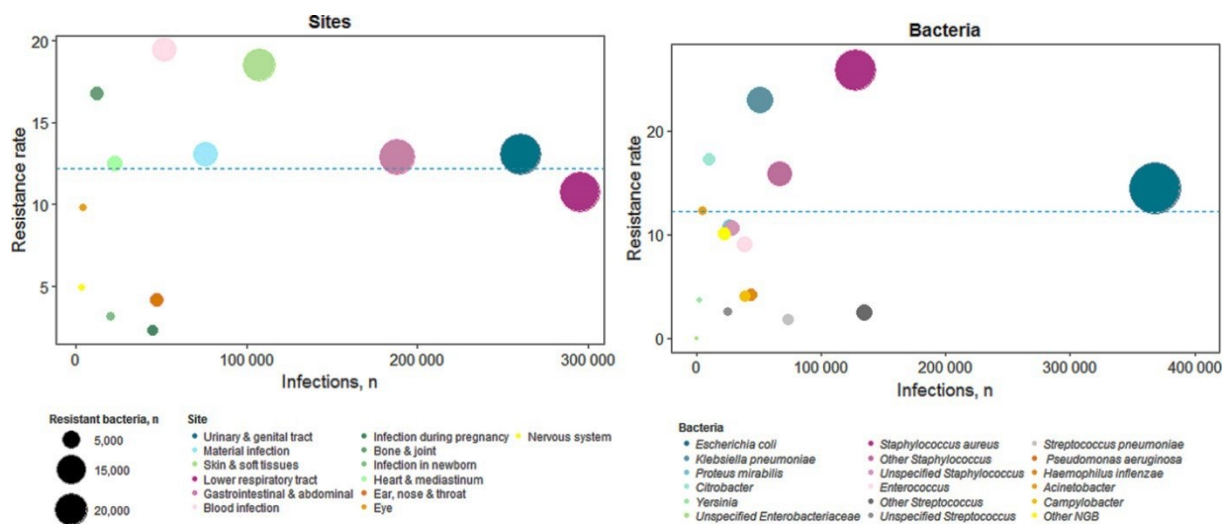


Figure 5. Nombre d'infections et taux d'antibiorésistance selon le site infectieux et l'espèce bactérienne en France en 2016.

Source: Opatowski et al. Hospitalisations with infections related to antimicrobial-resistant bacteria from the French nationwide hospital discharge database, 2016. 2019 (11)

## ii. Le cas particulier des pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) en réanimation

L'admission en réanimation est conditionnée à une défaillance d'un ou plusieurs organes régulant les grandes fonctions vitales (système cardio-vasculaire, respiratoire, rénal, neurologique, hépatique...) et mettant en jeu le pronostic vital du patient à court terme, en l'absence de prise en charge. Celle-ci repose à la fois sur un traitement étiologique et sur la mise en œuvre de techniques de suppléance des fonctions vitales, temporairement, jusqu'à la résolution de la pathologie causale. La mise sous ventilation mécanique est la technique la plus souvent mise en œuvre, que ce soit pour une défaillance respiratoire aiguë (principale cause d'admission en réanimation), ou pour une défaillance neurologique (protection des voies aériennes supérieures au cours du coma) (13, 14).

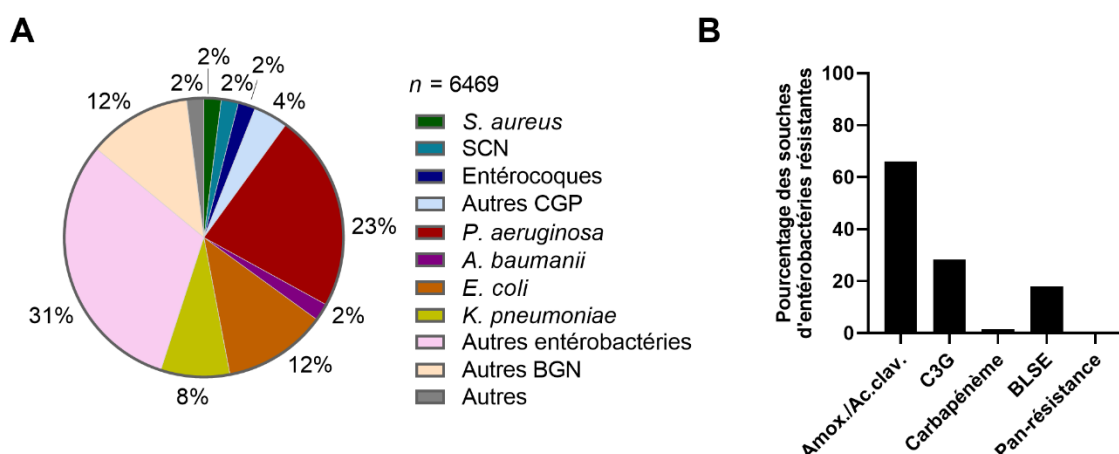
Les patients hospitalisés en réanimation sont donc particulièrement exposés aux infections associées aux soins (IAS) : ils cumulent des facteurs de risque infectieux liés au terrain (immunodépression, diabète, insuffisance rénale chronique dialysée), et une exposition à des dispositifs invasifs (85% à une sonde urinaire ; 63% aux cathéters veineux ou artériels ; 60% à une sonde d'intubation orotrachéale) (15). Ces dispositifs constituent des corps étrangers établissant un continuum entre des niches écologiques bactériennes (flores cutanée, bucco-pharyngée ou digestive du patient, ou du personnel soignant qui les manipule) et des sites anatomiques profonds (circulation sanguine, poumons, vessie). Tous ces dispositifs invasifs sont donc autant de portes d'entrée infectieuse pour une bactérie pathogène. Les PAVM constituent de loin la première cause d'IAS en réanimation.

La PAVM est définie par une infection du parenchyme pulmonaire chez les patients exposés à une ventilation mécanique invasive pendant au moins 48h. Cette IAS affecte entre 5 et 40%

des patients sous ventilation mécanique invasive (16). En Europe, la densité d'incidence rapportée est de 18,3 épisodes de PAVM pour 1000 jours-ventilateur (17) (15,4/1000 en France (15)) et la prévalence est de 6% des patients sous ventilation mécanique (18). Les PAVM sont en outre des infections graves impactant le pronostic du patient. Elles sont en effet associées à la fois à une surmortalité, et à une prolongation de la durée de la ventilation mécanique et du séjour en soins intensifs (17).

*E. coli* est le troisième organisme documenté en termes de fréquence (12%) au cours des PAVM en France par le réseau Réa-Raisin surveillant les IAS en réanimation sur un échantillon représentant près de la moitié des services de réanimation du pays (figure 6A) (15). Alors que les incidences des PAVM à *P. aeruginosa* et à *S. aureus* stagnent, celle des PAVM à entérobactéries progresse (19).

La population hospitalisée en réanimation est également soumise à d'importants facteurs de risque d'antibiorésistance : plus de la moitié d'entre eux a reçu au moins un antibiotique avant l'admission en réanimation, et un peu moins de la moitié était préalablement hospitalisée dans un établissement de santé. Parmi les souches d'entérobactéries isolées au cours d'IAS en France, le niveau d'antibiorésistance aux antibiotiques utilisés dans les infections respiratoires graves est préoccupant : la résistance aux C3G, bien que stable, reste élevée (28,3% en 2017 versus 17,8% en 2004) alors que la prévalence des BLSE progresse (17,9% en 2017 versus 9,9% en 2005). Enfin, 1,5% des souches d'entérobactéries présentent une résistance intermédiaire ou totale aux carbapénèmes (figure 6B) (15). Si les données du réseau Réa-Raisin ne décrivent pas ces résultats par espèce bactérienne ou site infectieux, Santé Publique France retrouvait à la même période une antibiorésistance importante (13% de souches BLSE) dans les infections respiratoires basses à *E. coli* documentées par prélèvement invasif, prélèvement quasi-uniquement réalisé en réanimation chez les patients sous ventilation mécanique invasive (prélèvement respiratoire protégé ou distal) (12).



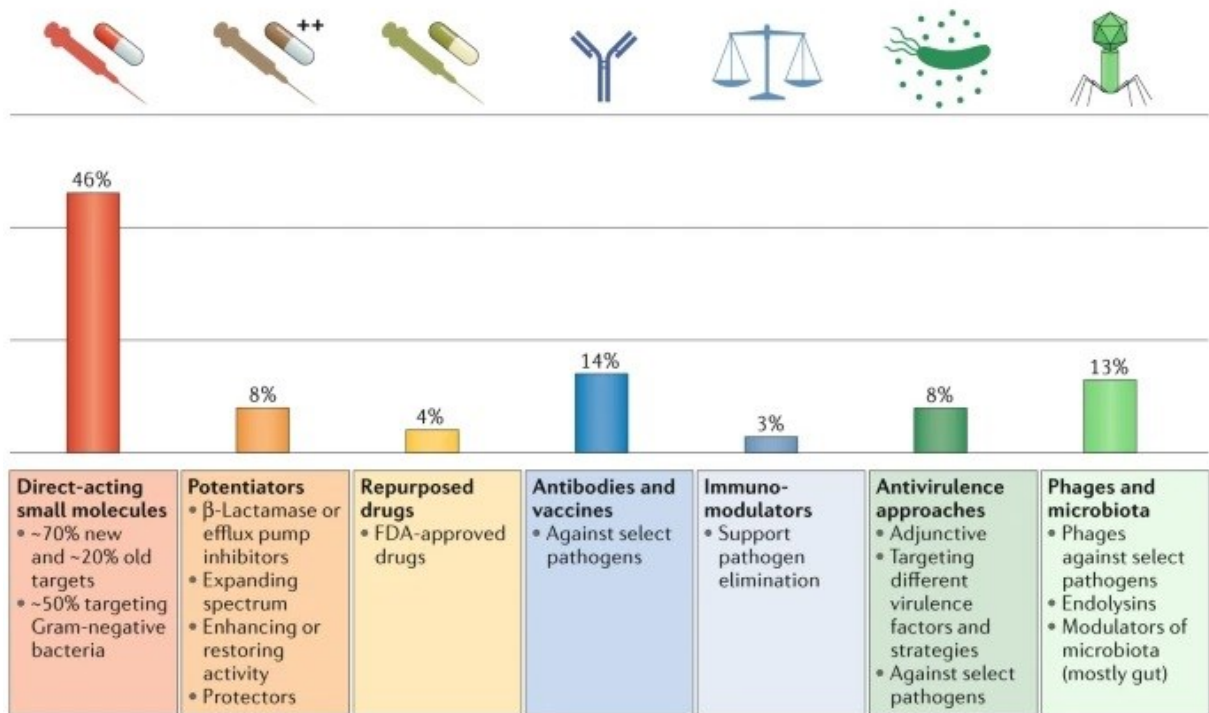
**Figure 6. Pourcentages des espèces bactériennes (A) et du taux d'antibiorésistance des entérobactéries (B) documentés dans les PAVM en réanimation en France en 2017.**

Source : Santé Publique France-Réseau REA-Raisin. Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte. 2017. (15)

### e. Nouveaux paradigmes et alternatives thérapeutiques

Jusqu'au début des années 1990, alors que l'utilité des antibiotiques plus anciens déclinait en raison de la propagation des bactéries résistantes, de nouveaux antibiotiques étaient découverts pour les remplacer (20). Mais depuis 30 ans, le pipeline de développement de nouveaux antibiotiques s'assèche drastiquement. Si l'arrivée de nouveaux antibiotiques sur le marché ces dernières années peut donner le sentiment que des progrès sur l'antibiothérapie se poursuivent, ces nouveaux antibiotiques sont le résultat de découvertes scientifiques qui ont eu lieu il y a des décennies. Par ailleurs, alors que les mécanismes de résistance sont communs au sein de la même classe d'antibiotique, aucune nouvelle classe d'antibiotique découverte depuis 30 ans ne cible les bactéries gram-négatives (21). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) s'est ainsi alarmée que depuis 2017, sur onze nouveaux antibiotiques autorisés par la Food and Drug Administration (FDA) et l'European Medicines Agency (EMA), seuls deux appartenaient à une nouvelle classe chimique (dont un nouvel inhibiteur de  $\beta$ -lactamase). Enfin, sur les 46 nouveaux antibiotiques, en développement en 2020, l'OMS remarquait que la moitié seulement concernait les groupes critiques de bactéries multirésistantes (entérobactéries, *P. aeruginosa* et *A. baumannii*), et seulement deux correspondaient à des médicaments innovants (absence de résistance croisée connue, nouvelle cible, nouveau mode d'action et/ou nouvelle classe) (22).

Dans ce contexte, un nouveau paradigme a émergé au sein de l'écosystème de recherche et de santé pour promouvoir le développement de traitements antibactériens alternatifs à l'antibiothérapie (20, 23). Des approches très diverses sont ainsi proposées. La moitié correspond à des molécules à action directe qui représentent de nouvelles classes, de nouvelles cibles ou de nouveaux mécanismes d'action (petits peptides antibactériens, potentiateur d'antibiotique). D'autres proposent des approches plus innovantes : approche anti-virulence, optimisation de la réponse immunitaire, stratégies de modification du microbiome. Enfin, une idée centenaire est peu à peu réexaminée : l'utilisation de bactériophages (figure 7) (24).



**Figure 7. Pipeline des projets précliniques développant des stratégies antibactériennes en 2019 dans le monde.**  
 Source: Theuretzbacher et al. The global preclinical antibacterial pipeline. 2019 (24)

## 2. Phagothérapie et bactériophages

Les bactériophages sont des virus capables d'infecter spécifiquement les bactéries mais incapables d'infecter les cellules eucaryotes. Leur nom vient du grec ancien « φάγος », mangeur, et « βακτηρία », bâton, venant de la forme bacillaire des premières bactéries observées. Il s'agit d'une traduction littérale de leur capacité à détruire les bactéries, ce qui a permis de les identifier au début du XX<sup>ème</sup> siècle.

### a. Découverte des bactériophages : une histoire liée à leur potentiel thérapeutique

Une découverte scientifique s'apparente davantage à un processus collectif qu'à un événement unique. Si la paternité de la découverte des bactériophages est traditionnellement attribuée à Frederick W. Twort et Félix d'Hérelle, des observations effectuées au cours de la dernière décennie du XIX<sup>ème</sup> siècle, décrivant des phénomènes de lyse bactérienne au contact d'échantillons environnementaux (eaux, filtrats), suggèrent que l'action bactéricide des bactériophages ait été observée bien avant d'être comprise (25).

En 1915, Frederick W. Twort, microbiologiste britannique travaillant à la Brown Institution à Londres, étudie la propagation *in vitro* de « virus filtrables » du matériel vaccinal de la variole. Il observe une « transformation vitreuse » de colonies bactériennes contaminant des boîtes de culture, et décrit également la transmission de ce phénomène sporadique de destruction bactérienne d'une culture atteinte à une culture saine de la même espèce (26, 27).

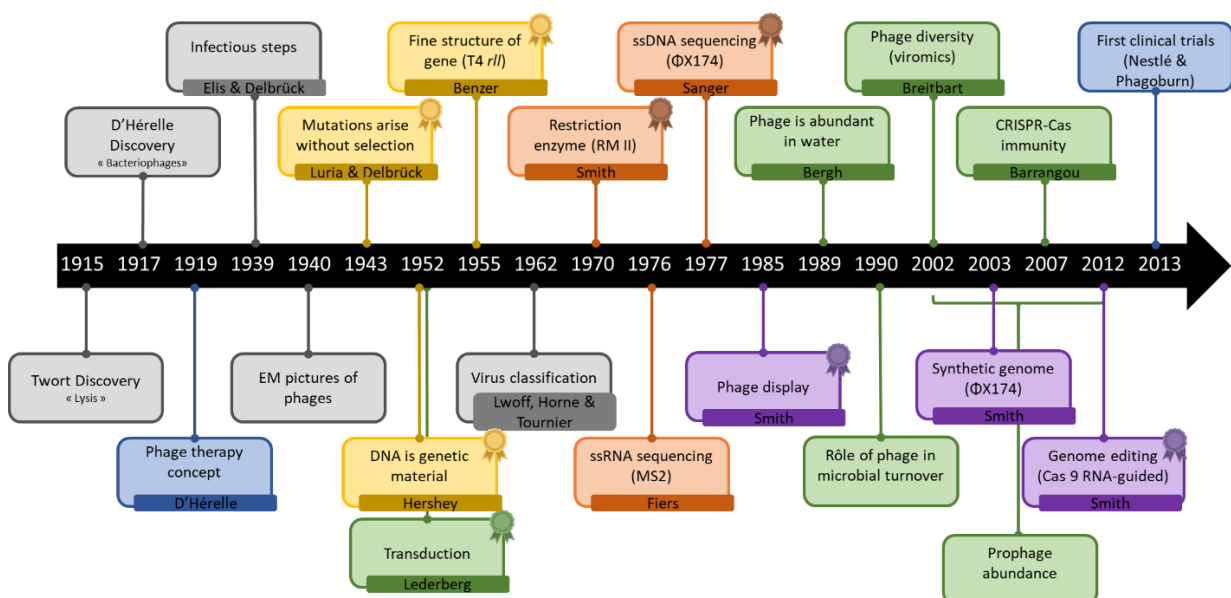
Deux ans plus tard, en 1917 Félix d'Hérelle, microbiologiste franco-canadien travaillant à l'Institut Pasteur à Paris, rapporte la lyse de cultures de bacilles de *Shigella* et la production de taches claires dépourvues de bactéries sur gélose après mise en contact avec un filtrat de selles collectées auprès de patients dysentériques. Il rapporte également la capacité de propager indéfiniment ce phénomène d'une culture à l'autre, même après une forte dilution. Il émet l'hypothèse que ce phénomène était dû à un microbe invisible capable de parasiter le bacille dysentérique. D'Hérelle leur attribua leur nom de bactériophage en raison de leur capacité à tuer les bactéries. Rapidement il développa le moyen de les isoler, de les purifier, et proposa de les utiliser comme agent thérapeutique de certaines maladies infectieuses bactériennes, donnant ainsi naissance à la phagothérapie (26, 28).

Entre 1920 et 1940, de nombreux traitements par bactériophages furent pratiqués pour des infections principalement staphylococciques et streptococciques, chirurgicales ou cutanées, mais aussi pour des infections intestinales, génitales, rhinopharyngées ou respiratoires. La phagothérapie a ainsi eu un succès grandissant dans le monde entier puisqu'elle promettait la guérison d'infections jusque-là souvent mortelles, avec cependant plus ou moins de réussite (29).

## b. Phagothérapie : un regain d'intérêt lié à la crise de l'antibiorésistance

Après des débuts prometteurs, la phagothérapie a été rapidement délaissée au profit de l'antibiothérapie au tournant de la seconde guerre mondiale. Les raisons de son abandon furent multiples : les bactériophages étaient moins faciles d'emploi du fait d'une moindre stabilité du produit et d'un spectre antibactérien plus étroit ; ils apparaissaient également moins efficaces en comparaison des antibiotiques, notamment à cause d'une mauvaise compréhension du mode d'action et à un usage sans méthodologie rigoureuse. Peu à peu abandonnée en Occident, la phagothérapie resta utilisée dans les pays d'Europe de l'Est tant en Pologne à l'Institut Ludwik Hirszfeld à Wroclaw, qu'en Géorgie à l'Institut Elavia à Tbilissi (29).

Depuis une vingtaine d'année, face à la crise de l'antibiorésistance, l'utilisation thérapeutique de bactériophages en médecine humaine connaît un regain d'intérêt. Cependant, son déploiement est limité par des données anciennes ou parcellaires issues des instituts polonais ou géorgiens et ne correspondant pas aux normes exigées de nos jours par les autorités de santé. Fort des connaissances accumulées sur la biologie des bactériophages (figure 8), la phagothérapie est actuellement repensée afin de ne pas s'exposer à de nouveaux échecs. Ainsi, depuis une dizaine d'années, l'efficacité et l'innocuité de la phagothérapie ont pu être démontrées dans de nombreux modèles expérimentaux. Sa transposition en médecine humaine prend peu à peu de l'ampleur : d'une utilisation exceptionnelle dans un cadre compassionnel pour le traitement d'infections à bactéries toto-résistantes, on se dirige, lentement, vers le développement d'essais cliniques (30, 31).



**Figure 8. Chronologie des découvertes majeures dans la recherche sur les bactériophages** dans les domaines de : la biologie des bactériophages (gris), de la génétique (jaune), de la biologie moléculaire (orange), de l'écologie (vert), des biotechnologies (violet) et de la thérapie (bleu). Plusieurs de ces découvertes ont été distinguées par un Prix Nobel (médailles). EM : *electronic microscopy* ; ssRNA/DNA : *single strain RNA/DNA*. Adapté de Salmond et al. A century of the phage: past, present and future. 2015 (32)

### c. Caractéristiques désirées chez les bactériophages utilisés en thérapeutique

Si la phagothérapie est une solution prometteuse, elle ne constitue pas une stratégie thérapeutique alternative miracle. Afin de ne pas répéter certaines des erreurs commises avec les antibiotiques, il est important de définir les caractéristiques qui font d'un bactériophage un bon candidat pour une utilisation thérapeutique.

Le candidat idéal serait un bactériophage spécifique de la bactérie ciblée, virulent et n'exposant pas à un risque pour la santé humaine ou pour l'environnement. La caractéristique la plus importante est ainsi la sélection de bactériophages adoptant exclusivement un cycle lytique. Les bactériophages tempérés et les bactériophages encodant des gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques dans leur génome sont à exclure afin de prévenir une dissémination de ce type d'information vers d'autres bactéries. Enfin, une spécificité du spectre, bien plus étroite par nature que pour les antibiotiques, est souhaitable, et s'inscrit dans la tendance à une approche plus personnalisée des stratégies thérapeutiques, et moins délétère pour les microbiotes (33).

L'ensemble de ces traits est étroitement lié au mode de vie que peut adopter le bactériophage au cours de l'infection de son hôte bactérien. Nous discuterons ici de mécanismes propres aux bactériophages à queue représentant l'immense majorité des bactériophages utilisés en thérapeutique.

### d. Classification des bactériophages

La classification des bactériophages est un domaine en évolution constante : au cours des décennies, différentes classifications se sont succédées : basées initialement sur la morphologie virale en microscopie électronique et le type d'acide nucléique, la classification actuelle par l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) se base sur leur proximité génomique (34).

#### i. Une classification historique reflétant la diversité morphologique

Le matériel génétique des bactériophages est composé soit d'ADN soit d'ARN, pouvant être double brin ou simple brin. Ce matériel génétique est empaqueté dans une capsid de structure variable : polyédrique, filamenteuse, pléomorphe ou reliée à une queue (figure 9) (35).

La grande majorité des bactériophages isolés à ce jour appartiennent à l'ordre (très récemment révoqué) des *Caudovirales* (>95%) (36). Leur structure commune comprend :

- Une capsid (*head*) icosaédrique constituée par l'assemblage répété de sous-unités protéiques (capsomères), parfois allongée et perdant ainsi sa symétrie, et qui contient le génome viral codé par une molécule d'ADN double brin ;
- Une structure de connexion (*connector* ou *portal-complex*), anneau dodécamère permettant l'attache de la queue sur la tête

- Une queue (*tail*) formée par une structure tubulaire protéique en hélice, et permettant le transit de l'ADN lors de son injection dans le cytoplasme bactérien ;
- Et de fibres caudales (*fibers* ou *spikes*) et/ou d'une ou plusieurs plaques de base (*base-plate*), permettant l'interaction du bactériophage (*Receptor Binding Protein (RBP)*) avec les récepteurs spécifiques de l'hôte bactérien.

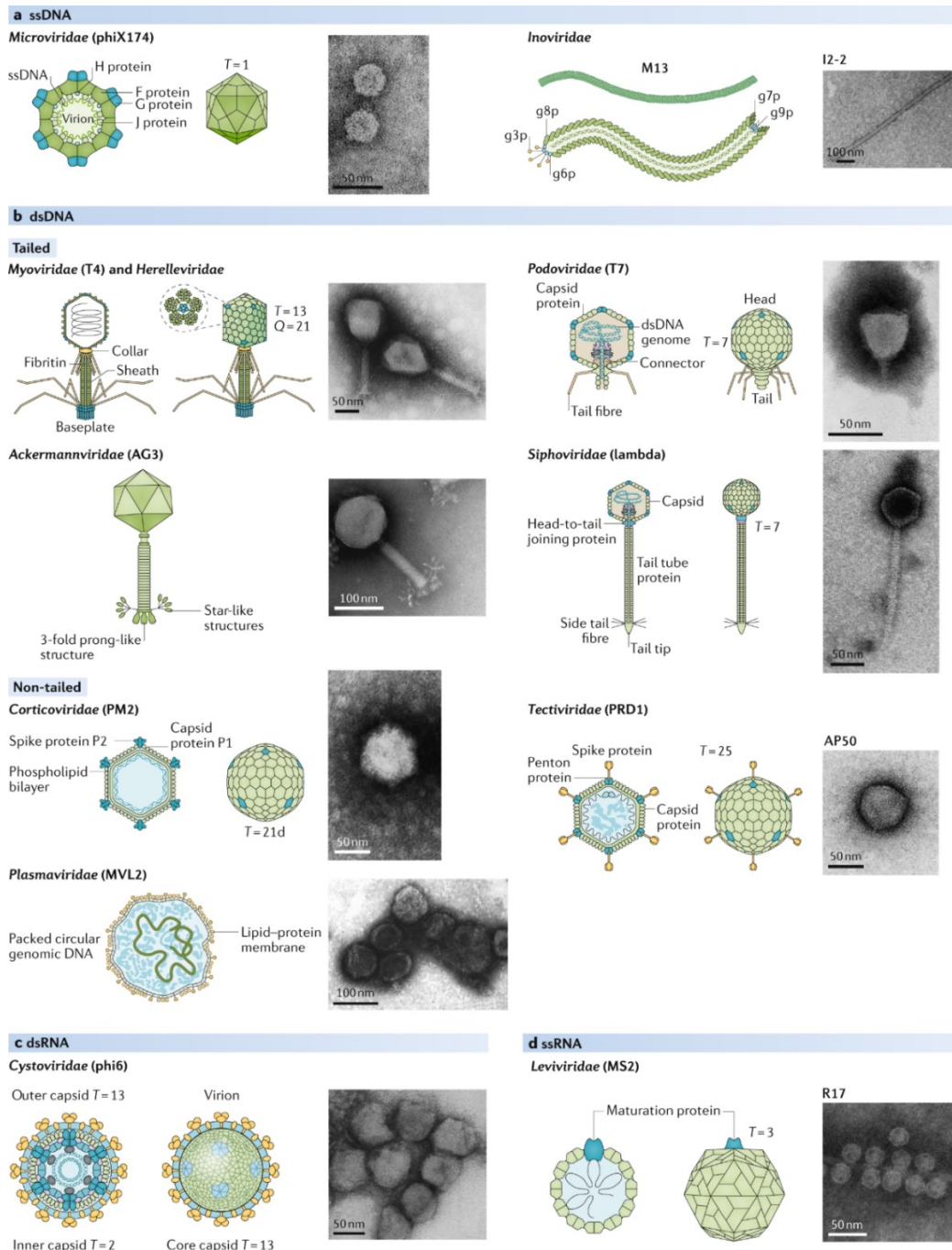
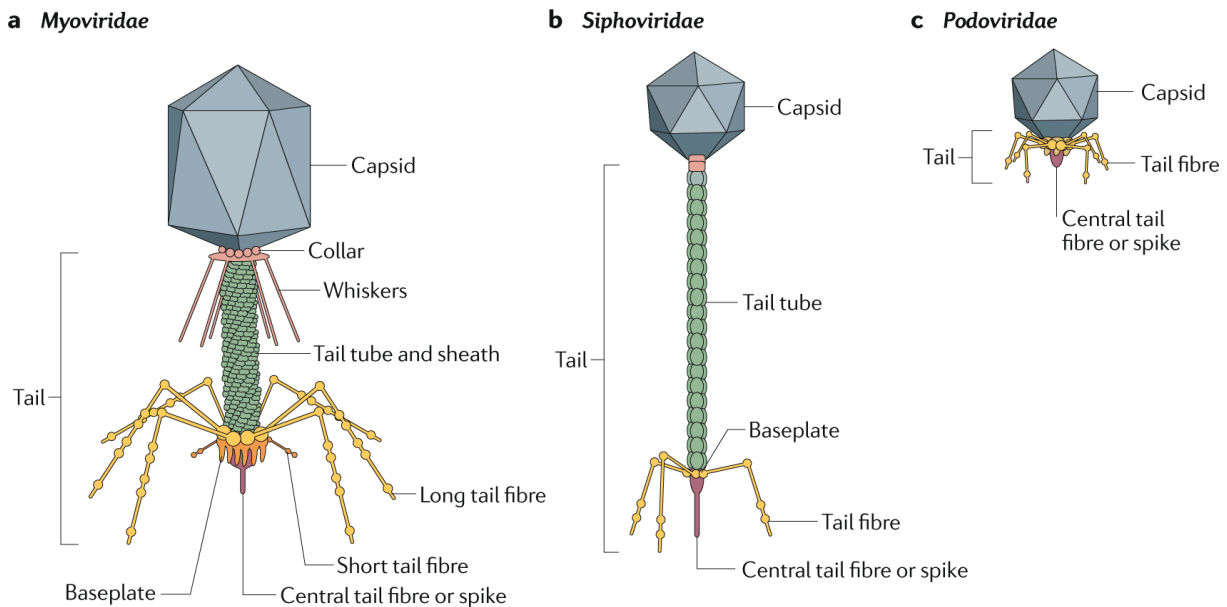


Figure 9. Classification des bactériophages basée sur la morphologie et le type de génome.

Source : Dion et al. Phage diversity, genomics and phylogeny. 2020 (38)



Historiquement, selon la taille et le caractère contractile de la queue, trois familles de *Caudovirales* étaient décrites : les *Podoviridae* (queue courte non contractile), les *Myoviridae* (queue longue contractile) et les *Siphoviridae* (queue longue flexible et non contractile) (figure 10) (37).



**Figure 10. Structures morphologiques des trois principales familles de l'ancien ordre des *Caudovirales*.**  
Source: Nobrega et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. 2018 (39)

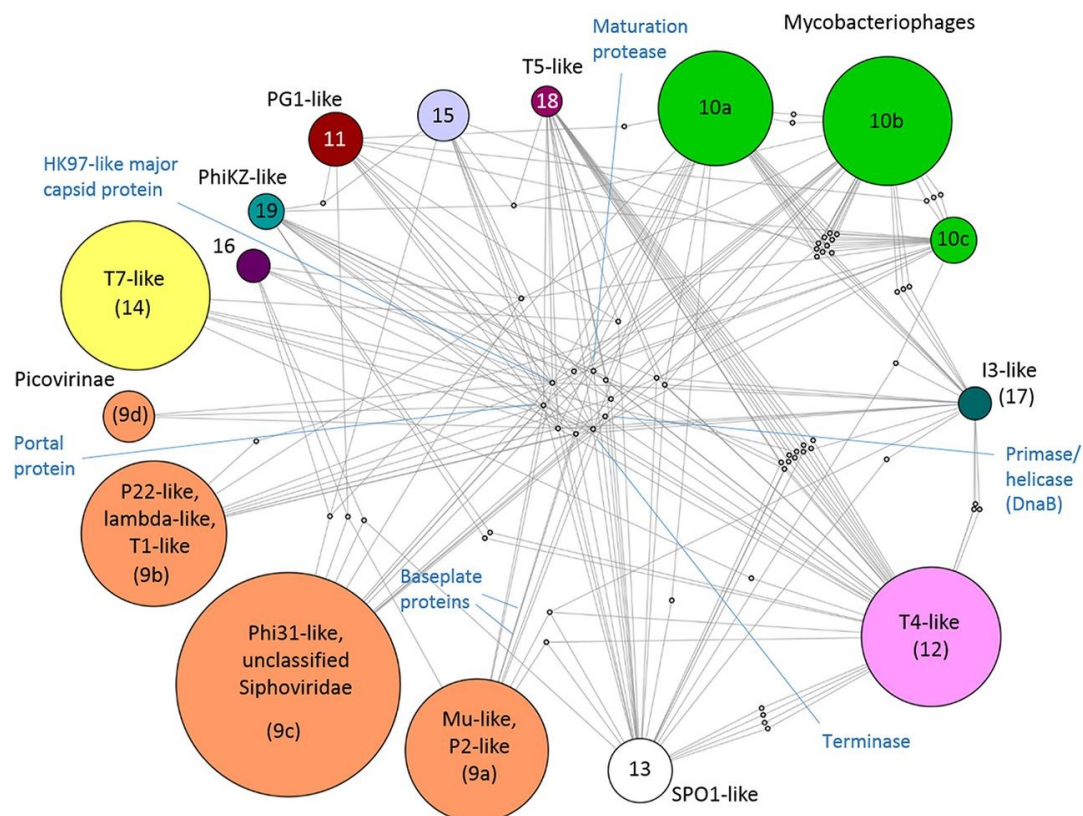
## ii. Nouvelle taxonomie : vers une monophylie familiale

La classification morphologique des bactériophages à queue échoue à représenter l'évolution complexe des bactériophages. Son caractère paraphylétique est devenu davantage prégnant au fur et à mesure de la découverte de nouveaux bactériophages (liée à l'intérêt grandissant pour l'utilisation des bactériophages et à l'exploration des microbiomes) et des progrès en génomique et en bio-informatique (40, 41).

Les bactériophages appartiennent pour l'immense majorité à la classe I de la classification de Baltimore des virus à ADN double brin. Leurs gènes sont souvent organisés en modules fonctionnels regroupant spatialement et sous la régulation d'un promoteur commun les gènes codant pour des protéines assurant un même processus fonctionnel. Ces grandes fonctions essentielles au cycle viral sont largement partagées par l'ensemble des bactériophages : réplication, transcription, assemblage de la capsid, de la queue et de la structure de connexion, ainsi que des modules de lyse cellulaire (et moins systématiquement de lysogénie).

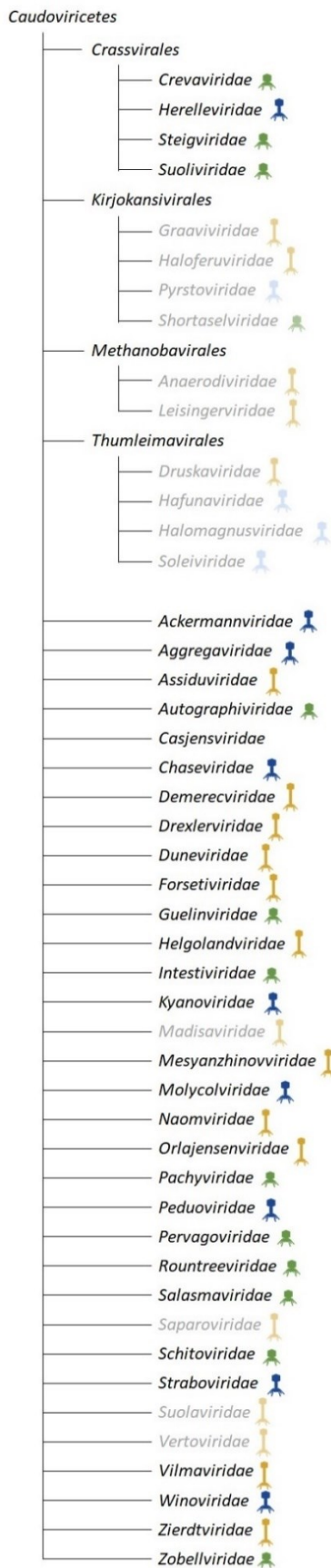
Les *Caudovirales* ont cette particularité d'être un ensemble viral homogène partageant des gènes communs codant pour des protéines majeures de capsid de type HK97 et pour une partie de leur système d'empaquetage de l'ADN (ATPase-nucléase) (42). Ils présentent ainsi une grande capacité de codage stockée dans un minimum de place grâce à un système d'empaquetage à haute densité de l'ADN au sein d'une capsid de même structure (43). Les

*Caudovirales* partagent aussi majoritairement d'autres gènes-core (protéine porte, protéase de maturation et ADN primase-hélicase de la famille DnaB) (42). De façon remarquable, les bactériophages à queue présentent également l'une des plus importantes diversités génomiques de la virosphère, que ce soit par leur taille (de 10kb jusqu'à 500kb) ou par leur contenu (35). Iranzo et al. ont montré l'absence de recoupement entre les familles de bactériophages précédemment établies et des groupes de bactériophages génomiquement homologues (figure 11) (42). Ainsi, les *Caudovirales* constituent un groupe hautement cohésif ayant hérité de quelques gènes caractéristiques au sein duquel on distingue des groupes de bactériophages, partageant de façon compartimentée un ensemble distinctif de gènes-core.



**Figure 11. Représentation du réseau bipartite des *Caudovirales* selon leur génome et leurs gènes homologues.**  
Source: Iranzo et al. The Double-Stranded DNA Virosphere as a Modular Hierarchical Network of Gene Sharing. 2018 (42)

Ainsi depuis 2018, les *Caudovirales* ont été progressivement séparés en familles monophylétiques, appartenant toutes à la classe des *Caudoviricetes*, supprimant au passage l'ordre des *Caudovirales* (44–46). Cette nouvelle taxonomie de l'ICTV a pour objectif de mieux refléter l'évolution virale : le niveau familial (47 familles en 2022, figure 12) constitue ainsi l'unité génomique en terme de diversité. Elle est amenée à continuer d'évoluer dans les années à venir : près de 37 sous-familles et 493 genres n'appartiennent à aucune famille en 2022. Elle vise à s'intégrer en complément de la classification historique distinguant les bactériophages par la morphologie de leur queue.



**Figure 12. Classification 2022 ICTV des virus appartenant à la classe des *Caudoviricetes* (4 genres et 47 familles) et morphotypes correspondants (podophage en vert, myophage en bleu, siphophage en jaune). Les familles en gris correspondent à des virus d'archée à queue. D'après (46).**

## e. Cycles infectieux des bactériophages

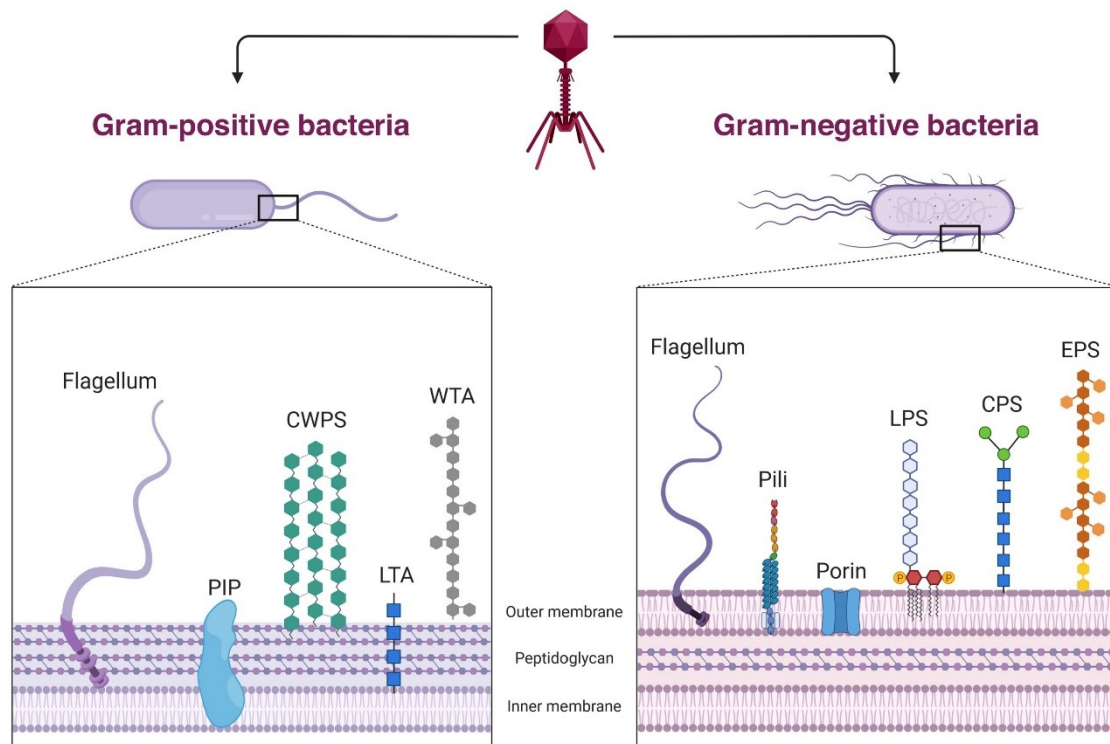
### i. Adsorption du bactériophage à la surface

L'infection par un bactériophage débute par une première étape commune : l'adsorption du bactériophage à la surface de la bactérie hôte. Au cours de cette étape, le bactériophage reconnaît un ou plusieurs composants spécifiques à l'hôte situé au niveau de la paroi cellulaire.

Les bactériophages interagissent avec des composants spécifiques situés à la surface de la cellule bactérienne par le biais de protéines de liaison aux récepteurs (RBP), qui émanent de la queue. Les RBP peuvent être classées en trois catégories : les fibres de queue, les protéines de pointe de queue et les protéines de pénétration de la membrane. Les fibres de queue sont de longues protéines, possédant à leur extrémité des domaines de liaison aux récepteurs bactériens d'une grande diversité, et sont dépourvues d'activité enzymatique. Les protéines de pointe de queue sont des protéines plus courtes, également caractérisées par une grande variabilité des domaines de liaison aux récepteurs bactériens. Elles ont généralement également une activité enzymatique envers un composant de la paroi bactérienne : enzymes dégradant le peptidoglycane (endopeptidases, N-acétylmuramyl-L-alanine amidases, N-acétylglycosaminidase, lysozymes, transglycosylases lytiques) ou d'autres sucres de surface comme les capsules polysaccharidiques (endoglycosidases, endosialidases, etc.). Enfin les protéines de pénétration de la membrane sont des protéines permettant à la queue de traverser la paroi cellulaire (membrane externe et probablement membrane interne même si peu de choses sont connues pour le franchissement de cette dernière) (39).

L'adsorption des bactériophages comprend trois étapes : le contact initial, une liaison réversible et enfin la fixation irréversible (47). Certains RBP dits RBP primaires (souvent des fibres de queue) se lient dans un premier temps à des composants de la paroi bactérienne afin de maintenir le bactériophage proche de la surface jusqu'à sa fixation à son récepteur définitif. Cette liaison est faible et donc non définitive autorisant une désorption du bactériophage (48). Elle est suivie d'une fixation spécifique et irréversible de RBP dits secondaires à un composant de la membrane externe de la bactérie. La liaison du bactériophage déclenche des changements conformationnels, transmis au connecteur permettant son ouverture et la libération du génome viral en dehors de la capsid (49).

Les RBP interagissent avec une variété de récepteurs situés au niveau de la membrane externe de la bactérie : protéines de la membrane externe, lipopolysaccharides (LPS), acides teichoïques, polysaccharides capsulaires et certains organites (*flagelles*, *fimbriae*, *pili*) (figure 13) (50).



**Figure 13. Récepteurs des bactériophages au niveau de la membrane externe des bactéries.**

*PIP* : phage infection proteins; *CWPS* : cell wall polysaccharide; *LTA* : lipoteichoic acid; *WTA* : wall-teichoic acid ; *LPS* : lipopolysaccharide ; *CPS* : capsular polysaccharide ; *EPS* : exopolysaccharide.

Source: Shen and Loessner. Beyond antibacterials – exploring bacteriophages as antivirulence agents. 2021. (51)

## ii. Différents modes de vie des bactériophages

Les bactériophages peuvent ensuite adopter différentes stratégies d'infection, dépendant à la fois des acteurs enzymatiques encodés dans leur génome et de l'état métabolique de l'hôte bactérien. Quatre cycles infectieux sont ainsi décrits dans la littérature. La plupart des bactériophages suivent des cycles lytiques ou lysogéniques. Plus rarement, certains bactériophages suivent des cycles dits pseudo-lysogéniques ou des cycles d'infection chronique (figure 14).

Dans un cycle lytique, le bactériophage détourne la machinerie cellulaire et les ressources de l'hôte pour la réplication de son génome, la production de protéines structurales et leurs assemblages en de nouveaux virions. Ceux-ci sont libérés dans l'environnement après la lyse cellulaire provoquée par la déstabilisation membranaire sous l'action de protéines encodées par le bactériophage (holines, endolysines). Les bactériophages adoptant un cycle strictement lytique sont dénommés bactériophages virulents (52).

Les bactériophages tempérés ont, quant à eux, la capacité supplémentaire de pouvoir entrer dans un cycle lysogénique. Le génome du bactériophage s'intègre alors dans le chromosome de l'hôte bactérien (il prend le nom de prophage) et se réplique de façon synchrone avec le chromosome bactérien. Il est ainsi transmis à la descendance bactérienne qualifiée de lysogène. Certains bactériophages tempérés (P1 ou N15) peuvent également persister sous forme d'épisomes (plasmides circulaires ou linéaires à faible nombre de copies) dans le cytosol

bactérien. Spontanément ou à la suite de signaux environnementaux de stress, un bactériophage tempéré peut sortir de sa phase de latence : le prophage est excisé et entre dans un cycle lytique, aboutissant à la libération de nouvelles particules virales (53).

Certains bactériophages suivent un cycle infectieux chronique et faiblement productif. Dans ce mode de vie, l'hôte bactérien n'est pas lysé lors de la libération des virions nouvellement formés : les particules virales sont assemblées à proximité de la membrane puis excrétées à travers celle-ci par bourgeonnement ou extrusion. De plus, les cellules infectées sont peu affectées par cette infection chronique : elles continuent à se diviser, transmettant également les virions à leur descendance. Les exemples d'infection chronique les mieux étudiés concernent des bactériophages filamenteux (M13) (53, 54).

Certains bactériophages à ARN (Phi6 ou LeviOr01) suivent une stratégie proche : ils entrent dans un mode de vie d'infection chronique mais non productif. Les particules virales sont produites et accumulées dans le cytoplasme de la cellule hôte sans libération dans le milieu extracellulaire, aboutissant à un portage chronique transmis uniquement à la descendance (53, 55, 56).

Enfin, au cours de la pseudo-lysogénie, le génome du bactériophage semble inactif dans le cytosol bactérien : il est non intégré au chromosome de l'hôte et n'est donc pas répliqué. Il est ainsi transmis de manière asymétrique aux cellules filles lors de la division cellulaire. La pseudo-lysogénie pourrait correspondre à un blocage dans le développement du bactériophage au cours de cycles lytiques ou lysogéniques, en particulier en réponse à une situation de pénurie de nutriments pour l'hôte (53, 57, 58).

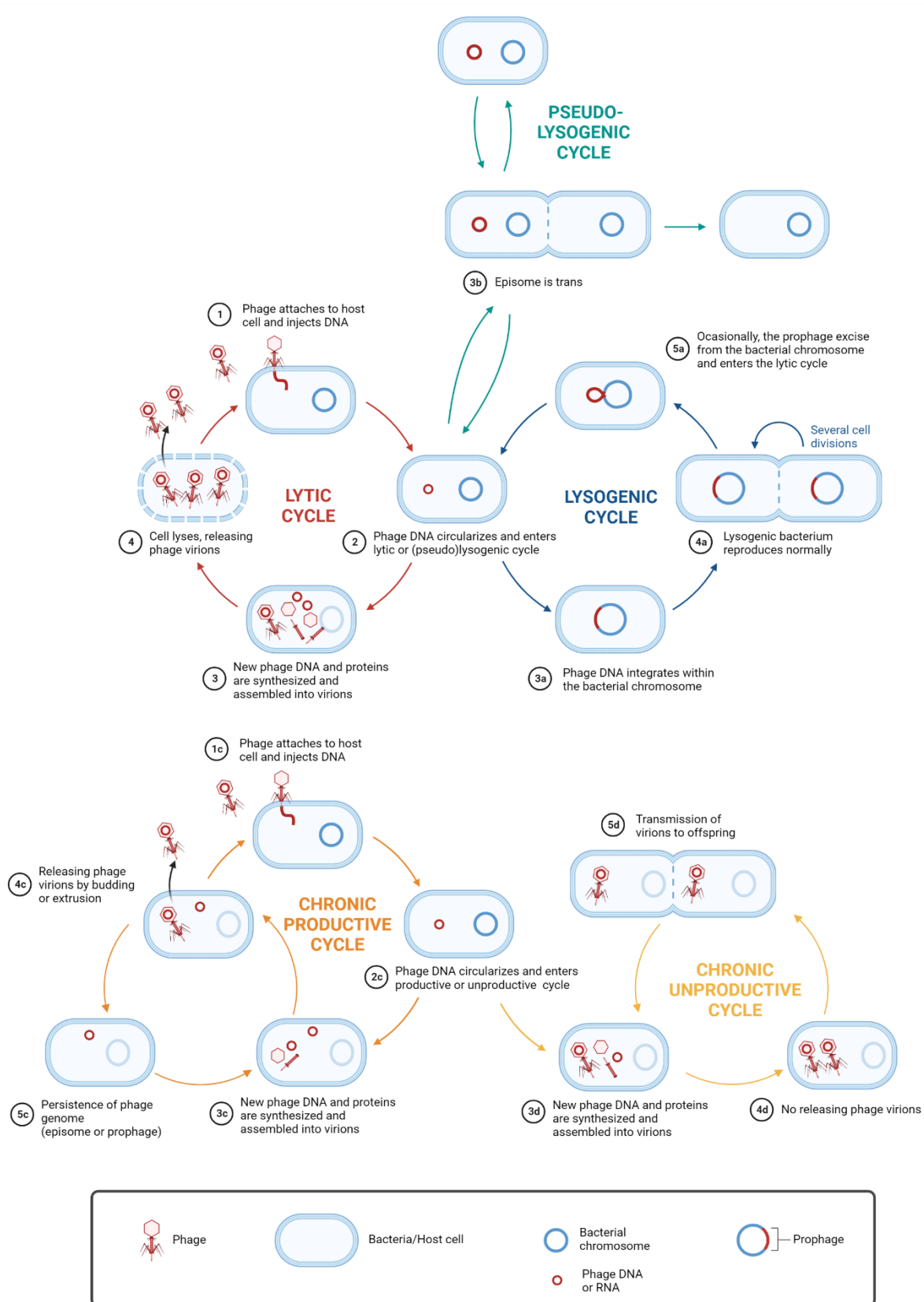
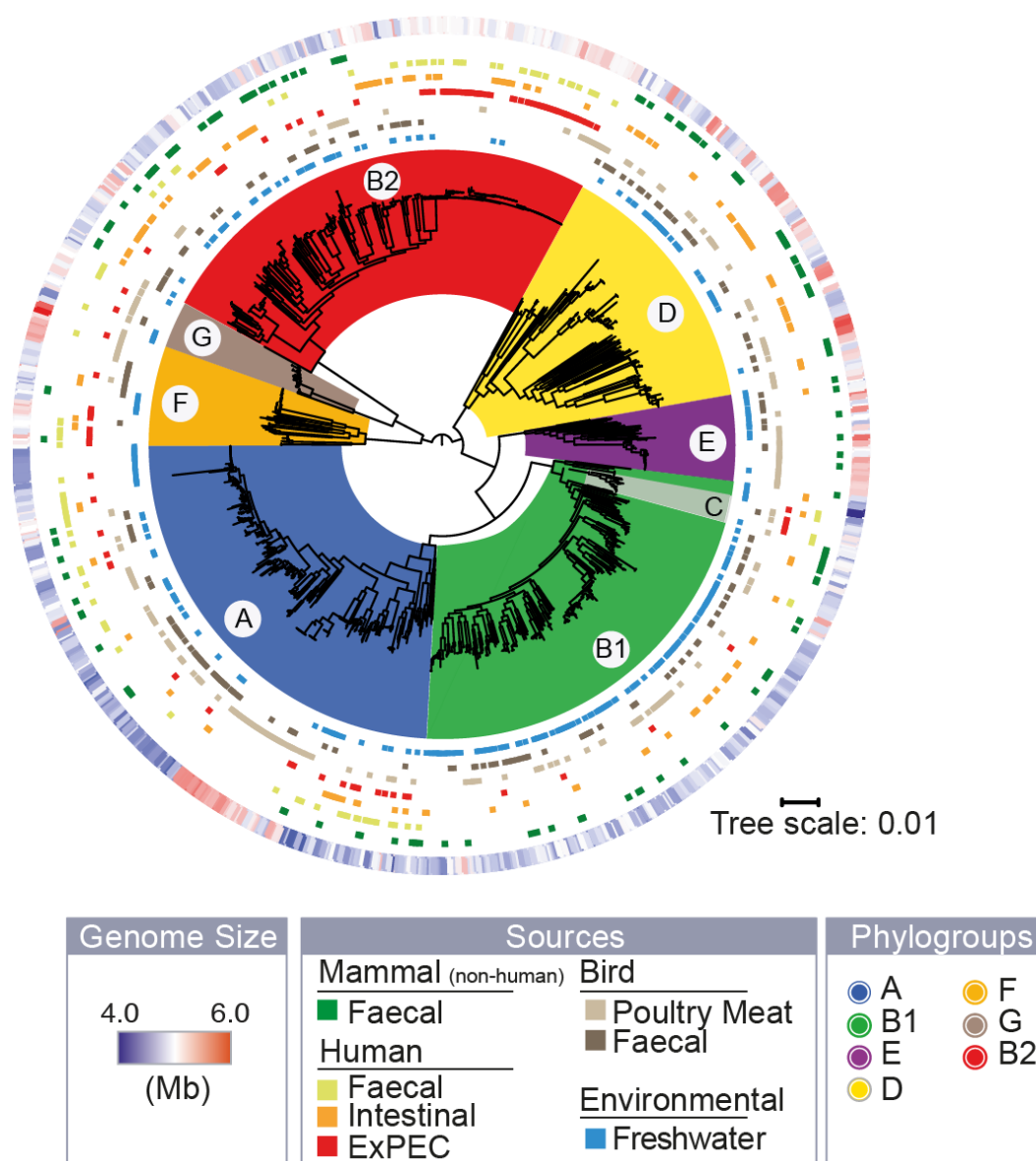


Figure 14. Différents cycles infectieux pouvant être adoptés par les bactériophages. D'après (53).  
Créée avec BioRender.com

### 3. *Escherichia* : un modèle écologique et pathogénique

*E. coli* est une bactérie, bacille à Gram négatif non sporulant, colonisant les intestins et les fèces des animaux à sang chaud (59). *E. coli* est également abondamment retrouvée dans l'eau et les sédiments qui constituent son habitat secondaire (60–62). L'espèce *E. coli* est enfin responsable d'un grand nombre de pathologies infectieuses. Elle arbore une grande capacité d'adaptation phénotypique et métabolique afin de s'acclimater à ces différents habitats, dont les conditions physico-chimiques et les sources de nutriments varient grandement. Ce polymorphisme (figure 15) est possible grâce à une extraordinaire plasticité génomique, et est mis à profit pour osciller entre mutualisme, commensalisme et pathogénie opportuniste voire pathogénie spécialisée.



**Figure 15. Diversité écologique de l'espèce *Escherichia coli***, illustrée à partir de 1294 isolats d'hôtes vertébrés humains et non humains et d'échantillons environnementaux collectés entre 1993 et 2015.

Source: Touchon et al. Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. 2020 (63)



## a. Plasticité génomique : un avantage clé dans l'adaptation

### i. Core-génome et pan-génome

Le génome d'*E. coli* est composé d'un chromosome circulaire, et souvent, de plasmides, encodant entre 3900 et 5800 gènes pour une taille comprise entre 4,2 et 6Mb (63). Le pan-génome (ensemble des gènes connus de l'espèce) correspond à un répertoire potentiel de gènes pour l'espèce, dans lequel les souches peuvent y acquérir ou y déposer de nouveaux gènes au fur et à mesure de leur évolution génomique. Il est estimé entre 15 000 gènes (64, 65) et plus de 75 000 gènes selon le nombre de génomes analysés (63). L'ensemble des souches d'*E. coli* partage seulement un peu plus de 2 000 gènes en commun qui forment le core-génome (figure 16) (63, 64).

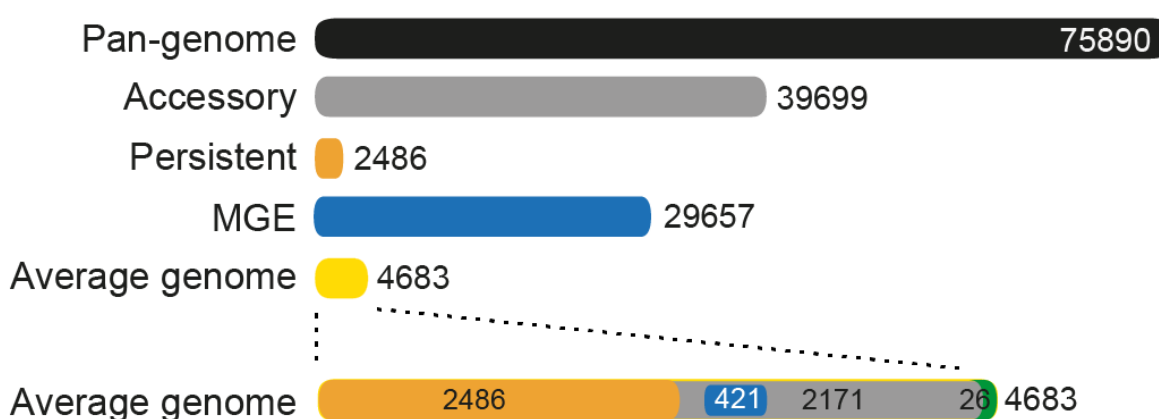


Figure 16. Diversité génomique de l'espèce *Escherichia coli* : moins de 2500 gènes (persistents ou core-génome) sur plus de 75000 (pan-génome) sont communs à toutes les souches.

Source: Touchon et al. Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. 2020 (63)

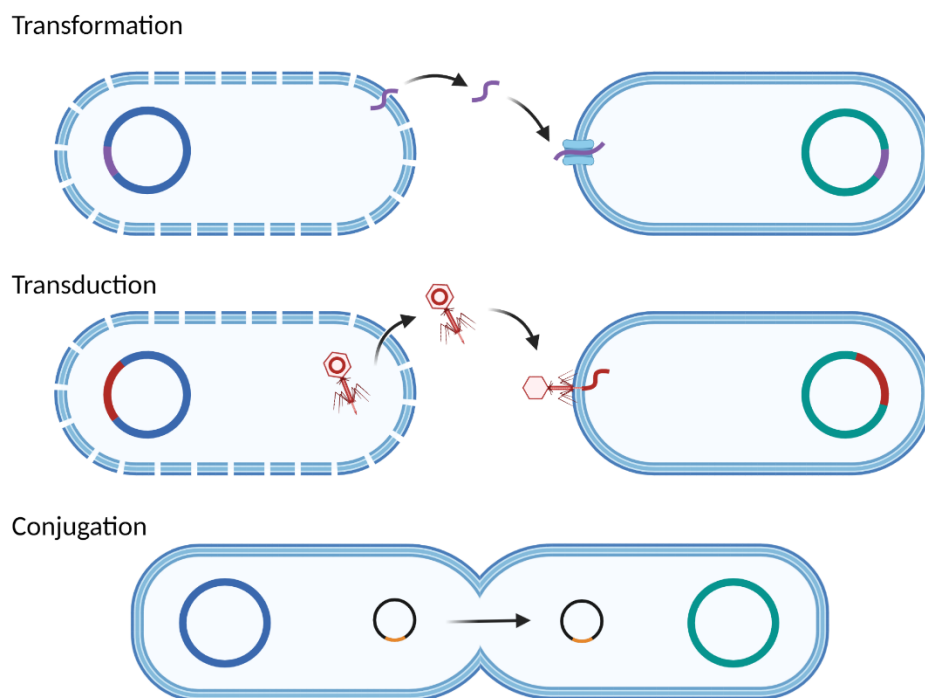
### ii. Mécanismes de plasticité du génome

La grande variabilité de la taille du génome des souches d'*E. coli* traduit l'extraordinaire plasticité du génome bactérien par la modification, l'acquisition ou la perte de fragments d'ADN.

Le taux de mutation du chromosome bactérien d'*E. coli* est d'environ  $10^{-3}$  par génome par génération (66, 67), et entre 0,2 et  $5 \times 10^{-10}$  par nucléotide par génération (66, 68, 69). Bien que le taux de petites insertions et délétions (moins de quelques nucléotides) soit élevé au niveau des séquences répétées, les indels surviennent dix fois moins fréquemment que les substitutions de bases nucléotidiques (66). Un taux élevé de recombinaison homologue est également observé sur le chromosome, et survient plus fréquemment que les mutations. La conversion génique concerne majoritairement des fragments de tailles moyennes (entre 50 bp et 2–4 kbp) (64). Un lien a été trouvé entre certains points chauds d'intégration et certains points chauds de recombinaison : lorsqu'un nouveau groupe de gènes est ainsi

incorporé dans le génome d'une souche, le locus peut se propager à travers l'espèce s'il offre un avantage, grâce à la recombinaison homologe (64, 70). Le *core*-génomme évolue ainsi principalement par mutation ou par recombinaison (64).

Alors que les gènes du *core*-génomme divergent par moins de 3% de leurs séquences nucléotidiques, cette divergence est de plus de 30% dans le reste du génome (71). Le génome accessoire dérive en effet d'un intense transfert horizontal de gènes (HGT pour *horizontal gene transfer*), conduisant à un temps de résidence assez bref des gènes accessoires dans le génome (64). Cet échange du matériel génétique est assuré par trois grands mécanismes (la conjugaison, la transformation, et la transduction), médiés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, bactériophages, séquences d'insertion, transposons et autres éléments d'intégration et de conjugaison (*pili*)) (figure 17). Presque toutes les souches d'*E. coli* portent des plasmides (>85%), le plus souvent de deux à quatre plasmides par souche (72, 73). De même les souches d'*E. coli* possèdent en moyenne six prophages par génome (74).



**Figure 17. Principaux mécanismes du transfert horizontal de gènes**, à l'origine de la plasticité du génome chez *Escherichia coli*. Au cours de la transformation (relargage de l'ADN directement) et de la transduction (relargage de l'ADN dans la capsid du bactériophage), la transmission de l'information génétique (souvent chromosomique) passe par la mort cellulaire ; au cours de la conjugaison (souvent plasmidique), elle peut se faire directement entre deux cellules via les *pili*. Les systèmes d'intégration permettent l'intégration de l'information dans le génome de la cellule receveuse.

Créée avec BioRender.com

La plasticité du génome est un avantage clé dans l'adaptation d'*E. coli* à des environnements variés et changeants. D'une part elle permet l'entrée dans de nombreuses voies évolutives parallèles par l'acquisition et la perte de gènes spécifiques. D'autre part, elle autorise une multitude de combinaisons de gènes, qui, par des interactions épistatiques, conduit à une

diversification phénotypique. Bien que dispersés sur le chromosome, les flux de gènes entrant sont concentrés au niveau de certaines régions particulières du génome, qui présentent ainsi un important polymorphisme (64).

### b. Diversité des structures membranaires

*E. coli* possède une structure bi-membranaire, composée d'une membrane externe, d'un espace périplasmique, et d'une membrane interne (figure 18).

La membrane externe est une barrière auto-protectrice d'une grande importance pour la survie et l'adaptation de la bactérie. Elle joue un rôle de premier plan dans la morphologie cellulaire, la croissance (division cellulaire), le métabolisme intracellulaire (absorption de nutriments et exportation de produits) et l'adaptation au stress (75).

La membrane externe est constituée par une bicouche lipidique dont la surface externe sert d'accroche à différents antigènes polysaccharidiques de surface dont le lipopolysaccharide (LPS) et la capsule. Elle sert aussi de point d'insertion pour des protéines servant notamment au transport (porine), à la mobilité (flagelle) ou à l'adhésion (*fimbriae*). Cette bicouche lipidique est reliée au peptidoglycane à sa surface interne (75).

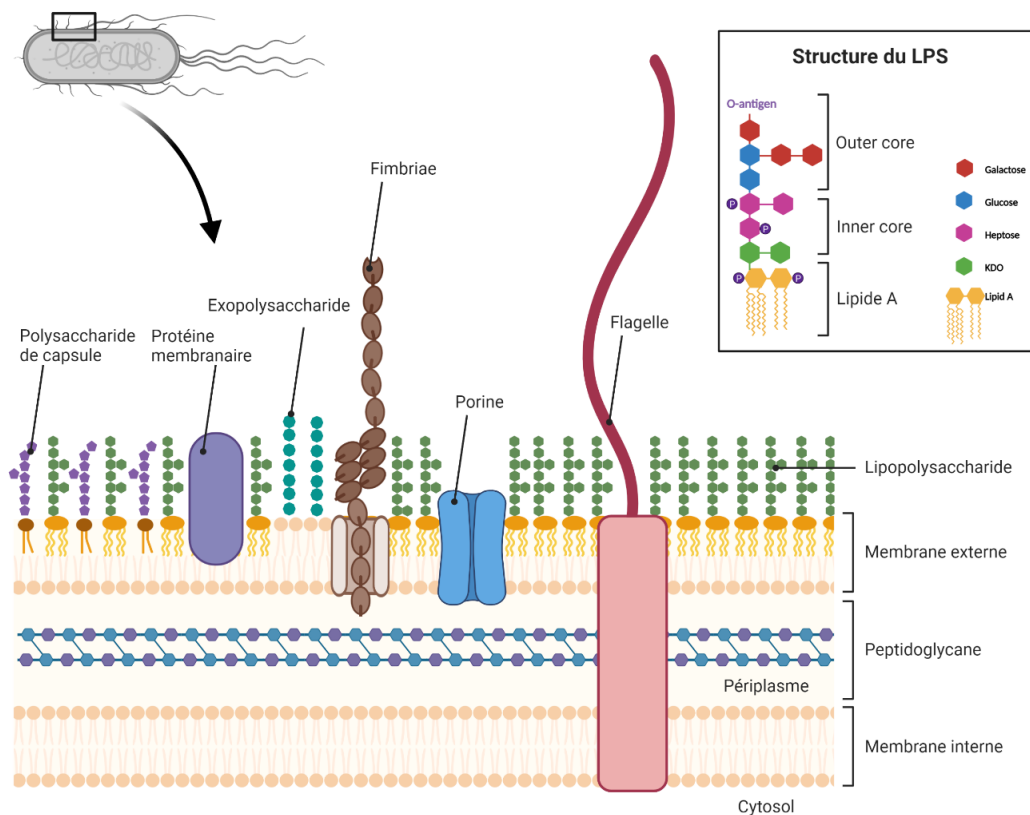


Figure 18. Représentation schématique des différents composants et de la structure de la paroi membranaire d'*E. coli*.

Créée avec BioRender.com

Le LPS est une structure moléculaire complexe constituée de lipides et de glucides couvrant près de 75% de la surface cellulaire. Il comprend systématiquement un composant lipidique hydrophobe formant le feuillet externe de la membrane externe (lipide A) et deux structures polysaccharidiques phosphorylées (*inner core* et *outer core*), et enfin en surface un polysaccharide (antigène O) (encadré figure 18). De structure hautement conservée, l'immense diversité du LPS passe par une gamme de plus de 170 antigènes O connus (76), et par cinq types d'*outer core*, selon l'ordre des unités de glucose et de galactose du squelette, mais également selon la nature et la position de la liaison des chaînes latérales. La biosynthèse de l'*outer core* est sous la dépendance de l'opéron *waa* (anciennement nommé *rfa*) codant pour des hexoses transférases qui assurent l'ajout d'une nouvelle unité saccharidique (figure 19) (77).

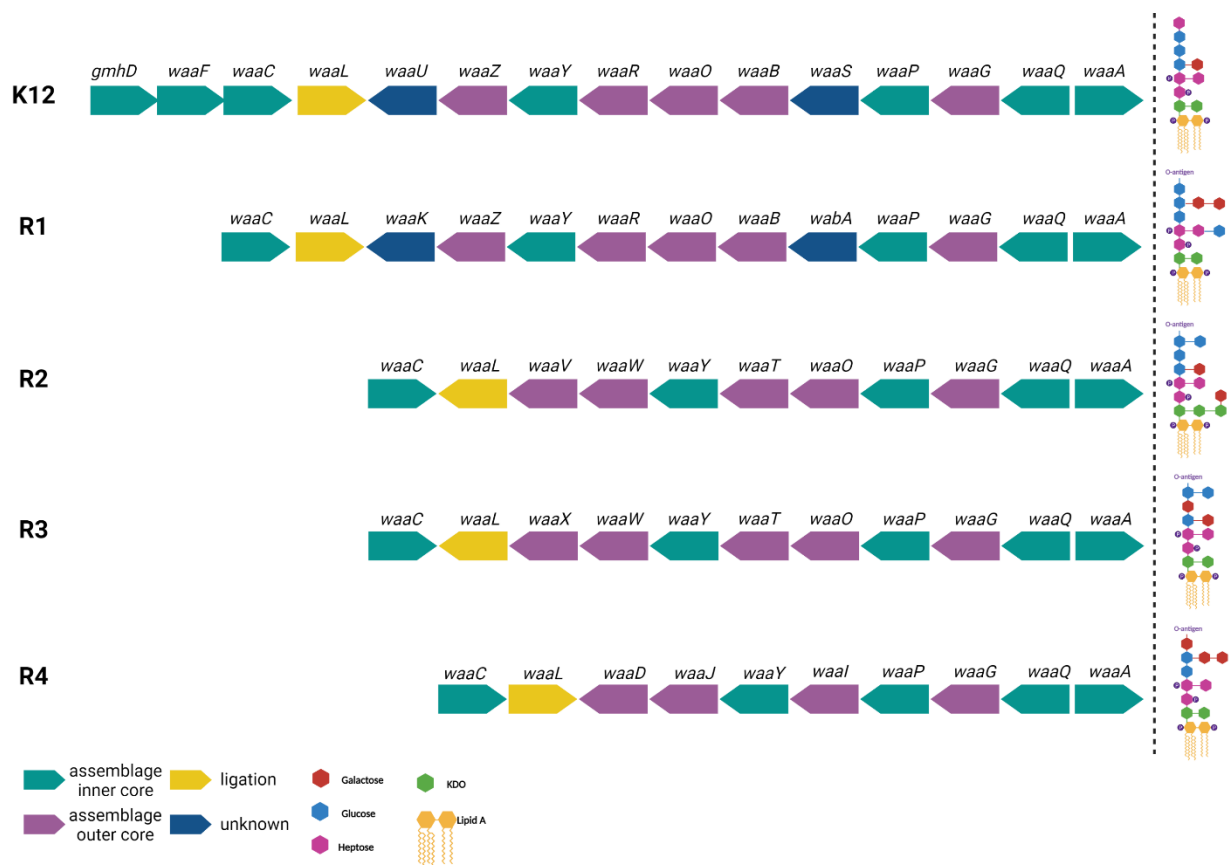


Figure 19. Organisation de l'opéron *waa* et structure hypothétique moléculaire selon les type de LPS (K12 et R#). D'après (77).

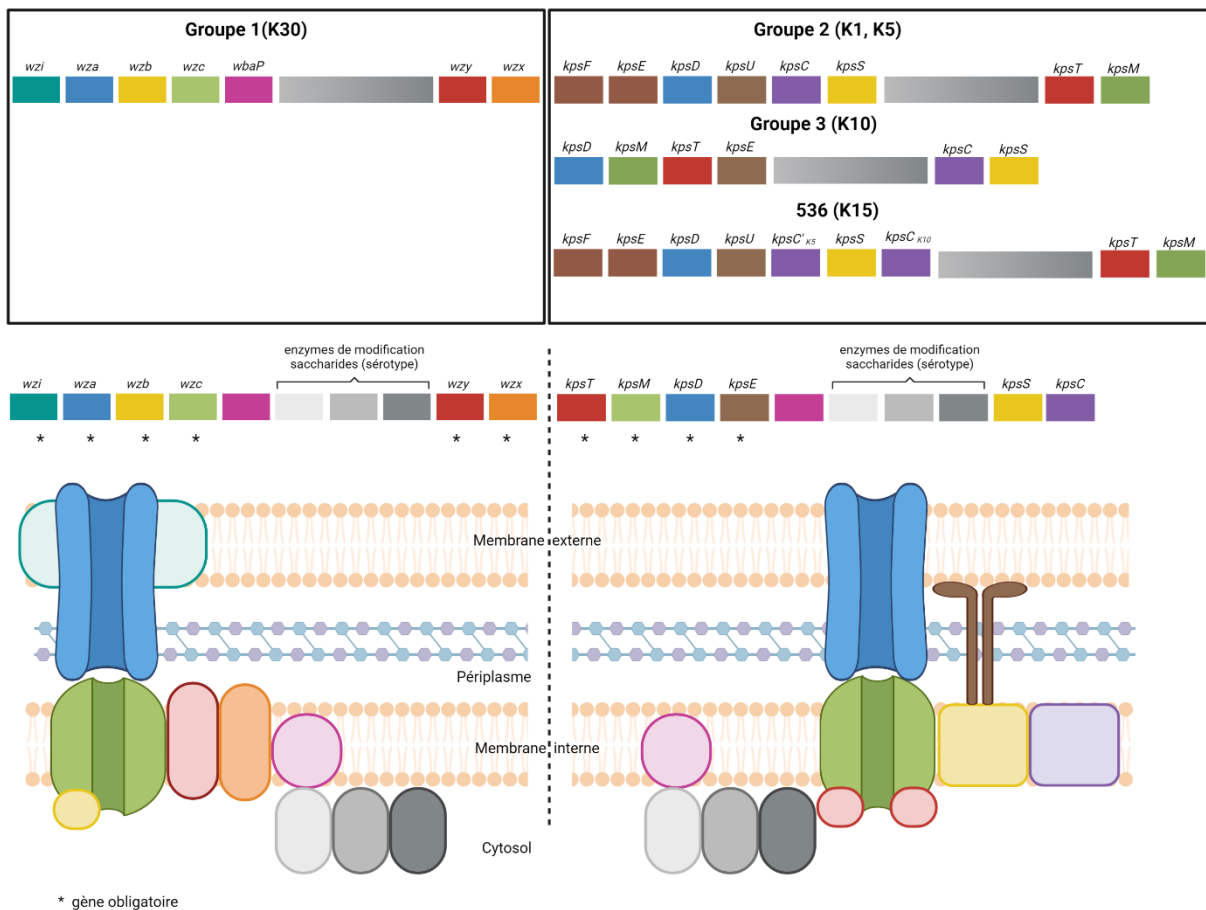
Créée avec BioRender.com

La capsule est une structure polysaccharidique à longue chaîne. Les polysaccharides capsulaires (CPS) sont présents à la surface de la plupart des souches d'*E. coli* (antigène K). Plus de 80 antigènes K sérologiquement uniques existent chez *E. coli*. On distingue deux stratégies d'assemblage et d'export à la surface des CPS : les capsules du groupe 1 et du groupe 4, dont la biosynthèse est sous la dépendance du système Wzx/Wzy, et celles du

groupe 2 et du groupe 3, sous la dépendance d'un transporteur ABC (figure 20) (78). Les génomes d'*E. coli* possèdent la plupart du temps plusieurs (jusqu'à quatre) groupes de capsules différents (79).

La plupart des souches d'*E. coli* sont mobiles grâce à la présence de flagelles. Le flagelle est une structure constituée de trois régions : le corps, le crochet et le filament. Le filament flagellaire est composé de plusieurs milliers de copies d'une seule sous-unité protéique, la flagelline. Les portions N- et C-terminales de la flagelline, importantes pour la structure des flagelles, sont hautement conservées alors que la région médiane du gène *fliC* codant pour des parties de la protéine qui sont exposées en surface est hautement variable et confère sa spécificité à l'antigène H-(flagellaire). Plus de 50 antigènes H ont été décrits (80).

*E. coli* présente ainsi un haut degré de polymorphisme des antigènes capsulaires K, O du LPS et H flagellaires, permettant de distinguer des centaines de sérotypes différents.



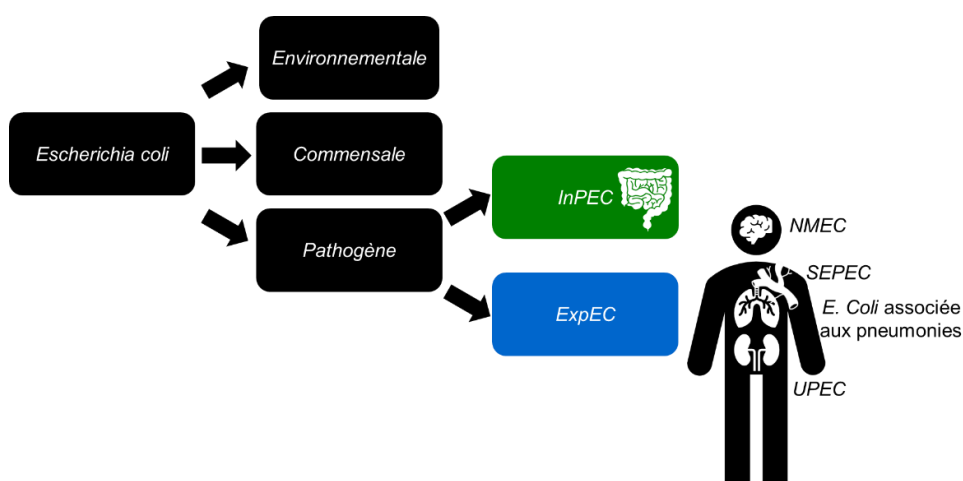
**Figure 20. Organisation du locus capsulaire et structure protéique de biosynthèse des CPS selon le groupe capsulaire.** Adapté de Rendueles et al. 2017 (79) et d'après Rahn et al. 1999 (81), Schneider et al. 2004 (82)  
Créée avec BioRender.com

### c. Diversité du genre *Escherichia* : phylogénie, clonalité, pathotype

Le genre *Escherichia* est actuellement composé de trois espèces (*Escherichia albertii*, *Escherichia fergusonii* et *Escherichia coli*) et de cinq clades cryptiques d'*Escherichia* (clades I à V). Ces clades sont phénotypiquement impossibles à distinguer d'*E. coli* mais divergent à divers degrés au niveau génomique. La taxonomie des souches d'*E. coli* se décompose en huit groupes phylogénétiques, répartis en deux clusters : les phylogroupes B2, G, F et D ; et les phylogroupes A, B1, C et E (83). Ce phylogroupage est accessible par des méthodes basées sur une PCR multiplex de gènes de ménage permettant de distinguer les phylogroupes d'*E. coli*, les clades et les espèces d'*Escherichia* (84–86), également disponibles *in silico* (87).

*E. coli* s'organise également selon une structure de population clonale. Un clone correspond à un ensemble d'isolats indiscernables, ou extrêmement proches, qui descendent d'un ancêtre commun. Cette structure clonale est définie par l'existence d'une forte association spécifique d'allèles de gènes-*core* situés à certains *loci*. Elle a été observée en se basant sur les sérotypes (antigènes somatiques (séro groupe O), capsulaires (K) et flagellaires (H)). Une autre approche porte sur la variation allélique de sept à huit gènes de ménage (technique du MLST (*multilocus sequence typing*)), permettant de déterminer un ST (*sequence type*) (88, 89). Aujourd'hui à partir de données de séquençage de génome complet, il est possible de déterminer *in silico* l'ensemble de ces typages : sérotypage classique (O:H:K) et ST.

Les souches pathogènes d'*E. coli* sont généralement classées en pathotypes (ou pathovars), selon les infections dans lesquelles elles sont retrouvées. On distingue les souches responsables de pathologies intestinales et de diarrhées (*InPEC*), avec une sous-classification selon le mécanisme de pathogénie, et celles en cause dans les infections extra-intestinales (*ExpEC*), parfois séparées selon l'organe ciblé (voies urinaires, poumons, méningites néonatales, bactériémies) (figure 21).



**Figure 21. Classification des souches d'*Escherichia coli* selon la niche écologique et le pathotype.**

*InPEC* : intestinal pathogenic *Escherichia coli* ; *ExpEC* : extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* ; *NMEC* : Neonatal meningitis-causing *Escherichia coli* ; *SEPEC* : sepsis-associated pathogenic *Escherichia coli* ; *UPEC* : Uro-pathogenic *Escherichia coli*.

#### **d. Niches écologiques : du commensalisme à la pathogénie : des incroyables capacités d'adaptation**

##### *i. E. coli : une bactérie caméléon*

*E. coli* est une bactérie capable de s'adapter à une large gamme de conditions environnementales. Elle peut ainsi survivre en présence de faibles concentrations de sources de carbone et d'énergie. Elle est également capable de faire face à une large amplitude de température (4 à 42°C), à des conditions aérobies comme anaérobies, à un pH aussi bas que 2,5 et à des osmolarités élevées (90). Lors d'une culture *in vitro* en milieu liquide riche en nutriments, son temps de génération est rapide : une vingtaine de minute à 37°C. Dans son habitat intestinal, il est sensiblement plus long (80-120minutes dans les fèces de souris) (91). Au cours d'une infection extra-intestinal le temps de génération a été estimé entre 60min (sepsis) et 180minutes (pyélonéphrite) dans un modèle murin (92).

##### *ii. Commensalisme*

*E. coli* est la bactérie aérobie prédominante dans le tractus gastro-intestinal. Elle colonise plus particulièrement la couche muqueuse du colon et du caecum qui tapisse l'épithélium intestinal (93). Elle est ensuite expulsée dans la lumière intestinale lors de la dégradation du mucus et excrétée sous l'effet du péristaltisme dans l'environnement avec les matières fécales.

Cette relation entre *E. coli* et l'hôte vertébré est souvent nommée commensalisme : elle est profitable pour la bactérie dont le métabolisme est parfaitement adapté au milieu intestinal, et sans danger pour le second. Dans cette niche écologique nutritionnelle, les souches se développent grâce aux sucres (notamment le gluconate) (94) acquis à partir du mucus produit par les cellules caliciformes de l'hôte et maximise sa croissance en alternant entre les respirations micro-aérobie et anaérobie (95). L'espèce bénéficie aussi d'un environnement stable, ainsi que de capacités de dissémination dans l'environnement vers d'autres hôtes.

##### *iii. Virulence*

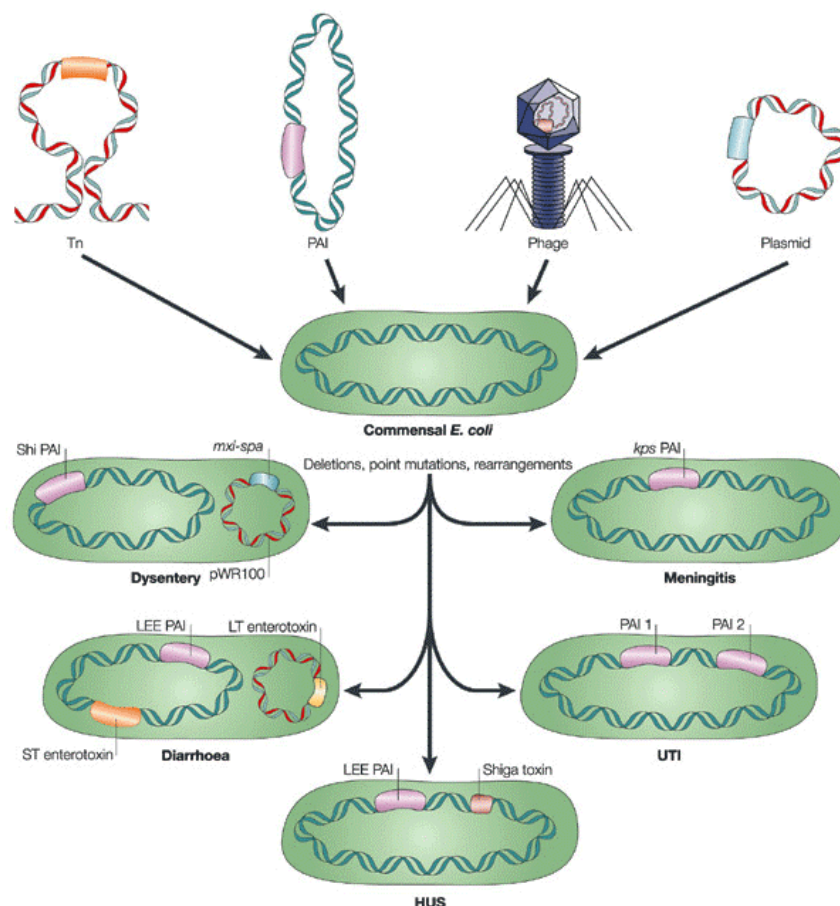
Cependant, plusieurs souches d'*E. coli* ont acquis des traits spécifiques de virulence leur conférant une capacité à s'adapter à de nouvelles niches et provoquant au passage un large spectre de maladies (96). La pathogénèse d'*E. coli* passe ainsi par sa capacité :

- de colonisation via des facteurs d'adhérence spécifiques (*fimbriae* et autres adhésines) de nouveaux sites muqueux, différents de son habitat primaire ;
- à produire des toxines (notamment par les systèmes de type III) responsables de lésions cellulaires chez l'hôte ;
- par l'évasion aux défenses de l'hôte (masquage capsulaire ou variation antigénique des antigènes de surface ; protectines réduisant la production des médiateurs de l'inflammation afin d'inhiber le recrutement des leucocytes au site infectieux) ;

- ou par sa capacité à se multiplier dans un environnement métabolique où la composition en nutriments est différente (systèmes d'acquisition du fer).

L'évolution vers la virulence d'une souche repose sur trois mécanismes principaux :

- L'acquisition d'un ou plusieurs gènes par transfert horizontal (figure 22). Les facteurs de virulence sont souvent encodés sur des éléments génétiques mobiles tels que des plasmides, des bactériophages, des transposons et des îlots de pathogénicité (PAI) (96). Les PAI sont des structures du chromosome bactérien composés de plusieurs gènes impliqués dans la virulence (97). Par leur structure modulaire, ils peuvent se réarranger selon de multiples combinaisons conduisant à de multiples phénotypes (70). Le transfert conjugatif et la recombinaison homologue jouent particulièrement un rôle majeur dans la dissémination par transfert horizontal des îlots de pathogénicité au sein de l'espèce *E. coli* (70).
- L'inactivation de gènes dont l'expression est incompatible avec la virulence (gènes anti-virulence), essentiellement dans les voies métaboliques (98).
- Les mutations ponctuelles patho-adaptatives aboutissant à un changement de fonction (99).



**Figure 22.** Les éléments génétiques mobiles contribuent fortement à l'évolution vers la virulence des souches d'*Escherichia coli* par transfert horizontal de gènes.

Tn : transposon ; PAI : îlot de pathogénicité ; UTI : infections urinaires.

Source : Kaper et al. Pathogenic *Escherichia coli*. 2004 (96)



iv. Rôle du fond génétique dans la virulence des ExPEC

Il existe une association spécifique entre le fond génétique, la présence de gènes de virulence dans le génome, et le phénotype de virulence de la souche. Les ExPEC arborent des phénotypes de virulence spécifiques, liés à la présence dans leur génome de nombreux gènes codant pour des facteurs de virulence (adhésines, toxines, protectines et systèmes de capture du fer). Ils appartiennent majoritairement à deux phylogroupes B2 et D. Les ExPEC sont essentiellement répartis en quatre grands complexes de *sequence type* représentant entre la moitié et les deux tiers des isolats d'ExPEC : STc131, STc73, STc95 (phylogroupe B2) et STc69 (phylogroupe D). Ils ont la particularité de n'être représentatifs que de quelques sérogroupes O seulement. Le complexe STc127 est un groupe très clonal présentant un unique sérotype (O6:H31) (figure 23) (83).

Pathotype	Définition	Phylogroupe	ST <sup>wu</sup>	Sérotypes
ExPEC	Infections non intestinale	B2	STc131	O16:H5, O25:H4
			STc73	O2:H1, O6:H1
			STc95	O1/O2/O18/O45:K1: H7, O2:K1:H4
			STc12	O4:H1/H5
			STc14	O75:H5
		D	STc69	O17/O73/O77:H18
		C	STc88	O8/O9:H4/H9/H19, O78:H4
F	STc62	O7:K1:H45		
<i>E. coli</i> associée aux PAVM	Pneumonies	B2	STc73	Idem ExPEC
			STc127	O6:H31
			STc141	O2:K1:H6

**Figure 23. Caractéristiques génétiques des ExPEC et du pathovar des souches impliquées dans les pneumonies acquises sous ventilation mécanique.**

ExPEC, extra-intestinal pathogenic *E. coli*; STc, sequencing type complex; ST<sup>wu</sup>, sequence type selon la classification de la Warwick University; PAVM: pneumonie acquise sous ventilation mécanique

Source: Denamur et al. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. 2020 (83)

e. *Escherichia* : le micro-organisme modèle

*E. coli* est donc une espèce extrêmement versatile : agent pathogène polyvalent responsable d'infections aussi bien intestinales qu'extra-intestinales, elle est avant tout une bactérie commensale et même parfois environnementale. Cette dualité fait de *E. coli* un parfait modèle pour comprendre les dynamiques évolutives complexes d'adaptation à un stress environnemental telle que la prédation par un bactériophage aussi bien au niveau écologique qu'au cours d'un traitement d'une infection aiguë. *E. coli* est également un important problème de santé publique dans le monde, en France et en réanimation comme

précédemment discuté. De plus, facile à isoler et à cultiver en laboratoire, *E. coli* est un modèle pour les études de génétique des populations depuis des décennies et chaque avancée conceptuelle ou technique est disponible pour cette espèce.

*i. E. coli 536 : une souche modèle pour les pneumonies à E. coli*

Les souches d'*E. coli* isolées dans les pneumonies présentent des caractéristiques qui les distinguent des autres *ExPEC*. Leurs spécificités incluent une très forte proportion d'isolats du phylogroupe B2; une surreprésentation des STc127 par rapports aux isolats de bactériémies, et un contenu en gènes de virulence singulier : *sfa/foc* (adhésine S-fimbriae et F1C fimbriae), *iroN* (sidérophore Salmocheline), *papGIII* (adhésine P-fimbriae), *cnf1* (toxine de nécrose), et *hlyC* (hémolysine) (100, 101).

La souche d'*E. coli* 536 est une souche pathogène extra-intestinale, hautement virulente, et isolée à partir d'un prélèvement clinique d'infection urinaire dans les années 1980 (102). Elle appartient au groupe phylogénétique B2, et au complexe STc127 (103). Elle arbore sept îlots de pathogénicité différents (figure 24), dont les PAI I et III impliqués dans sa pathogénicité pulmonaire chez le rat (104).

PAI	Taille du gène (kb)	Protéines (gène)
I	76	Alpha hémolysine, F17-fimbriae, CS12-fimbriae
II	102	Alpha hémolysine, P-fimbriae ( <i>pap</i> ), hémagglutinine
III	68	S-Fimbriae, sidérophore Salmochelin ( <i>iroN</i> ), récepteur de l'hème, toxine, protéase de l'hémoglobine, Ag 43
IV (HPI)	30	Sidérophore Yersiniabactine
V	80	Pilus P ( <i>pilX</i> ), Ag43, antigène de la capsule ( <i>kpSK15</i> )
VI	54	Polypeptide-polycétide synthase ( <i>pks</i> )
VII	20	Shufflon, protéine de type histone

**Figure 24. Îlots de pathogénicité et facteurs de virulences arborés dans le génome de la souche *E. coli* 536.**

Source: Tourret et al. Effects of single and multiple pathogenicity island deletions on uropathogenic *Escherichia coli* strain 536 intrinsic extra-intestinal virulence. 2010 (105)

*E. coli* 536 est l'archétype pour de nombreux modèles d'infections à *ExPEC* : infection urinaires (82, 103), septicémie (103, 105) et pneumonies (106). Dans ce dernier modèle, la souche 536 est responsable d'une importante létalité (100%) après infection par voie intra-nasale par  $4.10^7$  CFU en l'absence de traitement chez les souris de lignée *BalbCjRj*, alors qu'un traitement par une dose unique du bactériophage 536\_P1 deux heures après l'infection permet de guérir l'ensemble des animaux de façon similaire à un traitement par antibiothérapie par céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération.

#### 4. Interactions bactériophage-bactérie

Les bactériophages sont ubiquitaires, présents dans tous les écosystèmes connus hébergeant des bactéries. Ils sont l'entité la plus répandue de la biosphère avec près de  $10^{31}$  virions, soit un nombre dix à cent fois supérieur aux bactéries (107). La majorité des espèces bactériennes a déjà été infectée par des bactériophages puisque 45 à 90% des génomes bactériens possèdent au moins un prophage (74, 108–110).

##### a. Mécanismes bactériens de résistance aux bactériophages

Les bactéries possèdent de nombreux mécanismes de défense contre les bactériophages, contournés par une vaste batterie de stratégies virales de contre-attaque.

###### i. Bactérie : un large arsenal de défense

Les bactéries peuvent résister à l'attaque des bactériophages par différents mécanismes ciblant toutes les étapes du cycle infectieux viral.

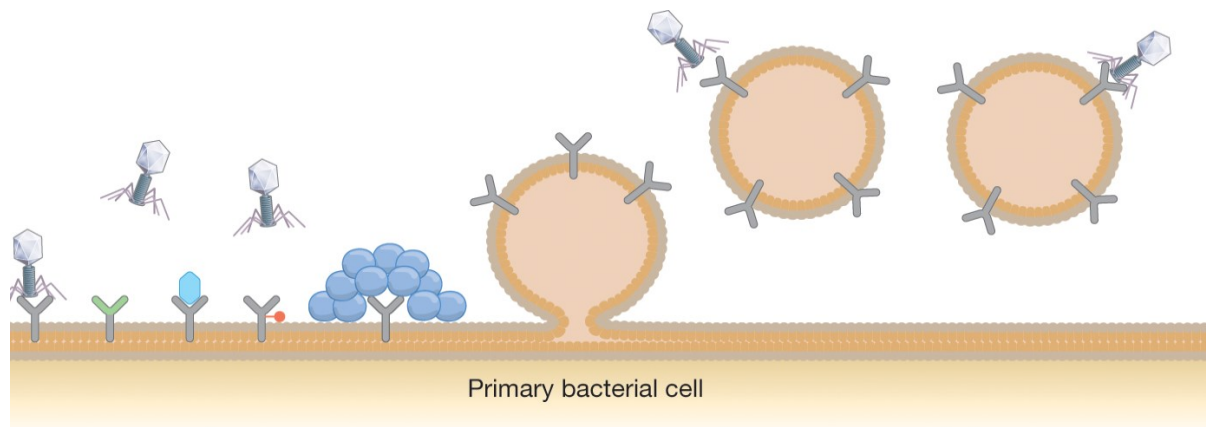
###### ▪ Empêcher l'adsorption du bactériophage

Au cours de l'étape initiale d'adsorption à la surface bactérienne, le bactériophage reconnaît un hôte potentiellement sensible par la fixation de ses RBP à des composants de la paroi bactérienne.

Pour contrer cette étape cruciale, la stratégie la plus couramment retrouvée consiste à bloquer le récepteur du bactériophage. Ce blocage peut se faire par une altération de la structure tri-dimensionnelle du récepteur, ou, par la modification ciblée de son domaine de liaison aux RBP. Ces mécanismes surviennent soit à la suite de mutations ponctuelles dans les gènes codant pour sa biosynthèse ou par des phénomènes de variation de phase. Le blocage du récepteur peut aussi être secondaire à une fixation compétitive du récepteur par une molécule produite par la bactérie (111, 112).

La seconde stratégie consiste pour la bactérie à masquer son récepteur par la production d'une matrice extracellulaire ou d'une capsule (111, 112). Les capsules ont cependant également été décrites comme des récepteurs utilisés par certains bactériophages pour leur adsorption (50).

La dernière stratégie est l'utilisation de récepteurs comme leurres pour les bactériophages : des vésicules de la membrane externe exposant des récepteurs à leur surface bourgeonnent dans l'environnement bactérien et capturent ainsi les bactériophages approchants (111, 112).



**Figure 25. Stratégies bactériennes empêchant l'adsorption du bactériophage à sa surface :** altération (vert), blocage compétitif (bleu), modification (rouge) ou masquage (cercles bleus) des récepteurs et utilisation d'OMV leurreux. *OMV: outer membrane vesicles.*

Source: Hampton et al. The arms race between bacteria and their phage foes. 2020 (112)

- *Bloquer l'injection de l'acide nucléique viral*

Suivant son adsorption à la surface bactérienne, le bactériophage transfère son génome depuis sa capsid vers le cytosol bactérien à travers sa queue. Certains systèmes bactériens sont capables d'inhiber une infection secondaire (appelée super-infection) d'un hôte bactérien précédemment infecté par un premier bactériophage : les systèmes de *superinfection exclusion (SIE)*. Les SIE bloquent l'injection de l'acide nucléique du bactériophage dans les cellules hôtes, par la production de protéines capables de s'ancrer dans la membrane. Ces protéines sont souvent encodées dans des gènes de prophages (113, 114).

- *Dégradation de l'acide nucléique viral*

Certains systèmes clivent l'ADN au niveau de motifs spécifiques. Ces systèmes contiennent au moins deux composants : 1) une enzyme qui assure une protection du génome bactérien (auto-immunité), en modifiant le site de restriction au niveau de l'ADN bactérien ; et 2) une endonucléase de restriction reconnaissant les motifs non modifiés, qui ainsi clive uniquement l'ADN du bactériophage. Les systèmes de restriction-modification (R-M) de type I, II et III, utilisent une méthyltransférase pour protéger le génome bactérien par méthylation des bases d'adénine ou de cytosine (115), tout comme d'autres systèmes plus rares (BREX, DISARM) (116, 117). D'autres systèmes assurent la protection du génome bactérien par des modifications de l'ADN sans méthylation : les systèmes DPD (modification des bases de guanine en 7-déazaguanine) (118), les systèmes DND (modification soufrée) (119). Enfin certains systèmes R-M utilisent *a contrario* des enzymes de restriction de type IV qui ciblent des modifications de l'ADN (115). Les argonautes bactériens (pAgo) sont quant à eux des systèmes clivant les acides nucléiques (ADN et ARN) viraux, guidés par des siRNA ou siDNA (120, 121).

Tous ces systèmes de défense ont été proposés comme constituant le système immunitaire anti-viral inné des bactéries, en opposition à un système adaptatif constitué des systèmes CRISPR-Cas (122).

Les systèmes CRISPR-Cas agissent en reconnaissant les acides nucléiques des bactériophages par le biais d'une mémoire immunitaire constituée de courtes séquences d'ADN viral incorporées dans le génome bactérien (123, 124). Ces systèmes comprennent deux types de structures : 1) de courtes séquences répétées palindromiques et régulièrement espacées (CRISPR), entre lesquelles on retrouve les séquences d'ADN viral acquises lors d'infections antérieures (*spacer*) ; et 2) des gènes codant pour des effecteurs protéiques (Cas). Les CRISPR *arrays* sont transcrits pour générer de courts ARN CRISPR (ARNcr) contenant chacun un *spacer* flanqué des séquences répétées. Ces ARNcr reconnaissent des séquences complémentaires dans l'ADN ou l'ARN du bactériophage (*proto-spacer*) et ainsi guident les effecteurs protéiques. Ceux-ci dégradent l'acide nucléique par une endonucléase.

Les systèmes de dégradation de l'acide nucléique viral sont ceux les plus fréquemment retrouvés dans les génomes bactériens (125).

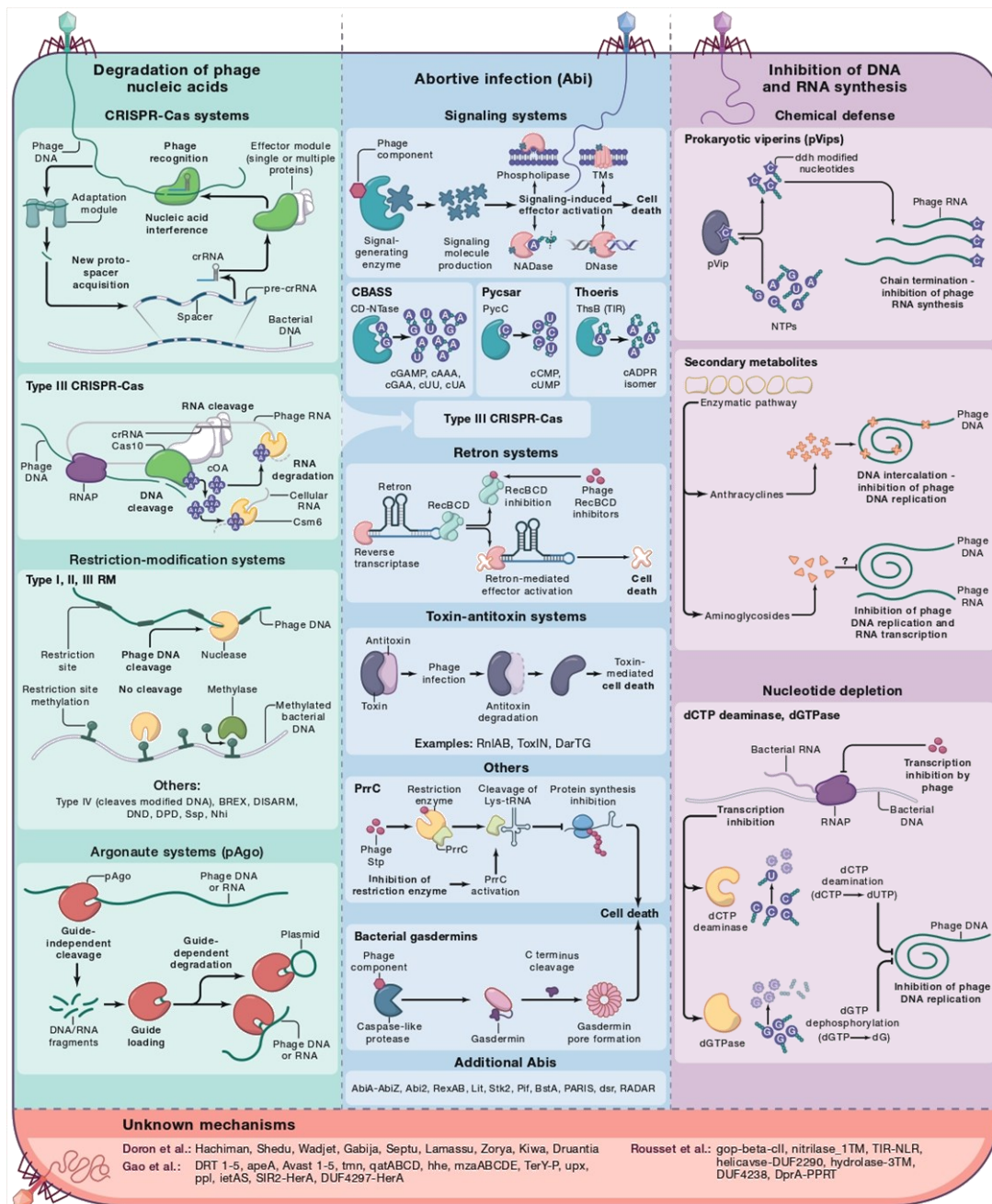
- *Inhibition de la synthèse d'ADN et d'ARN*

Certains systèmes de défense inhibent directement la synthèse des acides nucléiques viraux par des mécanismes de défense chimique (production de petites molécules : vipérines procaryotes (pVips) ; aminoglycosides) (126–128) ou par déplétion des bases nucléotidiques (dCTP désaminase et dGTPase) (129).

- *Infection abortive*

Enfin, une stratégie majeure de défense bactérienne contre les bactériophages aboutit au suicide de la cellule infectée afin de prévenir la dissémination de l'infection virale au reste de la population bactérienne. Elle fait appel aux systèmes d'infection abortive (Abi) qui déclenchent la mort cellulaire lorsqu'ils reconnaissent l'infection par les bactériophages, avant que ceux-ci n'aient pu se répliquer (130). Certains systèmes Abi comprennent des systèmes de signalisation qui produisent une molécule de signal activant ensuite un effecteur (CBASS, Pycsar, Thoeris et CRISPR-Cas de type III) (131–133). Les systèmes Rétrons sont eux constitués de trois composants : un hybride ADN-ARN (ADNms), une transcriptase inverse et un effecteur protéique ; leur inhibition par interférence d'une protéine virale induit la mort cellulaire (134). Certains systèmes toxine-antitoxine (TA) sont également utilisés comme systèmes abortifs au cours d'infections par des bactériophages (122, 135, 136).

De multiples autres systèmes dont les mécanismes restent inconnus ont également été découverts ces dernières années (Lamassu, Avast, Zorya, Shedu...) (137, 138).



**Figure 26** Trois grands types de mécanismes de défense antivirale des bactéries ciblant les étapes du cycle post-injection de l'acide nucléique du bactériophage : dégradation des acides nucléiques (vert), inhibition de la synthèse des acides nucléiques (violet), et systèmes abortifs (bleu).  
Source: Tal & Sorek. Snapshot: Bacterial immunity. 2022 (136)

L'immunité procaryote est ainsi extrêmement complexe. Le nombre de systèmes de défense codés dans un génome bactérien peut varier considérablement : chez *E. coli* on comptabilise en moyenne six systèmes de défense par génome. Certains systèmes sont très répandus (CRISPR et R-M) tandis que d'autres sont extrêmement rares (125). Les systèmes rares sont la principale source de diversité dans les arsenaux de défense contre les bactériophages.

## ii. Bactériophages : contre-attaque et modularité du génome

### ▪ Mécanismes de contre-attaque

Les RBP des bactériophages à queue ont une plasticité génétique élevée, ce qui permet aux bactériophages d'évoluer pour infecter de nouveaux hôtes ou restaurer leur pouvoir d'infectivité envers un hôte devenu résistant (111, 112). Des mutations compensatrices dans les gènes codant pour les RBP peuvent ainsi restaurer la reconnaissance du récepteur muté par le RBP modifié. D'autre part, certains bactériophages possèdent plusieurs RBP permettant la reconnaissance de plusieurs récepteurs. Enfin certains bactériophages augmentent la variabilité de leurs RBP grâce à des rétro-éléments. La diversité de la gamme de RBP d'un bactériophage est ainsi un déterminant essentiel de son spectre d'hôtes (139).

Pour pénétrer les matrices d'exo-polysaccharides produites en surface, certains bactériophages produisent des lyases des polysaccharides ou des hydrolases des polysaccharides (111, 112).

Les bactériophages sont également capables d'échapper au clivage de leur ADN : 1) en rendant méconnaissable les sites de restriction des endonucléases dans leurs génomes par l'accumulation de mutations ponctuelles ; 2) en codant dans leur génome des enzymes capables de reproduire les modifications d'ADN conférant l'auto-immunité à la bactérie ; 3) ou en codant des protéines inhibitrices de ces systèmes. Les bactériophages peuvent contourner la résistance bactérienne secondaire aux systèmes CRISPR-Cas par un grand nombre de mécanismes : mutation ponctuelle ou perte du *proto-spacer* ciblé, production de protéines anti-CRISPR empêchant la reconnaissance et la fixation à l'ADN ciblé ou le fonctionnement de l'effecteur protéique Cas (111, 112).

Enfin les bactériophages sont capables de contrecarrer les systèmes abortifs en produisant par exemple une antitoxine capable d'inhiber la toxine bactérienne (112), ou des protéines Tad1 capables d'inhiber un système Theoris (140).

### ▪ Mosaïcisme et recombinaison : un moteur de diversification

Les génomes des bactériophages présentent un fort degré de mosaïcisme, caractérisé par la présence de régions hautement homologues aux frontières abruptes avec les régions adjacentes non similaires. Ce mosaïcisme est considéré comme le moteur évolutif des bactériophages (141).

Il est secondaire à des échanges fréquents de gènes entre eux, médiés par différents mécanismes de recombinaison : la recombinaison homologue permettant l'échange de séquences similaires est beaucoup plus fréquente que la recombinaison non homologue, qui se produit aléatoirement à travers le génome ou que la recombinaison homéologue se produisant sur des régions légèrement homologues. Elles font appel à des recombinases codées par les bactériophages eux-mêmes (Gp2.5, UvsX) ou à des systèmes de recombinaisons bactériens (RecA) (142).

Ce haut degré de mosaïcisme est plus souvent retrouvé chez les bactériophages suivant un cycle de vie préférentiel non strictement lytique, qui favorise la présence de plusieurs génomes de bactériophages au même moment dans l'hôte bactérien, augmentant ainsi la probabilité de recombinaison entre les bactériophages.

## **b. Dynamiques évolutives bactériophage-bactérie hôte**

Les bactériophages virulents jouent un rôle majeur dans l'évolution des populations bactériennes : important facteur de mortalité (20 à 40% de la biomasse bactérienne aquatique), et de diversité bactérienne (via la transduction), ils imposent des pressions évolutives fortes sur leurs hôtes bactériens (143).

### *i. Coévolution bactériophage-bactérie : les modèles évolutifs*

La coévolution bactériophage-bactérie désigne un processus d'adaptation réciproque et de contre-adaptation entre le bactériophage et son hôte bactérien (144). Construits à partir d'expériences de coévolution (chemostat, transfert de culture en série, culture continue) et de modèles mathématiques, deux modèles concurrents de coévolution bactériophage-bactérie ont émergé : la dynamique de la course aux armements et la dynamique des sélections fluctuantes (figure 27) (145, 146).

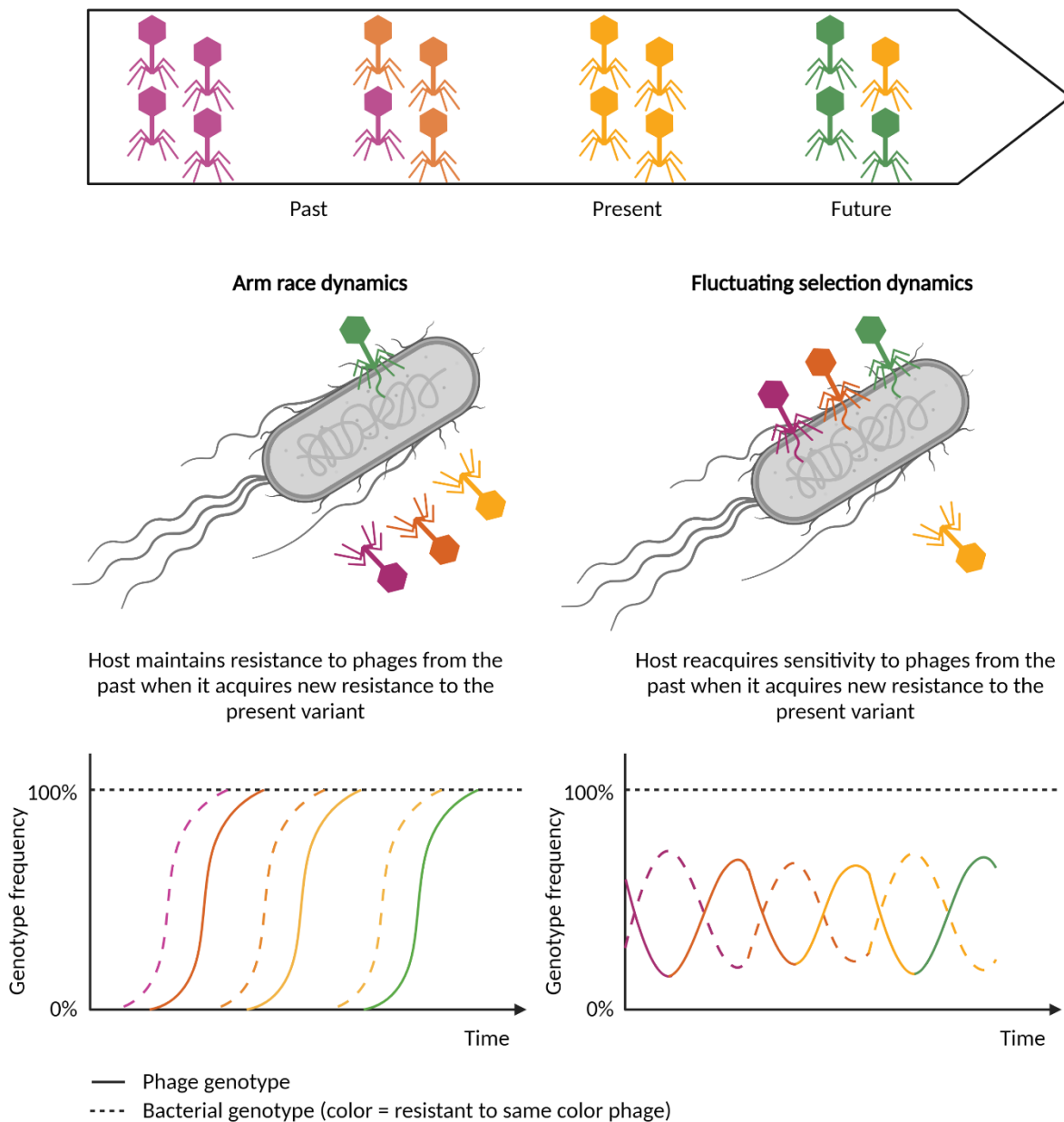
Dans la dynamique de la course aux armements, l'hôte bactérien et le bactériophage développent itérativement une nouvelle résistance aux bactériophages et une nouvelle infectiosité aux hôtes bactériens, tout en maintenant la résistance et l'infectiosité aux variants ancestraux. Un génotype est remplacé par un deuxième, lui-même remplacé par un troisième en raison de balayages sélectifs successifs, entraînant des améliorations continues dans les deux populations au fil du temps : les bactériophages accroîtraient ainsi progressivement leur spectre d'hôtes, incluant des hôtes arborant de plus en plus de mécanismes de résistance (147).

Dans la dynamique de sélection fluctuante, les interactions bactériophage-bactérie restent très spécifiques. Pour maintenir l'infectiosité, les bactériophages surmonteraient l'apparition d'une résistance nouvelle de l'hôte bactérien, mais perdraient la capacité d'infecter les hôtes ancestraux. Les hôtes ne seraient alors résistants qu'aux variants viraux contemporains et redeviendraient sensibles aux variants ancestraux. Au cours des cycles évolutifs les génotypes de populations bactériennes sensibles et résistantes aux bactériophages s'entrelacent avec ceux des bactériophages parents et de leurs progénitures évoluées qui retrouvent une infectiosité contre les bactéries résistantes contemporaines (147).

L'évolution vers le généralisme, la capacité à infecter un nombre plus élevé d'hôtes, est généralement associée à un coût : l'augmentation du spectre d'hôte des bactériophages coïncide avec une diminution de leur taux de réplication ou de leur viabilité. La dynamique de la course à l'armement devient rapidement trop coûteuse dans les environnements hostiles :



l'évolution vers toujours plus de résistance des bactéries ou toujours plus d'infectivité des bactériophages se retrouve ainsi limitée (148).



**Figure 27. Deux modèles de dynamique de coévolution entre un bactériophage virulent et son hôte bactérien : la courses aux armements ou la sélection fluctante dynamique.**

Adapté de <http://www.fieldslab.org/phage-technology.html> et (145)

Créée avec BioRender.com

Ces dynamiques aboutissent parfois à des déséquilibres entre le bactériophage et la bactérie jusqu'aux situations extrêmes d'impasses évolutives pour l'un des acteurs (145, 146). Le bactériophage lyse complètement la population bactérienne sans repousse secondaire observée : la bactérie met en œuvre un ou des mécanismes de résistance sans laisser l'opportunité au bactériophage de développer une contre-mesure. Ou au contraire, la lyse de

la population bactérienne par le bactériophage est suivie d'une re-croissance, secondaire à la sélection d'une sous-population résistante au bactériophage, qui remplacera entièrement la population bactérienne initiale (149, 150).

ii. *Spectre d'hôtes des bactériophages thérapeutiques : le résultat des dynamiques évolutives environnementales*

Le spectre d'hôtes d'un bactériophage se définit par l'ensemble des genres, espèces et souches bactériens qu'il peut lyser (151).

▪ *Spectre d'hôtes : spécificité et diversité*

Beaucoup d'études se sont intéressées au spectre d'hôtes de bactériophages. Alors que de nombreux bactériophages modèles bien étudiés semblent présenter un spectre d'hôtes étroit, souvent limité à quelques souches appartenant à une seule espèce bactérienne (152), des études écologiques et métagénomiques suggèrent que les spectres d'hôtes des bactériophages pourraient s'étendre sur un large continuum, d'extrêmement étroit à très large (153–156).

▪ *Déterminants du spectre d'hôtes*

Le spectre d'hôtes est déterminé par une multitude d'interactions moléculaires entre le bactériophage et l'hôte bactérien survenant à chaque étape du cycle infectieux (figure 28). Des mécanismes phénotypiques mais aussi génotypiques jouent ainsi un rôle prépondérant dans la définition du spectre d'hôtes (139).

Une partie de ces mécanismes a été précédemment présentée dans la partie 4.a « Mécanismes bactériens de résistance aux bactériophages ».

Par ailleurs, les interactions bactériophage-bactérie sont relativement instables : le mode de vie des bactériophages peut ainsi changer au cours du temps en réponse aux conditions environnementales et à l'état métabolique de l'hôte bactérien, passant d'un mode de vie non lytique vers un cycle lytique comme discuté dans la partie 2.e « Cycle infectieux des bactériophages ».

Enfin, au cours du *carrier-state* (« état de portage »), une partie seulement de la population bactérienne devient résistante aux bactériophages suite à des changements génétiques ou métaboliques. Le *carrier state* fait suite à la réception de molécules de signal diffusées par les cellules voisines (*quorum sensing*) ou à la distribution spatiale (comme dans les biofilms) des cellules bactériennes hôtes. Il correspond à un phénomène de population : une sous-population de bactéries sensibles assure la propagation continue du bactériophage, tandis que celle résistante assure la survie bactérienne (53).

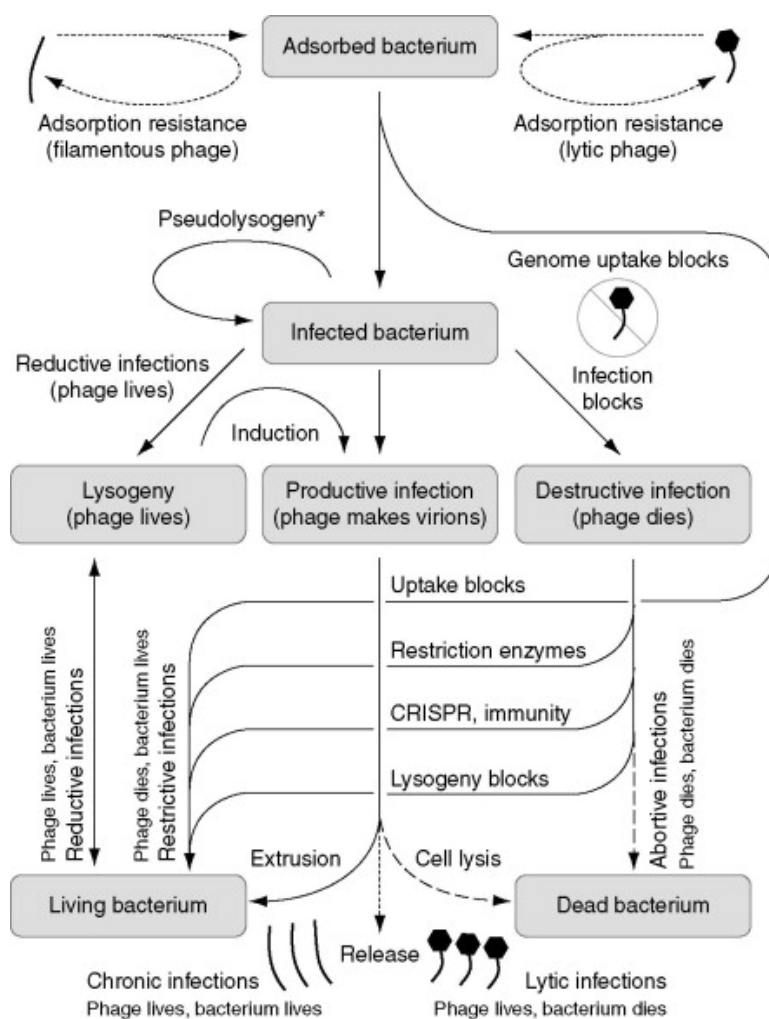


Figure 28. Réseau des interactions possibles bactériophage-bactérie menant soit à la lyse de la cellule bactérienne, soit à sa survie.

Source: Hyman & Abedon. Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. 2010 (152)

- *Le spectre d'hôtes dépend des techniques et des conditions utilisées pour sa détermination*

Les spectres d'hôtes testés et publiés reflètent une situation plus particulière que générale. D'une part il est en effet impossible de tester un bactériophage sur tous les hôtes possibles et dans toutes les conditions possibles. D'autre part, la majorité des interactions bactériophage-bactérie sont biaisées par les techniques utilisées pour étudier ces interactions.

Ces techniques utilisent toutes des monocultures de hautes concentrations bactériennes, mélangées à des solutions de bactériophages selon des ratios de particules virales-cellules bactériennes (*Multiplicity of Infection, MOI*) variables, soit en milieu liquide (par l'analyse de la cinétique de croissance bactérienne au cours du temps), soit en milieu gélosé double couche (*Efficiency of plating, Efficiency of center of infection, Spot testing*).

Dans tous les cas, ces tests ne peuvent détecter que les bactériophages capables de terminer un cycle lytique complet dans les conditions expérimentales données et dans le délai de

l'expérience (152). Ainsi l'absence de formation de plages de lyse après une incubation sur la nuit n'équivaut pas nécessairement à un échec d'infection productive d'une bactérie par le bactériophage : des périodes de latence longues, ou des *burst size* faibles, peuvent diminuer considérablement la formation de plages de lyses alors même que de nouveaux virions sont produits (157). Par ailleurs, la présence de formation de plages de lyse ne signe pas forcément un cycle infectieux lytique complet. Il peut en effet être secondaire au phénomène de *lysis from without* (« lyse de l'extérieur ») : c'est-à-dire une lyse bactérienne survenant précocement au cours de l'étape initiale d'adsorption, et qui se produit sans production de nouvelles particules virales. Ce phénomène est dû à la déstabilisation membranaire par l'interaction d'un très grand nombre de virions avec la surface cellulaire, mais ne présage pas de la capacité du bactériophage à poursuivre plus loin sa réplication. Il peut également être observé lors de l'utilisation d'un bactériophage sous forme de lysat : celui-ci peut en effet contenir des lysines (enzymes de dégradation de la paroi cellulaire produites par les bactériophages) en forte concentration. Le *lysis from without* est à distinguer des phénomènes d'infection abortive, au cours de laquelle des plages de lyse se forment sans production de nouveaux virions (158).

### *iii. Dynamique évolutive au cours des infections bactériennes traitées par bactériophage*

Dans le contexte de la phagothérapie, les interactions entre le bactériophage thérapeutique et la bactérie pathogène ciblée se déroulent dans un environnement complexe. Ces deux acteurs entrent en effet en interaction avec les microbiomes résidents (bactériophages, bactéries) et le système immunitaire de l'hôte humain. Les interactions tripartites entre le bactériophage, la bactérie et l'hôte humain façonnent la dynamique évolutive de chaque composant, et par conséquent le succès ou l'échec d'un traitement par bactériophage.

- *Système immunitaire : balance entre la synergie immunophage et la clairance virale*

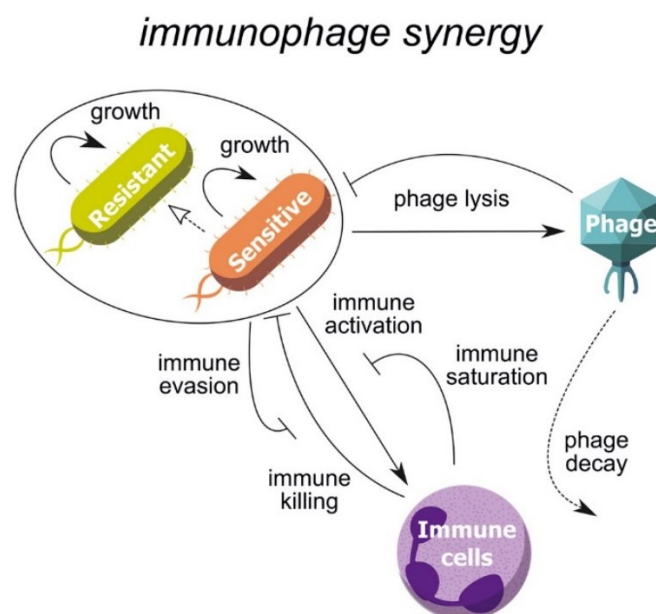
Au cours du processus infectieux, les systèmes immunitaires innés et adaptatifs de l'hôte humain reconnaissent la bactérie pathogène, ce qui active les voies de signalisation déclenchant les réponses inflammatoires et immunitaires. L'interaction du système immunitaire avec la bactérie vise ainsi à éliminer rapidement l'agent causal afin de permettre la cicatrisation des dommages tissulaires (159).

Suite à l'administration du bactériophage thérapeutique, les systèmes immunitaires innés et adaptatifs peuvent être activés par la détection de l'acide nucléique viral par les patterns recognition receptors (PPR). Cette activation aboutit dans un premier temps au déclenchement du processus de phagocytose viral, préférentiellement dans la rate et le foie (160), et dans un second temps, après un délai de deux à une dizaine de jours, à la production d'anticorps neutralisant le bactériophage (161–165). L'interaction directe du système immunitaire de l'hôte humain avec le bactériophage conduit ainsi à une clairance significative des particules virales.

Malgré la limitation possible de l'efficacité de la phagothérapie par la clairance virale de l'agent thérapeutique (165), la synergie entre le système immunitaire inné et le bactériophage est crucial pour le succès de la phagothérapie.

D'une part la reconnaissance immunitaire des bactériophages via les PRR pourrait contribuer au recrutement des phagocytes sur le site de l'infection (166). De même l'opsonisation de la surface des cellules bactériennes par les bactériophages peut augmenter la reconnaissance de la bactérie pathogène par les macrophages et par voie de conséquence sa phagocytose (167).

D'autre part, une coopération entre les polynucléaires neutrophiles et les bactériophages est indispensable à la résolution d'infections aussi diverses qu'une bactériémie à *P. aeruginosa* (168), une infection cutanée à *S. aureus* (169), ou une pneumonie à *P. aeruginosa* (170). Ces travaux ont mené à l'élaboration d'un modèle éco-évolutif *in silico*, appelé synergie immunophage, décrivant l'interaction tripartite entre la bactérie ciblée, le bactériophage thérapeutique et les polynucléaires neutrophiles (figure 29) (170, 171). L'absence de traitement peut conduire à une situation où la densité bactérienne au site infectieux est telle que les capacités du système immunitaire de l'hôte saturent et ne peuvent plus contrôler la croissance bactérienne, ce qui aboutit au décès de l'hôte. En cas de déficience du système immunitaire, une sous-population bactérienne résistante au bactériophage peut émerger et proliférer sans être contrôlée, ni par le bactériophage, ni par le système immunitaire. En combinant l'effet des défenses immunitaires de l'hôte et de la phagothérapie, la croissance bactérienne des bactéries sensibles aux bactériophages est entravée, et le système immunitaire de l'hôte, non saturé, peut alors contrecarrer la croissance des bactéries résistantes, avant que la densité bactérienne n'atteigne son seuil létal.

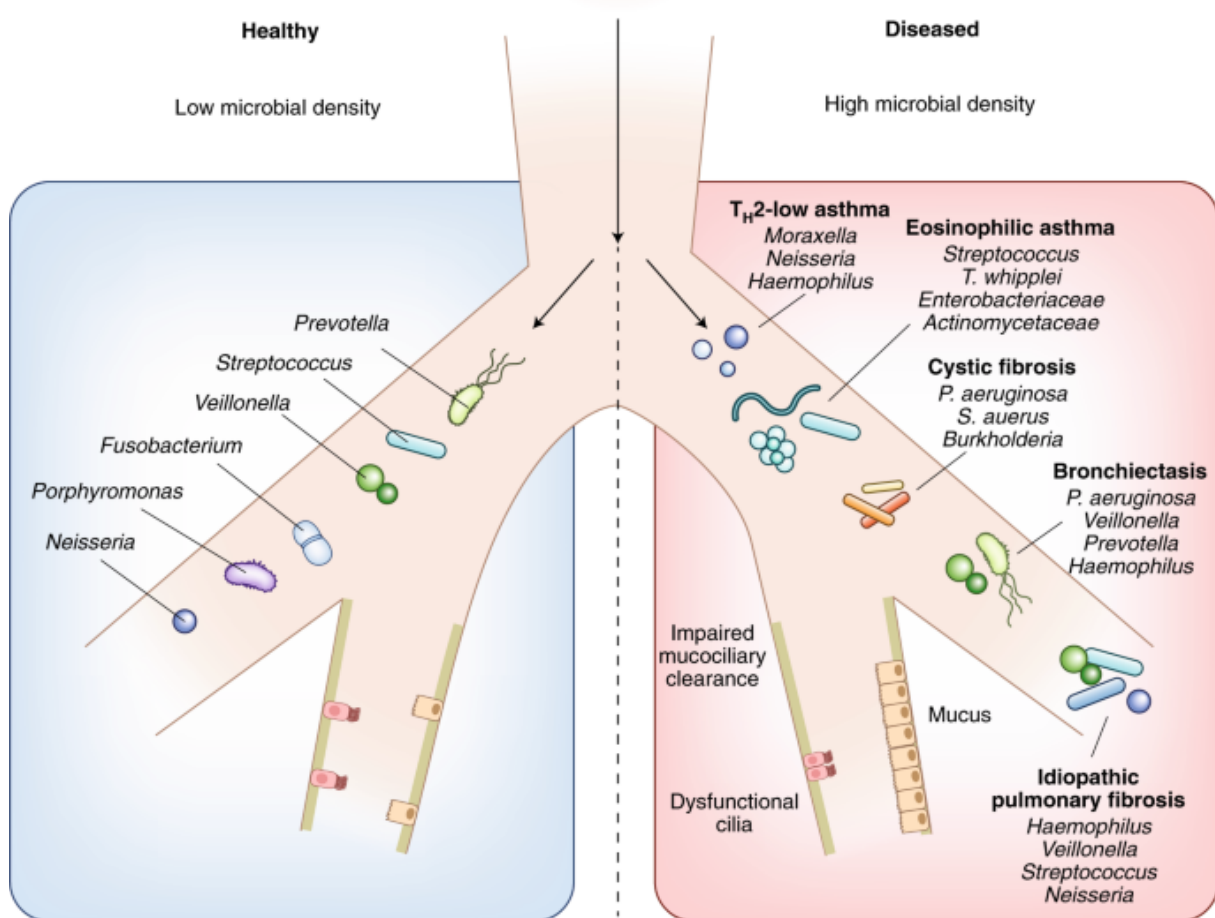


**Figure 29. Le concept de la synergie immunophage.** La coopération entre le système immunitaire inné de l'hôte vertébré et les bactériophages est nécessaire au succès de la phagothérapie pulmonaire.

Source: Roach et al. Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. 2017 (170)

- *Communautés microbiennes*

La présence d'une communauté microbienne peut également façonner les dynamiques évolutives bactérienne et virale. Les microbiomes limitent l'évolution des acteurs locaux en restreignant l'espace de niche disponible et en imposant de multiples pressions sélectives biotiques et abiotiques. Or l'arbre respiratoire arbore un microbiome unique (figure 30). Chez les individus sains, sa composition résulte de la balance entre la colonisation et l'élimination de bactéries, qui ne sont donc présentes que transitoirement. Au cours des maladies respiratoires, la composition change quantitativement et qualitativement, à la faveur d'un déséquilibre de cette balance : changement de la composition physico-chimique environnementale, défaut des mécanismes de clairance muco-ciliaire, augmentation des flux de colonisation bactérienne (intubation oro-trachéale, reflux oesophagien) (172).



**Figure 30. Le microbiome respiratoire chez l'individu sain** est essentiellement constitué de bactéries provenant de la sphère oropharyngée en faible concentration, alors qu'il se déséquilibre fortement au cours des maladies pulmonaires et bronchiques.

Source: Wypych et al. The influence of the microbiome on respiratory health. 2019 (172)

Les communautés microbiennes peuvent améliorer l'effet du bactériophage thérapeutique en imposant un coût évolutif très élevé à la résistance. La présence d'espèce bactériennes compétitrices, fréquemment retrouvées dans les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose, réduit l'émergence de la résistance de *P. aeruginosa* à la fois au bactériophage

ancestral et aux bactériophages contemporains. Cet effet était plus marginal chez un mutant non sensible au *quorum-sensing*, suggérant que l'effet protecteur des microbiomes envers l'apparition de population résistante est dépendante des densités bactériennes en présence (173). Des résultats similaires étaient retrouvés dans un autre modèle : la présence à la fois de la communauté microbienne et du bactériophage imposait une telle pression de sélection qu'elle aboutissait à l'élimination de la bactérie pathogène (*Klebsiella spp.*), contrairement à ce qui se passait en l'absence de la communauté (174).

Les communautés bactériennes peuvent également modifier qualitativement le développement de la résistance bactérienne au bactériophage. Ainsi Alesth et al. ont montré que les mécanismes de résistance en jeu étaient modifiés par le contexte communautaire : en présence d'espèces concurrentes, *P. aeruginosa* a principalement développé une résistance médiée par l'activation de système CRISPR-Cas, alors qu'en leur absence la résistance était principalement basée sur les mutations de surface (175).

La présence de bactéries concurrentes au site infectieux pourrait ainsi moduler les effets des bactériophages sur l'agent pathogène, avec pour limitante que les résultats mentionnés ci-dessus découlent d'expériences réalisées *in vitro*.

### **c. La résistance aux bactériophages émergeant au cours de la phagothérapie : état de l'art et questions**

Les dynamiques de coévolution bactériophage-bactérie au cours de la phagothérapie sont donc potentiellement influencées par les facteurs de l'hôte humain. Mais elles restent peu étudiées dans ce contexte particulier, alors même que le succès thérapeutique en dépend. Nous résumons ici l'état des connaissances actuelles, qui a fait l'objet d'une revue sur le sujet dont le texte intégral est disponible en annexe.

#### **▪ Quels sont les mécanismes de résistance au cours de la phagothérapie ?**

L'utilisation actuelle des bactériophages en thérapeutique reste à ce jour semi-empirique, en raison notamment du manque d'essais cliniques. Peu de données sont actuellement disponibles concernant l'efficacité clinique des bactériophages (une centaine de série de cas compassionnels et quelques essais cliniques) (31). Dans le cadre d'un traitement, la sélection de bactéries résistantes aux bactériophages pourrait compromettre le succès de la phagothérapie (176, 177).

Décrit très tôt, dès les premiers cas de phagothérapie, la résistance n'est pas un phénomène rare. Il est en effet rapporté dans près de la moitié des cas cliniques recensés ces cinq dernières années, et ayant adoptés une recherche systématique de résistance (revue). Des résultats similaires sont retrouvés dans les modèles précliniques de phagothérapie pour le traitement d'infections extra-intestinales aiguës (178)(revue).

Il est particulièrement frappant de noter que la surveillance de la résistance aux bactériophages au cours de la phagothérapie est souvent négligée. Et par conséquent, très peu de mécanismes de résistance aux bactériophages ont été décrits dans ce contexte : exclusivement des modifications des composants de la paroi bactérienne (178)(revue).

- *La résistance aux bactériophages est-elle systématiquement un atout thérapeutique ?*

La résistance aux bactériophages peut avoir un impact positif sur les résultats thérapeutiques en fonction du mécanisme de résistance impliqué. La phagothérapie pourrait capitaliser sur l'émergence de la résistance bactérienne aux bactériophages : soit en misant sur la résistance pour améliorer l'efficacité d'un traitement antimicrobien, soit en misant sur la résistance pour contraindre l'évolution bactérienne vers une impasse évolutive (179).

En effet, la résistance bactérienne aux bactériophages peut être associée à une diminution de la pathogénicité bactérienne. Les modifications de la surface cellulaire induisent des coûts physiologiques particulièrement élevés pour la bactérie. Les altérations du LPS ou de la capsule augmente la susceptibilité aux défenses immunitaires, tandis que la troncature de *pili* ou de flagelles affecte respectivement l'adhésion bactérienne aux épithéliums de l'hôte humain et la motilité bactérienne. La modification de la composition de la paroi cellulaire pourrait également diminuer la capacité bactérienne à absorber les nutriments dans un milieu pauvre. La production de biofilm, un autre facteur de virulence, pourrait également être altérée en empêchant l'adhésion bactérienne par les *pili* et la synthèse de matrice extracellulaire. Au cours des modèles précliniques et des études cliniques, l'émergence de clones bactériens résistants au bactériophage n'y est soit pas observée, soit observée à faible niveau, avec une diminution de la pathogénicité bactérienne et sans échec thérapeutique (178, 180–183), suggérant que, dans un contexte thérapeutique, pour résister aux bactériophages, la bactérie est contrainte vers une impasse évolutive.

Par ailleurs, la résistance bactérienne aux bactériophages est capable de favoriser la re-sensibilisation à un autre traitement. Les composants de la surface bactérienne sont en effet les cibles de nombreux agents antibactériens. La synergie bactériophage-antibiotique repose ainsi sur l'augmentation de la sensibilité aux antibiotiques, lorsque le bactériophage induit une modification de son récepteur à la surface bactérienne, comme une pompe à efflux (182, 184–187). De même, en évoluant pour résister à un bactériophage thérapeutique, les bactéries peuvent modifier la structure du récepteur du bactériophage, permettant ainsi à d'autres bactériophages d'accéder à leurs propres récepteurs. La re-sensibilisation à un premier bactériophage par acquisition de résistance à un second bactériophage a ainsi été décrite récemment (182). Cependant, cette synergie n'est pas systématique : certaines mutations de résistance aux bactériophages peuvent même conférer une résistance accrue aux antibiotiques (188).



- *Peut-on prédire les dynamiques de coévolution survenant au cours de la phagothérapie ?*

La prédiction de la dynamique de coévolution bactériophage-bactérie pourrait réduire le risque d'échec pour un traitement individuel d'un patient. Cependant, bien que la plupart des caractérisations des interactions bactéries-bactériophages proviennent d'environnements *in vitro* hautement contrôlés, nous ne savons pas dans quelle mesure les dynamiques observées *in vitro* pourraient refléter celles qui se déroulent *in vivo* quantitativement ou même qualitativement.

Des données limitées sont actuellement disponibles comparant les dynamiques de coévolution bactéries-bactériophages au cours de la phagothérapie et en laboratoire (181, 182, 189). Elles suggèrent une dynamique d'évolution parallèle, avec des mécanismes de résistance bactérienne similaires, se produisant lors d'un traitement par bactériophage (bactériophage unique en traitement de bactériémies à *E. coli* ou à *P. aeruginosa* ; cocktail de plusieurs bactériophages pour une décolonisation nasale à *P. aeruginosa*) et lors d'expériences *in vitro* de co-culture avec une administration similaire du (ou des) bactériophage(s). Cependant l'extrapolation des résultats de ces études est limitée par le faible nombre d'observations qui y étaient effectuées et la faible influence des facteurs de l'hôte (système immunitaire peu actif dans le nez, absence de communauté microbienne dans le sang). Des approches populationnelles plus larges ou associées à d'autres facteurs d'échec thérapeutique permettraient de mieux appréhender les potentielles divergences dans la coévolution bactérie-bactériophage entre des essais *in vitro* et une phagothérapie.

## Bibliographie de l'introduction

1. Meslé F. 1997. L'évolution de la mortalité par cause : les différentes facettes de la transition épidémiologique. *MS Médecine Sci Rev Pap* ISSN 0767-0974 1997 Vol 13 N° 8-9 P1008-17 <https://doi.org/10.4267/10608/499>.
2. Bowater RJ, Stirling SA, Lilford RJ. 2009. Is antibiotic prophylaxis in surgery a generally effective intervention? Testing a generic hypothesis over a set of meta-analyses. *Ann Surg* 249:551–556.
3. Schimpff S, Satterlee W, Young VM, Serpick A. 1971. Empiric therapy with carbenicillin and gentamicin for febrile patients with cancer and granulocytopenia. *N Engl J Med* 284:1061–1065.
4. 2019. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019.
5. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E, Johnson SC, Browne AJ, Chipeta MG, Fell F, Hackett S, Haines-Woodhouse G, Hamadani BHK, Kumaran EAP, McManigal B, Agarwal R, Akech S, Albertson S, Amuasi J, Andrews J, Aravkin A, Ashley E, Bailey F, Baker S, Basnyat B, Bekker A, Bender R, Bethou A, Bielicki J, Boonkasidecha S, Bukosia J, Carvalheiro C, Castañeda-Orjuela C, Chansamouth V, Chaurasia S, Chiurchiù S, Chowdhury F, Cook AJ, Cooper B, Cressey TR, Criollo-Mora E, Cunningham M, Darboe S, Day NPJ, Luca MD, Dokova K, Dramowski A, Dunachie SJ, Eckmanns T, Eibach D, Emami A, Feasey N, Fisher-Pearson N, Forrest K, Garrett D, Gastmeier P, Giref AZ, Greer RC, Gupta V, Haller S, Haselbeck A, Hay SI, Holm M, Hopkins S, Iregbu KC, Jacobs J, Jarovsky D, Javanmardi F, Khorana M, Kisson N, Kobeissi E, Kostyanov T, Krapp F, Krumkamp R, Kumar A, Kyu HH, Lim C, Limmathurotsakul D, Loftus MJ, Lunn M, Ma J, Mturi N, Munera-Huertas T, Musicha P, Mussi-Pinhata MM, Nakamura T, Nanavati R, Nangia S, Newton P, Ngoun C, Novotney A, Nwakanma D, Obiero CW, Olivas-Martinez A, Olliaro P, Ooko E, Ortiz-Brizuela E, Peleg AY, Perrone C, Plakkal N, Ponce-de-Leon A, Raad M, Ramdin T, Riddell A, Roberts T, Robotham JV, Roca A, Rudd KE, Russell N, Schnall J, Scott JAG, Shivamallappa M, Sifuentes-Osornio J, Steenkeste N, Stewardson AJ, Stoeva T, Tasak N, Thaiprakong A, Thwaites G, Turner C, Turner P, Doorn HR van, Velaphi S, Vongpradith A, Vu H, Walsh T, Waner S, Wangrangsimakul T, Wozniak T, Zheng P, Sartorius B, Lopez AD, Stergachis A, Moore C, Dolecek C, Naghavi M. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 399:629–655.
6. European Centre for Disease Prevention and Control, European Medicines Agency. 2009. The bacterial challenge : time to react : a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. disponible sur : <https://data.europa.eu/doi/10.2900/2518>.
7. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, Colomb-Cotinat M, Kretzschmar ME, Devleesschauwer B, Cecchini M, Ouakrim DA, Oliveira TC, Struelens MJ, Suetens C, Monnet DL, Burden of AMR Collaborative Group. 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 19:56–66.
8. Colomb-Cotinat M, Lacoste J, Brun-Buisson C, Jarlier V, Coignard B, Vaux S. 2016. Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. *Antimicrob Resist Infect Control* 5:56.
9. European Centre for Disease Prevention and Control., World Health Organization. 2022. Antimicrobial resistance surveillance in Europe: 2022 : 2020 data. Publications Office, LU. <https://data.europa.eu/doi/10.2900/112339>. Retrieved 21 August 2022.
10. OCDE. 2018. Stemming the Superbug Tide. disponible sur : <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264307599-en>.
11. Opatowski M, Tuppin P, Cosker K, Touat M, De Lagasnerie G, Guillemot D, Salomon J, Brun-Buisson C, Watier L. 2019. Hospitalisations with infections related to antimicrobial-resistant bacteria from the French nationwide hospital discharge database, 2016. *Epidemiol Infect* 147:e144.

12. Mission Spares. 2017. Surveillance de l'antibiorésistance en établissement de santé. Données 2018. Partie 2 : résistance bactérienne aux antibiotiques. Saint-Maurice : Santé publique France, Saint-Maurice : Santé publique France,. Disponible sur : [www.santepubliquefrance.fr](http://www.santepubliquefrance.fr).
13. M. Spieth P, Koch T, de Abreu MG. 2014. Approaches to Ventilation in Intensive Care. 42. *Dtsch Ärztebl Int* 111:714–720.
14. Society of Critical Care Medicine. 2022. Critical Care Statistics. Soc Crit Care Med SCCM. disponible sur : <https://sccm.org/Communications/Critical-Care-Statistics>. Retrieved 4 August 2022.
15. Santé publique France. 2019. Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte, Réseau REA-Raisin, France. Résultats 2017. Saint-Maurice (France); available at : [www.santepubliquefrance.fr](http://www.santepubliquefrance.fr).
16. Papazian L, Klompas M, Luyt C-E. 2020. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. 5. *Intensive Care Med* 46:888–906.
17. Koulenti D, Tsigou E, Rello J. 2017. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. 11. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 36:1999–2006.
18. ECDC. 2019. European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm (Sweden); available at : <https://www.ecdc.europa.eu/>.
19. Fihman V, Messika J, Hajage D, Tournier V, Gaudry S, Magdoud F, Barnaud G, Billard-Pomares T, Branger C, Dreyfuss D, Ricard J-D. 2015. Five-year trends for ventilator-associated pneumonia: Correlation between microbiological findings and antimicrobial drug consumption. 5. *Int J Antimicrob Agents* 46:518–525.
20. Baker SJ, Payne DJ, Rappuoli R, De Gregorio E. 2018. Technologies to address antimicrobial resistance. 51. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:12887–12895.
21. Lewis K. 2020. The Science of Antibiotic Discovery. 1. *Cell* 181:29–45.
22. Geneva: World Health Organization. 2021. 2020 antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. disponible sur : <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240021303>. Retrieved 4 August 2022.
23. Geneva: World Health Organization. 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. disponible sur : <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241509763>. Retrieved 4 August 2022.
24. Theuretzbacher U, Outterson K, Engel A, Karlén A. 2020. The global preclinical antibacterial pipeline. 5. *Nat Rev Microbiol* 18:275–285.
25. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. 2011. Phage treatment of human infections. 2. *Bacteriophage* 1:66–85.
26. Summers WC. 2011. In the beginning.... 1. *Bacteriophage* 1:50–51.
27. Twort FW. 1915. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. 4814. *The Lancet* 186:1241–1243.
28. D'Herelle F. 1917. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. *CR Acad Sci Paris*.
29. Dublanchet A. 2008. La phagothérapie au XXIe siècle. Deuxième partie : expérience actuelle. 4. *Antibiotiques* 10:219–225.

30. Brives C, Pourraz J. 2020. Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures. 1. *Palgrave Commun* 6:1–11.
31. Kwiatek M, Parasion S, Nakonieczna A. 2020. Therapeutic bacteriophages as a rescue treatment for drug-resistant infections – an in vivo studies overview. 4. *J Appl Microbiol* 128:985–1002.
32. Salmond GPC, Fineran PC. 2015. A century of the phage: past, present and future. 12. *Nat Rev Microbiol* 13:777–786.
33. Fernández L, Gutiérrez D, García P, Rodríguez A. 2019. The Perfect Bacteriophage for Therapeutic Applications-A Quick Guide. 3. *Antibiot Basel Switz* 8:E126.
34. Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. 2018. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). D1. *Nucleic Acids Res* 46:D708–D717.
35. Krupovic M, Prangishvili D, Hendrix RW, Bamford DH. 2011. Genomics of Bacterial and Archaeal Viruses: Dynamics within the Prokaryotic Virosphere. 4. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 75:610–635.
36. Ackermann H-W. 1998. Tailed Bacteriophages: The Order Caudovirales. *Adv Virus Res* 51:135–201.
37. Ackermann H-W. 2009. Phage classification and characterization. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 501:127–140.
38. Dion MB, Oechslin F, Moineau S. 2020. Phage diversity, genomics and phylogeny. 3. *Nat Rev Microbiol* 18:125–138.
39. Nobrega FL, Vlot M, de Jonge PA, Dreesens LL, Beaumont HJE, Lavigne R, Dutilh BE, Brouns SJJ. 2018. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. 12. *Nat Rev Microbiol* 16:760–773.
40. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. 2021. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. 3. *Viruses* 13:506.
41. Simmonds P, Aiewsakun P. 2018. Virus classification - where do you draw the line? 8. *Arch Virol* 163:2037–2046.
42. Iranzo J, Krupovic M, Koonin EV. 2016. The Double-Stranded DNA Virosphere as a Modular Hierarchical Network of Gene Sharing. 4. *mBio* 7:e00978-16.
43. Black LW, Thomas JA. 2012. Condensed genome structure. *Adv Exp Med Biol* 726:469–487.
44. Adriaenssens EM, Sullivan MB, Knezevic P, van Zyl LJ, Sarkar BL, Dutilh BE, Alfenas-Zerbini P, Łobocka M, Tong Y, Brister JR, Moreno Switt AI, Klumpp J, Aziz RK, Barylski J, Uchiyama J, Edwards RA, Kropinski AM, Petty NK, Clokie MRJ, Kushkina AI, Morozova VV, Duffy S, Gillis A, Rumnieks J, Kurtböke I, Chanishvili N, Goodridge L, Wittmann J, Lavigne R, Jang HB, Prangishvili D, Enault F, Turner D, Poranen MM, Oksanen HM, Krupovic M. 2020. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018-2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. 5. *Arch Virol* 165:1253–1260.
45. Krupovic M, Turner D, Morozova V, Dyall-Smith M, Oksanen HM, Edwards R, Dutilh BE, Lehman SM, Reyes A, Baquero DP, Sullivan MB, Uchiyama J, Nakavuma J, Barylski J, Young MJ, Du S, Alfenas-Zerbini P, Kushkina A, Kropinski AM, Kurtböke I, Brister JR, Lood C, Sarkar BL, Yigang T, Liu Y, Huang L, Wittmann J, Chanishvili N, van Zyl LJ, Rumnieks J, Mochizuki T, Jalasvuori M, Aziz RK, Łobocka M, Stedman KM, Shkoporov AN, Gillis A, Peng X, Enault F, Knezevic P, Lavigne R, Rhee S-K, Cvirkaite-Krupovic V, Moraru C, Moreno Switt AI, Poranen MM, Millard A, Prangishvili D, Adriaenssens EM. 2021. Bacterial Viruses Subcommittee and Archaeal Viruses Subcommittee of the ICTV: update of taxonomy changes in 2021. 11. *Arch Virol* 166:3239–3244.

46. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2022. Virus Taxonomy: 2021 Release. disponible sur : <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Retrieved 4 August 2022.
47. Duckworth DH. 1987. History and basic properties of bacterial viruses, p. 1–43. *In* Goyal SM Gerba CP Bitton G Phage Ecology. New York John Wiley & Sons.
48. Kokjohn TA, Miller RV. 1992. Gene transfer in the environment: transduction., p. 54–81. *In* Fry JC, Day MJ (eds). Release of Genetically Engineered and Other Micro-Organisms. Cambridge: Cambridge University Press.
49. Letellier L, Boulanger P, Plançon L, Jacquot P, Santamaria M. 2004. Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. *Front Biosci J Virtual Libr* 9:1228–1339.
50. Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. 2016. Host receptors for bacteriophage adsorption. 4. *FEMS Microbiol Lett* 363:fnw002.
51. Shen Y, Loessner MJ. 2021. Beyond antibacterials – exploring bacteriophages as antivirulence agents. *Curr Opin Biotechnol* 68:166–173.
52. Molineux IJ. 2006. Fifty-three years since Hershey and Chase; much ado about pressure but which pressure is it? 1. *Virology* 344:221–229.
53. Mäntynen S, Laanto E, Oksanen HM, Poranen MM, Díaz-Muñoz SL. 2021. Black box of phage-bacterium interactions: exploring alternative phage infection strategies. 9. *Open Biol* 11:210188.
54. Hay ID, Lithgow T. 2019. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. 6. *EMBO Rep* 20:e47427.
55. Romantschuk M, Bamford DH. 1981. phi 6-resistant phage-producing mutants of *Pseudomonas phaseolicola*. Pt 2. *J Gen Virol* 56:287–295.
56. 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. 8. *J Gen Virol* 98:2181–2189.
57. Ripp S, Miller RV. 1998. Dynamics of the pseudolysogenic response in slowly growing cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Read Engl* 144 ( Pt 8):2225–2232.
58. Łoś M, Węgrzyn G. 2012. Pseudolysogeny. *Adv Virus Res* 82:339–349.
59. Gordon DM, Cowling A. 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. Pt 12. *Microbiol Read Engl* 149:3575–3586.
60. Van Donsel DJ, Geldreich EE, Clarke NA. 1967. Seasonal Variations in Survival of Indicator Bacteria in Soil and Their Contribution to Storm-water Pollution. 6. *Appl Microbiol* 15:1362–1370.
61. Van Donsel D, Geldreich EE. 1971. Relationships of Salmonellae to Fecal Coliforms in Bottom Sediments. *Water Res - WATER RES* 5:1079–1087.
62. Goyal SM, Gerba CP, Melnick JL. 1977. Occurrence and distribution of bacterial indicators and pathogens in canal communities along the Texas coast. 2. *Appl Environ Microbiol* 34:139–149.
63. Touchon M, Perrin A, Sousa JAM de, Vangchhia B, Burn S, O'Brien CL, Denamur E, Gordon D, Rocha EP. 2020. Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. 6. *PLOS Genet* 16:e1008866.
64. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, Bingen E, Bonacorsi S, Bouchier C, Bouvet O, Calteau A, Chiapello H, Clermont O, Cruveiller S, Danchin A, Diard M, Dossat C, Karoui ME, Frapy E,

- Garry L, Ghigo JM, Gilles AM, Johnson J, Bouguéneq CL, Lescat M, Mangenot S, Martinez-Jéhanne V, Matic I, Nassif X, Oztas S, Petit MA, Pichon C, Rouy Z, Ruf CS, Schneider D, Tourret J, Vacherie B, Vallenet D, Médigue C, Rocha EPC, Denamur E. 2009. Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. 1. *PLOS Genet* 5:e1000344.
65. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GSA, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, Crabtree J, Sebahia M, Thomson NR, Chaudhuri R, Henderson IR, Sperandio V, Ravel J. 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. 20. *J Bacteriol* 190:6881–6893.
  66. Lee H, Popodi E, Tang H, Foster PL. 2012. Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. 41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E2774-2783.
  67. Foster PL, Lee H, Popodi E, Townes JP, Tang H. 2015. Determinants of spontaneous mutation in the bacterium *Escherichia coli* as revealed by whole-genome sequencing. 44. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E5990-5999.
  68. Garibyan L, Huang T, Kim M, Wolff E, Nguyen A, Nguyen T, Diep A, Hu K, Iverson A, Yang H, Miller JH. 2003. Use of the *rpoB* gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. 5. *DNA Repair* 2:593–608.
  69. Drake JW. 1991. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. 16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7160–7164.
  70. Schubert S, Darlu P, Clermont O, Wieser A, Magistro G, Hoffmann C, Weinert K, Tenailon O, Matic I, Denamur E. 2009. Role of intraspecies recombination in the spread of pathogenicity islands within the *Escherichia coli* species. 1. *PLoS Pathog* 5:e1000257.
  71. Welch RA, Burland V, Plunkett G, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou S-R, Boutin A, Hackett J, Stroud D, Mayhew GF, Rose DJ, Zhou S, Schwartz DC, Perna NT, Mobley HLT, Donnenberg MS, Blattner FR. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. 26. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:17020–17024.
  72. Williams LE, Wireman J, Hilliard VC, Summers AO. 2013. Large plasmids of *Escherichia coli* and *Salmonella* encode highly diverse arrays of accessory genes on common replicon families. 1. *Plasmid* 69:36–48.
  73. Sherley M, Gordon DM, Collignon PJ. 2003. Species differences in plasmid carriage in the Enterobacteriaceae. 1. *Plasmid* 49:79–85.
  74. Touchon M, Bernheim A, Rocha EP. 2016. Genetic and life-history traits associated with the distribution of prophages in bacteria. 11. *ISME J* 10:2744–2754.
  75. Wang J, Ma W, Wang X. 2021. Insights into the structure of *Escherichia coli* outer membrane as the target for engineering microbial cell factories. *Microb Cell Factories* 20:73.
  76. Liu B, Furevi A, Perepelov AV, Guo X, Cao H, Wang Q, Reeves PR, Knirel YA, Wang L, Widmalm G. 2020. Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. 6. *FEMS Microbiol Rev* 44:655–683.
  77. Heinrichs DE, Yethon JA, Whitfield C. 1998. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. 2. *Mol Microbiol* 30:221–232.
  78. Whitfield C. 2009. Structure and Assembly of *Escherichia coli* Capsules. 2. *EcoSal Plus* 3.
  79. Rendueles O, Garcia-Garcerà M, Néron B, Touchon M, Rocha EPC. 2017. Abundance and co-occurrence of extracellular capsules increase environmental breadth: Implications for the emergence of pathogens. *PLoS Pathog* 13:e1006525.

80. Machado J, Grimont F, Grimont PAD. 2000. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. 7. *Res Microbiol* 151:535–546.
81. Rahn A, Drummelsmith J, Whitfield C. 1999. Conserved organization in the *cps* gene clusters for expression of *Escherichia coli* group 1 K antigens: relationship to the colanic acid biosynthesis locus and the *cps* genes from *Klebsiella pneumoniae*. 7. *J Bacteriol* 181:2307–2313.
82. Schneider G, Dobrindt U, Brüggemann H, Nagy G, Janke B, Blum-Oehler G, Buchrieser C, Gottschalk G, Emödy L, Hacker J. 2004. The pathogenicity island-associated K15 capsule determinant exhibits a novel genetic structure and correlates with virulence in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* 72:5993–6001.
83. Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. 2021. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. 1. *Nat Rev Microbiol* 19:37–54.
84. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. 1. *Environ Microbiol Rep* 5:58–65.
85. Clermont O, Gordon DM, Brisse S, Walk ST, Denamur E. 2011. Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. 9. *Environ Microbiol* 13:2468–2477.
86. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. 10. *Appl Environ Microbiol* 66:4555–4558.
87. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. 2018. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genomics* 4.
88. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. 5. *Mol Microbiol* 60:1136–1151.
89. Jaureguy F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, Carbonnelle E, Lortholary O, Clermont O, Denamur E, Picard B, Nassif X, Brisse S. 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9:560.
90. van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT. 2011. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. 2. *ISME J* 5:173–183.
91. Rang CU, Licht TR, Midtvedt T, Conway PL, Chao L, Krogfelt KA, Cohen PS, Molin S. 1999. Estimation of growth rates of *Escherichia coli* BJ4 in streptomycin-treated and previously germfree mice by in situ rRNA hybridization. 3. *Clin Diagn Lab Immunol* 6:434–436.
92. Dalhoff A. 1985. Differences between bacteria grown in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother* 15 Suppl A:175–195.
93. Abraham S, Gordon DM, Chin J, Brouwers HJM, Njuguna P, Groves MD, Zhang R, Chapman TA. 2012. Molecular Characterization of Commensal *Escherichia coli* Adapted to Different Compartments of the Porcine Gastrointestinal Tract. 19. *Appl Environ Microbiol* 78:6799–6803.
94. Chang D-E, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, Stevenson SJ, Anderson AB, Grissom JE, Laux DC, Cohen PS, Conway T. 2004. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. 19. *Proc Natl Acad Sci* 101:7427–7432.
95. Jones SA, Chowdhury FZ, Fabich AJ, Anderson A, Schreiner DM, House AL, Autieri SM, Leatham MP, Lins JJ, Jorgensen M, Cohen PS, Conway T. 2007. Respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. 10. *Infect Immun* 75:4891–4899.

96. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. 2. *Nat Rev Microbiol* 2:123–140.
97. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. 5. *Nat Rev Microbiol* 2:414–424.
98. Bliven KA, Maurelli AT. 2012. Antivirulence genes: insights into pathogen evolution through gene loss. 12. *Infect Immun* 80:4061–4070.
99. Sokurenko EV, Chesnokova V, Dykhuizen DE, Ofek I, Wu X-R, Krogfelt KA, Struve C, Schembri MA, Hasty DL. 1998. Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. 15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8922–8926.
100. La Combe B, Clermont O, Messika J, Eveillard M, Kouatchet A, Lasocki S, Corvec S, Lakhali K, Billard-Pomares T, Fernandes R, Armand-Lefevre L, Bourdon S, Reignier J, Fihman V, de Prost N, Bador J, Goret J, Wallet F, Denamur E, Ricard J-D, COLOCOLI group, COLOCOLI Group. 2019. Pneumonia-Specific *Escherichia coli* with Distinct Phylogenetic and Virulence Profiles, France, 2012–2014. *Emerg Infect Dis* 25:710–718.
101. Messika J, Magdoud F, Clermont O, Margetis D, Gaudry S, Roux D, Branger C, Dreyfuss D, Denamur E, Ricard J-D. 2012. Pathophysiology of *Escherichia coli* ventilator-associated pneumonia: implication of highly virulent extraintestinal pathogenic strains. *Intensive Care Med* 38:2007–2016.
102. Hacker J, Knapp S, Goebel W. 1983. Spontaneous deletions and flanking regions of the chromosomally inherited hemolysin determinant of an *Escherichia coli* O6 strain. 3. *J Bacteriol* 154:1145–1152.
103. Brzuszkiewicz E, Brüggemann H, Liesegang H, Emmerth M, Olschläger T, Nagy G, Albermann K, Wagner C, Buchrieser C, Emody L, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U. 2006. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12879–12884.
104. Phillips-Houlbracq M, Ricard J-D, Foucrier A, Yoder-Himes D, Gaudry S, Bex J, Messika J, Margetis D, Chatel J, Dobrindt U, Denamur E, Roux D. 2018. Pathophysiology of *Escherichia coli* pneumonia: Respective contribution of pathogenicity islands to virulence. 2. *Int J Med Microbiol IJMM* 308:290–296.
105. Tourret J, Diard M, Garry L, Matic I, Denamur E. 2010. Effects of single and multiple pathogenicity island deletions on uropathogenic *Escherichia coli* strain 536 intrinsic extra-intestinal virulence. 7. *Int J Med Microbiol IJMM* 300:435–439.
106. Dufour N, Debarbieux L, Fromentin M, Ricard J-D. 2015. Treatment of Highly Virulent Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Pneumonia With Bacteriophages\*. *Crit Care Med* 43:e190.
107. Mushegian AR. 2020. Are There 10<sup>31</sup> Virus Particles on Earth, or More, or Fewer? 9. *J Bacteriol* 202:e00052-20.
108. Ghosh D, Roy K, Williamson KE, White DC, Wommack KE, Sublette KL, Radosevich M. 2008. Prevalence of Lysogeny among Soil Bacteria and Presence of 16S rRNA and trzN Genes in Viral-Community DNA. 2. *Appl Environ Microbiol* 74:495–502.
109. Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A, Brüßow H. 2003. Prophage Genomics. 2. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:238–276.
110. Cochran null, Paul null. 1998. Seasonal abundance of lysogenic bacteria in a subtropical estuary. 6. *Appl Environ Microbiol* 64:2308–2312.
111. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. 5. *Nat Rev Microbiol* 8:317–327.



112. Hampton HG, Watson BNJ, Fineran PC. 2020. The arms race between bacteria and their phage foes. 7790. *Nature* 577:327–336.
113. Abedon ST. 1994. Lysis and the interaction between free phages and infected cells. *Mol Biol Bacteriophage T4* 397–405.
114. Berngruber TW, Weissing FJ, Gandon S. 2010. Inhibition of superinfection and the evolution of viral latency. 19. *J Virol* 84:10200–10208.
115. Tock MR, Dryden DTF. 2005. The biology of restriction and anti-restriction. 4. *Curr Opin Microbiol* 8:466–472.
116. 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. 2. *EMBO J* 34:169–183.
117. 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. 1. *Nat Microbiol* 3:90–98.
118. Thiaville JJ, Kellner SM, Yuan Y, Hutinet G, Thiaville PC, Jumpathong W, Mohapatra S, Brochier-Armanet C, Letarov AV, Hillebrand R, Malik CK, Rizzo CJ, Dedon PC, de Crécy-Lagard V. 2016. Novel genomic island modifies DNA with 7-deazaguanine derivatives. 11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E1452-1459.
119. Wang L, Chen S, Xu T, Taghizadeh K, Wishnok JS, Zhou X, You D, Deng Z, Dedon PC. 2007. Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes. 11. *Nat Chem Biol* 3:709–710.
120. Swarts DC, Jore MM, Westra ER, Zhu Y, Janssen JH, Snijders AP, Wang Y, Patel DJ, Berenguer J, Brouns SJJ, van der Oost J. 2014. DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. 7491. *Nature* 507:258–261.
121. Lisitskaya L, Aravin AA, Kulbachinskiy A. 2018. DNA interference and beyond: structure and functions of prokaryotic Argonaute proteins. 1. *Nat Commun* 9:5165.
122. Bernheim A, Sorek R. 2020. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. 2. *Nat Rev Microbiol* 18:113–119.
123. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. 5819. *Science* 315:1709–1712.
124. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. 2017. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol* 37:67–78.
125. Tesson F, Hervé A, Mordret E, Touchon M, d’Humières C, Cury J, Bernheim A. 2022. Systematic and quantitative view of the antiviral arsenal of prokaryotes. 1. *Nat Commun* 13:2561.
126. Bernheim A, Millman A, Ofir G, Meitav G, Avraham C, Shomar H, Rosenberg MM, Tal N, Melamed S, Amitai G, Sorek R. 2021. Prokaryotic viperins produce diverse antiviral molecules. 7840. *Nature* 589:120–124.
127. Kronheim S, Daniel-Ivad M, Duan Z, Hwang S, Wong AI, Mantel I, Nodwell JR, Maxwell KL. 2018. A chemical defence against phage infection. 7735. *Nature* 564:283–286.
128. Kever L, Hardy A, Luthe T, Hünnefeld M, Gätgens C, Milke L, Wiechert J, Wittmann J, Moraru C, Marienhagen J, Frunzke J. 2022. Aminoglycoside Antibiotics Inhibit Phage Infection by Blocking an Early Step of the Infection Cycle. 3. *mBio* 13:e00783-22.

129. Tal N, Millman A, Stokar-Avihail A, Fedorenko T, Leavitt A, Melamed S, Yirmiya E, Avraham C, Brandis A, Mehlman T, Amitai G, Sorek R. 2022. Bacteria deplete deoxynucleotides to defend against bacteriophage infection. *Nat Microbiol* 7:1200–1209.
130. Lopatina A, Tal N, Sorek R. 2020. Abortive Infection: Bacterial Suicide as an Antiviral Immune Strategy. 1. *Annu Rev Virol* 7:371–384.
131. 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. 7780. *Nature* 574:691–695.
132. Tal N, Morehouse BR, Millman A, Stokar-Avihail A, Avraham C, Fedorenko T, Yirmiya E, Herbst E, Brandis A, Mehlman T, Oppenheimer-Shaanan Y, Keszei AFA, Shao S, Amitai G, Kranzusch PJ, Sorek R. 2021. Cyclic CMP and cyclic UMP mediate bacterial immunity against phages. 23. *Cell* 184:5728-5739.e16.
133. Ofir G, Herbst E, Baroz M, Cohen D, Millman A, Doron S, Tal N, Malheiro DBA, Malitsky S, Amitai G, Sorek R. 2021. Antiviral activity of bacterial TIR domains via immune signalling molecules. 7887. *Nature* 600:116–120.
134. Millman A, Bernheim A, Stokar-Avihail A, Fedorenko T, Voichek M, Leavitt A, Oppenheimer-Shaanan Y, Sorek R. 2020. Bacterial Retrons Function In Anti-Phage Defense. 6. *Cell* 183:1551-1561.e12.
135. Guegler CK, Laub MT. 2021. Shutoff of host transcription triggers a toxin-antitoxin system to cleave phage RNA and abort infection. 11. *Mol Cell* 81:2361-2373.e9.
136. Tal N, Sorek R. 2022. SnapShot: Bacterial immunity. *Cell* 185:578-578.e1.
137. Gao L, Altae-Tran H, Böhning F, Makarova KS, Segel M, Schmid-Burgk JL, Koob J, Wolf YI, Koonin EV, Zhang F. 2020. Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes. 6507. *Science* 369:1077–1084.
138. Doron S, Melamed S, Ofir G, Leavitt A, Lopatina A, Keren M, Amitai G, Sorek R. 2018. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. 6379. *Science* 359:eaar4120.
139. de Jonge PA, Nobrega FL, Brouns SJJ, Dutilh BE. 2019. Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range. *Trends Microbiol* 27:51–63.
140. Leavitt A, Yirmiya E, Amitai G, Lu A, Garb J, Morehouse BR, Hobbs SJ, Kranzusch PJ, Sorek R. 2022. Viruses inhibit TIR gcADPR signaling to overcome bacterial defense. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2022.05.03.490397>.
141. Hendrix RW, Smith MC, Burns RN, Ford ME, Hatfull GF. 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2192–2197.
142. Menouni R, Hutinet G, Petit M-A, Ansaldi M. 2015. Bacterial genome remodeling through bacteriophage recombination. *FEMS Microbiol Lett* 362:1–10.
143. Breitbart M, Bonnain C, Malki K, Sawaya NA. 2018. Phage puppet masters of the marine microbial realm. 7. *Nat Microbiol* 3:754–766.
144. Janzen DH. 1980. WHEN IS IT COEVOLUTION? *Evol Int J Org Evol* 34:611–612.
145. Dennehy JJ. 2012. What Can Phages Tell Us about Host-Pathogen Coevolution? *Int J Evol Biol* 2012:396165.
146. Koskella B, Brockhurst MA. 2014. Bacteria–phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *Fems Microbiol Rev* 38:916–931.

147. Gandon S, Buckling A, Decaestecker E, Day T. 2008. Host–parasite coevolution and patterns of adaptation across time and space. *J Evol Biol* 21:1861–1866.
148. Hall AR, Scanlan PD, Morgan AD, Buckling A. 2011. Host-parasite coevolutionary arms races give way to fluctuating selection. *Ecol Lett* 14:635–642.
149. Lenski RE, Levin BR. 1985. Constraints on the Coevolution of Bacteria and Virulent Phage: A Model, Some Experiments, and Predictions for Natural Communities. *Am Nat* 125:585–602.
150. Luria SE, Delbrück M. 1943. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* 28:491–511.
151. Kutter E. 2009. Phage Host Range and Efficiency of Plating. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 501:141–9.
152. Hyman P, Abedon ST. 2010. Chapter 7 - Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance, p. 217–248. *In Advances in Applied Microbiology*. Academic Press.
153. Roux S, Brum JR, Dutilh BE, Sunagawa S, Duhaime MB, Loy A, Poulos BT, Solonenko N, Lara E, Poulain J, Pesant S, Kandels-Lewis S, Dimier C, Picheral M, Searson S, Cruaud C, Alberti A, Duarte CM, Gasol JM, Vaqué D, Bork P, Acinas SG, Wincker P, Sullivan MB. 2016. Ecogenomics and potential biogeochemical impacts of globally abundant ocean viruses. *Nature* 537:689–693.
154. Paez-Espino D, Eloe-Fadrosh EA, Pavlopoulos GA, Thomas AD, Huntemann M, Mikhailova N, Rubin E, Ivanova NN, Kyrpides NC. 2016. Uncovering Earth’s virome. *Nature* 536:425–430.
155. Hussain FA, Dubert J, Elsherbini J, Murphy M, VanInsberghe D, Arevalo P, Kauffman K, Rodino-Janeiro BK, Gavin H, Gomez A, Lopatina A, Le Roux F, Polz MF. 2021. Rapid evolutionary turnover of mobile genetic elements drives bacterial resistance to phages. *Science* 374:488–492.
156. Piel D, Bruto M, Labreuche Y, Blanquart F, Goudenège D, Barcia-Cruz R, Chenivesse S, Le Panse S, James A, Dubert J, Petton B, Lieberman E, Wegner KM, Hussain FA, Kauffman KM, Polz MF, Bikard D, Gandon S, Rocha EPC, Le Roux F. 2022. Phage–host coevolution in natural populations. *Nat Microbiol* 7:1075–1086.
157. Abedon ST, Yin J. 2009. Bacteriophage Plaques: Theory and Analysis, p. 161–174. *In Clokie, MRJ, Kropinski, AM (eds.), Bacteriophages*. Humana Press, Totowa, NJ.
158. Abedon ST. 2011. Lysis from without. *Bacteriophage* 1:46–49.
159. Medzhitov R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819–826.
160. Van Belleggem JD, Dąbrowska K, Vaneechoutte M, Barr JJ, Bollyky PL. 2018. Interactions between Bacteriophage, Bacteria, and the Mammalian Immune System. *Viruses* 11:E10.
161. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, Carlton R, Merrill CR. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 70:204–210.
162. Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, Sun Z, Reed E, Ding L, Gong J, Li QQ, Hu J. 2006. Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Med* 17:309–317.
163. Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, Sun Z, Tao D, Ding L, Reed E, Gong J, Li QQ, Hu J. 2006. Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of mice with extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia. *Int J Mol Med* 17:347–355.

164. Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchniewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. 2019. Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os. *Front Immunol* 10:2607.
165. Hodyra-Stefaniak K, Miernikiewicz P, Drapała J, Drab M, Jończyk-Matysiak E, Lecion D, Kaźmierczak Z, Beta W, Majewska J, Harhala M, Bubak B, Kłopot A, Górski A, Dąbrowska K. 2015. Mammalian Host-Versus-Phage immune response determines phage fate in vivo. *Sci Rep* 5:14802.
166. Park K, Cha KE, Myung H. 2014. Observation of inflammatory responses in mice orally fed with bacteriophage T7. *J Appl Microbiol* 117:627–633.
167. Kaur S, Harjai K, Chhibber S. 2014. Bacteriophage-aided intracellular killing of engulfed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by murine macrophages. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:4653–4661.
168. Tiwari BR, Kim S, Rahman M, Kim J. 2011. Antibacterial efficacy of lytic *Pseudomonas* bacteriophage in normal and neutropenic mice models. *J Microbiol Seoul Korea* 49:994–999.
169. Pincus NB, Reckhow JD, Saleem D, Jammeh ML, Datta SK, Myles IA. 2015. Strain Specific Phage Treatment for *Staphylococcus aureus* Infection Is Influenced by Host Immunity and Site of Infection. *PLoS One* 10:e0124280.
170. Roach DR, Leung CY, Henry M, Morello E, Singh D, Di Santo JP, Weitz JS, Debarbieux L. 2017. Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. *Cell Host Microbe* 22:38-47.e4.
171. Leung CY, Weitz JS. 2017. Modeling the synergistic elimination of bacteria by phage and the innate immune system. *J Theor Biol* 429:241–252.
172. Wypych TP, Wickramasinghe LC, Marsland BJ. 2019. The influence of the microbiome on respiratory health. *Nat Immunol* 20:1279–1290.
173. Mumford R, Friman V-P. 2017. Bacterial competition and quorum-sensing signalling shape the eco-evolutionary outcomes of model in vitro phage therapy. *Evol Appl* 10:161–169.
174. Johnke J, Baron M, de Leeuw M, Kushmaro A, Jurkevitch E, Harms H, Chatzinotas A. 2017. A Generalist Protist Predator Enables Coexistence in Multitrophic Predator-Prey Systems Containing a Phage and the Bacterial Predator *Bdellovibrio*. *Front Ecol Evol* 5.
175. Alseth EO, Pursey E, Luján AM, McLeod I, Rollie C, Westra ER. 2019. Bacterial biodiversity drives the evolution of CRISPR-based phage resistance. *Nature* 574:549–552.
176. Cohan FM, Zandi M, Turner PE. 2020. Broad-scale phage therapy is unlikely to select for widespread evolution of bacterial resistance to virus infection. *Virus Evol* 6:veaa060.
177. Rohde C, Resch G, Pirnay J-P, Blasdel BG, Debarbieux L, Gelman D, Górski A, Hazan R, Huys I, Kakabadze E, Łobocka M, Maestri A, Almeida GM de F, Makalatia K, Malik DJ, Mašlaňová I, Merabishvili M, Pantucek R, Rose T, Štveráková D, Van Raemdonck H, Verbeken G, Chanishvili N. 2018. Expert Opinion on Three Phage Therapy Related Topics: Bacterial Phage Resistance, Phage Training and Prophages in Bacterial Production Strains. *Viruses* 10:178.
178. Oechslin F. 2018. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses* 10:E351.
179. Torres-Barceló C, Turner PE, Buckling A. 2022. Mitigation of evolved bacterial resistance to phage therapy. *Curr Opin Virol* 53:101201.

180. Egado JE, Costa AR, Aparicio-Maldonado C, Haas P-J, Brouns SJJ. 2021. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiol Rev* 46:fuab048.
181. Salazar KC, Ma L, Green SI, Zulk JJ, Trautner BW, Ramig RF, Clark JR, Terwilliger AL, Maresso AW. 2021. Antiviral Resistance and Phage Counter Adaptation to Antibiotic-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *mBio* 12:e00211-21.
182. Gordillo Altamirano FL, Kostoulis X, Subedi D, Korneev D, Peleg AY, Barr JJ. 2022. Phage-antibiotic combination is a superior treatment against *Acinetobacter baumannii* in a preclinical study. *EBioMedicine* 80:104045.
183. Engeman E, Freyberger HR, Corey BW, Ward AM, He Y, Nikolich MP, Filippov AA, Tyner SD, Jacobs AC. 2021. Synergistic Killing and Re-Sensitization of *Pseudomonas aeruginosa* to Antibiotics by Phage-Antibiotic Combination Treatment. 3. *Pharmaceuticals* 14:184.
184. Segall AM, Roach DR, Strathdee SA. 2019. Stronger together? Perspectives on phage-antibiotic synergy in clinical applications of phage therapy. *Curr Opin Microbiol* 51:46–50.
185. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. 2016. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. 1. *Sci Rep* 6:26717.
186. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, Barr JJ, Reed SL, Rohwer F, Benler S, Segall AM, Taplitz R, Smith DM, Kerr K, Kumaraswamy M, Nizet V, Lin L, McCauley MD, Strathdee SA, Benson CA, Pope RK, Leroux BM, Picel AC, Mateczun AJ, Cilwa KE, Regeimbal JM, Estrella LA, Wolfe DM, Henry MS, Quinones J, Salka S, Bishop-Lilly KA, Young R, Hamilton T. 2017. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00954-17.
187. Chang RYK, Chow MYT, Wang Y, Liu C, Hong Q, Morales S, McLachlan AJ, Kutter E, Li J, Chan H-K. 2022. The effects of different doses of inhaled bacteriophage therapy for *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections in mice. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 28:983–989.
188. Burmeister AR, Fortier A, Roush C, Lessing AJ, Bender RG, Barahman R, Grant R, Chan BK, Turner PE. 2020. Pleiotropy complicates a trade-off between phage resistance and antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:11207–11216.
189. Castledine M, Padfield D, Sierocinski P, Soria Pascual J, Hughes A, Mäkinen L, Friman V-P, Pirnay J-P, Merabishvili M, de Vos D, Buckling A. 2022. Parallel evolution of *Pseudomonas aeruginosa* phage resistance and virulence loss in response to phage treatment in vivo and in vitro. *eLife* 11:e73679.

## Objectifs et plan de thèse

Evaluer les interactions bactériophage-bactérie dans une perspective de phagothérapie pulmonaire à l'aide du modèle *Escherichia coli*.

L'anticipation des dynamiques évolutives est essentielle pour comprendre et contrôler les interactions entre le bactériophage thérapeutique, la bactérie pathogène ciblée et l'hôte humain, et donc finalement pour le succès ou l'échec de la phagothérapie. La conception et l'évaluation de la phagothérapie se base sur une série d'études, reposant sur des expériences *in vitro* et *in vivo* (modèles animaux), ainsi que sur des modèles informatiques *in silico*. Ces études ont fait progresser la compréhension des facteurs affectant les résultats de la phagothérapie (1-4).

Pour comprendre la complexité des interactions bactériophage-bactérie, je présente ici une démarche combinant des méthodes d'évaluation phénotypiques à une approche génomique, à la fois *in vitro* et *in vivo*, afin d'affiner des modèles *in silico* prédictifs du succès du traitement par bactériophage au cours d'une phagothérapie pulmonaire dans un modèle murin.

Dans un premier travail (chapitre 2), en couplant un modèle mathématique avec un outil d'imagerie *in vivo* pour suivre longitudinalement les animaux dans le temps, nous avons caractérisé l'interaction entre les bactériophages et les bactéries, lors du traitement, par une dose unique du bactériophage virulent 536\_P1, d'une pneumonie murine induite par la souche *E. coli* 536. Le modèle met en évidence plusieurs paramètres clés pour l'efficacité thérapeutique des bactériophages, notamment le rôle critique d'une population bactérienne résistante à ceux-ci.

Dans un second travail (chapitre 3), nous avons étudié une large population de clones résistants aux bactériophages, émergeant au cours de ce modèle de pneumonie murine. Nous l'avons comparé à une population résistante émergeant au cours d'une co-culture en milieu liquide riche en nutriments *in vitro*. Le séquençage génomique de ces clones bactériens a révélé une convergence mutationnelle des mécanismes de résistance au bactériophage vers la modification de deux composants de la paroi cellulaire (hyperproduction de la capsule et troncation du récepteur (LPS)). La résistance au bactériophage n'a pas conduit ici systématiquement à la sélection de clones moins virulents, mais a également sélectionné des clones restant aussi virulents que la souche sauvage. Cependant, la résistance à 536\_P1 conduisait à une sensibilisation à de nouveaux bactériophages. Nos résultats suggèrent que la résistance, survenant dans les premiers jours d'un traitement par bactériophage, pourrait être facilement prédite à partir d'expériences *in vitro*. Elle pourrait également être contrée par un cocktail de bactériophages, par leurs effets combinés sur l'évolution bactérienne pour résister aux bactériophages thérapeutiques.

Dans un troisième travail (chapitre 4), nous avons enfin exploré les déterminants du spectre d'hôtes des bactériophages à l'échelle du genre *Escherichia*. Nous avons combiné une méthode d'évaluation phénotypique standardisée, à une approche génomique, puis, développé des modèles préliminaires *in silico* pour prédire les interactions entre bactériophages et bactéries. Nous avons réalisé une caractérisation phénotypique et génomique d'une banque de 120 bactériophages isolés sur plus de 35 souches d'*E. coli*, et testée sur une collection de 369 souches représentatives du genre *Escherichia*. Nos résultats montrent que le taux d'interaction positive moyenne est de 17%, avec une grande divergence selon les souches. Le spectre d'hôtes des bactériophages est corrélé à leur proximité phylogénique. La phylogénie bactérienne ne semble pas être le déterminant principal du spectre d'hôtes au niveau intra-espèce. Ce dernier axe est détaillé dans le chapitre 4.

L'ensemble de ces résultats sont confrontés dans le chapitre 5 « Perspectives », où je discute de l'importance à accorder aux mécanismes de résistance bactérienne au cours de la constitution et de l'utilisation de cocktails thérapeutiques de bactériophages, notamment chez des patients présentant d'autres facteurs d'échec du traitement (immunodépression, biofilm).

1. Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. 2019. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clin Microbiol Rev* 32:e00066-18.
2. Kortright KE, Chan BK, Koff JL, Turner PE. 2019. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe* 25:219–232.
3. Melo LDR, Oliveira H, Pires DP, Dabrowska K, Azeredo J. 2020. Phage therapy efficacy: a review of the last 10 years of preclinical studies. *Crit Rev Microbiol* 46:78–99.
4. Roach DR, Leung CY, Henry M, Morello E, Singh D, Di Santo JP, Weitz JS, Debarbieux L. 2017. Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. *Cell Host Microbe* 22:38-47.e4.

# **CHAPITRE 2**

-

## **MODELE PHARMACOMETRIQUE DE PHAGOTHERAPIE PULMONAIRE**

-

## **LA RESISTANCE BACTERIENNE AU BACTERIOPHAGE THERAPEUTIQUE : UN FACTEUR D'ECHEC DU TRAITEMENT**





La translation des résultats expérimentaux pré-cliniques de phagothérapie aux essais cliniques reste difficile. Une limite majeure pour le déploiement de la phagothérapie à grande échelle reste la détermination de la dose optimale, de la voie d'administration et de la durée du traitement. Or les méthodes d'évaluations standard de pharmacologie clinique utilisées pour les médicaments ne sont pas adaptées aux bactériophages.

L'équipe de Jérémie Guedj, au laboratoire IAME, U1137, a développé une expertise sur la modélisation des dynamiques virales dans les infections chroniques pour optimiser le développement de traitement antiviraux (VIH, VHC, Ebola, Zika, grippe) (1, 2). Cette modélisation inclut une approche pharmacométrique originale qui combine des données *in vitro* et *in vivo* avec un modèle mathématique.

En adoptant cette approche, nous avons essayé de mieux comprendre les paramètres clés des interactions tripartites entre le bactériophage thérapeutique, la bactérie pathogène ciblée et l'hôte murin infecté, dans un modèle de phagothérapie pulmonaire. Dans ce modèle préalablement caractérisé au laboratoire, le traitement par une dose unique du bactériophage virulent 536\_P1, d'une pneumonie aigüe létale induite par la souche *E. coli* 536, est aussi efficace que l'antibiothérapie standard pour permettre la survie de tous les animaux (3).

A l'aide d'un outil d'imagerie *in vivo*, nous avons collecté longitudinalement un ensemble de données sans précédent sur l'évolution des densités bactériennes pulmonaires (souche bioluminescente) de chaque animal au cours du temps. En les combinant à des données de biodistribution du bactériophage dans l'organisme déterminée selon deux voies d'administration (locale ou systémique), et aux paramètres du cycle infectieux de 536\_P1 sur la souche 536, déterminés par des expériences de *One Step Growth*, nous avons développé un modèle mathématique semi-mécanistique décrivant les dynamiques bactériennes observées.

Le modèle met en évidence plusieurs paramètres clés pour l'efficacité thérapeutique des bactériophages. Il s'agit en premier lieu de facteurs influençant la quantité de bactériophages au site infectieux : la dose et la voie d'administration, la *burst size*. Il retrouve également le caractère critique de la synergie avec le système immunitaire, avec un seuil au-delà duquel le traitement par bactériophage est indispensable au contrôle de la croissance bactérienne. Il souligne enfin le rôle d'une population bactérienne réfractaire qui comprend des bactéries inaccessibles spatialement aux bactériophages et les bactéries résistantes aux bactériophages.

Ce travail montre le potentiel critique de l'émergence d'une population bactérienne résistante au bactériophage dans le succès thérapeutique, dans un modèle de phagothérapie pourtant efficace, et ce dès les premières heures. La croissance de la sous-population résistante ne peut être jugulée que par le système immunitaire. Si le traitement par bactériophage contrôle suffisamment vite et efficacement la densité des bactéries sensibles et accessibles, le système immunitaire peut prendre en charge la sous-population réfractaire ; dans le cas contraire, les capacités du système immunitaire sont rapidement saturées par sa tentative de contrôler la

croissance de la population sensible et échouent à empêcher le développement de celle réfractaire.

*Ce travail a été mené par Raphaëlle Delattre (partie expérimentale) et Jérémie Seurat (partie modélisation), dont il constitue le cœur de leurs travaux de thèse respectifs. J'ai réalisé en collaboration avec Raphaëlle Delattre une partie des expériences in vivo présentées ici (biodistribution du bactériophage 536\_P1, suivi des animaux infectés et suivi des animaux infectés-traités). Ce travail a été publié en mai 2022 dans Cell Reports.*

1. Friberg LE, Guedj J. 2020. Acute bacterial or viral infection—What's the difference? A perspective from PKPD modellers. *Clin Microbiol Infect* 26:1133–1136.
2. Perelson AS, Guedj J. 2015. Modelling hepatitis C therapy--predicting effects of treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12:437–445.
3. Dufour N, Debarbieux L, Fromentin M, Ricard J-D. 2015. Treatment of Highly Virulent Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Pneumonia With Bacteriophages. *Crit Care Med* 43:e190

## Combination of *in vivo* phage therapy data with *in silico* model highlights key parameters for pneumonia treatment efficacy

Raphaëlle Delattre,<sup>a,b</sup> Jérémy Seurat,<sup>a</sup> Feyrouz Haddad,<sup>a,b</sup> Thu-Thuy Nguyen,<sup>a</sup> Baptiste Gaborieau,<sup>a,b,c</sup> Rokhaya Kane,<sup>b</sup> Nicolas Dufour,<sup>d</sup> Jean-Damien Ricard,<sup>a,c</sup> Jérémie Guedj,<sup>a#</sup> Laurent Debarbieux,<sup>b#</sup>

<sup>a</sup>Université Paris Cité, INSERM UMR1137, IAME, Paris, France

<sup>b</sup>Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR6047, Bacteriophage Bacterium Host, Paris, France

<sup>c</sup>APHP, Hôpital Louis Mourier, DMU ESPRIT, Service de Médecine Intensive Réanimation, Colombes, France

<sup>d</sup>Centre Hospitalier René Dubos, Médecine Intensive Réanimation, Cergy Pontoise, France

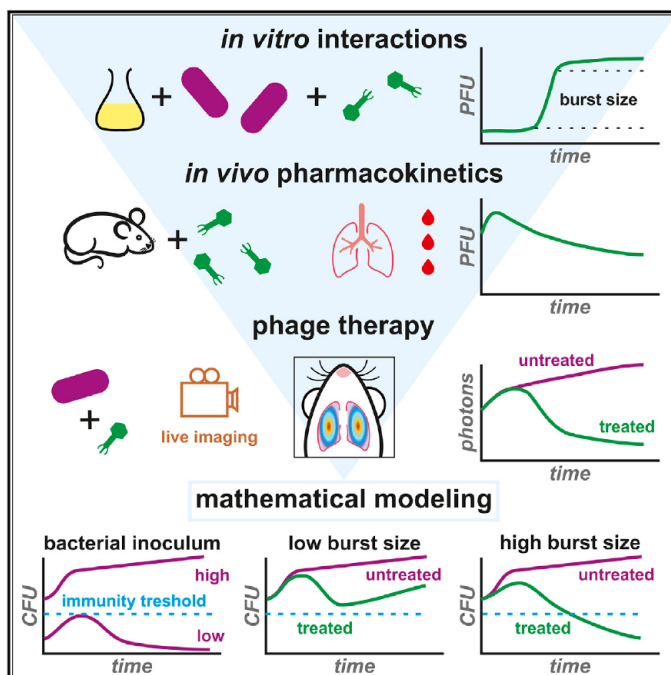
#Address correspondence to Laurent Debarbieux, [laurent.debarbieux@pasteur.fr](mailto:laurent.debarbieux@pasteur.fr), Jérémie Guedj, [jeremie.guedj@inserm.fr](mailto:jeremie.guedj@inserm.fr)

### Authors contribution

J.-D.R., J.G., L.D., and R.D. conceived the study and secured funding. B.G., F.H., R.D., and R.K. performed experiments. J.-D.R., J.G., J.S., L.D., and R.D. analyzed the data. J.G., J.S., and T.-T.N. performed modeling. N.D. provided feedback. J.S. and R.D. wrote the first draft. J.G. and L.D. reviewed and edited final draft.

# Combination of *in vivo* phage therapy data with *in silico* model highlights key parameters for pneumonia treatment efficacy

## Graphical abstract



## Authors

Raphaëlle Delattre, Jérémy Seurat, Feyrouz Haddad, ..., Jean-Damien Ricard, Jérémie Guedj, Laurent Debarbieux

## Correspondence

jeremie.guedj@inserm.fr (J.G.), laurent.debarbieux@pasteur.fr (L.D.)

## In brief

The clinical development of phage therapy to treat antibiotic-resistant bacterial infections requires understanding the dose-effect relationship. Delattre et al. use a murine pneumonia model to longitudinally record phage-bacteria interactions. Mathematical modeling characterizes the synergy between phages and the host immune response. Predictions of treatment outcome could guide clinicians.

## Highlights

- Longitudinal records of pulmonary infections quantify the immunity threshold
- *In situ* amplification of phages is required for treatment efficacy
- A mathematical model predicts the outcome of phage-therapy treatment schemes



Delattre et al., 2022, Cell Reports 39, 110825  
May 17, 2022 © 2022 The Author(s).  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110825>

## Article

# Combination of *in vivo* phage therapy data with *in silico* model highlights key parameters for pneumonia treatment efficacy

Raphaëlle Delattre,<sup>1,2,5</sup> Jérémy Seurat,<sup>2,5</sup> Feyrouz Haddad,<sup>1,2</sup> Thu-Thuy Nguyen,<sup>2</sup> Baptiste Gaborieau,<sup>1,2,3</sup> Rokhaya Kane,<sup>1</sup> Nicolas Dufour,<sup>4</sup> Jean-Damien Ricard,<sup>2,3</sup> Jérémie Guedj,<sup>2,6,\*</sup> and Laurent Debarbieux<sup>1,6,7,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR6047, Bacteriophage Bacterium Host, Paris 75015, France

<sup>2</sup>Université Paris Cité, INSERM U1137, IAME, Paris 75006, France

<sup>3</sup>APHP, Hôpital Louis Mourier, DMU ESPRIT, Service de Médecine Intensive Réanimation, Colombes, France

<sup>4</sup>Centre Hospitalier René Dubos, Médecine Intensive Réanimation, Cergy Pontoise 95503, France

<sup>5</sup>These authors contributed equally

<sup>6</sup>These authors contributed equally

<sup>7</sup>Lead contact

\*Correspondence: [jeremie.guedj@inserm.fr](mailto:jeremie.guedj@inserm.fr) (J.G.), [laurent.debarbieux@pasteur.fr](mailto:laurent.debarbieux@pasteur.fr) (L.D.)

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110825>

## SUMMARY

The clinical (re)development of bacteriophage (phage) therapy to treat antibiotic-resistant infections faces the challenge of understanding the dynamics of phage-bacteria interactions in the *in vivo* context. Here, we develop a general strategy coupling *in vitro* and *in vivo* experiments with a mathematical model to characterize the interplay between phage and bacteria during pneumonia induced by a pathogenic strain of *Escherichia coli*. The model allows the estimation of several key parameters for phage therapeutic efficacy. In particular, it quantifies the impact of dose and route of phage administration as well as the synergism of phage and the innate immune response on bacterial clearance. Simulations predict a limited impact of the intrinsic phage characteristics in agreement with the current semi-empirical choices of phages for compassionate treatments. Model-based approaches will foster the deployment of future phage-therapy clinical trials.

## INTRODUCTION

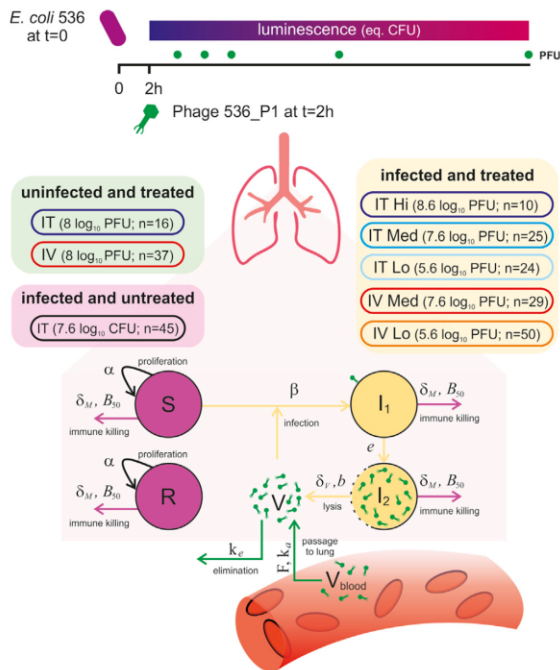
The pronounced slowdown in the discovery of new antibiotics to treat bacterial infections caused by multidrug resistant (MDR) pathogens has revived interest in bacteriophages (phages), viruses infecting bacteria (Gordillo Altamirano and Barr, 2019; Kortright et al., 2019). Pre-clinical experiments and several clinical case reports have demonstrated the potential of phages to successfully treat infections caused by MDR bacteria (Aslam et al., 2020; Bull et al., 2002; Corbellino et al., 2020; Jennes et al., 2017; Melo et al., 2020; Schooley et al., 2017). These successes are nonetheless balanced by unreported failures as well as disappointing clinical studies (Jault et al., 2019; Leitner et al., 2020; Sarker et al., 2016), showing that translation from experimental results to clinical trials remains challenging.

A major milestone for the widespread use in human populations is the determination of the optimal dose, route of administration, and treatment duration. This is a particularly complex endeavor for phages, as standard assessments of clinical pharmacology used to determine the processes of administration, distribution, metabolism, and excretion (ADME) of drugs are not adapted to phages. Indeed, phages massively replicate on their target bacteria, with kinetic parameters governing this viral amplification (receptor recognition, genome amplification, particles assembly, and bacterial lysis) being specific to each phage-

bacteria pair (Dion et al., 2020). Furthermore, phages are naturally present in human-associated microbiotas, and their rate and route of elimination do not follow usual metabolic pathways of xenobiotic products through kidney or liver (Dabrowska and Abedon, 2019).

Here, we coupled *in vitro* and *in vivo* experiments with mathematical modeling to approach the key parameters of phage-bacteria-host interactions and guide treatment strategies. This approach has been successful in drug development for various chronic (HIV, hepatitis C virus and acute (Ebola, Zika, influenza) viral infections (Friberg and Guedj, 2020; Perelson and Guedj, 2015). Unlike previous models that focused on specific aspects of phage-bacteria, phage-host immune system, or bacteria-host immune system interactions (Cairns et al., 2009; Roach et al., 2017; Smith et al., 2011; Weld et al., 2004), here we aimed to design a synthetic, semi-mechanistic model that could be used to understand the tripartite phage-bacteria-host interactions *in vivo*. We designed specific experiments (Figure 1) to estimate the key parameters of phage-bacteria interactions using a previously characterized experimental model (Dufour et al., 2015). The virulent phage 536\_P1 (141,471 bp), a *Myoviridae* belonging to the *Phaepocovirus* genus, quickly (20 min) lyses the hypervirulent *Escherichia coli* strain 536 *in vitro*. Moreover, a single dose of phage 536\_P1 administered intranasally to mice 2 h post-infection by a lethal dose of strain 536 rescued





**Figure 1. Schematic representation of the experimental design of the study**

*In vivo* experiments were conducted in mice that were either (1) uninfected and treated (green box, with phages administered either intratracheally [IT] or intravenously [i.v.]), (2) infected and untreated (magenta box), or (3) infected and IT- or i.v.-treated at various doses (yellow box). The intensity of light emitted by *E. coli* strain 536-lux was recorded along all experiments and translated to bacterial lung density, while phage 536\_P1 density was measured only once (upon sacrifice) in each animal at specific time points. A mathematical compartmental model was developed to fit to these data, with S, R,  $I_1$ , and  $I_2$  representing the susceptible, refractory, infected non-productive, and productively infected bacteria, respectively, and V and  $V_{\text{blood}}$  the phage concentrations in lungs and blood, respectively. The arrows indicate the processes affecting each compartment. Model parameters characterizing these processes are indicated on these arrows, with  $\alpha$  the bacterial growth rate,  $\delta_M$  the maximal immunity effect,  $B_{50}$  the bacterial load leading to 50% of  $\delta_M$ ,  $\beta$  the infectivity rate,  $e$  the transition rate from latent to productive bacteria,  $\delta_V$  the bacterial lysis rate,  $b$  the burst size,  $F$  the phage relative bioavailability in the lungs after i.v. compared with IT,  $k_a$  the phage absorption rate from the blood to the lungs and  $k_e$  the phage elimination rate in the lungs.

100% of animals, while untreated animals died within 72 h, demonstrating the efficacy of this phage to treat an acute pulmonary infection (Dufour et al., 2015).

Here, dynamic and direct microbiological data were collected from groups of animals that were either (bacterial) uninfected and (phage) treated, infected and untreated, or infected and treated, using different inoculum doses and routes of administration. These data led us to develop an original mathematical model recapitulating the tripartite interactions over time. This model identified key parameters affecting bacterial kinetics *in vivo*. It was then exploited to test scenarios including variations of phage intrinsic properties. The use of such a model will ratio-

nalize the phage choice, the dose, and the route of administration in order to optimize the efficacy of phage therapy.

## RESULTS

### Biodistribution of phage in uninfected mice

Our investigations started by assessing two routes of phage administration, intratracheal (IT) and intravenous (i.v.), in uninfected mice using a single dose of  $8 \log_{10}$  plaque-forming units (PFUs) of phage 536\_P1 (Figure 2). The observed peak of median (interquartile range) phage concentrations in the lungs was reached 4 h post-administration by i.v. ( $5.1 [4.7, 5.5] \log_{10}$  PFU/g) and was lower than the concentration observed post-administration by IT at the same time point ( $7.2 [6.8, 7.8] \log_{10}$  PFU/g). The nearly 2-log difference showed that post-i.v. administration, only a fraction  $F$  of the phage, estimated to 0.02%, ultimately reached the lung compartment, leading to exposure approximately 5,000 times lower than post IT administration, and an estimation of the absorption rate into the lung compartment,  $k_a$ , of  $0.3 \text{ h}^{-1}$  (Equations 1 and 2). During the 48 h post-phage administration, the kinetics of the phage elimination rate in the lungs was slow following IT administration with an estimated half-life value of 12 h ( $\log(2)/k_e(IT)$ ), while it was much faster following i.v. administration, with an estimated value of 3 h (Table 1).

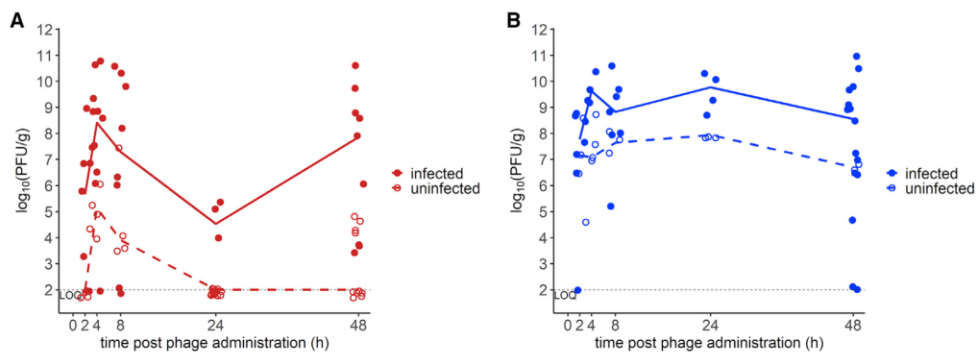
### Bacterial kinetics in infected, untreated mice

IT administration of the *E. coli* strain 536 led to a large variability in the lung bacterial load of untreated animals ( $N = 45$ ), as measured by emitted luminescence and colony-forming unit (CFU)eq/g (see STAR Methods and Figure S1). Two h post-infection, bacterial load ranged between 5.0 and  $9.9 \log_{10}$  CFUeq/g (Figure 3), allowing us to evaluate the impact of phage across the large spectrum of values that can be observed in clinical conditions (Jiang et al., 2014). The large range of effective inoculums also informed on the threshold of bacterial density, above which the immune response of the host cannot control the infection. When the bacterial load was greater than  $6.8 \log_{10}$  CFUeq/g at 2 h post-infection, the bacterial density increased continuously and led to rapid death of all animals within 72 h. In contrast, below this threshold, a reduction of the bacterial density was generally observed, likely reflecting the effect of the immune response in clearing the infection (Figures 3 and S2).

### Bacterial and phage kinetics in infected, treated mice

Next, using the same infection procedure as above, mice ( $N = 138$ ) were treated 2 h post-infection with various doses of phage 536\_P1 (low dose: 5.6, medium dose: 6.6, high dose:  $7.6 \log_{10}$  PFU), administered either by IT or i.v. route. The initial effective median bacterial inoculum in the lungs 2 h post-infection was similar across treatment groups, with levels of 6.9 (6.1, 8.0), 7.2 (6.3, 8.5), and 6.7 (6.3, 7.8)  $\log_{10}$  CFUeq/g in untreated and IT- and i.v.-treated animals, respectively (Figure 3).

Globally, phage density in the lungs of IT- and i.v.-treated animals reached values 2- to  $3\text{-}\log_{10}$  higher than in uninfected animals, showing that phages rapidly encountered bacteria and efficiently replicated (Figure 2). At 4 h post-phage administration (6 h post-bacterial infection), the median titer of phage in the



**Figure 2. Distribution of phage 536\_P1 in lungs following two routes of administration**  
(A and B) Lungs of uninfected (empty circles, N = 53) and *E. coli*-infected (filled circles, N = 76) mice were homogenized at 2, 4, 8, 24, or 48 h post-administration of a single dose of phage 536\_P1 ( $8 \log_{10}$  PFU in uninfected mice and 5.6, 7.6, or  $8.6 \log_{10}$  PFU in infected mice), either by i.v. (A, red) or IT (B, blue) route. Lines connect the median phage concentrations at each time point (dashed lines, uninfected; full lines, infected). The black dotted line represents the limit of quantification (LOQ =  $2 \log_{10}$  PFU/g).

lungs of IT-treated mice (N = 59) was  $9.6 [9.3, 9.9] \log_{10}$  PFU/g as compared with  $7.1 [7.1, 7.4] \log_{10}$  PFU/g in uninfected, i.t.-treated mice (N = 16). A similar difference was also observed in i.v.-treated animals (N = 79), with phage concentrations of  $8.4 (7.0, 9.1) \log_{10}$  PFU/g as compared with  $5.1 (4.7, 5.5) \log_{10}$  PFU/g in uninfected, i.v.-treated animals (N = 37) (Figure 2).

To illustrate the impact of the above phage amplification on disease progression, bacterial kinetics and survival were reported following the stratification of animals by the bacterial load measured 2 h post-infection (Figure 4). Phage therapy had no significant effect on bacterial kinetics and survival in animals having a low bacterial load ( $<6.8 \log_{10}$  CFUeq/g, N = 78), reflecting the effective role of the immune response to clear the pathogen. By contrast, in animals having a higher load ( $\geq 6.8 \log_{10}$  CFUeq/g, N = 99), treated animals showed a faster kinetics of the bacterial control ( $p = 0.028$ ).

#### Unraveling bacteria-phage interaction using a mathematical model

Next, we used the data from both infected and uninfected animals together with parameters determined *in vitro* (see STAR Methods) to build a mathematical model of phage-bacteria-host interaction (Equations 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10; Data S1; Figure 1).

Fitting the model to bacterial load data, we first determined that a model accounting for the control of bacterial growth by the innate immune response was needed to recapitulate the threshold effect associated with the effective bacterial inoculum. This phenomenon could be well captured using our model (Equation 3), with estimates of  $\delta_M$ , the maximal decay induced by the immune response, of  $6.8 \log_{10}$  CFUeq/g/h and  $B_{50}$ , the bacterial load needed to reach  $\delta_M/2$ , of  $7.4 \log_{10}$  CFUeq/g. This corresponds to a threshold for bacterial control equal to  $6.94 \log_{10}$  CFUeq/g. Thus, if the administered bacterial inoculum,  $B_0$ , was below this value, bacteria were rapidly eliminated by the immune system with a rate of  $\delta_M/B_{50} = 0.3 \text{ h}^{-1}$ , corresponding to a half-life of 2.3 h. However, when the bacterial inoc-

ulum was above this value, the model predicts a saturation of the immune response, enabling bacterial growth with a bacterium doubling time estimated at 3.5 h.

*In vitro* experiments allowed us to estimate two key parameters of phage dynamics that could not be identified *in vivo*, namely the median eclipse phase and the burst size (see STAR Methods and Figure S3). Assuming that these parameters had the same value *in vivo*, we could then estimate the *in vivo* infection rate of bacteria by phages, denoted as  $\beta$ , to  $-6.9 \log_{10}$  g/CFU/h and the *in vivo* elimination rate of phage-infected bacteria,  $\delta_V$ , to  $0.09 \text{ h}^{-1}$  (e.g., a half-life of 7.7 h), which is slower than *in vitro* estimation ( $1.39 \text{ h}^{-1}$ ).

Finally, we also used the model to assess the impact of bacterial kinetics on survival. Assuming a log-linear effect of bacterial load on the instantaneous risk of death,  $h(t)$ , the bacterial load was found to be highly associated with death ( $\gamma = 1.44$ ,  $p < 10^{-3}$ , Wald test). This corresponds to a hazard ratio of 4.2; in other words, an increase of 2 log of the bacterial load raised the instantaneous risk of death by  $\sim 18$ . The joint model developed could simultaneously recapitulate bacterial kinetics, phage counts, and survival rate (Figures 5, S4, and S5), despite the heterogeneity of the individual profiles experimentally observed (Figures 5 and S2).

#### Effects of phage dose and route of administration on the bacterial kinetics

The model was then used to identify the key factors governing bacterial kinetics. Unsurprisingly, the bacterial inoculum,  $B_0$ , was the most important parameter. In animals with  $B_0 < 6 \log_{10}$  CFUeq/g, bacterial loads rapidly decreased below the limit of quantification within 48 h regardless of treatment. In animals with large bacterial inoculum  $B_0 > 8 \log_{10}$  CFUeq/g, phage therapy was not sufficient to control the continuous growth of bacteria regardless of the route and administered phage dose (Figure 6). The benefit of phage therapy was apparent mostly for animals having an intermediate effective inoculum size, e.g.,  $6 < B_0 < 8 \log_{10}$  CFUeq/g. In those animals, the larger ratio of



**Table 1. Parameter estimates of the phage-bacteria dynamics model**

Parameter	Name	Unit	Fixed/estimated from	Fixed effect (rse, %)	SD of random effect (rse, %)
Bacterial growth rate	$\alpha$	$\text{h}^{-1}$	untreated infected	0.21 (–)	0 (–)
Initial number of bacteria	$B_0$	$\log_{10}\text{CFU g}^{-1}$	untreated infected	7.1 (1)	0.14 (6)
Bacterial-load plateau	$B_{max}$	$\log_{10}\text{CFU g}^{-1}$	untreated infected	10.4 (–)	0 (–)
Time for immunity activation	$t_I$	h	untreated infected	3.0 (–)	0 (–)
Maximal immunity effect	$\hat{\delta}_M$	$\text{CFU g}^{-1} \text{h}^{-1}$	untreated infected	$6.7 \cdot 10^6$ (–)	0.05 (–)
Bacterial load for 50% of $\hat{\delta}_M$	$B_{50}$	$\text{CFU g}^{-1}$	untreated infected	$2.3 \cdot 10^7$ (–)	0 (–)
Infectivity rate	$\beta$	$\log_{10} \text{g CFU}^{-1} \text{h}^{-1}$	treated infected	-6.9 (7)	0.11 (43)
Transition rate	$e$	$\text{h}^{-1}$	<i>in vitro</i>	1.2 (–)	0 (–)
Lysis rate	$\hat{\delta}_V$	$\text{h}^{-1}$	treated infected	0.09 (25)	0 (–)
Burst size	$b$	$\text{PFU CFU}^{-1}$	<i>in vitro</i>	570 (–)	0 (–)
Relative bioavailability (i.v./IT)	$F$	–	treated uninfected	0.0002 (–)	0 (–)
Phage absorption rate	$k_a$	$\text{h}^{-1}$	treated uninfected	0.3 (–)	0 (–)
Phage elimination rate after IT	$k_e(IT)$	$\text{h}^{-1}$	treated uninfected	0.058 (–)	0 (–)
Phage elimination rate after i.v.	$k_e(IV)$	$\text{h}^{-1}$	treated uninfected	0.23 (–)	0 (–)
Phage distribution weight	$W$	g	treated uninfected	1 (–)	0 (–)
Initial refractory proportion	$f$	–	treated infected	0.105 (45)	2.8 (19)
Weibull shape	$\kappa$	–	treated infected	1.8 (11)	0 (–)
Weibull scale	$\lambda$	$\text{h}^{-1}$	treated infected	$2.4 \cdot 10^4$ (98)	0 (–)
Impact of bacterial kinetics on death	$\gamma$	$\text{g CFU}^{-1}$	treated infected	1.44 (13)	0 (–)
Additive error on bacterial load	$\sigma_B$	$\log_{10}\text{CFU g}^{-1}$	treated infected	–	0.47 (4)
Additive error on phage concentration	$\sigma_V$	$\log_{10}\text{PFU g}^{-1}$	treated infected	–	2.6 (11)

SD, standard deviation; rse, relative standard error.

phage to bacteria led to a large number of bacteria being rapidly infected by phages, which prevented bacterial growth and maintained the bacterial load under control by the immune response. Bacterial-load decline was biphasic, with a rapid decline in the first 4 h of treatment, mainly due to the decay of susceptible bacteria (S) by phages, followed by a slower decline afterward. This slower second phase was attributed in our model to the unrestricted replication of a sub-population of bacteria that were not eliminated by phages (V), representing both phage-resistant and -inaccessible (spatially out of reach) bacteria (R).

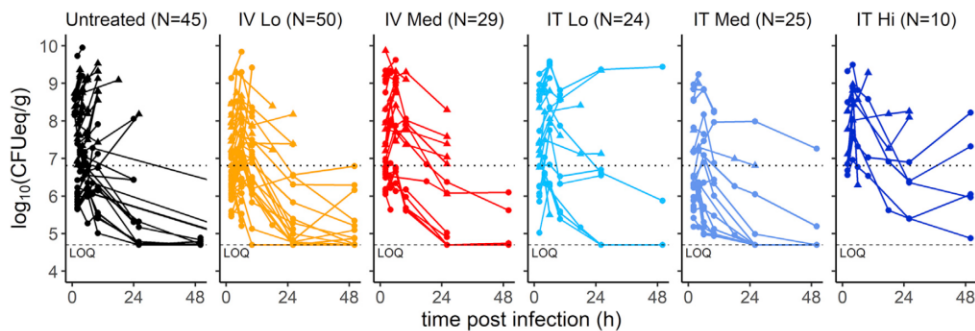
The initial proportion of the phage-refractory population was estimated to be 10% (Table 1) but could be variable across individuals (from 0.03% to 76%). The dynamics of refractory bacteria was individual dependent, leading to either a slow but continuous bacterial decline or a rebound of fully refractory bacteria within 24–48 h (see individual examples in Figure 5). Importantly, the need to incorporate a compartment of refractory bacteria in the model was strongly supported by the data and led to a significant improvement of the data fitting ( $p < 10^{-3}$ , likelihood ratio test, data not shown).

The raw data did not allow us to observe a role of the route of administration in the treatment outcome, except with a low bacterial inoculum ( $B_0 = 6 \log_{10} \text{CFUeq/g}$ ) for which the rapid clearance of bacteria limited the encounter rate with phage. With this inoculum, relative to the kinetics in the untreated group, simulations indicated that an IT or i.v. medium dose of phages halved

the total bacterial load in 3.1 and 8.1 h after administration, respectively. Our simulations also indicated that IT and i.v. treatments otherwise led to similarly high phages concentrations ( $>7 \log_{10} \text{PFU/g}$ ) in lungs (Figure 6). IT administration was, however, associated with a substantially faster time to peak viral load, and this difference was particularly apparent with a low or intermediate bacterial inoculum. For instance, with an intermediate bacterial inoculum ( $B_0 = 7 \log_{10} \text{CFUeq/g}$ ), the time to peak viral load varied between 1.6 (IT high dose) and 6.0 h (i.v. IV low dose). As a consequence of this delay in phage maximal replication, the i.v. route had a lower efficiency to stop bacterial growth, with a time to peak bacterial load that could be as long as 4.0 h (i.v. low dose), to less than 1.1 h with the IT route (IT low dose), and as low as 0.3 h in the case of the IT high dose. Overall, with this lethal intermediate inoculum, the bacteria grew exponentially in untreated mice, whereas the bacterial load declined in all phage-treated groups. Therefore, in any phage-treated group, the median total bacterial load was increasingly lower than that of the untreated group. For instance, 24 h after administration, the bacterial load in treated groups was more than 100 times lower than in the untreated group (Figure 6).

#### Effects of phage characteristics on the bacterial kinetics

Finally, we also used the model to explore the effect of intrinsic phage characteristics, namely burst size and lysis



**Figure 3. Kinetics of bacterial densities in untreated and phage-treated animals**

CFU equivalent data from bioluminescent recordings of infected animals, which were either untreated (black) or treated with phage 536\_P1 administered by i.v. (low dose =  $5.6 \log_{10}$  PFU, yellow, or medium dose =  $7.6 \log_{10}$  PFU, red) or IT (low dose, cyan, medium dose, blue, or high dose =  $8.6 \log_{10}$  PFU, dark blue). The dotted horizontal line at  $6.8 \log_{10}$  CFUeq/g corresponds to the threshold value of bacterial load at 2 h post-infection, below which all animals controlled the infection. The dashed line represents the LOQ of bacterial load ( $LOQ = 4.7 \log_{10}$  CFUeq/g).

rate, on the bacterial kinetics. A 10-fold reduction in burst size (i.e., 57 PFU/CFU) predicted a larger impact of the route of administration, with a time to bacterial peak of 10 h post-i.v. compared with less than 3 h post-IT administration. Even when using a low dose of phage, the time to bacterial peak relative to untreated bacterial load was estimated at 12 h post-IT compared with 20 h post-i.v. (Figure S6). However, a higher lysis rate value counter-balanced the effects of a low burst-size value (Figure S7), showing the sensitivity of the model to phage characteristics.

## DISCUSSION

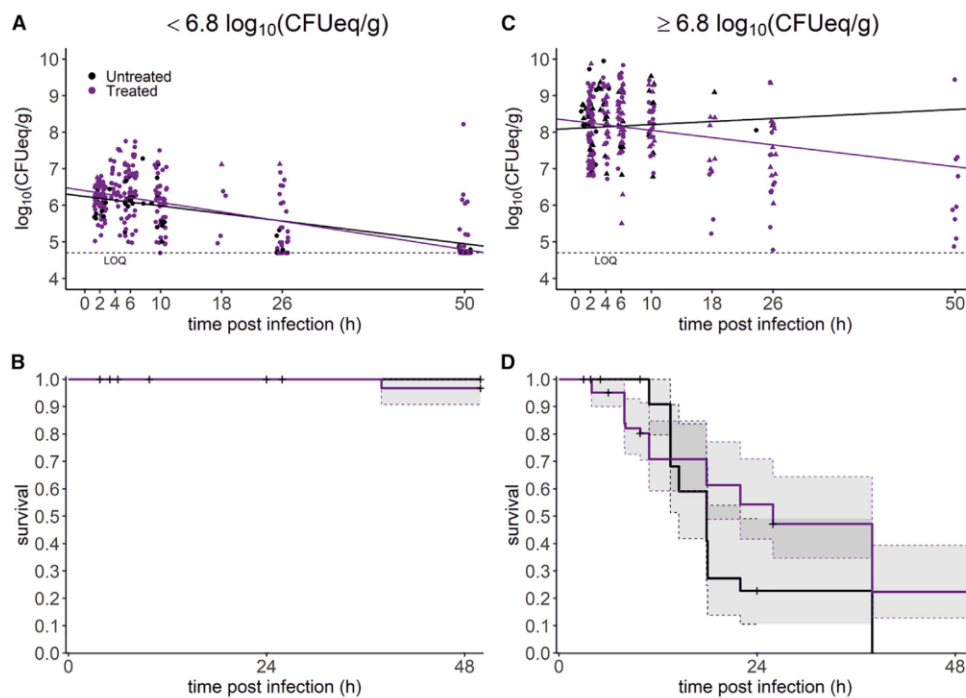
Despite many encouraging data from both ancient literature and recent compassionate treatments, phage therapy remains underexploited, notably because of ambiguous results from clinical trials (Luong et al., 2020). In fact, the translation from *in vitro* to clinical conditions remains unmet, in particular since using phages as a drug requires specific methods to elaborate a rational scheme for safe and optimal administration. While some studies performed *in silico* or in laboratory conditions (Cairns et al., 2009; Kasman et al., 2002; Leung and Weitz, 2017; Payne and Jansen, 2001, 2003) led to the proposal of several mathematical models of phage-bacteria interactions, very few studies conducted *in vivo* incorporated the immune response (Dabrowska and Abedon, 2019; Roach et al., 2017).

Our experimental approach was inspired from work performed during the development of new drugs, where longitudinal pharmacokinetic and pharmacodynamic data are collected to understand the exposure-response relationship and optimize the dosing regimen (Marshall et al., 2019). It is important to acknowledge that bioluminescence is nonetheless a proxy of bacterial load compared with CFU counts from lung samples, as reflected by the measurement error associated with bioluminescent data (parameter  $\sigma_B$ ; Table 1). However, this limitation is largely compensated by longitudinal recordings that provide a unique insight on the determinants of bacterial kinetics for each animal.

The acute murine lung infection induced by bacterial pathogens that we used for this study imposed two constraints. First, less than 1-log variation of the bacterial inoculum can lead to contrasted outputs from rapid (24 h) mortality to no lethality (B.G., L.D., and G. Nouailles-Kursar unpublished observations with various strains of *E. coli* or *Pseudomonas aeruginosa* for which preliminary experiments were performed to identify the most appropriate bacterial inoculum). Second, the high pathogenicity of pathogens necessitated a phage administration 2 h post-infection to preserve a high survival rate of treated animals (Debarbieux et al., 2010). It is worth noting that until the early 2000s, *Enterobacteriaceae* were not considered major pathogens responsible for ventilator-associated pneumonia (VAP) (Chastre and Fagon, 2002). However, recent data have consistently shown that *Enterobacteriaceae* are now frequent etiologic agents of VAP, more frequently encountered than *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (Fihman et al., 2015; Hamet et al., 2012; Kollef et al., 2017). In particular, several studies have clearly identified specific traits of strains of *E. coli* responsible for intensive care unit (ICU)-acquired pneumonia (La Combe et al., 2019; Messika et al., 2012).

The heterogeneity of the initial bacterial loads observed 2 h post-infection provided a large range of situations reflecting clinical situations (Jiang et al., 2014). The variety of individual profiles was captured by using non-linear mixed-effect models to estimate phage-bacterial interaction, a statistical approach that borrows strength from the between-subjects variability to increase the precision of parameter estimation, and tease out the effects of bacteria parameters, doses, and routes of administration. A direct consequence of the above conditions was the precise quantification of the threshold value ( $6.94 \log_{10}$  CFUeq/g), above which the immune response was overwhelmed in the absence of phage therapy.

The modeling of phage-bacteria interactions in the host also unraveled less-evident factors, such as the role of a refractory bacterial population to capture bacterial-load kinetics. This compartment could not be phenotypically characterized but encompasses bacteria that are escaping phage predation because

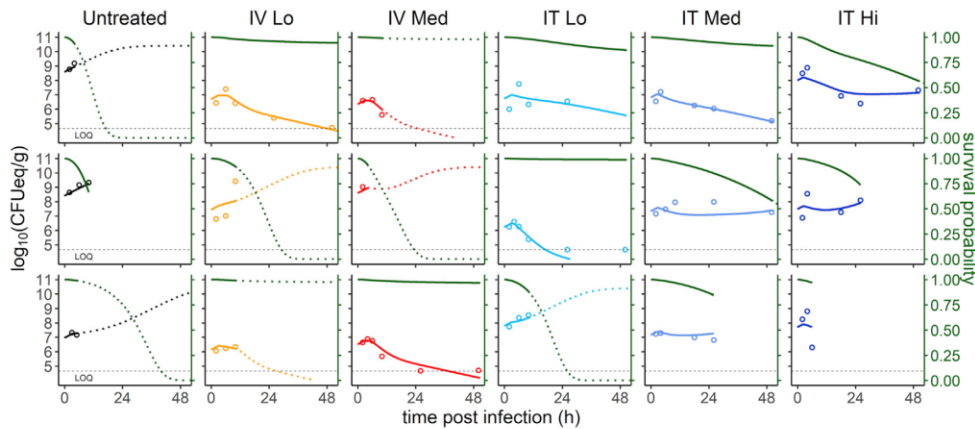


**Figure 4. Bacterial load and survival of infected animals stratified by the pulmonary bacterial load at 2 h post-infection**

Infected animals were untreated (black) or phage treated (purple). (A–D) The left panels (A and B) show animals with a low bacterial load ( $N = 78$ : 15 untreated, 63 treated), while the right panels (C and D) show animals with a high bacterial load ( $N = 99$ : 28 untreated, 71 treated). Of note, 6 animals sacrificed at 2 h post infection were not considered here. The top panels (A and C) show bacterial loads over time, with circles corresponding to live animals and triangles to animals that died before the scheduled sacrifice time. The difference between untreated and treated groups was assessed using a linear mixed-effects model, where the slope of bacterial change over time was adjusted on both the bacterial load value and the presence of treatment. The effect of treatment on bacterial kinetics was significant ( $p = 0.028$ , likelihood ratio test). Solid lines represent the median bacterial load predictions obtained with this model. The bottom panels (B and D) represent survival curves, with crosses indicating sacrifice time. The difference between untreated and treated groups was assessed using a log-rank tests (B,  $p = 0.53$ ; D,  $p = 0.08$ ).

they are phage resistant and/or they remain spatially inaccessible to phages (Leung and Weitz, 2017; Lourenco et al., 2020; Sousa and Rocha, 2019). The inclusion of this compartment is supported by both the emergence of phage resistance observed *in vitro* after 10 h of incubation with phage 536\_P1 (Figure S4) and by previous studies showing that the spatial distribution of bacteria in organs makes some of them inaccessible to phages (Lourenco et al., 2020; Sousa and Rocha, 2019). This was also in agreement with the modelling of phage therapy in immunocompromised hosts (Roach et al., 2017). Despite the large variation of the bacterial loads that directly affect the initial density of this refractory population, our model could appropriately recapitulate the kinetics of phage-bacteria interactions for each individual mouse, including the survival probability, testifying to its robustness. In addition, simulations performed with larger or lower burst sizes and lysis rates showed that the model predicts outputs that are in agreement with results from animal studies in which different phages were used to treat bacterial infections (Alemayehu et al., 2012; Carmody et al., 2010; Henry et al., 2013; Morello et al., 2011).

To ensure that the model recapitulates kinetics of phage-bacteria interactions during therapy, it was necessary to use, as much as possible, parameters deduced from animal experiments instead of *in vitro* conditions. For instance, the growth rate of bacteria, infectivity rate, and lysis rate were all deduced from experimental data. Nevertheless, some parameters should be more deeply investigated to improve the fidelity of the model. For instance, growth of the refractory population was approximated as similar to the susceptible bacteria, neglecting the possibility that the fitness of mutants might be affected in the host. Indeed, such mutants could be, either or both, less virulent and strongly affected in their growth, allowing immune cells to eliminate them more effectively (Oechslin et al., 2017; Pouillot et al., 2012; Smith et al., 1987). The involvement of the immune response in the success of respiratory phage therapy was previously demonstrated and modeled but remains mechanistically poorly explored (Roach et al., 2017). In this work, we chose to account for the immune response in a synthetic way that encompasses mechanical factors, such as mucins and surfactant proteins, as well as various cellular actors of the innate immune system (Bergeron et al., 1998; Levin et al.,



**Figure 5. The mathematical model recapitulates the individual variations of the pulmonary bacterial loads and estimates the survival of infected animals**

Data and model predictions for three mice (lines) randomly chosen from each experimental group (columns) are shown. The circles correspond to the pulmonary bacterial loads, the color lines correspond to the individual predictions from the model, and the green line represents the predicted survival probability. Lines are solid between  $t = 0$  and the last observation time point (death or pre-specified sacrifice) and are dotted after the pre-specified sacrifice. Interrupted lines indicate the death of animals before the pre-specified time point. The horizontal dashed line represents the LOQ ( $LOQ = 4.7 \log_{10} \text{CFUeq/g}$ ).

2017; Marriott and Dockrell, 2007). However, the immune response would have been more mechanistically characterized if several markers (cytokines, immune cells) had been monitored. Our model also considers the lung compartment homogeneous, which ignores the complex structure of this organ that will most likely affect phage-bacteria interactions.

Predictions from the mathematical model showed the importance of viral load, burst size, and lysis rate to fully capture bacterial kinetics and animal outcomes. Therefore, for a suboptimal couple phage bacteria, which may often take place in clinics, the administration route, and to a lesser degree, the dose, will play a role in the rate at which bacterial growth will be controlled. This supports the determination of key parameters of phage-bacteria interactions, such as the infectivity rate and the lysis rate, for optimizing the phage-administration scheme. However, when the dose and route of administration are appropriately chosen, the model predicted that substantial variations of the intrinsic characteristics of phages (burst size and lysis rate) were not jeopardizing the treatment outcome, which fits with the current semi-empirical choice of phages for compassionate treatments. Indeed, currently, phages are chosen exclusively for their capacity to infect bacteria on *in vitro* conditions where phage-bacteria interactions are artificially optimized. To further evaluate the model, we performed simulations (external visual predictive check) from previous data obtained several years apart with the same phage-bacteria couple (Dufour et al., 2015). Despite a different route of administration (intranasal) for both the bacteria and the phage, we found that the model predicted acceptable results compared with the *in vivo* data, which argues in favor of its robustness and its putative relevance for many other phages (Figure S8).

#### Limitations of the study

The use of bioluminescent data as a proxy for CFU counts is limited by the accuracy of the correlation curve, which may be

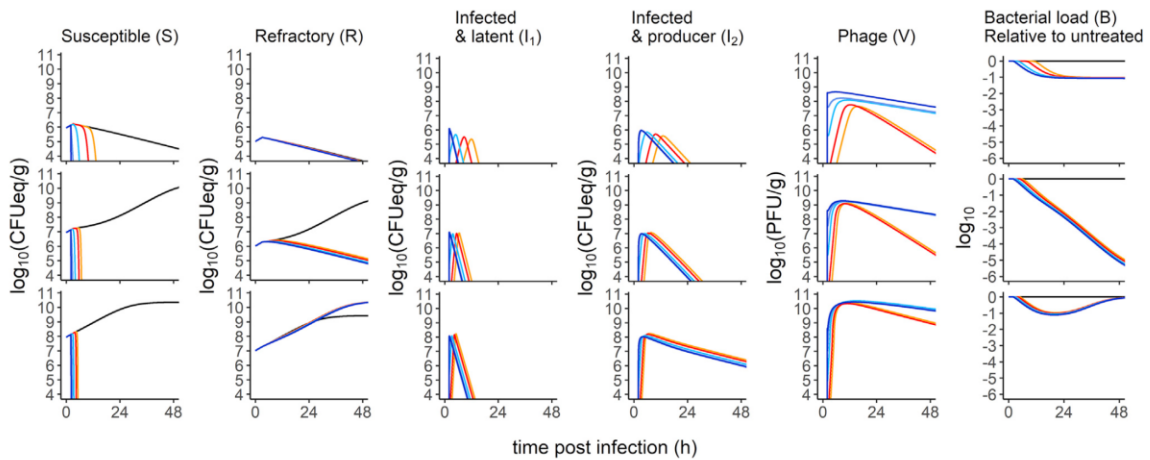
improved by lowering the delay between recording the photon emission from the animals and the actual plating of samples in selective media. In the model, we compensated this limitation by taking into account the error measurements (parameter  $\sigma_B$ ). Another limitation is a lack of the phenotypic characterization of bacteria of the refractory compartment. The initial dispersion of phages in the lungs will not be sufficient to reach every single bacterial cell, but it remains unknown whether their amplification over time will be high enough and, at the same time, how it would influence the selection of phage-resistant bacteria. The susceptibility to phages of bacteria recovered from lung tissues collected should inform on the rate at which phage-resistant bacteria grow over time.

To conclude, the model developed during this work could be used to predict the efficacy of virtually any phage for which a minimum set of *in vitro* and *in vivo* data must be obtained, which will considerably lower the number of experiments needed to validate such a phage during pre-clinical development. Beyond phage therapy, the model could also be implemented to test combined anti-infectious therapies such as the association of phages with antibiotics (Lin et al., 2020).

#### STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead contact
  - Materials availability
  - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODELS AND SUBJECT DETAILS
  - Ethic statement
  - Phages and bacterial strains



**Figure 6. Simulations of different bacterial inoculums inform on the impact of refractory bacteria**

Median profile assuming initial bacterial inoculums of 6, 7, and 8  $\log_{10}$  CFUeq/g (top, middle, and bottom lines, respectively). Predictions were calculated for each bacterial population (S, R,  $I_1$ , and  $I_2$ ) and phages (V). The last column represents the ratio of the total bacterial load ( $B = S + R + I_1 + I_2$ ) in the treated groups to that of the untreated group. The colors are indicative of both the route and the dose of phage administered: untreated (black), i.v.-Lo (5.6  $\log_{10}$  PFU, orange), i.v.-Med (7.6  $\log_{10}$  PFU, red), IT-Low (cyan), IT-med (blue), and IT-high (8.6  $\log_{10}$  PFU, dark blue).

#### METHOD DETAILS

- Purification of bacteriophages
- Determination of *in vitro* infection parameters of phage 536\_P1
- One-step-growth experiments
- Dynamic quantification of bacteria and phages over time
- Kinetic of lysis
- *In vitro* data analysis
- Presentation of the murine model of pulmonary phage therapy
- Bioluminescence and longitudinal follow up of bacterial load in lungs
- Phage distribution
- Bacterial kinetics in untreated mice
- Phage-bacteria interaction in treated mice
- Non-linear mixed effect model for phage-bacteria interactions
- Impact of bacterial kinetics on survival
- Model evaluation
- Model based simulations for the impact of treatment procedures and phage parameter values

#### QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110825>.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly funded by ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé) project no. HAP-2019-S003. B.G. received support from AIHP (Amicale des Anciens Internes des Hôpitaux de Paris). R.D. and N.D. both received, independently, support from Poste d'Accueil APHP/

IP. We thank Hervé Le Nagard and Lionel de la Tribouille for the use of the CATiBioMed calculus facility.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.-D.R., J.G., L.D., and R.D. conceived the study and secured funding. B.G., F.H., R.D., and R.K. performed experiments. J.-D.R., J.G., J.S., L.D., and R.D. analyzed the data. J.G., J.S., and T.-T.N. performed modeling. N.D. provided feedback. J.S. and R.D. wrote the first draft. J.G. and L.D. reviewed and edited final draft.

#### DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: April 8, 2021  
Revised: October 19, 2021  
Accepted: April 25, 2022  
Published: May 17, 2022

#### REFERENCES

- Almayehu, D., Casey, P.G., McAuliffe, O., Guinane, C.M., Martin, J.G., Shanahan, F., Coffey, A., Ross, R.P., and Hill, C. (2012). Bacteriophages  $\phi$ MR299-2 and  $\phi$ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. *mBio* 3, e00029-00012. <https://doi.org/10.1128/mBio.00029-12>.
- Aslam, S., Lampley, E., Wooten, D., Karris, M., Benson, C., Strathdee, S., and Schooley, R.T. (2020). Lessons learned from the first 10 consecutive cases of intravenous bacteriophage therapy to treat multidrug-resistant bacterial infections at a single center in the United States. *Open Forum Infect. Dis.* 7, ofaa389. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa389>.
- Bergeron, Y., Ouellet, N., Deslauriers, A.M., Simard, M., Olivier, M., and Bergeron, M.G. (1998). Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect. Immun.* 66, 912-922. <https://doi.org/10.1128/iai.66.3.912-922.1998>.

- Bergstrand, M., Hooker, A.C., Wallin, J.E., and Karlsson, M.O. (2011). Prediction-corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models. *AAPS J.* 13, 143–151. <https://doi.org/10.1208/s12248-011-9255-z>.
- Brzuszkiewicz, E., Bruggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Olschlager, T., Nagy, G., Albermann, K., Wagner, C., Buchrieser, C., Emody, L., et al. (2006). How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 12879–12884. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603038103>.
- Bull, J.J., Levin, B.R., DeRouin, T., Walker, N., and Bloch, C.A. (2002). Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. *BMC Microbiol.* 2, 35. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-2-35>.
- Cairns, B.J., Timms, A.R., Jansen, V.A.A., Connerton, I.F., and Payne, R.J.H. (2009). Quantitative models of in vitro bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy. *PLoS Pathog.* 5, e1000253. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000253>.
- Carmody, L.A., Gill, J.J., Sumner, E.J., Sajjan, U.S., Gonzalez, C.F., Young, R.F., and LiPuma, J.J. (2010). Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. *J. Infect. Dis.* 207, 264–271. <https://doi.org/10.1086/649227>.
- Chastre, J., and Fagon, J.Y. (2002). Ventilator-associated pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 867–903. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.7.2105078>.
- Corbellino, M., Kieffer, N., Kutateladze, M., Balarjishvili, N., Leshkasheli, L., Askilashvili, L., Tsertsvadze, G., Rimoldi, S.G., Nizharadze, D., Hoyle, N., et al. (2020). Eradication of a multidrug-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate following oral and intra-rectal therapy with a custom made, lytic bacteriophage preparation. *Clin. Infect. Dis.* 70, 1998–2001. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz782>.
- Dabrowska, K., and Abedon, S.T. (2019). Pharmacologically aware phage therapy: pharmacodynamic and pharmacokinetic obstacles to phage antibacterial action in animal and human bodies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 83, e00012-19. <https://doi.org/10.1128/mmb.00012-19>.
- Debarbieux, L., Leduc, D., Maura, D., Morello, E., Criscuolo, A., Grossi, O., Balloy, V., and Touqui, L. (2010). Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J. Infect. Dis.* 201, 1096–1104. <https://doi.org/10.1086/651135>.
- Desmee, S., Mentre, F., Veyrat-Follet, C., and Guedj, J. (2015). Nonlinear mixed-effect models for prostate-specific antigen kinetics and link with survival in the context of metastatic prostate cancer: a comparison by simulation of two-stage and joint approaches. *AAPS J.* 17, 691–699. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9745-5>.
- Dion, M.B., Oechslin, F., and Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>.
- Dufour, N., Debarbieux, L., Fromentin, M., and Ricard, J.D. (2015). Treatment of highly virulent extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* pneumonia with bacteriophages. *Crit. Care Med.* 43, e190–198. <https://doi.org/10.1097/ccm.0000000000000968>.
- Dufour, N., Delattre, R., Chevallereau, A., Ricard, J.D., and Debarbieux, L. (2019). Phage therapy of pneumonia is not associated with an overstimulation of the inflammatory response compared to antibiotic treatment in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e00379-19. <https://doi.org/10.1128/aac.00379-19>.
- Fihman, V., Messika, J., Hajage, D., Tournier, V., Gaudry, S., Magdoud, F., Barraud, G., Billard-Pomares, T., Branger, C., Dreyfuss, D., and Ricard, J.D. (2015). Five-year trends for ventilator-associated pneumonia: correlation between microbiological findings and antimicrobial drug consumption. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.07.010>.
- Friberg, L.E., and Guedj, J. (2020). Acute bacterial or viral infection-What's the difference? A perspective from PKPD modellers. *Clin. Microbiol. Infect.* 26, 1133–1136. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.12.008>.
- Gordillo Altamirano, F.L., and Barr, J.J. (2019). Phage therapy in the postantibiotic era. *Clin. Microbiol. Rev.* 32, e00066-18. <https://doi.org/10.1128/cmr.00066-18>.
- Hamet, M., Pavon, A., Dalle, F., Pechinot, A., Prin, S., Quenot, J.P., and Charles, P.E. (2012). *Candida* spp. airway colonization could promote antibiotic-resistant bacteria selection in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med.* 38, 1272–1279. <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2584-2>.
- Henry, M., Lavigne, R., and Debarbieux, L. (2013). Predicting in vivo efficacy of therapeutic bacteriophages used to treat pulmonary infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5961–5968. <https://doi.org/10.1128/aac.01596-13>.
- Hyman, P., and Abedon, S.T. (2009). Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods Mol. Biol.* 501, 175–202. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_18).
- Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J.P., Que, Y.A., Resch, G., Rousseau, A.F., Ravat, F., Carsin, H., Le Floch, R., et al. (2019). Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect. Dis.* 19, 35–45. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30482-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30482-1).
- Jennes, S., Merabishvili, M., Soentjens, P., Pang, K.W., Rose, T., Keersebilck, E., Soete, O., Francois, P.M., Teodorescu, S., Verween, G., et al. (2017). Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia in a patient with acute kidney injury—a case report. *Crit. Care* 21, 129. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1709-y>.
- Jiang, W., Yan, Y., Ji, W., Wang, Y., and Chen, Z. (2014). Clinical significance of different bacterial load of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Braz. J. Infect. Dis.* 18, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.06.004>.
- Kasman, L.M., Kasman, A., Westwater, C., Dolan, J., Schmidt, M.G., and Norris, J.S. (2002). Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *J. Virol.* 76, 5557–5564. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5557-5564.2002>.
- Kollef, M.H., Ricard, J.D., Roux, D., Francois, B., Ischaki, E., Rozgonyi, Z., Boulain, T., Ivanyi, Z., Janos, G., Garot, D., et al. (2017). A randomized trial of the amikacin fosfomycin inhalation system for the adjunctive therapy of Gram-Negative ventilator-associated pneumonia: IASIS trial. *Chest* 151, 1239–1246. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.11.026>.
- Kortright, K.E., Chan, B.K., Koff, J.L., and Turner, P.E. (2019). Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host Microbe* 25, 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.014>.
- Kuhn, E., and Lavielle, M. (2005). Maximum likelihood estimation in nonlinear mixed effects models. *Comput. Stat. Data Anal.* 49, 1020–1038. <https://doi.org/10.1016/j.csda.2004.07.002>.
- La Combe, B., Clermont, O., Messika, J., Eveillard, M., Kouatchet, A., Lasocki, S., Corvec, S., Lakkhal, K., Billard-Pomares, T., Fernandes, R., et al. (2019). Pneumonia-specific *Escherichia coli* with distinct phylogenetic and virulence profiles, France, 2012–2014. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 710–718. <https://doi.org/10.3201/eid2504.180944>.
- Leitner, L., Ujmajuridze, A., Chanishvili, N., Goderdzishvili, M., Chkonia, I., Rigvava, S., Chkhotua, A., Changashvili, G., McCallin, S., Schneider, M.P., et al. (2020). Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Lancet Infect. Dis.* 21, 427–436. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30330-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30330-3).
- Leung, C.Y.J., and Weitz, J.S. (2017). Modeling the synergistic elimination of bacteria by phage and the innate immune system. *J. Theor. Biol.* 429, 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.06.037>.
- Levin, B.R., Baquero, F., Ankomah, P.P., and McCall, I.C. (2017). Phagocytes, antibiotics, and self-limiting bacterial infections. *Trends Microbiol.* 25, 878–892. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.005>.
- Lin, Y., Quan, D., Yoon Kyung Chang, R., Chow, M.Y.T., Wang, Y., Li, M., Morales, S., Britton, W.J., Kutter, E., Li, J., and Chan, H.K. (2020). Synergistic

- activity of phage PEV20-ciprofloxacin combination powder formulation-A proof-of-principle study in a *P. aeruginosa* lung infection model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 158, 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.11.019>.
- Lourenco, M., Chaffringeon, L., Lamy-Besnier, Q., Pedron, T., Campagne, P., Eberl, C., Berard, M., Stecher, B., Debarbieux, L., and De Sordi, L. (2020). The spatial heterogeneity of the gut limits predation and fosters coexistence of bacteria and bacteriophages. *Cell Host Microbe* 28, 390–401.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.002>.
- Luong, T., Salabarria, A.C., and Roach, D.R. (2020). Phage therapy in the resistance era: where do we stand and where are we going? *Clin. Ther.* 42, 1659–1680. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.07.014>.
- Marriott, H.M., and Dockrell, D.H. (2007). The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria. *Exp. Lung Res.* 33, 493–505. <https://doi.org/10.1080/01902140701756562>.
- Marshall, S., Madabushi, R., Manolis, E., Krudys, K., Staab, A., Dykstra, K., and Visser, S.A.G. (2019). Model-informed drug discovery and development: current industry good practice and regulatory expectations and future perspectives. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 8, 87–96. <https://doi.org/10.1002/psp4.12372>.
- Melo, L.D.R., Oliveira, H., Pires, D.P., Dabrowska, K., and Azeredo, J. (2020). Phage therapy efficacy: a review of the last 10 years of preclinical studies. *Crit. Rev. Microbiol.* 46, 78–99. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2020.1729695>.
- Messika, J., Magdoud, F., Clermont, O., Margetis, D., Gaudry, S., Roux, D., Branger, C., Dreyfuss, D., Denamur, E., and Ricard, J.D. (2012). Pathophysiology of *Escherichia coli* ventilator-associated pneumonia: implication of highly virulent extraintestinal pathogenic strains. *Intensive Care Med.* 38, 2007–2016. <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2699-5>.
- Morello, E., Sausseureau, E., Maura, D., Huerre, M., Touqui, L., and Debarbieux, L. (2011). Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention. *PLoS One* 6, e16963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016963>.
- Morin, C.E., and Kaper, J.B. (2009). Use of stabilized luciferase-expressing plasmids to examine in vivo-induced promoters in the *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD 103-HgR. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 57, 69–79. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2009.00580.x>.
- Oechslein, F., Piccardi, P., Mancini, S., Gabard, J., Moreillon, P., Entenza, J.M., Resch, G., and Que, Y.A. (2017). Synergistic interaction between phage therapy and antibiotics clears *Pseudomonas aeruginosa* infection in endocarditis and reduces virulence. *J. Infect. Dis.* 215, 703–712. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw632>.
- Payne, R.J., and Jansen, V.A. (2001). Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process. *J. Theor. Biol.* 208, 37–48. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2000.2198>.
- Payne, R.J., and Jansen, V.A. (2003). Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. *Clin. Pharmacokinet.* 42, 315–325. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342040-00002>.
- Perelson, A.S., and Guedj, J. (2015). Modelling hepatitis C therapy—predicting effects of treatment. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 437–445. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.97>.
- Pouillot, F., Chomton, M., Blois, H., Courroux, C., Noelig, J., Bidet, P., Bingen, E., and Bonacorsi, S. (2012). Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by a clone O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* strain producing CTX-M-15. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3568–3575. <https://doi.org/10.1128/aac.06330-11>.
- Roach, D.R., Leung, C.Y., Henry, M., Morello, E., Singh, D., Di Santo, J.P., Weitz, J.S., and Debarbieux, L. (2017). Synergy between the host immune system and bacteriophage is essential for successful phage therapy against an acute respiratory pathogen. *Cell Host Microbe* 22, 38–47.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.018>.
- Sarker, S.A., Sultana, S., Reuteler, G., Moine, D., Descombes, P., Charton, F., Bourdin, G., McCallin, S., Ngom-Bru, C., Neville, T., et al. (2016). Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh. *EBioMedicine* 4, 124–137. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.12.023>.
- Schooley, R.T., Biswas, B., Gill, J.J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J., Lessor, L., Barr, J.J., Reed, S.L., Rohwer, F., Benler, S., et al. (2017). Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e00954-17. <https://doi.org/10.1128/aac.00954-17>.
- Smith, A.M., McCullers, J.A., and Adler, F.R. (2011). Mathematical model of a three-stage innate immune response to a pneumococcal lung infection. *J. Theor. Biol.* 276, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.01.052>.
- Smith, H.W., Huggins, M.B., and Shaw, K.M. (1987). The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1111–1126. <https://doi.org/10.1099/00221287-133-5-1111>.
- Sousa, J.A.M.D., and Rocha, E.P.C. (2019). Environmental structure drives resistance to phages and antibiotics during phage therapy and to invading lysozymes during colonisation. *Sci. Rep.* 9, 3149. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39773-3>.
- Weld, R.J., Butts, C., and Heinemann, J.A. (2004). Models of phage growth and their applicability to phage therapy. *J. Theor. Biol.* 227, 1–11. [https://doi.org/10.1016/s0022-5193\(03\)00262-5](https://doi.org/10.1016/s0022-5193(03)00262-5).



## STAR★METHODS

### KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Bacterial and virus strains</b>		
Escherichia coli 536-lux	<a href="#">Dufour et al. (2015)</a>	N/A
Bacteriophage 536_P1	<a href="#">Dufour et al. (2015)</a>	N/A
<b>Experimental models: Organisms/strains</b>		
Mouse Balb/cJrj	Janvier Labs	N/A
<b>Software and algorithms</b>		
Prism	GraphPad	Version 8
Monolix (algorithm SAEM)	Lixoft	Version 2018R2
R	The R foundation	Version 3.4.3.

### RESOURCE AVAILABILITY

#### Lead contact

Further information and requests for resources, reagents and numerical codes should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Laurent Debarbieux ([laurent.debarbieux@pasteur.fr](mailto:laurent.debarbieux@pasteur.fr)).

#### Materials availability

The bacterial strain 536-lux and the phage 536\_P1 are available from the [lead contact](#) upon completion of a Materials Transfer Agreement (MTA).

#### Data and code availability

- Data is available from the [lead contact](#) upon request.
- The original code of the phage-bacteria mathematical model is available as [Data S1](#) in the [supplemental information](#) and software used are reported in the [key resources table](#).
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the [lead contact](#) upon request.

### EXPERIMENTAL MODELS AND SUBJECT DETAILS

#### Ethic statement

A total of 241 eight-week-old BALB/cJrj male mice (Janvier Labs, France) were housed in animal facility in accordance with French and European regulations on the care and protection of laboratory animals. Food and drink were provided ad libitum. Protocol was approved by the veterinary staff of the Institut Pasteur animal facility (approval number 20.173) and the National Ethics Committee regulating animal experimentation (APAFIS#26874-2020081309052574 v1).

#### Phages and bacterial strains

The *E. coli* strain 536 and phage 536\_P1 were previously described as reported in the [key resources table](#).

### METHOD DETAILS

#### Purification of bacteriophages

Phage 536\_P1 was amplified on strain 536 and purified by first, filtration of lysate to 0.1  $\mu\text{m}$  followed by tangential ultrafiltration (Viva-flow™, Sartorius, 100 kDa), two ultracentrifugations on cesium chloride, dialysed against TN (Tris-HCl pH8, NaCl 150 mM), passed three times through an endotoxin removal column (Endotrap Blue, Hyglos, Germany) and filtered-sterilized at 0.22  $\mu\text{m}$ .

#### Determination of *in vitro* infection parameters of phage 536\_P1

Parameters of the interactions between strain 536 and phage 536\_P1 have been determined *in vitro*, notably the rate of transition  $e$  from infected non-productive bacteria to productively infected bacteria (eg,  $\log(2)/e$  is the median eclipse phase duration), and the burst size  $b$ , *i.e.* the number of virions released by a lysed bacteria. The median eclipse phase time and the burst size were estimated



from non-linear mixed effect models performed with the SAEM algorithm implemented in Monolix software (version 2018R2) (Kuhn and Lavielle, 2005) using data from one-step-growth experiments (see Supplemental information).

### One-step-growth experiments

The one-step growth experiment was performed in triplicate, using Luria Bertani Broth (Lennox). As previously described (Hyman and Abedon, 2009), an exponential-phase culture (9 mL) of strain 536 (optical density at 600 nm 0.25, ie  $9 \log_{10}$  CFU) was mixed with 1 mL of  $8 \log_{10}$  PFU of phage 536\_P1 (MOI of 0.1). The mixture was placed under constant shaking (100 rpm) at 37°C. Duplicated samples were collected at 2-min intervals during 30 min. Six minutes after mixing phages and bacteria, the mixture was 1000 fold diluted in LB medium in order to lower bacterial concentration and avoid any reinfection. Out of the duplicated samples, one was immediately diluted and plated for phage titration, while the second was treated with 10% (vol/vol) chloroform to release intracellular phages in order to determine the eclipse period before phage titration.

### Dynamic quantification of bacteria and phages over time

We first established the correlation between optical density and CFU for strain 536 by plating on LB agar dilutions of independent aliquots of exponentially growing cells from which OD600 nm was recorded before dilutions. Then, an exponential bacterial culture (50 mL of a total of  $8.7 \log_{10}$  CFU) was mixed with  $5.7 \log_{10}$  PFU (ie MOI  $1 \times 10^{-3}$ ) and incubated under constant shaking (150 rpm, 37°C). Samples from this mixture were withdrawn at specific time points to measure optical density at 600 nm and count the number of phages after serial dilutions and plating on LB agar covered with strain 536. Experiments were performed three times from independent cultures.

### Kinetic of lysis

To assess the behavior of strain 536 in presence of phage 536\_P1 at different MOI, OD600 nm was recorded over time from microtiter plates. In each well, 180  $\mu$ L of an exponential culture of strain 536 (OD 0.1) was mixed with 20  $\mu$ L of phage 536\_P1 at different concentrations (each replicated six times) to reach MOI of 0.001; 0.01; 0.1; 1 and 10. Controls included wells with phage alone, or bacteria alone or LB alone. The microplates were incubated in a microplate reader (Tecan) set at 37°C during 12 h with orbital agitation. Three independent experiments were performed.

### In vitro data analysis

Models of *in vitro* data were built using similar methodology used for analyzing *in vivo* PK/PD data: parameters of mixed models were estimated using SAEM algorithm and the model selection was based on BIC. Model of phage/bacteria interactions *in vitro* was built in three steps.

First, one step growth experiments reproduced a single lysis cycle of the phage and therefore allowed to estimate the burst size (*i.e.* the number of virions released from each bacterium lysed) and the time of a cycle, including an eclipse period. The best fit of these one step growth data was obtained using a multiple transit compartments model. The burst size (570 virions/CFU) was estimated with acceptable precision of estimation (relative standard error < 30%). To confirm this burst size value which was higher than expected, another estimation method was used. A nonlinear regression was performed ( $y(t) = E0 + \frac{Emax}{1 + 10^{(\log(T50) - t)/\gamma}}$ , with  $y(t)$  in  $\log_{10}$  PFU/infected cell,  $E0$  the baseline,  $Emax$  the plateau,  $\log(T50)$  the time to reach  $\frac{E0 + Emax}{2}$  and  $\gamma$  a shape parameter) on the mean data from the three different experiments. A burst size ( $b = \frac{10^{Emax} - 10^{E0}}{10^{E0}}$ ) of 554 virions/CFU was estimated from the estimates of this nonlinear regression, which was close to the value obtained from the nonlinear mixed effect model. The median period for a phage to produce and release new phages was estimated at 35 min. Second, bacterial growth was characterized from the above *in vitro* experiments exploiting the condition MOI 0 (without any phage). The bacterial doubling time was estimated at 63 min from the model. Third, lysis kinetics experiments (at MOI > 0) were modelled using a predator-prey model with similar structure to *in vivo* model (see equations below and Table S1). The burst size and bacterial growth were fixed at values respectively obtained at the above first and second steps. The lysis rate (corresponding to rate between infected latent and infected productive bacteria) was fixed from one step growth experiments on 536\_P1. The eclipse period was obtained by sensitivity analysis on the transition rate  $e$ . The proportion of phage-resistant clones at baseline and their relative fitness ( $w$ ) were characterized from this model.

$$\frac{dS}{dt} = \alpha \left( 1 - \frac{S + I_1 + I_2 + R}{10^{E_{max}}} \right) S - \beta VS$$

$$\frac{dI_1}{dt} = \beta VS - eI_1$$

$$\frac{dI_2}{dt} = eI_1 - \delta_V I_2$$



$$\frac{dR}{dt} = w\alpha \left( 1 - \frac{S + I_1 + I_2 + R}{10^{\beta_{max}}} \right) R$$

$$\frac{dV}{dt} = -\beta VS + \delta_v b I_2$$

### Presentation of the murine model of pulmonary phage therapy

The *E. coli* strain 536 is a virulent clinical strain belonging to the B2 phylogenetic group (Brzuszkiewicz et al., 2006). The *E. coli* strain 536-lux was obtained by the transformation of wild-type 536 strain with plasmid pCM17, which carries the *luxCDABE* operon from *Photobacterium luminescens* under *OmpC* promoter (Morin and Kaper, 2009). This plasmid is stable over 7 days without adding antibiotic in the medium (Dufour et al., 2015).

Phage 536\_P1 (Dufour et al., 2015) is a virulent *Myoviridae* (149.4 Kb) that was amplified on strain 536 and purified according to molecular biology protocols including an endotoxin removal step (Endotrap Blue, Hyglos, Germany). The stock solution of 8.2 log<sub>10</sub> PFU/mL has an endotoxin concentration of 2.15 EU/mL.

Pneumonia was induced by intratracheal (IT) administration of strain 536-lux in eight-week-old BALB/cJrj anesthetized male mice (mixture of Ketamine and Xylazine administered intraperitoneally, IP). IT was performed using elongated tips guided by the glottis visualization with a cold light. The correct position of the tip was checked by the liquid movement inside the tip caused by the ventilatory movement of the animal. The liquid was then expelled from the tip with a pipette, and 100 μL of air was then pushed to aerosolize the solution to the lower airways. Mice were maintained in prone position during at least 5 min. Exponentially growing bacteria in Luria Bertani Broth (Lennox) at 37°C were centrifuged and washed twice and finally resuspended in PBS to obtain inoculums ranging from 7.6 to 8.2 log<sub>10</sub> CFU in 20 μL. Previous work showed that a single intranasal dose of 7.6 log<sub>10</sub> CFU led to a fatal outcome at 72 h post-infection for 100% of mice. Moreover, mice similarly infected were successfully treated (100% survival 10 days post-infection) when a single intranasal dose of 7.0 log<sub>10</sub> PFU of phage 536\_P1 was administered 2 h post-infection (Dufour et al., 2015).

Phage treatment was applied under general anesthesia (isoflurane, inspired fraction = 2%) using IT or intravenous (IV, retro-orbital injection) administration two hours after infection. A volume of 20 μL of phage 536\_P1 was used, containing either a low (Lo; 6.6 log<sub>10</sub> PFU), medium (Me; 7.6 log<sub>10</sub> PFU) or high (Hi; 8.6 log<sub>10</sub> PFU) amount of phages.

At 2, 4, 8, 24 and 48 h after phage administration, mice were sacrificed, and blood (in heparin coated tubes) and lungs were recovered and put on ice. Lungs were weighted, homogenized in PBS with protease inhibitor (EDTA free micro Tabs, SigmaAldrich). Lungs and blood were then centrifuged (5000 g, 15 min, 4°C). The supernatant was collected, serially diluted and spotted (in triplicate) on agar plates covered with strain 536 to titer phage 536\_P1.

### Bioluminescence and longitudinal follow up of bacterial load in lungs

In all our experiments photon emission of the luminescent bacteria was recorded at regular intervals under general anesthesia (isoflurane, inspired fraction = 2%) using IVIS Spectrum and analyzed with Living Image software (PerkinElmer, Richmond, CA) as previously described (Debarbieux et al., 2010). Photons emitted within the chest area of each mouse were collected as photon/s/cm<sup>2</sup>/steradian.

To fully exploit the *in vivo* imaging tool we established the correlation between bioluminescence and CFU count in lungs using data from 17 untreated animals that were euthanized at different time points and for which lung bacteria was quantified by plating (Figure S1). The relationship obtained allowed us to derive from the luminescence signal an equivalent counts of CFU per gram of lung (noted CFUeq/g) that was used to obtain in all infected animals (untreated or treated by phages) the bacterial densities. The accuracy of this correlation curve was tested against previously published mice lungs CFUs data obtained 6 h post-infection by the bioluminescent strain 536 (Dufour et al., 2015). The corresponding amount of emitted light was retrieved for 8 animals and was converted to obtain CFUeq/g. The median predicted value was 2.3 × 10<sup>7</sup> CFUeq/g (interquartile range: [1.9 × 10<sup>7</sup>, 3.2 × 10<sup>7</sup>]), which is close to the observed value of 8.3 × 10<sup>6</sup> CFU/g (interquartile range: [5.2 × 10<sup>6</sup>, 1.0 × 10<sup>7</sup>]) initially reported in the Table 1 of that study.

### Phage distribution

A dose of 8 log<sub>10</sub> PFU of phage 536\_P1 was administered in uninfected mice (N = 53) using IT (N = 16) or IV (N = 37) route. At 2, 4, 8, 24 and 48 h after phage administration, mice were sacrificed, and blood (in heparin coated tubes) and lungs were recovered and put on ice. Lungs were weighted, homogenized in PBS with protease inhibitor (EDTA free micro Tabs, SigmaAldrich). Lungs and blood were then centrifuged (5000 g, 15 min, 4°C). The supernatant was collected, serially diluted and spotted (in triplicate) on agar plates covered with strain 536 to titer phage 536\_P1.

We used the following standard pharmacokinetic model to estimate phage biodistribution:

$$\frac{dV_B}{dt} = -k_a V_B \quad (\text{Equation 1})$$

$$\frac{dV}{dt} = Fk_a V_B - k_e V \quad (\text{Equation 2})$$

where  $V$  and  $V_B$  denote phage quantity in lung and blood compartments, respectively,  $k_e$  is the elimination rate from lungs,  $k_a$  is the transfer rate from blood to lungs,  $F$  is the bioavailability in lungs after IV administration. The initial condition of these equations are  $V_B(0) = \text{dose}$  and  $V(0) = 0$  in case of IV administration and  $V_B(0) = 0$  and  $V(0) = \text{dose}$  in case of IT administration.  $V$  is divided by the phage distribution weight ( $W$ ) to obtain the phage concentration in lung compartment. Before the modeling analysis, the median phage concentration at baseline ( $8 \log_{10}$  PFU/g) was determined following the IT administration of a single dose of  $8 \log_{10}$  PFU, and  $F$  was obtained by performing the ratio of IV/IT area under the curves in the lungs. The parameter  $W$  was deduced from the phage concentration at baseline. Estimations of the other parameters were performed by naive pooling of data (i.e. considering all the measures for each group (IV and IT) as if they came from a single individual and performing a nonlinear regression).

### Bacterial kinetics in untreated mice

We characterize the natural bacterial kinetics (i.e., in absence of treatment) in animals infected with doses of  $7.6 \log_{10}$  CFU (34 mice) or  $8.2 \log_{10}$  CFU (12 mice) and the bacterial kinetics obtained by bioluminescence (see above) using the following model (one mouse was not analyzed due to death during bacterial inoculation, i.e.  $N = 45$ ):

$$\frac{dB}{dt} = \alpha \left(1 - \frac{B}{B_{max}}\right) B - \delta_M \frac{B}{B_{50} + B} \quad (\text{Equation 3})$$

Where  $\alpha$  is the exponential growth rate of bacteria (eg,  $\log(2)/\alpha$  is the doubling time) and  $B_{max}$  is the maximal carrying capacity, determined by sensitivity analysis. The initial condition of  $B$  was estimated by the parameter  $B_0$  ( $B(0) = 10^{B_0}$ ). Consistent with previous work (Dufour et al., 2019), we assumed that in the first 3 h of infection the immune system had no activity (eg, bacteria could grow exponentially during this period). After this period the elimination of bacteria by the host was modeled by a non-linear saturable term, given by  $\delta_M \frac{B}{B_{50} + B}$ .

### Phage-bacteria interaction in treated mice

We characterized phage-bacterial interactions using data obtained in 142 mice infected by  $7.6 \log_{10}$  CFU and treated subsequently (four mice were not analyzed due to death during bacterial inoculation, i.e.  $N = 138$ ), using the protocol described above, with a single dose (low, medium or high) of phages administered using IT or IV route (detail of the groups in Figure 1). Bacterial kinetics was derived from bioluminescence (see above) and lungs were collected at 2, 4, 8, 24 or 48 h after phage administration to count PFU. We also considered data in untreated mice (see previous section) for the analysis.

A linear mixed model of longitudinal bacterial load has been built using the lmer function of the lme4 R package lmer. Two covariates were considered: the treatment (untreated or treated) and the inoculum ( $<6.8 \log_{10}$  CFUeq/g) or ( $\geq 6.8 \log_{10}$  CFUeq/g). The basis model included the intercept, the slope (time effect), the treatment and the inoculum effect on the intercept, the inoculum effect on the slope and the interaction between the inoculum and the treatment. The final model included these parameters as well as the treatment effect on the slope. To evaluate the phage treatment effect on the bacterial load evolution, a likelihood ratio test was performed to compare the two nested model.

The model describing interactions between phage 536\_P1 and strain 536 relied on a system of ordinary differential equations (ODE) (Figure 1, Equations 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10, presented below). We combined standard model of viral (Perelson and Guedj, 2015) and bacterial kinetics (Friberg and Guedj, 2020) to tease out the main parameters governing phage-bacteria interaction in mice. In lungs, phages can infect susceptible bacteria (S) following a mass-action term, with rate  $\beta$ . We also considered a population of refractory bacteria (of initial proportion  $f$ ), noted R, that includes both phage-resistant and phage-inaccessible bacteria.

$$\frac{dS}{dt} = \alpha \left(1 - \frac{S + I_1 + I_2 + R}{B_{max}}\right) S - \delta_M \frac{S}{B_{50} + S + I_1 + I_2 + R} - \beta VS \quad (\text{Equation 4})$$

$$\frac{dI_1}{dt} = \beta VS - eI_1 - \delta_M \frac{I_1}{B_{50} + S + I_1 + I_2 + R} \quad (\text{Equation 5})$$

$$\frac{dI_2}{dt} = eI_1 - \delta_V I_2 - \delta_M \frac{I_2}{B_{50} + S + I_1 + I_2 + R} \quad (\text{Equation 6})$$

$$\frac{dR}{dt} = \alpha \left(1 - \frac{S + I_1 + I_2 + R}{B_{max}}\right) R - \delta_M \frac{R}{B_{50} + S + I_1 + I_2 + R} \quad (\text{Equation 7})$$



$$\frac{dV_B}{dt} = -k_d V_B \quad (\text{Equation 8})$$

$$\frac{dV}{dt} = -\beta V S + b \delta_V I_2 + F k_B V_B - k_e V \quad (\text{Equation 9})$$

We considered the following initial condition for this system:  $S(0) = 10^{B_0} (1 - f)$ ,  $I_1(0) = 0$ ,  $I_2(0) = 0$ ,  $R(0) = 10^{B_0} \times f$ ,  $V_B(0) = 0$ ,  $V(0) = 0$ . The dose of phages is added to  $V$  or  $V_B$  at the phage administration time by IT or IV route, respectively.

### Non-linear mixed effect model for phage-bacteria interactions

The model parameters in bold were estimated using data from all infected animals while all other parameters were fixed to the values determined above, either *in vitro* ( $e$ ,  $b$ ), in uninfected treated mice ( $k_B$ ,  $F$ ,  $k_e$ ) or in infected untreated mice ( $\alpha$ ,  $B_{max}$ ,  $\delta_M$ ,  $B_{50}$ ). All inference procedures were performed in a non-linear mixed effect model framework using the SAEM algorithm implemented in Monolix software (Kuhn and Lavielle, 2005) (see the phage-bacteria mathematical model reported in Data S1 and related to Figure 5). All inference procedures assumed an additive Gaussian error model on the log-transformed data, with  $\sigma_B$  (resp.  $\sigma_V$ ) representing the standard deviation of the measurement error associated with bacterial load (resp. phage concentration). All parameters along with their estimated standard error are summarized in Table 1.

### Impact of bacterial kinetics on survival

Finally, we aimed to consider the potential bias due to the fact that more severely infected animals died earlier, making the population study less and less representative as time goes by. In this approach, called joint models (Desmées et al., 2015), the probability to survive up to time  $t$ ,  $S(t)$ , is modeled as:  $S(t) = e^{-\int_0^t h(t) dt}$  where

$$h(t) = \frac{\kappa}{\lambda} \left(\frac{t}{\lambda}\right)^{\kappa-1} e^{\gamma \times \log(S(t) + I_1(t) + I_2(t) + R(t))} \quad (\text{Equation 10})$$

$h(t)$  is the instantaneous hazard function,  $\kappa$  and  $\lambda$  are scale parameters characterizing the risk of death in absence of infection and  $\gamma$  quantifies the impact of bacterial load on mortality. Thus, in this model  $\gamma = 0$  is indicative of an absence of association between bacterial load and mortality, while  $\gamma > 0$  indicates that increased bacterial load is associated with an increased risk of death.

### Model evaluation

Individual fits were investigated to evaluate the different models. For the final model, we also evaluated the model predictions i) for the bacterial kinetics by using prediction corrected-visual predictive checks (Bergstrand et al., 2011), accounting for the risk of death and ii) visual predictive checks of the survival. Simulations for validation methods were made using mlxR package.

### Model based simulations for the impact of treatment procedures and phage parameter values

Model based predictions were performed to investigate various scenarios as follows. For each simulation, the median profile of different model compartments ( $S$ ,  $R$ ,  $I_1$ ,  $I_2$  and  $V$ ) was investigated using the parameters determined in Table 1 and different experimental conditions regarding the route of administration (IV or IT), the dose of phage administered (Lo: 5.6, Med: 7.6 or Hi: 8.6  $\log_{10}$  PFU) and initial bacterial load (6, 7 or 8  $\log_{10}$  CFUeq/g). We also evaluated the effects of different burst size (10 fold lower, 10 fold larger than the estimated value *in vitro*), using a single initial bacterial load of 7  $\log_{10}$  CFUeq/g. Furthermore, when setting a burst size 10 times lower than the estimated value (and a fixed initial bacterial load of 7  $\log_{10}$  CFUeq/g), we investigated the effect of three different lysis rates values: the value estimated *in vivo* (0.09  $\text{h}^{-1}$ ); a value three times higher (0.27  $\text{h}^{-1}$ ); a value estimated *in vitro* (1.39  $\text{h}^{-1}$ ).

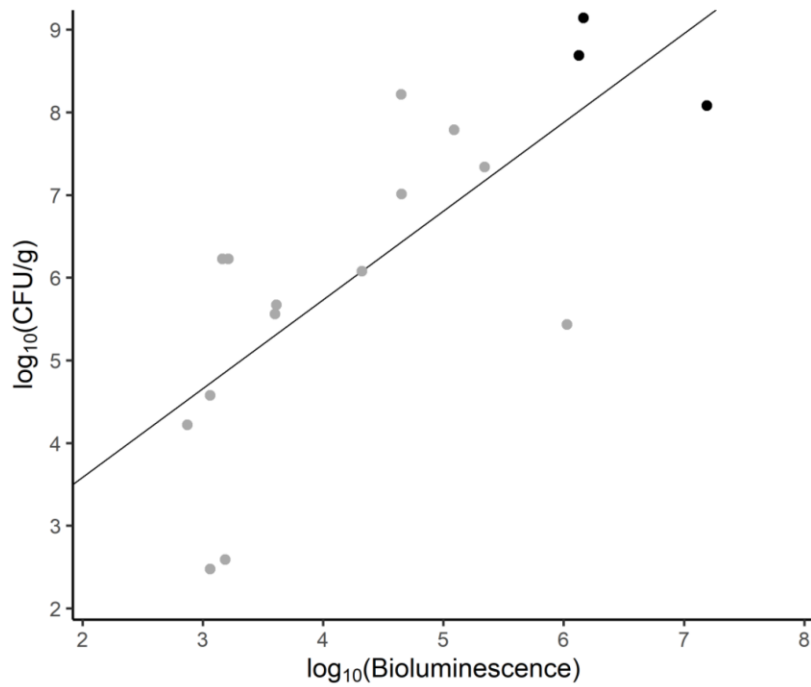
### QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Quantification and statistical analysis reported in this work are described in the corresponding Method details sections or figure legends. The statistical procedures were performed using R, except for those related to non-linear mixed effects models which were performed with Monolix.

**Supplemental information**

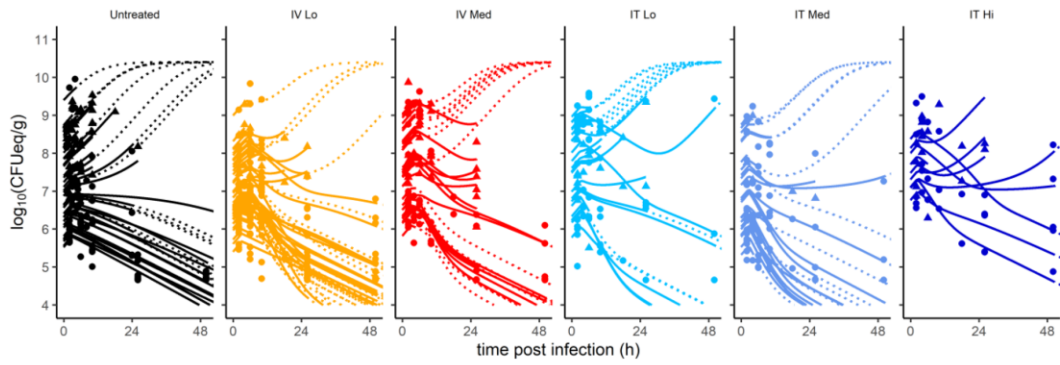
**Combination of *in vivo* phage therapy data  
with *in silico* model highlights key parameters  
for pneumonia treatment efficacy**

**Raphaëlle Delattre, Jérémy Seurat, Feyrouz Haddad, Thu-Thuy Nguyen, Baptiste Gaborieau, Rokhaya Kane, Nicolas Dufour, Jean-Damien Ricard, Jérémie Guedj, and Laurent Debarbieux**



**Figure S1. Correlation of bioluminescence and CFU counts in the lungs of infected and untreated mice (related to Figure 3)**

From 17 mice, 14 were infected with an inoculum of 7.6 log<sub>10</sub> CFU (grey dots) and 3 with an inoculum of 8.2 log<sub>10</sub> CFU (black dots). The regression line equation is  $\log_{10}(CFU/g) = 1.44 + 1.07 \log_{10}(Bioluminescence)$ . The adjusted coefficient of determination (adjusted-R<sup>2</sup>) is 0.52 (p=0.0006, Spearman's correlation test).



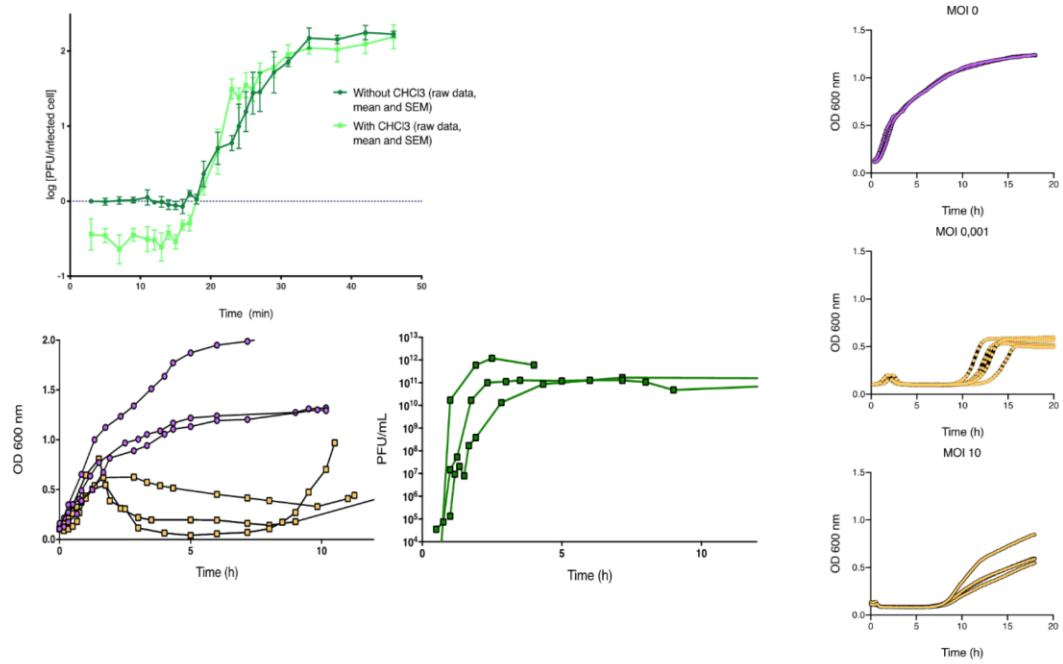
**Figure S2. Representation over time of bacterial loads and individual fits for all infected mice (N=183; related to Figure 3)**

Solid lines represent individual predictions from the infection time to the last observation time.

The dotted lines are individual predictions starting from the sacrifice time point.

Interrupted solid lines correspond to animal that die before the scheduled sacrifice time.

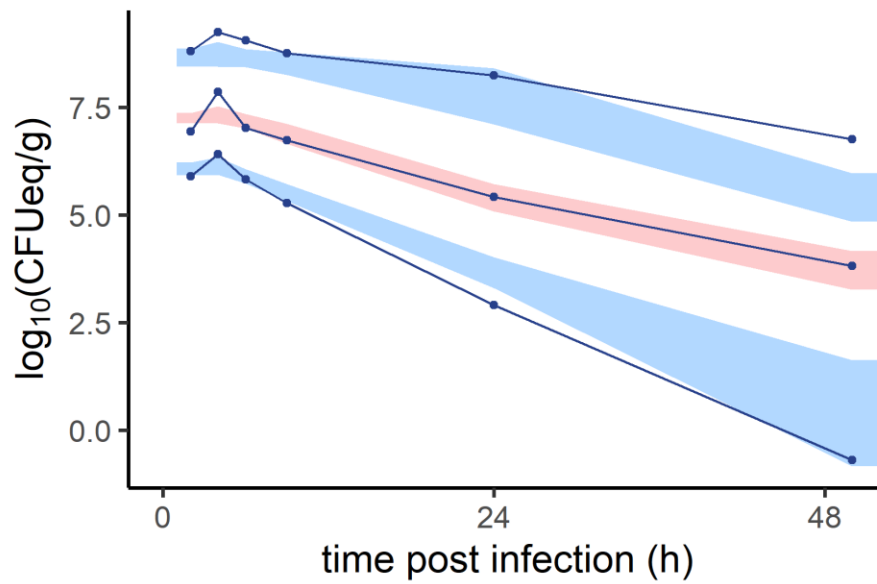
Circles correspond to data in live animals while triangles correspond to animals at time of sacrifice after recording the bioluminescence.



**Figure S3. *In vitro* experiments describing the dynamic interactions between strain 536 and phage 536\_P1 (related to Table 1)**

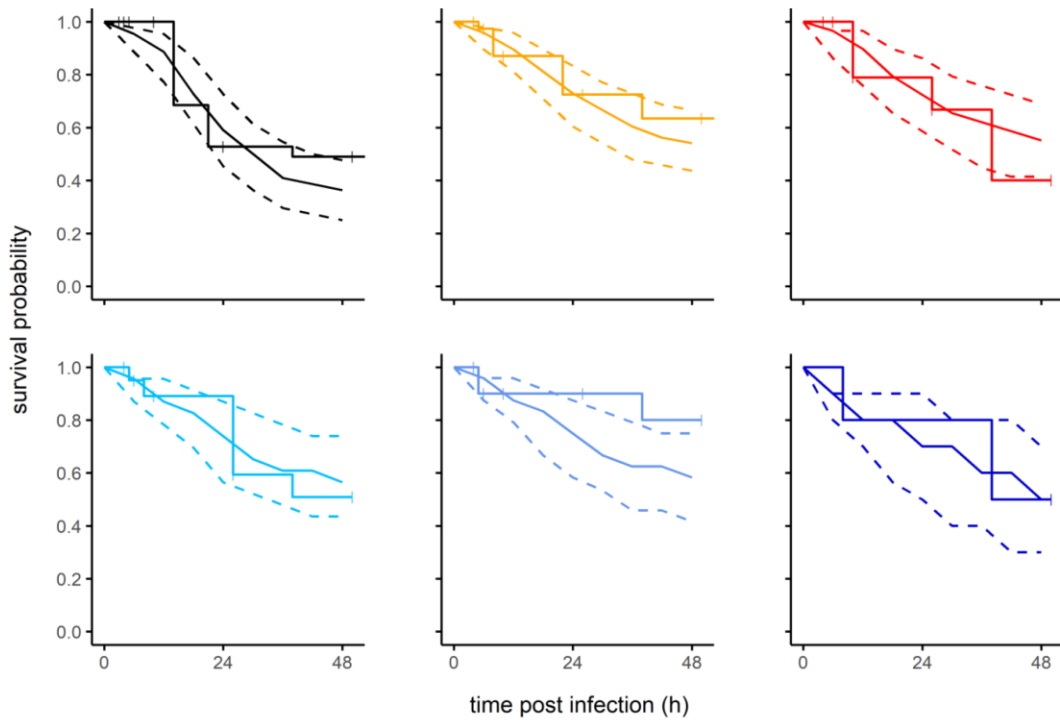
The one step growth data (3 replicates) are presented on top left, the dynamic quantification of strain 536 and phage 536\_P1 (3 replicates at MOI 0 and at MOI 0.001) are presented on bottom left, and the kinetics of lysis (3 or 4 replicates at MOI 0, MOI 0.0001 and MOI 10) are presented on the right (see STAR methods).





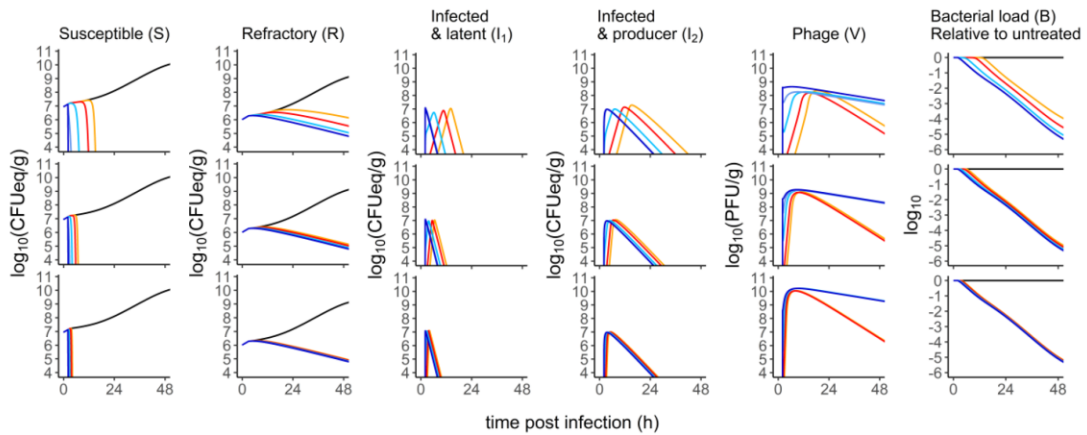
**Figure S4. Prediction-corrected visual predictive check for the bacterial load (related to Figure 5)**

The 90% confidence intervals around the 10<sup>th</sup> (bottom), 50<sup>th</sup> (middle) and 90<sup>th</sup> (top) model-predicted percentiles, obtained from 1000 simulated data sets from the final model, are represented as blue (10<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentiles) and pink (50<sup>th</sup> percentile) areas. The blue dots represent the 10<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentiles of the observations from the original data set.



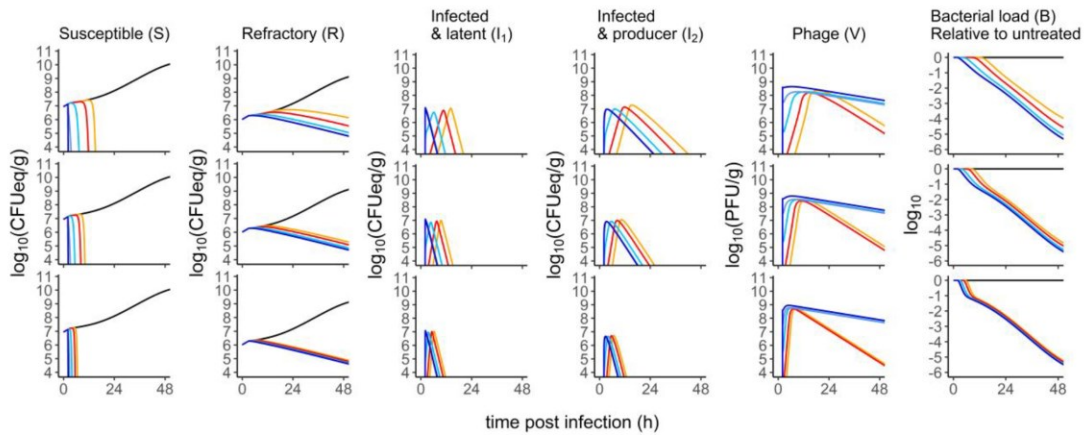
**Figure S5. Visual predictive check plot for the survival of infected and treated mice (related to Figure 5)**

Untreated mice are in black, phage 536\_P1 treated mice (2 h after infection) groups are in colors, with different phage administration scheme: intravenously (IV) at low dose ( $5.6 \log_{10}$  PFU) in orange or medium dose ( $7.6 \log_{10}$  PFU) in red, intratracheally (IT) at low dose in cyan, medium dose in blue or high dose ( $8.6 \log_{10}$  PFU) in dark blue (IT Hi). The dashed lines around the solid line represent the 10<sup>th</sup> (bottom), 50<sup>th</sup> (middle) and 90<sup>th</sup> (top) percentiles of survival obtained from 1000 simulated data sets from the final model. The stepped line is the observed survival (Kaplan-Meier curve), with crosses representing censoring.



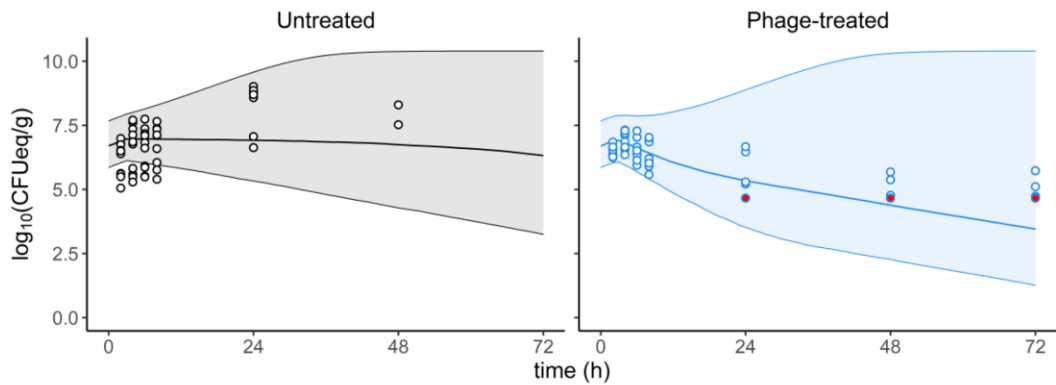
**Figure S6. Predictive models of the burst size effect in the different treatment groups (related to Figure 6)**

Median profile of model predictions for different burst sizes: 57, 570 (*i.e.* the estimated value) and 5700 PFU/CFU in the top, middle, and bottom line, respectively), with a fixed inoculum of 7 log<sub>10</sub> CFUeq/g. Each column represents different model compartments: bacteria (S, R, I<sub>1</sub> and I<sub>2</sub>) and phages in lungs. The last column represents the ratio of the total bacterial load (B = S + R + I<sub>1</sub> + I<sub>2</sub>) in the treated groups to that of the untreated group. The colors are indicative of both the route of administration (IT or IV) and the dose of phage received (Lo: 5.6 log<sub>10</sub> PFU; Med: 7.6 log<sub>10</sub> PFU; Hi: 7.6 log<sub>10</sub> PFU): untreated (black), IV-Lo (orange), IV-Med (red), IT-Lo (cyan), IT-med (blue), IT-high (dark blue).



**Figure S7. Predictive models of the lysis rate effect in the different treatment groups (related to Figure 6)**

Median profile of model predictions for different lysis rates: 0.09 (*i.e.* the estimated value in the final model), 0.27 and 1.39 h<sup>-1</sup> (*i.e.* the estimated value *in vitro*) in the top, middle, and bottom line, respectively, with a fixed inoculum of 7 log<sub>10</sub> CFUeq/g and a burst size of 57 PFU/CFU. Each column represents different model compartments: bacteria (S, R, I<sub>1</sub> and I<sub>2</sub>) and phages in lungs. The last column represents the ratio of the total bacterial load (B = S + R + I<sub>1</sub> + I<sub>2</sub>) in the treated groups to that of the untreated group. The colors are indicative of both the route of administration (IT or IV) and the dose of phage received (Lo: 5.6 log<sub>10</sub> PFU; Med: 7.6 log<sub>10</sub> PFU; Hi: 8.6 log<sub>10</sub> PFU): untreated (black), IV-Lo (orange), IV-Med (red), IT-Lo (cyan), IT-med (blue), IT-high (dark blue).



**Figure S8 related to Figure 3. External visual predictive checks**

The circles correspond to CFUeq/g of observed bacterial loads recorded from live imaging of animals (inoculum of  $7.6 \log_{10}$  of the bioluminescent strain 536 ) previously reported (Dufour et al., 2015) from the untreated group (infected and PBS-treated; black) on the left panel and from the phage-treated group (single intranasal administration of  $1.2 \cdot 10^8$  PFU of phage 536\_P1 2 h post infection; blue) on the right panel. The red dots correspond to threshold of detection of the light. Simulations ( $N=2000$  in each group) based on our model have been performed, using an inoculum parameter corresponding to the median and the variability of the effective inoculum, observed 2 hours post infection (Dufour et al., 2015). In the simulations, the phage pharmacokinetics model and parameters were those of an intratracheal administration. The thick line corresponds to the median and the colored areas included the 5<sup>th</sup> and the 95<sup>th</sup> percentiles of the simulations.

**Table S1. Parameter estimates of the final *in vitro* model (related to Table1)**

Parameter	Name	Unit	Fixed/Estimated from	Fixed effect (rse, %)	Sd of random effect (rse, %)
Bacterial growth rate	$\alpha$	min <sup>-1</sup>	Coev + Lysis (MOI 0)	0.011 (-)	0 (-)
Initial number of susceptible	$S_0$	log <sub>10</sub> CFU mL <sup>-1</sup>	Coev + Lysis (MOI 0)	7.9 (-)	0 (-)
Bacterial load plateau	$B_{max}$	log <sub>10</sub> CFU mL <sup>-1</sup>	Coev + Lysis (MOI 0)	9.9 (-)	0 (-)
Infectivity rate	$\beta$	log <sub>10</sub> mL CFU <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	Lysis (MOI > 0)	-9.6 (<1)	0.01 (26)
Transition rate	$e$	min <sup>-1</sup>	Lysis (MOI > 0)	0.02 (-)	0 (-)
Lysis rate	$\delta_V$	min <sup>-1</sup>	Dufour et al., 2017	0.5 (-)	0 (-)
Burst size	$b$	PFU CFU <sup>-1</sup>	OSG	570 (-)	0 (-)
Initial number of resistant	$R_0$	log <sub>10</sub> CFU mL <sup>-1</sup>	Lysis (MOI > 0)	6.7 (<1)	0.05 (10)
Relative fitness	$w$	-	Lysis (MOI > 0)	0.49 (4)	0.27 (10)
Additive error on bacterial load	$\sigma_B$	log <sub>10</sub> PFU g <sup>-1</sup>	Lysis (MOI > 0)	-	0.1 (1)

Sd: standard deviation, rse: relative standard error; OSG: one step growth



# **CHAPITRE 3**

-

## **ÉTUDES DES MECANISMES DE RESISTANCE AUX BACTERIOPHAGES AU COURS D'UNE PHAGOTHERAPIE PULMONAIRE**





Le bactériophage 536\_P1, a été caractérisé précédemment dans le laboratoire. Il a toutes les caractéristiques du candidat idéal face à la souche d'*Escherichia coli* 536, grâce à sa *burst size* élevée, son temps de latence faible et son caractère virulent.

Dans un modèle de pneumonie aigüe létale chez la souris immunocompétente, une dose unique de ce bactériophage administrée par voie nasale est suffisante pour assurer la guérison de tous les animaux, que ce soit avec des posologies faibles (ratio bactériophages bactéries à 0,3) ou forte (ratio bactériophages bactéries à 3). Or dans ce modèle, le développement d'une population bactérienne résistante à 536\_P1 pourrait contribuer à l'échec thérapeutique dans certaines conditions comme discuté dans le chapitre précédent.

Au cours d'une culture en milieu liquide LB de la souche 536 en présence d'une faible quantité de 536\_P1 (MOI à 0,1 ou 1), après une lyse de l'immense majorité de la culture bactérienne, une population résistante émerge en effet rapidement en quelques heures.

Le but de cette étude est de caractériser les dynamiques évolutives bactériennes en jeu dans le contexte complexe que constitue la phagothérapie pulmonaire, et de les comparer à celles se manifestant *in vitro*, afin de déterminer si ces dynamiques pouvaient être prédites. Nous avons caractérisé une cinquantaine de clones résistants aux bactériophages, émergeant *in vitro* et *in vivo*. Le séquençage génomique de ces clones bactériens a révélé une convergence mutationnelle des mécanismes de résistance au bactériophage vers la modification de deux composants de la paroi cellulaire (hyperproduction de la capsule et troncation du récepteur (LPS)). La résistance au bactériophage n'a pas conduit ici systématiquement à la sélection de clones moins virulents, mais a également sélectionné des clones restant aussi virulents que la souche sauvage. Cependant, la résistance à 536\_P1 a conduit à une sensibilisation à de nouveaux bactériophages.

Nos résultats montrent que : (1) la résistance aux bactériophages qui se produit pendant un traitement pourrait être prédite à partir d'un simple test en milieu liquide; (2) la résistance aux bactériophages a un coût majeur en terme de virulence, qui n'est pas systématique ; mais (3) la résistance pourrait être contrée par l'utilisation d'un cocktail de bactériophages.

*Ma contribution à ce travail comprend toutes les étapes expérimentales ainsi que l'ensemble des analyses bio-informatiques, et la rédaction du manuscrit. Ce travail a été soumis pour publication dans la revue mBio.*



# The two major *in vivo* bacteriophage resistance mechanisms of the hypervirulent *Escherichia coli* strain 536 select for avirulent and as virulent clones.

Baptiste Gaborieau,<sup>a,b,c</sup> Raphaëlle Delattre,<sup>a,b</sup> Sandrine Adiba,<sup>d</sup> Olivier Clermont,<sup>a</sup> Erick Denamur,<sup>a,e</sup># Jean-Damien Ricard,<sup>a,c</sup># Laurent Debarbieux,<sup>b</sup>#

<sup>a</sup>Université Paris Cité, INSERM UMR1137, IAME, Paris, France

<sup>b</sup>Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR6047, Bacteriophage Bacterium Host, Paris, France

<sup>c</sup>APHP, Hôpital Louis Mourier, DMU ESPRIT, Service de Médecine Intensive Réanimation, Colombes, France

<sup>d</sup>Institut de Biologie de l'ENS (IBENS), École Normale Supérieure CNRS UMR 8197, Paris, France.

<sup>e</sup>APHP, Hôpital Bichat, Service de Génétique Moléculaire, Paris, France

#Address correspondence to Laurent Debarbieux, [laurent.debarbieux@pasteur.fr](mailto:laurent.debarbieux@pasteur.fr), Jean-Damien Ricard, [jean-damien.ricard@aphp.fr](mailto:jean-damien.ricard@aphp.fr)

## Running Head

Fitness cost of phage resistance in *E. coli*

## Authors contribution

J.-D.R., L.D., E.D., R.D and B.G. conceived the study and secured funding. B.G., R.D., O.C. and S.A. performed experiments. B.G. analyzed the data. B.G. wrote the first draft. J.-D.R., E.D. and L.D. reviewed and edited final draft.

## Abstract

Bacteria exposed to killing agents such as antibiotics or viruses develop resistance. While phage therapy, the use of bacteriophages (phages) for treating bacterial infections, is proposed to answer the antibiotic resistance crisis, bacterial resistance to phages remains poorly characterized during phage treatment. We studied a large population of phage-resistant *Escherichia coli* clones emerging from both *in vitro* (liquid medium) and *in vivo* (murine pneumonia) conditions. Genome sequencing revealed a mutational convergence of phage resistance mechanisms towards the modification of two cell-wall components, the K15 capsule and the LPS, showing that their identification could be predicted from the *in vitro* conditions. The fitness cost of all phage resistant clones was broad in terms of growth rate and resistance to grazing by amoeba and could not discriminate K15 capsule to LPS mutants. By contrast, the virulence of the clones tested in mice showed that K15 capsule mutants were as virulent as the wild type strain while LPS mutants were strongly attenuated. We also found that resistance to one phage led to the sensitization to other phages. In clinics, to control phage-resistant clones that remains virulent phage cocktail should include phages infecting both phage susceptible and future phage resistant clones.

## Importance

*Escherichia coli* is a leading cause of life-threatening infections, including pneumonia acquired during ventilatory assistance for patients hospitalized in Intensive Care Unit, and a major multidrug resistant pathogen. A century-old concept, phage therapy (i.e. using specific anti-bacterial viruses), is being clinically re-evaluated supported with hundreds of successful compassionate phage treatments. However, along billions of years of coevolution bacteria have developed many ways to resist to phages. Phage resistance occurring during phage therapy remains often overlooked despite its critical role for a successful outcome. During this work we characterized phage resistant mutants and found that (1) phage resistance taking place during a phage treatment *in vivo* could be predicted from an *in vitro* assay; (2) phage resistance has, often but not always, a major fitness cost in terms of virulence; and (3) could be countered by cocktails of phages.

## Introduction

Antibiotic resistance constitutes a major threat for global public health, exposing patients to an increased risk of therapeutic impasse worldwide and increased mortality (1).

*Enterobacterales*, which include the genus *Escherichia*, are one of the most threatening multi drug resistant (MDR) bacterial families (1). In particular, *Escherichia coli* strains have become frequent etiological agents of ventilator-assisted pneumonia (VAP) (2, 3). Specific traits of extra-intestinal pathogenic strains of *E. coli* (ExPEC) involved in VAP include higher antimicrobial resistance and virulence factors, and belongs more often to ST127/B2 phylogroup (4, 5).

Within this context, phage therapy, the use of bacteriophages (phages), is increasingly considered for patients infected by MDR pathogens (6). Numerous experimental models and clinical compassionate-use case series support phage therapy efficacy (7–12). Remarkably, in experimental treatments a single dose of phages is often as efficient as multiple injections of antibiotics (13, 14). Nevertheless, these successes are currently offset by the lack of convincing clinical studies (15–17).

Like for antibiotics, bacteria have developed many ways to resist to phages (18). Intense research has revealed several novel phage-defense systems that target virtually all steps of the phage life cycle from adsorption to lysis (19, 20). Therefore, emergence of bacterial resistance to phages is possibly a critical factor, that could lead to treatment failure (21, 22). Interestingly, while phage resistance has been shown to develop rapidly *in vitro*, studies in humans have yielded discrepant results, reporting either the presence (23) or the absence (24) of phage resistance. This questions the importance of this phenomenon *in vivo*. Moreover, when phage resistance is studied *in vivo*, mechanisms involved are rarely investigated (25, 26).

A possible explanation for the lack of detection of phage resistance *in vivo* comes from the proposed synergistic action of phages with the immune system (27). Assaulted by two different antibacterial weapons, phages and immune cells, the density of bacteria rapidly decreases, which lowers the frequency of selection of phage-resistant clones. Alternatively, or complementarily, phage-resistant clones could display trade-off costs increasing their killing by immune cells. For instance, in several *in vivo* models of infection, resistance mechanisms resulted in altered virulence (14, 28, 29).

In order to gain mechanistic insights of phage resistance during phage therapy, we sequenced over 50 phage-resistant clones of the *E. coli* strain 536 exposed to the virulent phage 536\_P1 collected from both *in vitro* (liquid medium) and *in vivo* (mice lungs) conditions. We previously reported that a single dose of this phage cures mice developing an otherwise fatal pneumonia

by the *E. coli* strain 536 (30). Here, we identify a mutational convergence from the two conditions towards genes involved in either LPS or K15 capsule biosynthesis. Fitness studies of phage-resistant clones performed *in vitro* could not distinguish between the two classes of mutants. By contrast, a virulence assay in mice revealed that LPS-related mutants were almost avirulent while K15 capsule-related mutants were as virulent as the wild type (WT) strain. Finally, we found that some of the phage-resistant clones could become susceptible to other phages that are unable to infect the wild type strain.

## Results

### A single dose of phage 536\_P1 selects phage-resistant clones more rapidly *in vitro* than *in vivo*

To assess the frequency of phage resistance emergence, as well as the molecular mechanisms involved, in two conditions, *in vitro* in liquid broth and *in vivo* during a phage therapy treatment of a murine pneumonia, we challenged the ExPEC strain 536 with a single dose of the virulent *Myoviridae* 536\_P1 (30). We collected and re-isolated more than 90 clones per condition from multiple replicates (table 1). While less than 0.4% of the naïve population is resistant to phage 536\_P1, the mean resistance rate is about 40% after 4 h of incubation in nutrient-rich liquid medium. *In vivo*, 13% of the clones recovered from mice lungs 10 h post-infection are resistant. This rate reached about 40% at 48 h (table 1). We observed that the bacterial resistance rate is heterogeneous among the replicates in all conditions suggesting that different resistance mechanisms could be involved (supplementary S1). To obtain a naïve population of bacteria exposed to the mice but not the phage, we also collected clones from the lungs of untreated mice 24 h post-infection and found that they all remained susceptible to phage 536\_P1 (table 1).

**Table 1. Experimental conditions and description of phage 536\_P1-resistant clones.**

Condition	Groups	Time <sup>1</sup> (hours)	MOI <sup>2</sup>	Experimental replicates  <i>n</i>	Bacterial clones per replicate	Bacterial resistance rate (%)		Bacterial clones sequenced	Clones carrying mutation
					<i>mean (SD)</i>	<i>median [IQ]</i>	<i>mean (SD)</i>	<i>n</i>	<i>n (%)</i>
<i>Initial</i>		0	-	3	96 (±0)	<0.4 [0-0]	<0.4 (±0)	-	
<i>In vitro</i>	536_P1	4	0.1	7	13 (±5)	25 [20-70]	41 (±30)	18	18 (100%)
<i>In vivo</i>	PBS	24	-	8	20 (±0)	<5 [0-0]	<5 (±0)	19	0 (0%)
	536_P1	10	3	10	17 (±6)	10 [0-21]	13 (±16)	17	17 (100%)
	536_P1	48	3	7	20 (±12)	30 [0-71]	38 (±40)	22	22 (100%)

<sup>1</sup> Time post-infection (phage treatment administered 2 h post-infection)

<sup>2</sup> MOI, multiplicity of infection

## Genome sequencing reveals a mutational convergence of phage resistance mechanisms towards the modification of two cell-wall components

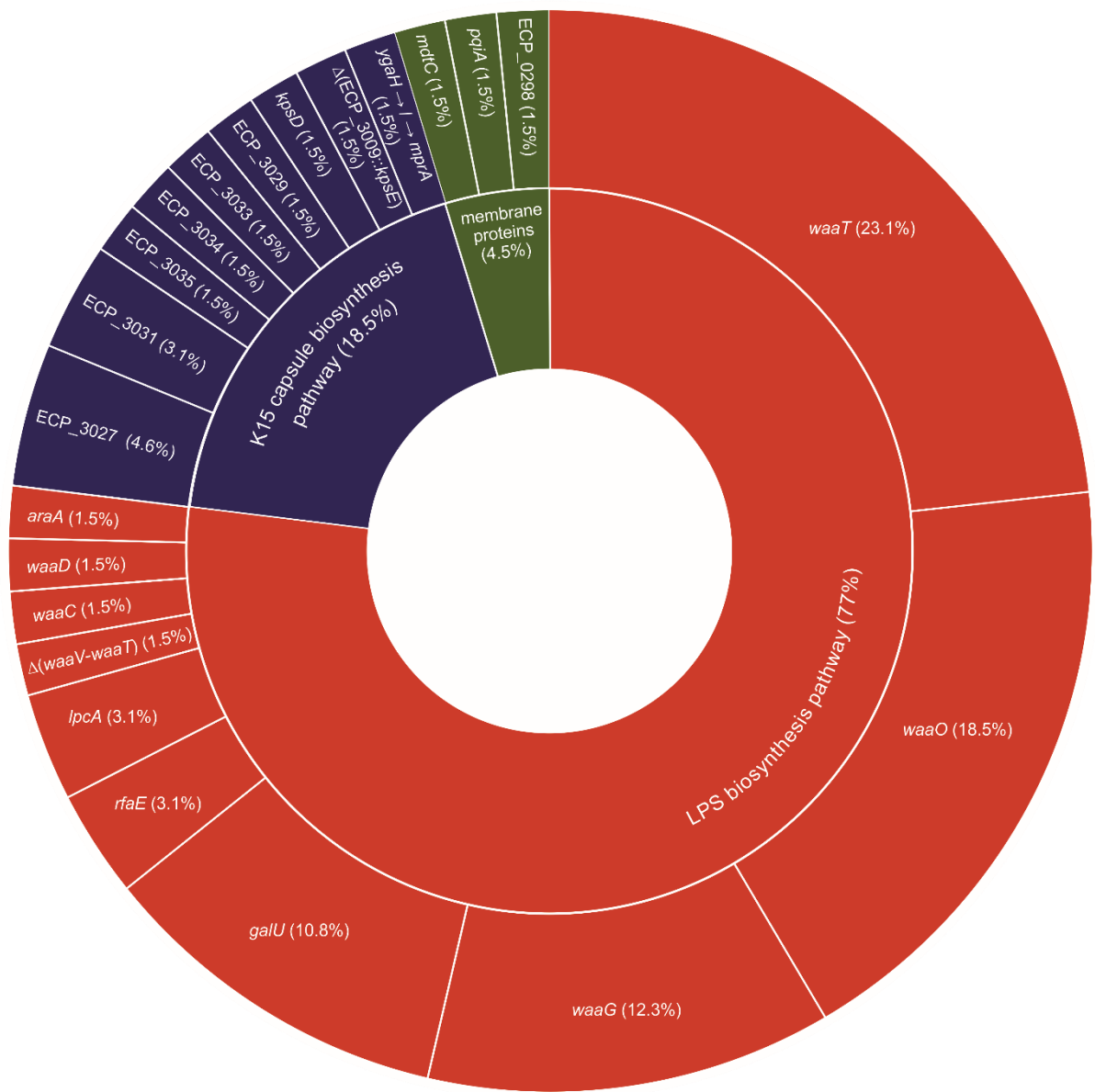
The genome of a subset of 57 phage-resistant clones from the above experiments was sequenced, revealing 65 mutations, including 53 different mutations, with at least one mutation per clone. By contrast, all phage-susceptible clones from control mice ( $n = 19$ ) do not carry any mutation as compared to the original WT strain 536 (table 1; supplementary S2). Out of 53 unique mutations, 50 are expected to alter severely the function of the encoded proteins: 40 are truncating mutations and 10 are *in silico* predicted as deleterious mutations for protein function. None of them is specifically associated to the origin of samples (*in vitro* vs *in vivo*) (supplementary S2).

A large proportion (85%) of phage-resistant clones have at least one mutation in a gene involved in the LPS biosynthesis pathway, which overall include 77% of all mutations. The remaining mutations are located in the K15 capsule coding region (18%) and in the three following genes, all coding membrane proteins (5%): *mdtC* encoding an efflux system protein (31); *pqiA* involved in a membrane stability system (32); and *ECP\_0298* predicted to be a homolog of a surface adhesin precursor (figure 1).

By plotting the correspondence between mutated genes and the origin of samples (figure 2a) and by an MCA analysis (figure 2b), we found that none of the mutations is specifically associated with either *in vitro* or *in vivo* samples, showing that phage 536\_P1 exerts a similar selection pressure on strain 536, independently of the environment where it infects it, liquid broth or mice lungs. The only obvious singularity are the three clones mutated in membrane proteins that originate from the lungs of infected and treated mice collected at 10 h post-treatment. However, these mutations are always associated with another mutation in a gene involved in LPS or K15 capsule biosynthesis. Nevertheless, while the same pathways (LPS and K15 capsule) are affected in both conditions, strictly identical mutations remain very low (three identical mutations among 65 different mutations were found in both conditions), showing a lack of hotspots (supplementary S2). Interestingly, the mutations located in LPS or K15 capsule related genes are mainly exclusive as only two out of 57 clones display mutations in both pathways (figure 2a).

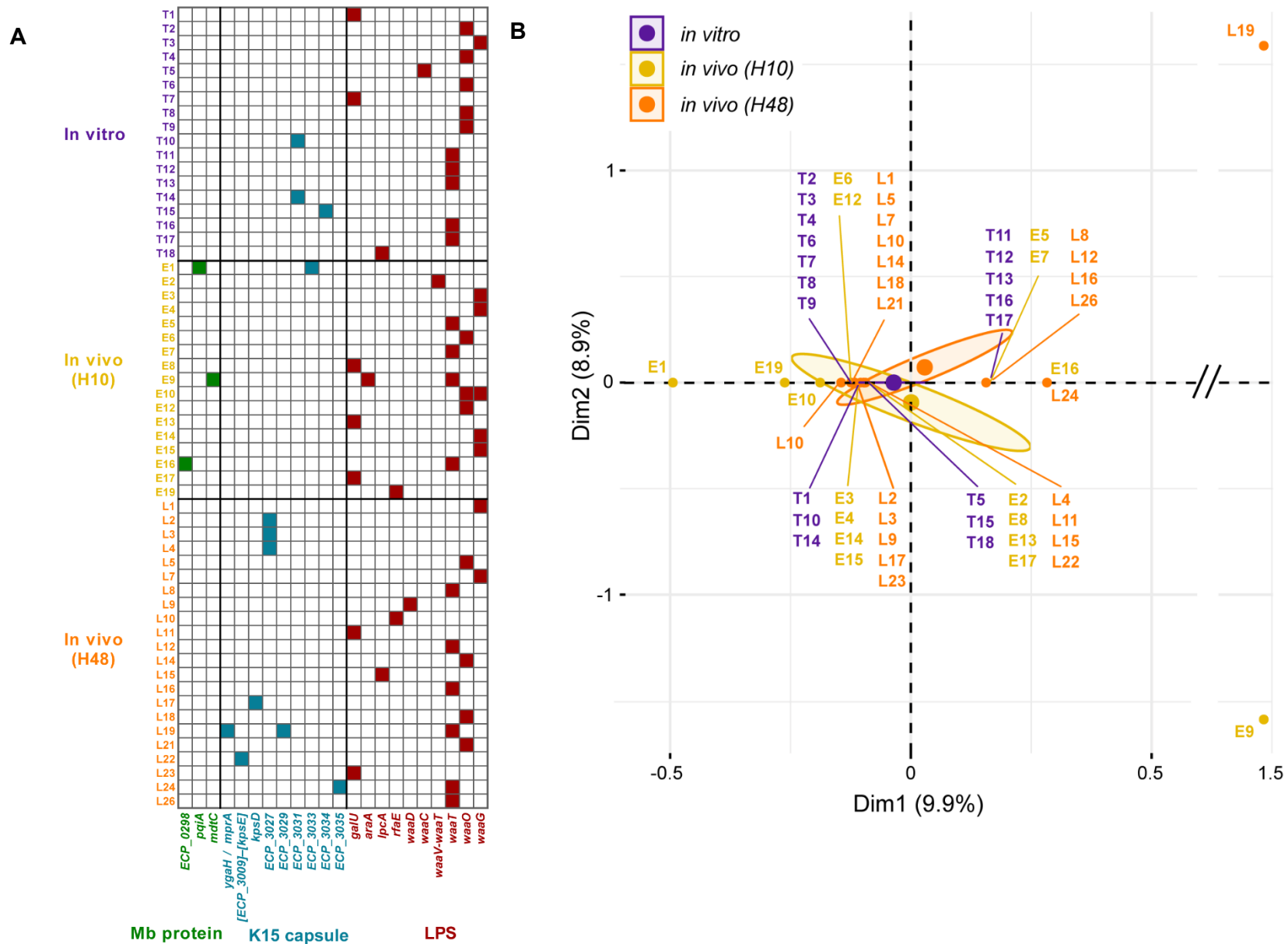
These data argue for a mutational convergence whatever the condition, a hallmark of similar selection (33).





**Figure 1. LPS and K15 capsule biosynthesis pathways are the two main targets of mutations identified from phage-resistant clones.**

Colours correspond to biosynthetic pathways. For each gene the percentage over the total number of mutations is indicated ( $n=57$  clones).



**Figure 2. Genome sequencing of the 57 phage-resistant clones reveals a mutational convergence of phage resistance mechanisms at two levels (genes and metabolic pathways). (A) Mutated genes for each of the 57 clones are grouped per colour-coded conditions (*in vitro* and *in vivo* at 10 h and 48 h) and colour-coded metabolic pathways. (B) Multiple correspondence analysis computed according to mutated genes and metabolic pathways. LPS, lipopolysaccharide; *Mb*, membrane.**

### **The complementation of LPS but not K15 related mutants restore phage susceptibility**

LPS is a surface exposed molecule well-known for its role in phage adsorption and many mutations in several genes involved in its biosynthetic pathways are associated to a loss of phage infection (34). The identified mutations would likely result in various degree of truncation of the LPS, as they occur either in the *waa* (or *galU*) cluster, which is involved in the assembly of the inner and outer cores, or in the *gmH* cluster (*lpcA*, *rfaE*, *waaD*), which is required for the synthesis of heptose (supplementary S3). To formally demonstrate that phage 536\_P1 uses LPS as a receptor, we trans-complemented some LPS related mutants with a plasmid expressing the WT version of the mutated genes. Both phage 536\_P1 susceptibility and adsorption were restored (supplementary S4a,b). By contrast, the same strategy applied to K15 capsule mutants failed to restore phage susceptibility (supplementary S4a), suggesting that instead of a loss of capsule synthesis these clones may produce a more abundant capsule to prevent phage infection. By using a K15 capsule specific serum we found that these mutants display a strong phenotype of agglutination by contrast to the WT strain 536 or a K15-negative control strain (supplementary S4c). Interestingly, none but one of the K15 capsule related mutations affects the capsule operon promoter (supplementary S2). We concluded that strain 536 deploys mainly two strategies to escape phage 536\_P1 predation by modifying its receptor or making it inaccessible. As these two phage defence systems are nearly exclusive, we next evaluated the fitness cost of these mutations.

### **The fitness cost of phage-resistant clones is dependant of the target of mutation and the environment**

To determine the potential fitness cost of the various phage-resistant mutations, we studied their behaviour in three environments of increasing complexity.

First, the maximum growth rate (MGR) in non-limited nutrient medium of all clones with distinct mutations ( $n=47$ ) was measured. Compared to WT strain 536 that has a MGR of  $0.73 \text{ h}^{-1}$ , clones mutated in LPS or in K15 capsule biosynthetic pathways have significantly lower MGR with a median of  $0.53 \text{ h}^{-1}$  (range  $0.33$  to  $0.68 \text{ h}^{-1}$ ;  $p=0.027$ ) or  $0.58 \text{ h}^{-1}$  (range  $0.47$  to  $0.61 \text{ h}^{-1}$ ;  $p=0.042$ ), respectively, while with a median MGR of  $0.61 \text{ h}^{-1}$  (range  $0.60$  to  $0.67 \text{ h}^{-1}$ ;  $p=0.349$ ) the three clones mutated in membrane proteins remain similar to the WT strain 536 (figure 3a; supplementary S5).

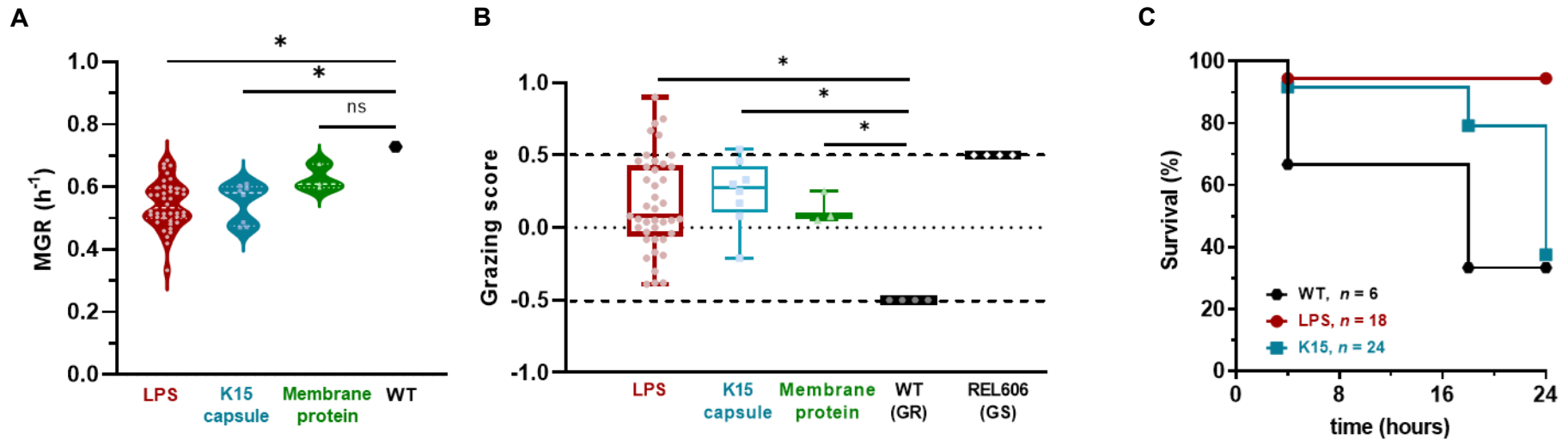
Second, we used *Dictyostelium discoideum*, a unicellular organism mimicking macrophage phagocytosis (35–37), to assess the grazing resistance (GR) phenotype of the above clones ( $n=47$ ). The WT strain 536 is fully resistant to amoeba phagocytosis with no lysis plaque (GR phenotype) at densities of  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  and  $10^5$  amoebae per  $10^8$  CFU of bacteria, whereas the control strain REL606 is grazing susceptible (GS phenotype) characterized by large lysis plaques and the formation of fruit bodies (supplementary S6). All the mutated clones showed an increased susceptibility to *D. discoideum*, compared to the WT strain 536, with some being

even more susceptible than the GS control. However, no significant difference in the amplitude of the grazing phenotype was observed between LPS and K15 capsule mutants ( $p=0.80$ ) (figure 3b).

Finally, we wondered if the virulence of phage-resistant clones towards the murine pneumonia model could be affected. We selected six mutated clones carrying single mutations either in the LPS (*galU*, clone T1; *waaG* clone E15; *waaT*, clone T11) or in the K15 capsule (*ECP\_3033*, clone E1; *ECP\_3027*, clone L3;  $\Delta$ (*ECP\_3009*–*kpsE*), clone L22). Kaplan-Meier survival curves of mice infected by these clones show a significant decrease of the virulence ( $p = 0.001$ ) of the LPS mutated group of clones ( $n=18$ ; 94% survival at 24 h post-infection), while K15 capsule mutated group of clones ( $n=24$ ; 62.5% of survival at 24 h pi) remain as virulent ( $p=0.24$ ), both compared to the WT strain 536 ( $n=6$ ; 33% survival at 24 h pi) (figure 3c). When plotted for each mutated gene, results remain similar (supplementary S7b). As expected from the survival curves, the median level of CFUs in mice lungs at 24 h post-infection is 3-log lower for LPS mutants compared to both WT strain 536 and K15 capsule mutants (supplementary S7a). Therefore, while the above two *in vitro* assays do not discriminate any of the mutants, the *in vivo* virulence assay clearly segregates LPS to K15 capsule mutants.

### **Resistance to one phage can lead to susceptibility to another one**

The selection of K15 capsule phage-resistant clones that remain as virulent as the WT strain 536 could lead to phage treatment failure. We then asked whether other phages could readily infect these clones as a counter measure. We selected five virulent phages (536\_P3, CLB\_P2, LF73\_P1, LF110\_P3, DIJ07\_P1) (supplementary S8) previously isolated and characterized in our laboratory for their ability to form plaques on a large collection of *E. coli* VAP strains (4). Amongst these five phages, two of them (LF110\_P3 and DIJ07\_P1) are unable to infect the original WT strain 536 (figure 4a). We tested these five phages for their ability to form plaques on 536\_P1-resistant clones that have distinct mutations targeting capsule related genes ( $n = 7$ ). We obtained a susceptibility coverage ranging from 0% (536\_P3) to 100% (CLB\_P2), showing that the overproduction of the K15 capsule does not provide a broad protection against many phages. Unexpectedly, phages LF110\_P3 and DIJ07\_P1 infect one and two, K15 mutants, respectively (figure 4b). Susceptibility to these two phages is also observed when testing LPS mutants, with a much larger extent for phage DIJ07\_P1 that infects 39% of them (figure 4c). Therefore, when strain 536 exposed to phage 536\_P1 responds by LPS or capsule modifications, these phage resistance mechanisms can be bypassed using additional phages, even if some of them are initially unable to infect the WT strain 536.



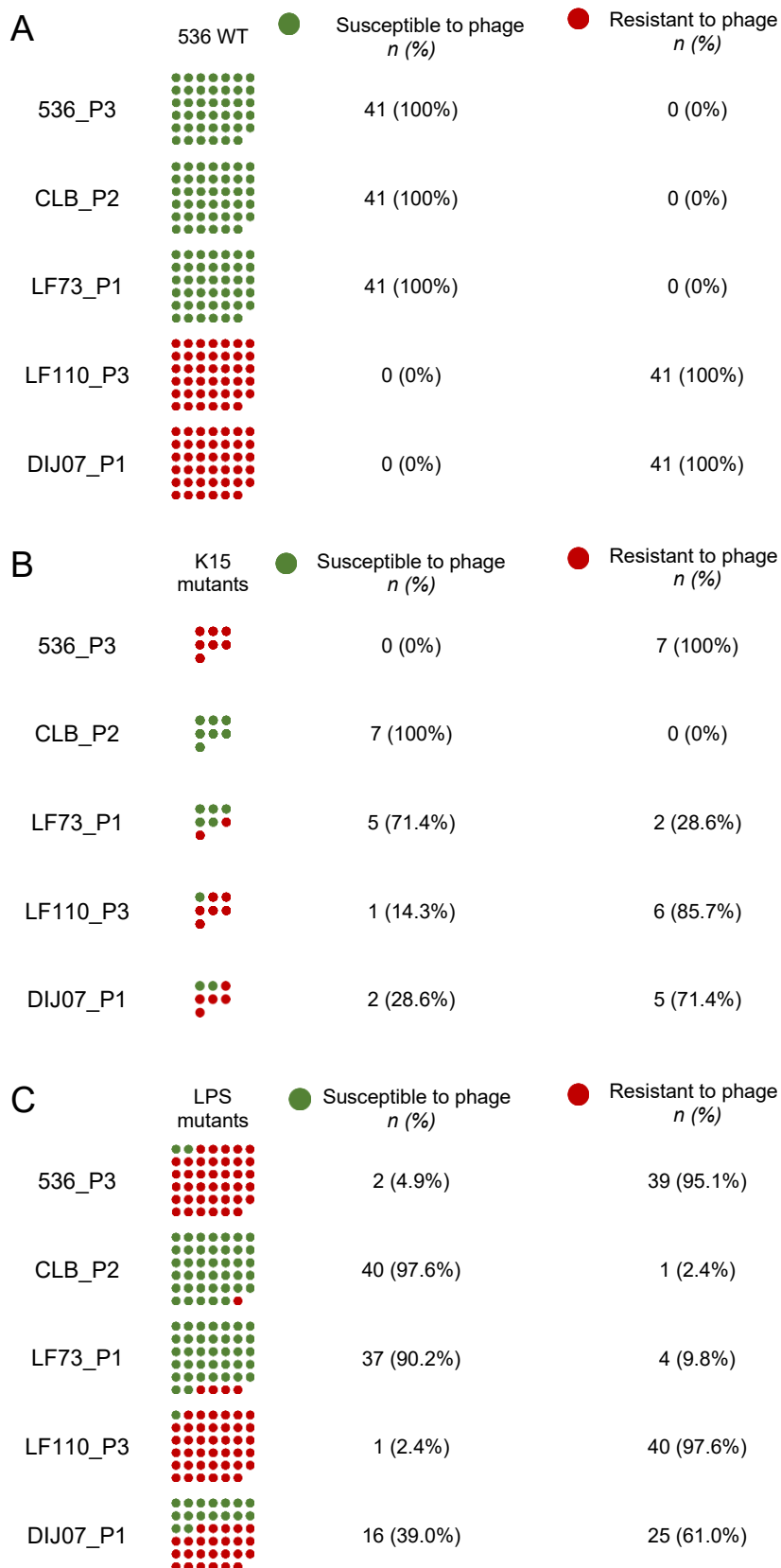
**Figure 3. Phage resistant clones display a broad fitness cost *in vitro* and *in vivo*.**

**(A)** The growth rate of the 47 clones with distinct mutations in non-limited nutrient medium LB was calculated from kinetics recorded every 15 min in a microplate reader during 10 h ( $n=3$  for each clone).

**(B)** Protozoan predation by *D. discoideum* of the 47 clones with distinct mutations was evaluated by their grazing score ( $n=3$  for each clone).

**(C)** Virulence in acute pneumonia model was assessed towards a subset of clones carrying either single mutations in the LPS ( $n=3$ ) or in K15 capsule locus ( $n=3$ ). The survival of mice during 24 h post-infection ( $4 \times 10^8$  CFU intra-nasal) by either the WT strain 536 ( $n=6$ ) or clones ( $n=3$ ) carrying single mutations in the LPS biosynthesis pathway ( $n=6$  for each clone) or clones ( $n=3$ ) carrying single mutations in the K15 capsule locus ( $n=8$  per clone) is represented as Kaplan-Meier.

LPS, lipopolysaccharide; MGR, maximum growth rate; GR, grazing resistance; GS, grazing sensitive



**Figure 4. Phage 536\_P1 resistant clones display uneven susceptibility to five other phages.**

Susceptibility tests of 41 clones of the WT strain 536 (A), 7 phage 536\_P1 resistant clones carrying a mutation in K15 capsule coding region (B) and 41 phage 536\_P1 resistant clones carrying a mutation in a gene involved in LPS biosynthetic pathway (C) towards phages 536\_P3, CLB\_P2, LF73\_P1, LF110\_P3, DIJ07\_P1.

## Discussion

Phage therapy has the potential to help patients infected by MDR bacteria (6). However, the current use of phages remains semi-empirical because of notably the lack of conclusive clinical trials. Moreover, the monitoring of phage resistance and the related mechanisms involved in patients undergoing treatment are often neglected although this resistance could be critical for the success of phage therapy (25, 26). Here, we studied a large population of phage-resistant clones from both *in vitro* and *in vivo* conditions and evaluated their mutational fitness costs. By contrast with several reports (14, 38, 39), phage resistance does not systematically drive the selection of less virulent clones but also selects for clones that remain as virulent as the WT strain, calling for a systematic monitoring of this phenomenon during treatment.

The sequence analysis of phage-resistant clones revealed a strong mutational convergence directed towards only two biosynthetic pathways, either the LPS or the K15 capsule. Nevertheless, the number of identical mutations remained rare, which argues for a lack of hotspots and support selection events taking place independently during each experiment. The two identified biosynthetic pathways have been previously reported as targets used by bacteria to defend themselves against phages *in vivo* (14, 28, 29, 40). Mechanisms involved in these two pathways of phage resistance are however different. LPS related mutations led the bacterium to interrupt phage receptor synthesis, while K15 capsule related mutants mask the receptor. With half of the bacterial genomes encoding at least one capsule biosynthetic cluster (41), including extra-intestinal virulent B2 phylogroup *E. coli* strains (42), the overproduction of capsule to provide phage resistance might be more frequent than anticipated. It is possible that the low number of phage resistant clones analyzed in former similar studies may have prevented the isolation of such mutants (26). We also cannot exclude that our observations may be restricted to this particular phage/bacterium couple.

It is expected that phage resistance mechanisms affecting the bacterial envelope display a fitness cost compared to the WT phage-susceptible strain. This was indeed the case for all the mutants when measuring either their growth rates or their grazing resistance to amoeba. However, the lack of major fitness differences between LPS and K15 capsule related mutants towards amoeba remains surprising. Even if both LPS and capsule are envelope components involved in the pathogenicity of strain 536 (43–45), it was anticipated that LPS mutants would be more affected than capsule mutants. However, while serum resistance is directly linked to the presence of capsule in strain 536 (46) and contributes to grazing resistance (37), a previous study showed that mutants of strain 536 carrying an increasing number of deletions of pathogenicity islands did not become less resistant to grazing (47). The grazing test may therefore not be sensitive enough compared to the *in vivo* virulence assay, which revealed that capsule mutants were as virulent as the WT strain, while LPS mutant became avirulent. Therefore, the selection exerted by phage 536\_P1 on strain 536 gives rise to two populations of resistant clones with opposite behaviors towards the animal host. However, since the

frequency of capsule mutants is much lower than LPS mutants, the overall phage treatment remains successful (30). Nevertheless, we can reasonably expect that in other conditions, such as an immunodeficient context, the growth of these capsule mutants could lead to the failure of the treatment.

The time to reach 40% of mutants *in vivo* (48h) was much larger than *in vitro* (4h) most likely because of the time needed for the phage to reach and infect a large population of susceptible bacteria as well as the time needed for phage-resistant clones to grow. Nevertheless, in both conditions studied, the selection of phage-resistant clones led to mutations affecting the same biosynthetic pathways. This suggests that the animal host does not influence this selection process. However, the acute pneumonia model imposes limitations such as the use of a large bacterial population to initiate a fatal infection by overwhelming the immune system, as well as a large phage dose to provide a rapid and efficient treatment (48). It then remains possible that a putative impact of the animal host on phage resistance mechanisms could not be detected within this setting and may require extended time of observation. Nevertheless, we noticed that the frequency of K15 capsule mutants was higher at 48h compared to 10h post-infection, which is in agreement with their unaffected virulence. Then, the data presented here suggest that the characterization of phage resistant mutants selected *in vitro* could be sufficient to identify, at least, the main mechanisms by which bacteria will escape phage predation during the first phase of a treatment, in agreement with a recent compassionate treatment (49).

A counter measure to defeat the selection of phage-resistant mutants relies on the use of several phages, namely phage cocktails. However, the rules governing the choice of phages to be incorporated within a cocktail depends on the application. Currently, compassionate treatments include often several phages selected for their capacity to infect the strain of a patient, while commercial cocktails available in Georgia include phages infecting different bacterial species (50). Here, we found that some phage-resistant clones become susceptible to phages that cannot infect the WT strain 536. Similar phenomenon was recently reported (51). These observations suggest that phage cocktails may not necessarily need to include only phages infecting the patient's targeted strain. Replacing phage therapy in a broader context of phage-bacteria coevolution could provide opportunities for each phage included in a cocktail to become at some point the most efficient phage (21).

In conclusion, we anticipate that the rapid analysis of phage-resistant mutants arising *in vitro* should be performed for each therapeutic phage in order to help building robust phage cocktails to be used in clinics.



## **Materials and methods**

### **Bacterial strain and bacteriophage**

*E. coli* strain 536 (4,938,920 bp; NC\_008253.1) belongs to the B2 phylogenetic group, the O6:K15:H31 serotype and the sequence type 127 (52).

Phage 536\_P1 (149.4 Kb) (30), was amplified on strain 536 and purified according to adapted molecular biology protocols (53) with an additional step of endotoxin removal using EndoTrap® (Lionex, Germany). The stock solution of  $3.1 \times 10^{10}$  PFU/mL before use has an endotoxin concentration of 2.15 EU/mL and was diluted in phosphate buffered saline (PBS).

### **Bacterial culture conditions**

Unless otherwise specified, strains were cultivated at 37°C on LB medium (lysogeny broth) liquid or agar (Becton Dickinson, USA). Drigalski agar medium (Bio-Rad, France) was used to count bacteria from mice lungs. In amoeba experiments bacteria were cultivated in glucose-HL5 medium liquid or agar (Formedium, UK).

### **Animals and Ethics statement**

A total of 73 eight-week-old BALB/cJrj male mice (Janvier Labs, France) were housed in animal facilities in accordance with French and European regulations on the care and protection of laboratory animals. Food and drink were provided ad libitum. Protocols were approved by the veterinary staff of the Institut Pasteur animal facility (approval number 20.173) and the National Ethics Committee regulating animal experimentation (APAFIS#26874-2020081309052574 v1 and APAFIS#4947-2016020915474147 v5).

### **Isolation of phage-resistant clones**

#### *From in vitro condition*

A fresh exponential bacterial culture of a single *E. coli* strain 536 clone, from glycerol stock, was grown in LB medium under constant agitation at 37°C. Bacteriophage 536\_P1 was added at MOI of  $10^{-1}$ . The bacterial growth was monitored by measuring the turbidity using a spectrophotometer (Novaspec II, Pharmacia LKB, UK) at regular intervals. When the nadir was reached, remaining bacterial cells were centrifuged (4000g, 15 min, 4°C) and the supernatant removed. The resuspended pellets were plated on LB agar plates and incubated overnight at 37°C. Seven independent replicates were performed.

#### *From in vivo condition*

We used a murine model of pulmonary phage therapy as previously described (30). Mice, anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine by intra-peritoneal administration, were infected by intranasal inoculation with  $1 \times 10^8$  CFU of *E. coli* strain 536, suspended in 20  $\mu$ L of PBS (H0). Two hours later, mice, anesthetized by isoflurane inhalation (2%), were either

treated by an intranasal administration of 20  $\mu\text{L}$  of 536\_P1 (i.e.  $3 \times 10^8$  PFU) (treated group,  $n=17$ ), or either received an intranasal administration of PBS (control group,  $n=8$ ). Mice were hydrated by subcutaneous route with 150  $\mu\text{L}$  of 0.9% NaCl (Aguettant, France) and monitored twice a day to assess weight loss and behavior. The treated group was split in an early follow-up group (H10,  $n=10$ ) and a late follow-up group (H48,  $n=7$ ). For the control group, mice were sacrificed at H24 by intraperitoneal injection of 150  $\mu\text{L}$  of sodium pentobarbital (Ceva Santé Animale, France). Lungs were aseptically recovered, weighted and homogenized in PBS (FastPrep 25-5G, MP Biomedical, USA). Homogenates were centrifuged (4,000g, 15 min, 4°C), and the resuspended pellets in PBS were plated on Drigalski agar and incubated overnight at 37°C.

### **Determination of bacterial susceptibility to bacteriophage**

From each animal and *in vitro* experiment, a maximum of 20 clones were randomly chosen and re-isolated three times on LB agar. The susceptibility to 536\_P1 was tested by two independent experiments in both liquid (growth kinetics) and solid (efficiency of plaquing, EOP) media. See supplementary information

#### *Growth kinetics*

The bacterial growth recorded by monitoring the turbidity of the medium using a microplate spectrophotometer (Tecan Infinite F200 pro, Switzerland) (OD600nm every 15 minutes at 37°C under regular agitation for 10 hours). The OD600nm for each clone in two conditions (with and without phage) was measured in three different wells. The starting conditions were standardized: from a saturated culture, the strains were put into an exponential growth culture, were adjusted to OD600nm 0.1, before 150  $\mu\text{L}$  filled in a 96-well plate (i.e.  $4.5 \times 10^6$  CFU). Ten  $\mu\text{L}$  of bacteriophage (i.e.  $1.5 \times 10^6$  PFU) were added to the wells; 10  $\mu\text{L}$  of PBS were added to control wells. A lysis positive control (WT *E. coli* strain 536) was added in each microplate. The clones were classified into three categories according to the kinetic profiles recorded: sensitive (bacterial growth kinetic equivalent to the WT *E. coli* strain 536 infected by 536\_P1), resistant (bacterial growth kinetic equivalent to the control of the WT *E. coli* strain 536 not infected), intermediate (any profile different to the two above mentioned).

#### *Efficiency of plaquing (EOP)*

Bacteriophage 536\_P1 was serially diluted (10-fold) in PBS and one drop of 4  $\mu\text{L}$  of each dilution was spotted on LB agar plates previously inundated by either the WT strain 536 or each mutant individually. The EOP was calculated as the ratio of the titer on a given mutant over the titer of the WT strain. A ratio of less than 0.5 indicates the presence of a resistant phenotype as previously defined (54).

#### DNA extraction and Whole Genome Sequencing

Bacterial DNA extraction was carried out using the EZ1 DNA tissue kit (Qiagen, Germany) on EZ1 Advanced XL (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's recommendations. The

libraries were prepared using the Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, USA) according to the protocol previously described by Baym et al. in 2015 (55). A pair-end sequencing (300 bp) was performed on the MiSeq platform (Illumina, USA).

### **Bioinformatics analysis of mutants**

Reads quality was checked using FastQC (v0.11.8) (56). Reads were assembled with SPAdes (v3.11.1) (57). *In silico* typing of the clones was carried out using SRST2 (v0.2.0) allowing confirmation of both the sequence type (ST) according to the MultiLocus Sequence Typing (MLST) Pasteur (ST33) and Warwick (ST127), and the serotype (O6H31) (58). Phylogroup B2 of all phage-resistant clones was confirmed by the Clermont Typing software (59).

The WT strain 536 used for this study was sequenced together with phage-resistant clones. Compared to the referenced genome (NC\_008253.1), some mutations were identified and integrated into the reference genome using *gdtools* utility of Breseq (v0.33).

Mutations were identified by comparing the reads for each phage-resistant clone to the updated reference genome using Breseq Variant Report (V0.33) (60).

Each single nucleotide polymorphism detected was reviewed and verified manually. For mutations located in genes of unknown function, protein-to-protein interactions search using the STRING database (61) was performed.

The functional consequence of mutations was predicted using SIFT (v1.3) (62), PolyPhen-2 (v2.2.2) (63) and PROVEAN (v1.1.3) (64). A mutation was considered potentially harmful if at least two of the predictions were concordant (EIPD score <0.05, a PolyPhen-2 result equal to "probably damaging" or "potentially damaging" and a PROVEAN score  $\leq$  2.5).

### **Complementation of LPS and K15 capsule mutants**

Phage-resistant clones carrying only one mutation in a gene involved in LPS biosynthetic pathway (*galU*, T7; *lpcA*, L15; *rfaE*, E19) were complemented by the corresponding ASKA plasmids (pCA24N backbone, chloramphenicol 25 $\mu$ g/mL) (65) To complement K15 capsule-related phage-resistant clones (ECP\_3022, L17; ECP\_3031, T10) the corresponding ORFs were amplified from the WT strain 536 and cloned into the pUC18 plasmid (ampicillin 100 $\mu$ g/mL) using *Bam*HI and *Sph*I enzymes (New England Biolabs, USA) (ECP\_3022 : F-GGATCCGAATGAGTTTGTGATGAAATTA, R-GCATGCTTACAAAGACAGAATCACTTTT; ECP\_3031 : F-GCATGCTTAAATTTCTGAGTACGGCAAA, R-GGATCCAATGGTCAAATATGAAAATCAA) Cloned ORFs were sequenced and plasmids transformed in the corresponding mutants.

### **Phage adsorption**

Adsorption of phage 536\_P1 was assessed as described previously (66). Briefly, cells were infected at low MOI (0.1) and incubated 10 min at 37°C with constant agitation. 50  $\mu$ L samples were collected every 30 sec until 7 min and kept on ice before titration on the WT strain 536 to determine the amount of free phages over time.

### **K15 antiserum aggregation assay**

Aggregation using a K:15 antiserum (Statens Serum Institut, Danmark) was performed as described (67). Briefly, 5  $\mu\text{L}$  of two-fold serial dilutions of the K:15 antiserum (range dilution from 1:20 to 1:2560) were mixed with 10  $\mu\text{L}$  ( $1.10^7$  CFU) of each bacterium tested and incubated at 37°C without agitation during 1 h and then at 4°C overnight.

### **Fitness assays**

#### *Growth rate in non-limited liquid medium*

For each strain, a single colony was picked from an agar plate to inoculate a single well of a 96-well plate filled with 150  $\mu\text{L}$  of LB, sealed with a sterile gas-permeable film and incubated overnight under agitation at 37°C. 15  $\mu\text{L}$  of each well was transferred into a new plate filled with 150  $\mu\text{L}$  of LB, sealed and introduced into a microplate spectrophotometer (Tecan Infinite F200 pro, Switzerland) to record OD600nm every 15 minutes at 37°C under regular agitation during 10 h. Three independent replicates were performed for each clone. The growth curves were analyzed with R software. For each curve, we normalized the initial time point as the first OD600nm measurement 0.1. We then smoothed the time series with the smooth.spline function and calculated the first (growth rate) and second derivatives, with respect to time, of the data expressed logarithmically. All time points at which the second derivatives changed sign (i.e., time points at which the growth rate was at a local maximum or minimum) were identified. We considered those to correspond to the maximum growth rate (MGR expressed in  $\text{h}^{-1}$ ). Smoothing was required to decrease significantly the contribution of measurement noise to the maximum growth rate.

#### *Dictyocellium discoideum grazing assay*

The amoeba *D. discoideum* axenic strain AX3 and associated methods have been described previously (37). Fresh bacterial exponential cultures, cultivated in 10 mL HL5 medium at 37°C under agitation, were washed in 10 mL of MCPB buffer, and adjusted to a bacterial concentration of  $1.10^8$  CFU in 300  $\mu\text{L}$ , which were plated on HL5 medium agar (55 mm diameter dishes). Fresh 24 h culture of *D. discoideum* cells grown in 10 mL of HL5 medium at 23 °C with no agitation, were washed with 10 mL of MCPB buffer, and adjusted to five concentrations corresponding to 10,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  amoebae in 300  $\mu\text{L}$ , which were overlaid on agar plates covered by bacterial lawns. Plates were incubated at 23°C and were examined at 3 and 6 days to record the appearance of lysis plaques, which translate the phagocytosis of the bacteria by the amoeba and defined the grazing sensitive (GS) phenotype. Lack of phagocytosis defines the grazing resistant (GR) phenotype. The strain *E. coli* REL606 was used as a negative control (GS) while the WT strain 536 was previously reported as GR. Results were expressed as a grazing score (number conditions with appearance of lysis plaques:  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , and sporulation at D6). The scores were normalised for each independent experiment from -0.5 (GR of 536 WT) to 0.5 (GS of REL 606). Three independent replicates were performed by strain.

### *Virulence assay using the murine acute pneumonia model*

BALB/cJRj mice ( $n=48$ ) were infected as described above and monitored to assess weight loss and behaviour three times within 24 h, at which point they were sacrificed to collect lungs that were processed as described above to count bacteria.

### **Statistical analysis**

Results are presented as the median and range, mean and standard deviation or the number and percentage of individuals.

Multiple Correspondence analysis (MCA) was performed with the *mca* function of the FactoMineR package (v 1.34) (68). MCA generated a simultaneous display of 57 observations (clones with at least one mutation) and 26 qualitative variables as condition with three modalities: *in vitro*, *in vivo* H10, *in vivo* H48; as LPS biosynthesis pathway or K15 capsule pathway or membrane protein coding gene, and as 22 different genes on a two-dimensional representation.

ANOVA was used to compare the MGRs in LB medium of the clones from three different conditions (*in vitro*, *in vivo* H10 and *in vivo* H48) and the WT strain 536, as well as grazing scores. All statistical analyses were carried out with GraphPad Prism software (v9.4.0) (GraphPad Software, USA) as well as Kaplan-Meier estimates of mouse survival. Survival differences were estimated by Log-Rank test. Significance is reached when the *p* value is  $<0.05$ .

### **Acknowledgments**

This work was partly funded by ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé) HAP-2019-S003 to L.D., ANR (Agence Nationale de la Recherche) ANR-19-AMRB-0002 to J.D.R. and L.D. and FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) DEQ20161136698 to E.D. (équipe FRM 2016). B.G. received partial support from AIHP (Amicale des Anciens Internes des Hôpitaux de Paris). R.D. received support from Poste d'Accueil APHP/IP. We thank Hervé Le Nagard and Lionel de la Tribouille for the use of the CATIBioMed calculus facility and Thierry Pédrón for his help with the agglutination assay.

### **References**

1. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E, Johnson SC, Browne AJ, Chipeta MG, Fell F, Hackett S, Haines-Woodhouse G, Hamadani BHK, Kumaran EAP, McManigal B, Agarwal R, Akech S, Albertson S, Amuasi J, Andrews J, Aravkin A, Ashley E, Bailey F, Baker S, Basnyat B, Bekker A, Bender R, Bethou A, Bielicki J, Boonkasidecha S, Bukosia J, Carvalheiro C, Castañeda-Orjuela C, Chansamouth V, Chaurasia S, Chiurchiù S, Chowdhury F, Cook AJ, Cooper B, Cressey TR, Criollo-Mora E, Cunningham M, Darboe S, Day NPJ, Luca MD, Dokova K, Dramowski A, Dunachie SJ, Eckmanns T, Eibach D, Emami A, Feasey N, Fisher-Pearson N, Forrest K, Garrett D, Gastmeier P, Giref AZ,

- Greer RC, Gupta V, Haller S, Haselbeck A, Hay SI, Holm M, Hopkins S, Iregbu KC, Jacobs J, Jarovsky D, Javanmardi F, Khorana M, Kissoon N, Kobeissi E, Kostyanev T, Krapp F, Krumkamp R, Kumar A, Kyu HH, Lim C, Limmathurotsakul D, Loftus MJ, Lunn M, Ma J, Mturi N, Munera-Huertas T, Musicha P, Mussi-Pinhata MM, Nakamura T, Nanavati R, Nangia S, Newton P, Ngoun C, Novotney A, Nwakanma D, Obiero CW, Olivas-Martinez A, Olliaro P, Ooko E, Ortiz-Brizuela E, Peleg AY, Perrone C, Plakkal N, Ponce-de-Leon A, Raad M, Ramdin T, Riddell A, Roberts T, Robotham JV, Roca A, Rudd KE, Russell N, Schnall J, Scott JAG, Shivamallappa M, Sifuentes-Osornio J, Steenkeste N, Stewardson AJ, Stoeva T, Tasak N, Thaiprakong A, Thwaites G, Turner C, Turner P, Doorn HR van, Velaphi S, Vongpradith A, Vu H, Walsh T, Waner S, Wangrangsimakul T, Wozniak T, Zheng P, Sartorius B, Lopez AD, Stergachis A, Moore C, Dolecek C, Naghavi M. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 399:629–655.
2. ECDC. 2019. European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm (Sweden); available at : <https://www.ecdc.europa.eu/>.
  3. Santé publique France. 2019. Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte, Réseau REA-Raisin, France. Résultats 2017. Saint-Maurice (France); available at : [www.santepubliquefrance.fr](http://www.santepubliquefrance.fr).
  4. La Combe B, Clermont O, Messika J, Eveillard M, Kouatchet A, Lasocki S, Corvec S, Lakhali K, Billard-Pomares T, Fernandes R, Armand-Lefevre L, Bourdon S, Reignier J, Fihman V, de Prost N, Bador J, Goret J, Wallet F, Denamur E, Ricard J-D, COLOCOLI group, COLOCOLI Group. 2019. Pneumonia-Specific Escherichia coli with Distinct Phylogenetic and Virulence Profiles, France, 2012–2014. *Emerg Infect Dis* 25:710–718.
  5. Messika J, Magdoud F, Clermont O, Margetis D, Gaudry S, Roux D, Branger C, Dreyfuss D, Denamur E, Ricard J-D. 2012. Pathophysiology of Escherichia coli ventilator-associated pneumonia: implication of highly virulent extraintestinal pathogenic strains. *Intensive Care Med* 38:2007–2016.
  6. Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. 2019. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clin Microbiol Rev* 32:e00066-18.
  7. Aslam S, Lampley E, Wooten D, Karris M, Benson C, Strathdee S, Schooley RT. 2020. Lessons Learned From the First 10 Consecutive Cases of Intravenous Bacteriophage Therapy to Treat Multidrug-Resistant Bacterial Infections at a Single Center in the United States. *Open Forum Infect Dis* 7:ofaa389.
  8. Bull JJ, Levin BR, DeRouin T, Walker N, Bloch CA. 2002. Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. *BMC Microbiol* 2:35.
  9. Corbellino M, Kieffer N, Kutateladze M, Balarjishvili N, Leshkasheli L, Askilashvili L, Tsertsvadze G, Rimoldi SG, Nizharadze D, Hoyle N, Nadareishvili L, Antinori S, Pagani C, Scorza DG, Romanò ALL, Ardizzone S, Danelli P, Gismondo MR, Galli M, Nordmann P, Poirel L. 2020. Eradication of a Multidrug-Resistant, Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae Isolate Following Oral and Intra-rectal Therapy With a Custom Made, Lytic Bacteriophage Preparation. *Clin Infect Dis* 70:1998–2001.
  10. Jennes S, Merabishvili M, Soentjens P, Pang KW, Rose T, Keersebilck E, Soete O, François P-M, Teodorescu S, Verween G, Verbeken G, De Vos D, Pirnay J-P. 2017. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive Pseudomonas aeruginosa septicemia in a patient with acute kidney injury—a case report. *Crit Care* 21:129.

11. Melo LDR, Oliveira H, Pires DP, Dabrowska K, Azeredo J. 2020. Phage therapy efficacy: a review of the last 10 years of preclinical studies. *Crit Rev Microbiol* 46:78–99.
12. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, Barr JJ, Reed SL, Rohwer F, Benler S, Segall AM, Taplitz R, Smith DM, Kerr K, Kumaraswamy M, Nizet V, Lin L, McCauley MD, Strathdee SA, Benson CA, Pope RK, Leroux BM, Picel AC, Mateczun AJ, Cilwa KE, Regeimbal JM, Estrella LA, Wolfe DM, Henry MS, Quinones J, Salka S, Bishop-Lilly KA, Young R, Hamilton T. 2017. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00954-17.
13. Dufour N, Delattre R, Chevallereau A, Ricard J-D, Debarbieux L. 2019. Phage Therapy of Pneumonia Is Not Associated with an Overstimulation of the Inflammatory Response Compared to Antibiotic Treatment in Mice. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e00379-19.
14. Oechslin F, Piccardi P, Mancini S, Gabard J, Moreillon P, Entenza JM, Resch G, Que Y-A. 2017. Synergistic Interaction Between Phage Therapy and Antibiotics Clears *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Endocarditis and Reduces Virulence. *J Infect Dis* 215:703–712.
15. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que Y-A, Resch G, Rousseau AF, Ravat F, Carsin H, Floch RL, Schaal JV, Soler C, Fevre C, Arnaud I, Bretaudeau L, Gabard J. 2019. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* 19:35–45.
16. Leitner L, Ujmajuridze A, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Chkonia I, Rigvava S, Chkhotua A, Changashvili G, McCallin S, Schneider MP, Liechti MD, Mehnert U, Bachmann LM, Sybesma W, Kessler TM. 2021. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Lancet Infect Dis* 21:427–436.
17. Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, Moine D, Descombes P, Charton F, Bourdin G, McCallin S, Ngom-Bru C, Neville T, Akter M, Huq S, Qadri F, Talukdar K, Kassam M, Delley M, Loiseau C, Deng Y, Aidy SE, Berger B, Brüßow H. 2016. Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. *eBioMedicine* 4:124–137.
18. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. 5. *Nat Rev Microbiol* 8:317–327.
19. Tal N, Sorek R. 2022. SnapShot: Bacterial immunity. *Cell* 185:578-578.e1.
20. Bernheim A, Sorek R. 2020. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. 2. *Nat Rev Microbiol* 18:113–119.
21. Torres-Barceló C, Turner PE, Buckling A. 2022. Mitigation of evolved bacterial resistance to phage therapy. *Curr Opin Virol* 53:101201.
22. Rohde C, Resch G, Pirnay J-P, Blasdel BG, Debarbieux L, Gelman D, Górski A, Hazan R, Huys I, Kakabadze E, Łobocka M, Maestri A, Almeida GM de F, Makalatia K, Malik DJ, Mašlaňová I, Merabishvili M, Pantucek R, Rose T, Štveráková D, Van Raemdonck H, Verbeken G, Chanishvili N. 2018. Expert Opinion on Three Phage Therapy Related Topics: Bacterial Phage Resistance, Phage Training and Prophages in Bacterial Production Strains. *Viruses* 10:178.

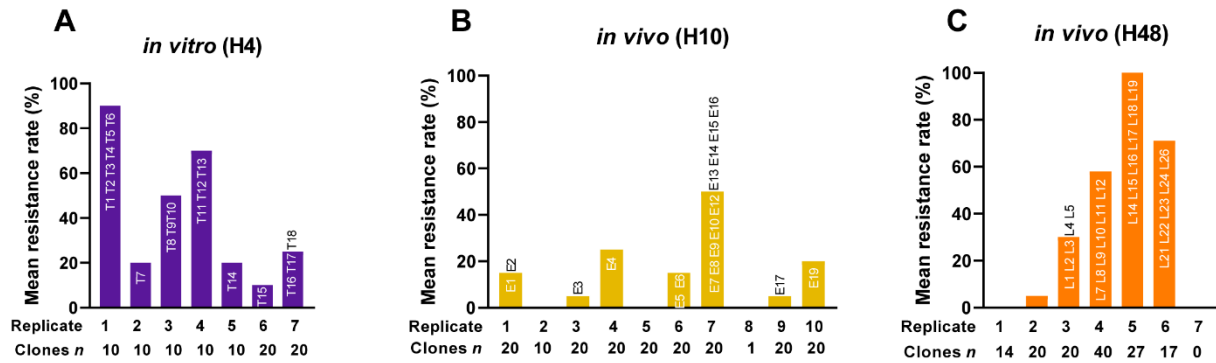
23. Zhvania P, Hoyle NS, Nadareishvili L, Nizharadze D, Kutateladze M. 2017. Phage Therapy in a 16-Year-Old Boy with Netherton Syndrome. *Front Med* 4:94.
24. Khawaldeh A, Morales S, Dillon B, Alavidze Z, Ginn AN, Thomas L, Chapman SJ, Dublanchet A, Smithyman A, Iredell JRY 2011. Bacteriophage therapy for refractory *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection. *J Med Microbiol* 60:1697–1700.
25. Egado JE, Costa AR, Aparicio-Maldonado C, Haas P-J, Brouns SJJ. 2021. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiol Rev* 46:fuab048.
26. Oechslin F. 2018. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses* 10:E351.
27. Roach DR, Leung CY, Henry M, Morello E, Singh D, Di Santo JP, Weitz JS, Debarbieux L. 2017. Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. *Cell Host Microbe* 22:38-47.e4.
28. Smith HW, Huggins MB. 1983. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J Gen Microbiol* 129:2659–2675.
29. Smith HW, Huggins MB, Shaw KM. 1987. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *J Gen Microbiol* 133:1111–1126.
30. Dufour N, Debarbieux L, Fromentin M, Ricard J-D. 2015. Treatment of Highly Virulent Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Pneumonia With Bacteriophages\*. *Crit Care Med* 43:e190.
31. Kim H-S, Nagore D, Nikaido H. 2010. Multidrug efflux pump MdtBC of *Escherichia coli* is active only as a B2C heterotrimer. *J Bacteriol* 192:1377–1386.
32. Nakayama T, Zhang-Akiyama Q-M. 2016. *pqiABC* and *yebST*, Putative mce Operons of *Escherichia coli*, Encode Transport Pathways and Contribute to Membrane Integrity. *J Bacteriol* 199:e00606-16.
33. Tenailon O, Rodríguez-Verdugo A, Gaut RL, McDonald P, Bennett AF, Long AD, Gaut BS. 2012. The molecular diversity of adaptive convergence. *Science* 335:457–461.
34. Washizaki A, Yonesaki T, Otsuka Y. 2016. Characterization of the interactions between *Escherichia coli* receptors, LPS and *OmpC*, and bacteriophage T4 long tail fibers. *MicrobiologyOpen* 5:1003–1015.
35. Dunn JD, Bosmani C, Barisch C, Raykov L, Lefrançois LH, Cardenal-Muñoz E, López-Jiménez AT, Soldati T. 2018. Eat Prey, Live: *Dictyostelium discoideum* As a Model for Cell-Autonomous Defenses. *Front Immunol* 8.
36. Dallaire-Dufresne S, Paquet VE, Charette SJ. 2011. *Dictyostelium discoideum* : un modèle pour l'étude de la virulence bactérienne. *Can J Microbiol* 57:699–707.
37. Adiba S, Nizak C, van Baalen M, Denamur E, Depaulis F. 2010. From grazing resistance to pathogenesis: the coincidental evolution of virulence factors. *PLoS One* 5:e11882.
38. Pouillot F, Chomton M, Blois H, Courroux C, Noelig J, Bidet P, Bingen E, Bonacorsi S. 2012. Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by a clone O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* strain producing CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother* 56:3568–3575.



39. Salazar KC, Ma L, Green SI, Zulk JJ, Trautner BW, Ramig RF, Clark JR, Terwilliger AL, Maresso AW. 2021. Antiviral Resistance and Phage Counter Adaptation to Antibiotic-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *mBio* 12:e00211-21.
40. Smith HW, Huggins MB. 1982. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J Gen Microbiol* 128:307–318.
41. Rendueles O, Garcia-Garcerà M, Néron B, Touchon M, Rocha EPC. 2017. Abundance and co-occurrence of extracellular capsules increase environmental breadth: Implications for the emergence of pathogens. *PLOS Pathog* 13:e1006525.
42. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahim N, Bingen E, Elion J, Denamur E. 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 67:546–553.
43. Raetz CRH, Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71:635–700.
44. Trent MS, Stead CM, Tran AX, Hankins JV. 2006. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J Endotoxin Res* 12:205–223.
45. Jann K, Jann B. 1992. Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Can J Microbiol* 38:705–710.
46. Schneider G, Dobrindt U, Brüggemann H, Nagy G, Janke B, Blum-Oehler G, Buchrieser C, Gottschalk G, Emödy L, Hacker J. 2004. The pathogenicity island-associated K15 capsule determinant exhibits a novel genetic structure and correlates with virulence in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* 72:5993–6001.
47. Smati M, Magistro G, Adiba S, Wieser A, Picard B, Schubert S, Denamur E. 2017. Strain-specific impact of the high-pathogenicity island on virulence in extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol IJMM* 307:44–56.
48. Delattre R, Seurat J, Haddad F, Nguyen T-T, Gaborieau B, Kane R, Dufour N, Ricard J-D, Guedj J, Debarbieux L. 2022. Combination of in vivo phage therapy data with in silico model highlights key parameters for pneumonia treatment efficacy. *Cell Rep* 39.
49. Castledine M, Padfield D, Sierocinski P, Soria Pascual J, Hughes A, Mäkinen L, Friman V-P, Pirnay J-P, Merabishvili M, de Vos D, Buckling A. 2022. Parallel evolution of *Pseudomonas aeruginosa* phage resistance and virulence loss in response to phage treatment in vivo and in vitro. *eLife* 11:e73679.
50. Zschach H, Joensen KG, Lindhard B, Lund O, Goderdzishvili M, Chkonia I, Jgenti G, Kvatadze N, Alavidze Z, Kutter EM, Hasman H, Larsen MV. 2015. What Can We Learn from a Metagenomic Analysis of a Georgian Bacteriophage Cocktail? *Viruses* 7:6570–6589.
51. Gordillo Altamirano FL, Kostoulas X, Subedi D, Korneev D, Peleg AY, Barr JJ. 2022. Phage-antibiotic combination is a superior treatment against *Acinetobacter baumannii* in a preclinical study. *EBioMedicine* 80:104045.
52. Brzuszkiewicz E, Brüggemann H, Liesegang H, Emmerth M, Olschläger T, Nagy G, Albermann K, Wagner C, Buchrieser C, Emody L, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U. 2006. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12879–12884.

53. Henry M, Lavigne R, Debarbieux L. 2013. Predicting In Vivo Efficacy of Therapeutic Bacteriophages Used To Treat Pulmonary Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 57:5961–5968.
54. Viazis S, Akhtar M, Feirtag J, Brabban A d., Diez-Gonzalez F. 2011. Isolation and characterization of lytic bacteriophages against enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 110:1323–1331.
55. Baym M, Kryazhimskiy S, Lieberman TD, Chung H, Desai MM, Kishony R. 2015. Inexpensive Multiplexed Library Preparation for Megabase-Sized Genomes. *PLOS ONE* 10:e0128036.
56. Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
57. Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. 2020. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinforma* 70:e102.
58. Inouye M, Dashnow H, Raven L-A, Schultz MB, Pope BJ, Tomita T, Zobel J, Holt KE. 2014. SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome Med* 6:90.
59. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. 2018. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genomics* 4.
60. Deatherage DE, Barrick JE. 2014. Identification of mutations in laboratory evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1151:165–188.
61. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, Doncheva NT, Legeay M, Fang T, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. 2021. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res* 49:D605–D612.
62. Ng PC, Henikoff S. 2001. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 11:863–874.
63. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7:248–249.
64. Choi Y, Chan AP. 2015. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 31:2745–2747.
65. Kitagawa M, Ara T, Arifuzzaman M, Ioka-Nakamichi T, Inamoto E, Toyonaga H, Mori H. 2005. Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res Int J Rapid Publ Rep Genes Genomes* 12:291–299.
66. Kropinski AM. 2009. Measurement of the rate of attachment of bacteriophage to cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 501:151–155.
67. Aribam SD, Elsheimer-Matulova M, Matsui H, Hirota J, Shiraiwa K, Ogawa Y, Hikono H, Shimoji Y, Eguchi M. 2015. Variation in antigen-antibody affinity among serotypes of *Salmonella* O4 serogroup, determined using specific antisera. *FEMS Microbiol Lett* 362:fnv168.
68. Lê S, Josse J, Husson F. 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J Stat Softw* 25:1–18.

## Supplementary data



### Supplementary S1. Bacterial resistance rates to phage 536\_P1 from the independent groups of both *in vitro* and *in vivo* conditions.

**(A)** A total of seven liquid cultures of strain 536 were infected by phage 536\_P1 at a phage:bacteria ratio of 1:10 during 4 h before sampling phage-resistant clones ( $n=10$  to 20 per replicate).

**(B,C)** A total of 17 BALB/cJRj mice were infected by a single dose of  $1 \times 10^8$  CFU of strain 536 and treated 2 h later by a single administration of phage 536\_P1 ( $3 \times 10^8$  PFU). Mice lungs were collected 10 h ( $n=10$ ) **(B)** and 48 h ( $n=7$ ) **(C)** post-infection to sample phage-resistant clones (up to 20 clones per mouse). The identity of sequenced clones ( $n=57$ ) reported in this study and listed in **Supplementary S2** are indicated over the vertical bars.

Clone <sup>1</sup>	Mutation type	Nucleotide change	Gene	Protein change	<i>In silico</i> prediction <sup>2</sup>			Function
					SIFT	PROVEAN	POLYPHEN-2	
E16	SNP	A→C	<i>ECP_0298</i>	Y160S	Tolerated (0.08)	Deleterious (-6.782)	Probably damaging (1.000)	Surface adhesin precursor
E1	SNP	T→C	<i>pgiA</i>	M314T	Affect protein function (0.04)	Deleterious (-4.524)	Probably damaging (0.998)	Membrane stability
E9	SNP	T→A	<i>mdtC</i>	L194Q	Affect protein function (0.00)	Deleterious (-5.815)	Probably damaging (1.000)	Efflux system
L19	SNP	A→G	<i>ygaH</i> → / → <i>mprA</i>					K15 capsule biosynthesis (transcriptional regulation)
L22	indel	del 8494bp	<i>[ECP_3009]-[kpsE]</i>					K15 capsule biosynthesis (export)
L17	SNP	G→T	<i>kpsD</i>	G32*				K15 capsule biosynthesis (export)
L2; L3; L4	indel	del 1bp	<i>ECP_3027</i>					K15 capsule biosynthesis (export)
L24	indel	del 353bp	<i>ECP_3035</i>					K15 capsule biosynthesis (export)
L19	indel	del 1bp	<i>ECP_3029</i>					K15 capsule biosynthesis (synthesis)
T14; T10	indel	del 1bp	<i>ECP_3031</i>					K15 capsule biosynthesis (synthesis)
E1	indel	del 1bp	<i>ECP_3033</i>					K15 capsule biosynthesis (synthesis)
T15	SNP	A→T	<i>ECP_3034</i>	W281R	-	Deleterious (-7.875)	Probably damaging (1.000)	K15 capsule biosynthesis (synthesis)
E9	SNP	T→G	<i>araA</i>	Q287P	Affect protein function (0.01)	Deleterious (-5.997)	Probably damaging (0.998)	LPS biosynthesis
T18; L15	SNP	C→T	<i>lpcA</i>	P78L	Affect protein function (0.00)	Deleterious (-5.603)	Probably damaging (0.999)	LPS biosynthesis
L23	indel	del 1bp	<i>galU</i>					LPS biosynthesis
E13	indel	del 1bp	<i>galU</i>					LPS biosynthesis
T1	indel	del 1bp	<i>galU</i>					LPS biosynthesis
E17	indel	del 1bp	<i>galU</i>					LPS biosynthesis
T7; L11	SNP	C→T	<i>galU</i>	Q274*				LPS biosynthesis
L10	indel	del 1bp	<i>rfaE</i>					LPS biosynthesis
E19	SNP	G→A	<i>rfaE</i>	T231I	Affect protein function (0.00)	Deleterious (-5.917)	Probably damaging (1.000)	LPS biosynthesis
L9	indel	del 1bp	<i>waaD</i>					LPS biosynthesis
T5	SNP	G→A	<i>waaC</i>	W47*				LPS biosynthesis
E2	indel	del 2468 bp	<i>waaV-waaT</i>					LPS biosynthesis
T17	indel	del 1bp	<i>waaT</i>					LPS biosynthesis
E7	SNP	C→T	<i>waaT</i>	W290*				LPS biosynthesis
E5	SNP	T→C	<i>waaT</i>	D212G	Affect protein function (0.00)	Deleterious (-6.863)	Probably damaging (1.000)	LPS biosynthesis
L24	indel	del 1bp	<i>waaT</i>					LPS biosynthesis
L19	indel	del 2bp	<i>waaT</i>					LPS biosynthesis
E9	indel	del 1bp	<i>waaT</i>					LPS biosynthesis
T16; L12	SNP	C→T	<i>waaT</i>	G177D	Affect protein function (0.00)	Deleterious (-6.916)	Probably damaging (1.000)	LPS biosynthesis
T12	SNP	C→A	<i>waaT</i>	E112*				LPS biosynthesis
L16	SNP	G→T	<i>waaT</i>	Y105*				LPS biosynthesis
E16	SNP	G→A	<i>waaT</i>	Q98*				LPS biosynthesis
T11; T13	SNP	G→T	<i>waaT</i>	S80*				LPS biosynthesis
L26	SNP	G→A	<i>waaT</i>	Q76*				LPS biosynthesis
L8	indel	del 1bp	<i>waaT</i>					LPS biosynthesis
T8; T9	SNP	C→T	<i>waaO</i>	W294*				LPS biosynthesis
L21	SNP	C→T	<i>waaO</i>	W276*				LPS biosynthesis
T2; T4; T6	SNP	G→T	<i>waaO</i>	S252*				LPS biosynthesis
E6; E10; E12	indel	del 1bp	<i>waaO</i>					LPS biosynthesis
L5	indel	del 1bp	<i>waaO</i>					LPS biosynthesis

L14	indel	del 1bp	<i>waaO</i>					LPS biosynthesis
L18	indel	+A	<i>waaO</i>					LPS biosynthesis
L7	indel	del 54bp	<i>waaG</i>					LPS biosynthesis
E14; L1	SNP	G→A	<i>waaG</i>	Q280*				LPS biosynthesis
L1	SNP	G→A	<i>waaG</i>	R208C	Tolerated (0.06)	Deleterious (-4.221)	Probably damaging (1.000)	LPS biosynthesis
E4	indel	del 81 bp	<i>waaG</i>					LPS biosynthesis
E15	indel	del 18bp	<i>waaG</i>					LPS biosynthesis
T3	SNP	C→T	<i>waaG</i>	W71*				LPS biosynthesis
E3	SNP	G→T	<i>waaG</i>	S58*				LPS biosynthesis
			<i>galU</i>					LPS biosynthesis
E8	recombination		<i>galU/hns</i>					LPS biosynthesis
			<i>waaG</i>					LPS biosynthesis
E10	recombination		<i>waaG</i>					LPS biosynthesis

---

**Supplementary S2. List of the 53 distinct mutations identified from the 57 phage-resistant clones sequenced.**

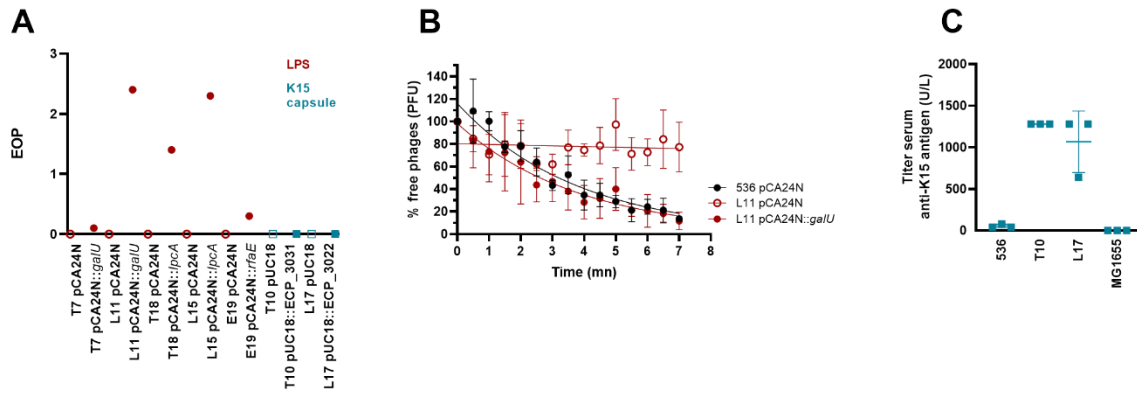
<sup>1</sup> T#, clones from *in vitro* condition; E#, clones from *in vivo* (10 h); L#, clones from *in vivo* (48 h).

<sup>2</sup> Predictions of the consequence of mutations on protein function.

Phage-resistant clones	Mutated genes	Predicted LPS structure
536 WT	none	
T18. L15 E19. L10 L9	<i>lpcA</i> <i>rfaE</i> <i>waaD</i>	
T5	<i>waaC</i>	
T1. T7. E8. E13. E17. L11. L23 T3. E3. E4. E10. E14. E15. L1. L7	<i>galU</i> <i>waaG</i>	
T2. T4. T6. T8. T9. E6. E12. L5. L14. L18. L21	<i>waaO</i>	
T11. T12. T13. T16. E2. E5. E7. E9. E16. L8. L12. L16. L19. L24. L26	<i>waaT</i>	

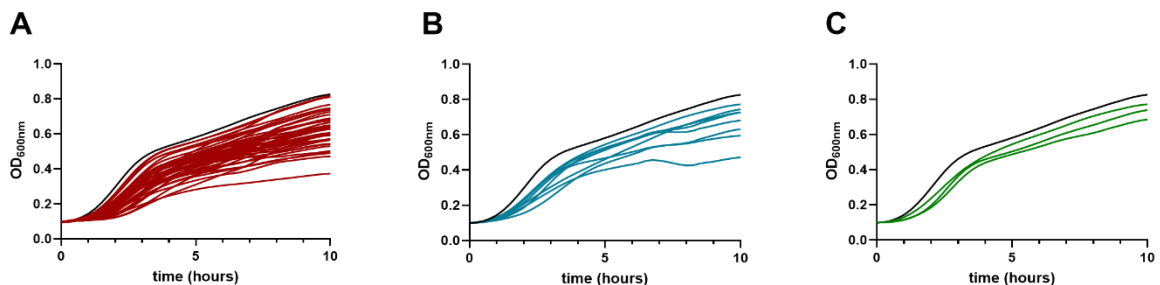
**Supplementary S3. Schematic representation of the LPS structures deduced from the mutated genes identified in phage-resistant clones.**

On the left column are indicated the list of the 47 clones carrying a point mutation in genes involved in the LPS biosynthesis pathway.



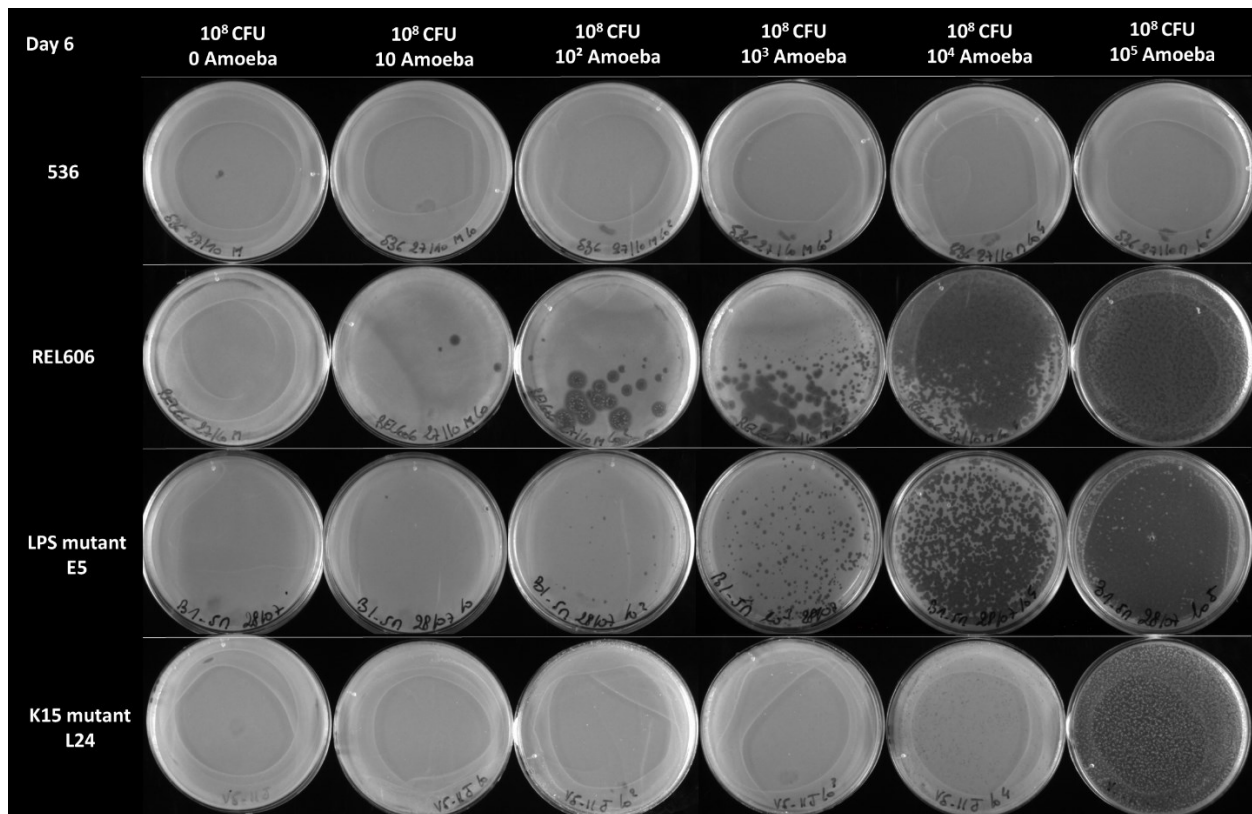
**Supplementary S4. Trans-complementation of LPS but not K15 capsule phage-resistant clones restore phage susceptibility.**

**(A)** Representative LPS (*galU*, clones T7 and L11; *lpcA*, clone T18 and L15; *rfaE*, clone E19) and K15 capsule (*ECP\_3031*, clone T10; *ECP\_3022*, clone L17) phage-resistant clones carrying a single mutation were trans-complemented by the corresponding WT gene cloned in a plasmid (pCA24N) and were assayed for their susceptibility to phage 536\_P1. **(B)** Phage 536\_P1 adsorption on the clone L11 (*galU*) is restored by trans-complementation. **(C)** Agglutination assays of two representative K15 capsule phage-resistant clones (L17 and T10) compared to strain 536 and the non-capsulated strain MG1655. *EOP*, efficiency of plaquing



**Supplementary S5. The growth rate of phage-resistant mutants is lower than the wild-type strain 536.**

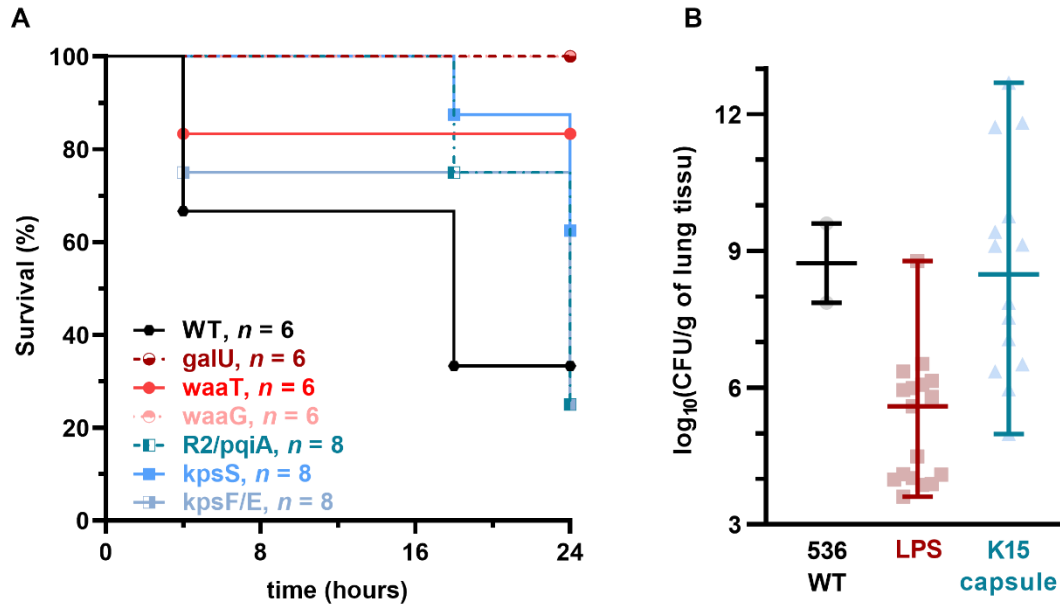
The growth of all sequenced phage-resistant clones with no identical mutation ( $n=47$ ) in a non-limited nutrient medium (LB medium) is represented as the mean and smoothed growth curve of three independent replicates compared to the WT strain 536 (black) and displayed by mutated functions in **(A)** clones involved in LPS biosynthetic pathway (red), **(B)** mutated clones involved in K15 capsule genes (blue) and **(C)** mutated clones in membrane proteins (green).



**Supplementary S6. Phage resistant clones become susceptible to the protozoan predation by *Dictyostelium discoideum*.**

Representative images of grazing resistant (strain 536) and grazing susceptible (strain REL606) phenotypes estimated by the serial dilution of amoeba cells from 0 (left) to 10<sup>5</sup> (right) on bacteria lawns (10<sup>8</sup> CFU) as well as two phage-resistant clones (E5 and L24).





**Supplementary S7. The virulence of LPS but not K15 capsule phage-resistant mutants is strongly attenuated.** (A) Three representatives of LPS mutants (*galU*, clone T1; *waaT*, clone T11; *waaG*, clone E15) and three K15 capsule mutants (*ECP\_3033*, clone E1; *ECP\_3027*, clone L3;  $\Delta$ (*ECP\_3009-kpsE*), clone L22) were used to infect BALB/cJrj mice (a single dose of  $1 \times 10^8$  CFU; n=6 to 8 per group), whose survival rates over 24 h were monitored. (B) Lungs from infected mice described in (A) were collected 24 h post-infection to count bacteria.

**Supplementary S8. List of the six phages used in this study.**

Bacteriophage	Morphology	Genus	Genome size (kb)	Infects WT strain 536
536_P1	<i>Myoviridae</i>	<i>Phaepocotavirus</i>	149.4	Yes
536_P3	<i>Podoviridae</i>	<i>Phaepocotavirus</i>	39.7	Yes
CLB_P2	<i>Myoviridae</i>	<i>Dhakavirus</i>	171.8	Yes
LF73_P1	<i>Myoviridae</i>	<i>Tequatrovirus</i>	168.9	Yes
LF110_P3	<i>Myoviridae</i>	<i>Felixounavirus</i>	88.2	No
DIJ07_P1	<i>Myoviridae</i>	<i>Phaepocotavirus</i>	142.8	No

# **CHAPITRE 4**

-

## **SPECTRE D'HOTES DES BACTERIOPHAGES : DETERMINANTS GENOMIQUES BACTERIENS ET VIRAUX**

-

### **UNE ETUDE AU NIVEAU DU GENRE *ESCHERICHIA***



L'identification d'un ou de plusieurs bactériophages virulents efficaces contre un isolat bactérien spécifique reste dépendant d'expériences effectuées au laboratoire. L'infectivité des bactériophages est traditionnellement caractérisée par des tests d'interaction sur géloses, appelés phagogrammes. Plusieurs auteurs ont proposé récemment le concept de phagogramme *in silico* reposant sur des données « omics », permettant d'accélérer et de simplifier la sélection des bactériophages à utiliser (1, 2). Malgré de bons résultats, les approches prédictives *in silico* restent limitées à la détermination de l'espèce bactérienne hôte d'un bactériophage (3-8). A ce jour, par un manque de compréhension de la complexité des mécanismes déterminant le spectre d'hôte, par une difficulté à les détecter, et du fait dans les précédentes études d'agrégation de données expérimentales très hétérogènes, aucun modèle ne permet de prédire correctement le spectre d'hôtes d'un bactériophage, sur un taxon plus précis que l'espèce.

L'objectif de ce travail est de mieux comprendre ses déterminants à l'échelle du genre *Escherichia*. Nous avons combiné une méthode d'évaluation phénotypique standardisée sur gélose (dérivée de l'*Efficiency of plating*), à une approche génomique (détection par des outils bio-informatiques pré-existants de traits associés à la résistance bactérienne aux bactériophages). Nous avons réalisé une caractérisation phénotypique et génomique d'une banque de 120 bactériophages, isolés sur plus de 35 souches d'*E. coli*, et testée sur une collection de 369 souches représentatives du genre *Escherichia*. Nos résultats montrent que le taux d'interaction positive moyenne était de 17%, avec une grande divergence selon les souches. Le spectre d'hôtes des bactériophages est corrélé à leur proximité phylogénétique. La phylogénie bactérienne ne semble pas être le déterminant principal du spectre d'hôtes au niveau intra-espèce, ni le nombre de systèmes de défense, de capsule ou de prophages. Nous avons ensuite développé de façon préliminaire des modèles statistiques (régression logistique, random forest) pour tester notre capacité à prédire à partir de quelques données génomiques les interactions entre bactériophages et bactéries.

*Ma contribution à ce travail comprend la conception et la coordination de l'étude et des expériences en collaboration avec Aude Bernheim. J'ai aussi participé à la production des données expérimentales, à l'analyse des matrices d'interactions, au séquençage des bactéries et des bactériophages, ainsi qu'à l'analyse statistiques des données. J'ai rédigé le manuscrit de ces résultats préliminaires. Au cours de ce travail collaboratif de grande ampleur, j'ai également assuré l'encadrement de trois étudiants en master 2. Les analyses bio-informatiques et les modèles prédictifs ont été réalisés par Florian Tesson. Ce travail n'a pas été soumis pour publication à ce jour.*

1. Lood C, Boeckaerts D, Stock M, De Baets B, Lavigne R, van Noort V, Briers Y. 2022. Digital phagograms: predicting phage infectivity through a multilayer machine learning approach. *Curr Opin Virol* 52:174–181.
2. Versoza CJ, Pfeifer SP. 2022. Computational Prediction of Bacteriophage Host Ranges. *Microorganisms* 10:149.
3. Boeckaerts D, Stock M, Criel B, Gerstmans H, De Baets B, Briers Y. 2021. Predicting bacteriophage hosts based on sequences of annotated receptor-binding proteins. 1. *Sci Rep* 11:1467.
4. Coutinho FH, Zaragoza-Solas A, López-Pérez M, Baryliski J, Zielezinski A, Dutilh BE, Edwards R, Rodriguez-Valera F. 2021. RaFAH: Host prediction for viruses of Bacteria and Archaea based on protein content. *Patterns* 2:100274.
5. Li M, Wang Y, Li F, Zhao Y, Liu M, Zhang S, Bin Y, Smith AI, Webb GI, Li J, Song J, Xia J. 2021. A Deep Learning-Based Method for Identification of Bacteriophage-Host Interaction. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 18:1801–1810.
6. Liu D, Ma Y, Jiang X, He T. 2019. Predicting virus-host association by Kernelized logistic matrix factorization and similarity network fusion. *BMC Bioinformatics* 20:594.
7. Leite DMC, Brochet X, Resch G, Que Y-A, Neves A, Peña-Reyes C. 2018. Computational prediction of inter-species relationships through omics data analysis and machine learning. *BMC Bioinformatics* 19:420.
8. Liu Q, Liu F, He J, Zhou M, Hou T, Liu Y. 2019. VFM: Identification of Bacteriophages From Metagenomic Bins and Contigs Based on Features Related to Gene and Genome Composition. *IEEE Access* 7:177529–177538.

# Genomic determinants of bacteriophage host-range within *Escherichia* genus

Baptiste Gaborieau,<sup>a,b,c</sup> Florian Tesson,<sup>a,d</sup> Juliette Bernier,<sup>a</sup> Inès Charachon,<sup>a,d</sup> Tanguy Dequidt,<sup>b</sup> Héloïse Georgeon,<sup>d</sup> Olivier Clermont,<sup>a</sup> Laurent Debarbieux,<sup>b</sup> Erick Denamur,<sup>a,e</sup> Jean-Damien Ricard,<sup>a,c</sup> Aude Bernheim,<sup>d#</sup>

<sup>a</sup>Université Paris Cité, INSERM UMR1137, IAME, Paris, France

<sup>b</sup>Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR6047, Bacteriophage Bacterium Host, Paris, France

<sup>c</sup>APHP, Hôpital Louis Mourier, DMU ESPRIT, Service de Médecine Intensive Réanimation, Colombes, France

<sup>d</sup>SEED, U1284, INSERM, Université de Paris, Paris, France

<sup>e</sup>APHP, Hôpital Bichat, Service de Génétique Moléculaire, Paris, France

#Address correspondence to Aude Bernheim, [aude.bernheim@inserm.fr](mailto:aude.bernheim@inserm.fr)

## Running Head

Phage host-range within *Escherichia* genus

## Authors contribution

A.B. and B.G. conceived the study and secured funding. B.G., J.B., I.C., T.D. and O.C. performed experiments. F.T. computed bioinformatic detection and preliminary predictive model. B.G. and F.T. analyzed the data. B.G. wrote the first draft. J.-D.R., E.D. and L.D. provided feedback. A.B. and B.G. reviewed and edited final draft.



## Introduction

Antibiotic resistance became in few decades a global public health problem, responsible for millions of deaths worldwide (1). With the prevalence of antibiotic resistance on the rise, alternative antibacterial treatments are needed (2). Phage therapy, the use of bacteriophages for therapeutic purposes, is experiencing growing interest. Phages are viruses targeting bacteria capable of killing their host upon release of viral progeny. Their interest lies in their lower impact on the ecology of bacterial communities, compared to antibiotics, by their narrow host spectrum. Finding infective phages against a specific pathogenic bacterial isolate remains a challenge. Thus, understanding phage-host interactions is crucial for the application of phages in medicine (phage-therapy).

Bacteria and phages have co-evolved for billions years (3). These never-ending evolutionary dynamics have been shaped by reciprocal selective pressures exerted by changes in resistance and counter-resistance mechanisms, targeting every step of the infection process (4). Productive infection requires phages to adsorb to specific receptors at the bacterial cell surface, then bypass immune host defenses and hijack bacterial metabolism, before being released often by killing the host in the process. Successful propagation of a phage is restricted by numerous and highly diverse systems, including phage receptor repertoire (surface proteins and membrane glycans), shields of extra-cellular polysaccharides (capsules), and a large arsenal of cytosolic antiviral systems (5). All these molecular interactions determine the host range of a phage, i.e. the taxonomic diversity of hosts it can successfully infect (6).

Phage infectivity is traditionally tested against a specific bacterium by a culture-based approach (plaques assays or growth in liquid medium). New methods have recently been developed, like microfluidic-PCR (7) or fluorescence in situ hybridization (8). However, all these bench approaches are laborious, costly and takes time, and are challenging especially when scaled up for high-throughput screening of large libraries of several hundred phages.

With the rise of omics data, new tools have been developed to detect prokaryotic genomic features - defense systems (9, 10), capsules (11), prophages (12–15) - and to recognize the phage life cycle (16). It is an open question whether it is possible to predict *in silico* from genomic data the result of an interaction between a phage and a bacterium. Predictive models have been recently developed (17–23). Although promising, these models fail to predict the host spectrum of a phage at a taxonomic level deeper than the species. These studies are based on public databases, which combine phage-bacteria interaction datasets determined according to heterogeneous methodologies and with a limited representativeness of bacterial and viral diversity (6).

We investigated here, how much of the phage host range can be inferred from genomics data at the species level. To do so, we built predictive models that use genomes of bacterial strains as an input and evaluated their performance, focusing on the well characterized species *Escherichia coli*. To train the models, we combined a standardized phenotypic evaluation plaque assay of 369 bacterial strains representative of *Escherichia* genus and of 120 phages



representative of *Escherichia coli* phages, with an *in silico* detection of bacterial and viral genomic features.

## Results

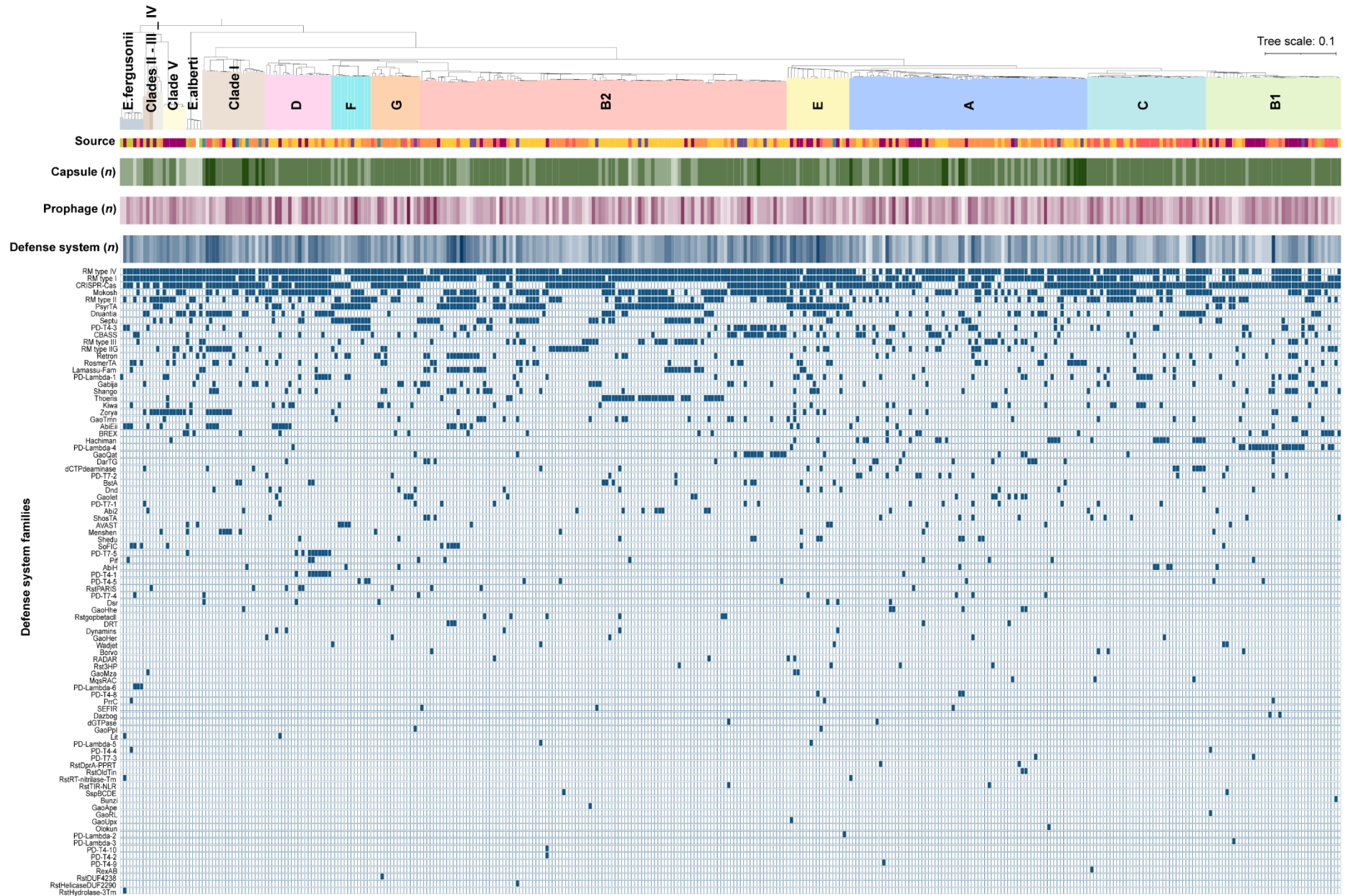
### Genomic characterization of a diverse collection of *Escherichia* strains

To study phage host range at the species level, we set out to gather a collection representative of the diversity of *Escherichia* strains both at the ecological and genomic level (25). We expected that the host range would not be dependent on one single trait like phylogeny or habitat. A high turnover of mobile genetic elements leads to a continuous change of gene content in *E. coli*, so closed phylogenetic strains can be phenotypically and genomically heterogeneous (24). It was for example shown that the number and types of defense systems vary greatly from one strain to another in *E. coli* (9). We thus hypothesized that a diverse collection from an ecological level would reveal diversity in terms of phage resistance mechanism.

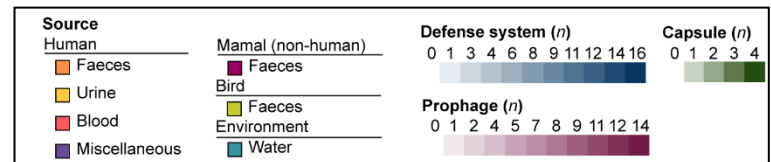
Together, the 369 bacterial strains are representative of all phylogenetic groups (figure 1): the three *Escherichia* species (*E. coli*, *E. fergusonii* and *E. albertii*) and the eight phylogroups and five cryptic clades of *E. coli* strains. Unlike other collections, this one brings together both clinical isolates but also commensal and environmental strains (figure S1a), collected from a variety of human, animal and aquatic sources. From an epidemiological perspective, all the main pathogenic clones responsible for extra-intestinal infections (ExPEC) are well represented.

We detected genomic traits that we hypothesized could be involved in phage resistance. We used Defense Finder (9) to detect the up-to-date anti-phage defense system families; Capsule Finder (11) to detect capsule systems, that could shield against the phage access to its receptor; Virorter2 (12) to detect prophages, which can encode for systems inhibiting the infection by another distant phage (i.e. superinfection exclusion system) (26).

We found that in *Escherichia*, these mechanisms are numerous, extremely diverse and not dependent on the phylogeny (figure 1). On average, *Escherichia* strains encode 8 defense systems (7.7). This number varies widely from a minimum of one to a maximum of 16 (figure S2a). To estimate the diversity of this antiviral arsenal, we computed the number of distinct families of antiviral systems per genome. On average, the strains encode five distinct families of antiviral systems (5.3), varying from one to 12 different families (figure S2b). Some of these families are widely presents in the *Escherichia* strains. Restriction modification systems (RM types IV and I, more than 80% of the strains genomes) and CRISPR-Cas systems (about 70%) are extremely common. Between a quarter and a half of the strains have also a Mokosh, an



**Figure 1. Bacterial collection (n = 369) is representative of the phylogenetic diversity of Escherichia genus and present a broad range of anti-phage systems.** From top to bottom: (1) phylogenetic tree of the collection colored by phylogroup, (2) ecological niches of the strains (Source), (3) gradient colors plots representing the capsules number (green), prophages number (purple) and defense systems number (blue) encoded in their genomes. Details about the presence (blue square) of each family of defense system, ranked from the most to the least frequent, are shown into a binary matrix.



RM type II or a PsyrTA system. And 11 other systems (Druantia, Septu, PD-T4-3, CBASS, RM type IIG and III, Retron, Lamassu, PD-Lambda 1, Gabija and Shango) have been found in more than 10% of the genomes (figure S2c). Besides these common systems, 83 other families were detected, highlighting the huge diversity of the arsenal in the *Escherichia* genus, in accordance with Tesson et al (9).

We also identified from one to 14 prophages per bacterial genome with an average of six prophages (5.8) (figure S2d), in accordance with previous data (24, 27). The prophages belong to 22 viral genera, with a frequent co-occurrence of several genera (until 7 different genera) (figure S2e).

Finally, all bacterial genomes encoded at least one capsule system, averaging three (2.8). We found that 98% of them had more than one, from two to four different systems (Figure S2f). Capsules from group IV and group I (Wzx/Wzy-dependent biosynthetic pathway) were the most frequent, accounting for 56% and 30% of the total, respectively. Among the strains possessing several capsules, only one coded for capsules belonging to the same group. These results demonstrate that the capsulated trait is widespread in *Escherichia* strains, confirming previous data (11). The co-occurrence allows diversification of the capsulation phenotype with 15 different combinations of capsule systems observed. Six of them were present in more than 10 strains.

Our collection sampled the diversity of phage resistance-related traits of the *Escherichia* genus, reflecting its versatility to respond to viral predation.

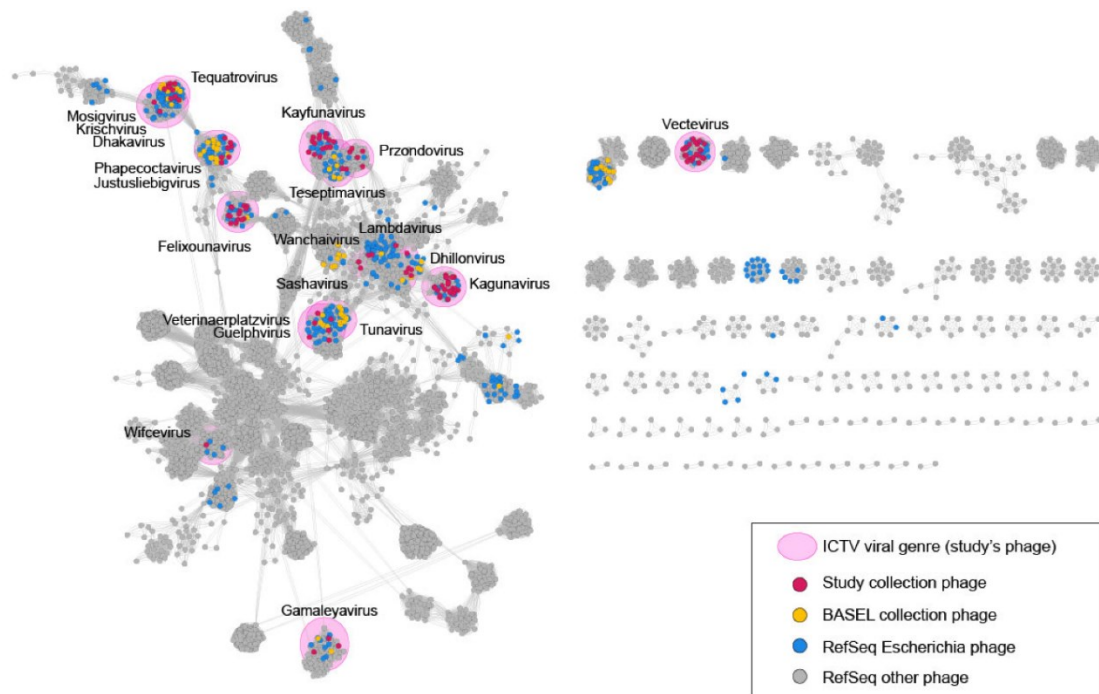
### **Establishing a collection encompassing the diversity of phages of *E. coli***

In mirror to *Escherichia* diversity, we wondered to what extent the diversity of phages in terms of counter-defense systems and receptor binding proteins might shape their ability to infect certain *E. coli* hosts rather than others. We therefore wanted to constitute a collection representative of the diversity of all currently known phages whose preferential or exclusive host was *E. coli*. Despite the complexity of their evolutionary pathways, shaped by the mosaicity of their genome, phages specifically share hallmark genes with some other phages, coding for structural proteins or essential enzymes (28). With the recent update of phage taxonomic classification by International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), a viral genus includes phages with at least 70% nucleotide identity and is monophyletic for the signature genes (29).

We assembled a collection of 120 phages. 118 phages were previously isolated in our labs from sewage water collected over 10 years in different locations around Paris area (France). With a total of 35 different *E. coli* hosts used to isolate these phages, we hypothesized that this method of isolation would lead to an important diversity. The two archetypal *E. coli* phages T4 and T7 were added to the 118 phages. Genome sequencing reveals that all these phages were different from another (figure S3). Out of 7080 possible phages couples, 50 are more than 98% but less than 100% identical at the nucleotide level over their full genome

length tested reciprocally. All the phages belong to the *Caudoviricetes* class according to the ICTV classification. They represent 21 different genera of *Caudoviricetes*, of which 40% are podovirus, 27.5% myovirus and 32.5% siphovirus (figure S1b and c). Excepted for one (*Lambdavirus*), none of the phages belonged to the same genera than strains prophages. In addition, these phages were initially isolated for their ability to form lysis plaques on a bacterial overlay agar plate.

We then wondered if this new collection covered the diversity of viral genera of phages whose host species is *Escherichia*. We compared its diversity with two reference collections: the BASEL collection comprising 77 phages (30), and all the known genomes of phages in the RefSeq database having for host *Escherichia* ( $n = 407$ ) (figure 2). To do this, we used the vConTACT2 software: a network-based phylogeny improves the representation of phylogenetic links between phages, since it also takes into account horizontal gene transfer. *Escherichia* phages clustered into large viral clusters. The phages belonged to about ten known major *Escherichia* phage clusters. Compared to BASEL collection, four viral clusters were missing, representing six viral genera (*Eseptimavirus/Tequintavirus*; *Nonagvirus/Seuratvirus*; *Peduovirus*; *Punavirus*), while thirteen genera were specific to this study. Three additional main clusters from RefSeq genomes are non-represented: *Kuravirus*, *Kuttermavirus* and *Carltongylesvirus/Sabourvirus*. As expected, since all our phages belong to the class of *Caudoviricetes*, we didn't match with non-tailed-phages clusters from the *Inoviridae*, *Fiersviridae* and *Microviridae* families (figure S4).



**Figure 2. Phage collection ( $n = 120$ , purple points) is representative of the diversity of known *Escherichia* phages.** Network representation of 4,679 phage genomes: 120 *E. coli* phage genomes from this study (purple, current study), 77 *E. coli* phage genomes from the BASEL collection of *E. coli* phages (yellow), and 4,482 NCBI RefSeq phage genomes (grey), of which 407 belongs to *E. coli* phages (blue). vConTACT2 v0.11.3 was used to measure distance between phages, and Cytoscape v3.7.1 for visualization of the network. Each genome is represented by a node (point); edges (line) were computed using number of shared protein clusters. ICTV taxonomic level for genus of the study collection are shown in pink circles.

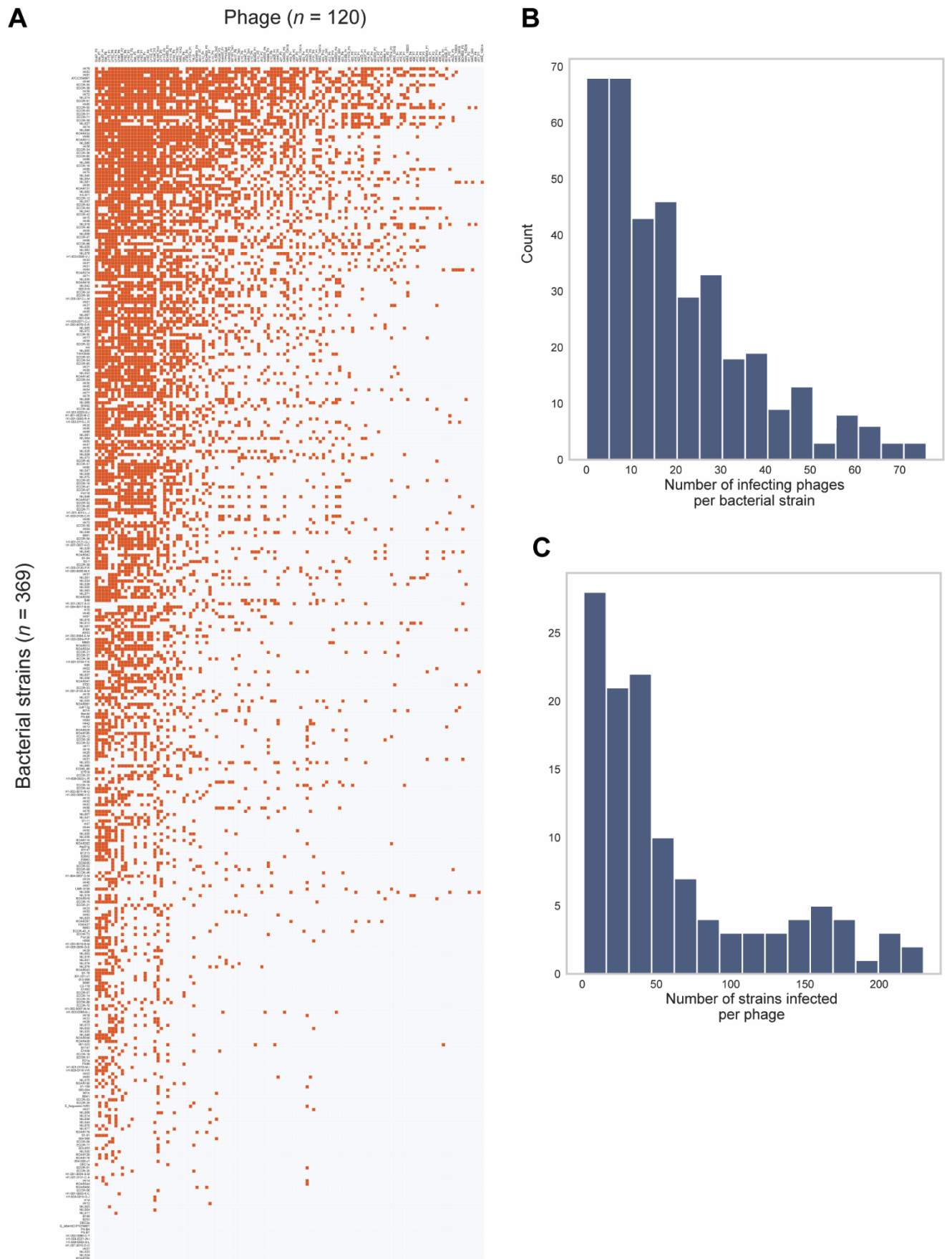
We conclude that the collection of 120 different phages represents a large phylogenetic diversity and is suitable to investigate phage-bacteria interactions within *Escherichia* genus.

### **Phage host range of *Escherichia* phages is highly variable**

We then wanted to determine which phages were capable of infecting which bacterial strains. With the exception of studies in the marine environment, most previous studies found that the phage-bacteria infection networks were predominantly nested (31) : generalist phages can infect both the most susceptible and the most resistant bacteria, while specialist phages can only infect the most susceptible hosts. We conducted a large-scale study of plaque assays. The host range of each of the 120 phages was determined on the 369 *Escherichia* strains (figure 3a). A positive interaction corresponded to the appearance of a lysis plaque in the bacterial layer, at least on the highest Multiplicity of Infection (MOI, i.e. ratio between the number of viral particles and bacterial cells) (see methods), indicating a molecular interaction between the phage and its host.

We found that most bacteria were resistant to the majority of phages with few positive interactions. Out of 44,280 phage-host interaction tested, only 16.6% displayed lysis plaques on the agar overlay. On average, one bacterial strain was infected by 20 phages, with a huge variability from pan-resistant clones with no infecting phage ( $n = 15$ ), to very susceptible ones (infected by 76 phages) (figure 3b). Interestingly, pan resistant strains did not differ from the others either by their ecological niche (birds, humans and other mammals), their lifestyle (ExPEC and commensal strains), their phylogroup (B2, B1, A, C and *E. fergusonii* and *E. albertii*) or their number of families of defense systems (4.8), capsules (2.4) and prophages (5.9).

A phage could infect on average 61 strains. The host ranges considerably varied from only one to 230 susceptible hosts (figure 3c). The phage-bacteria interaction network is overall organized in a nested fashion (figure 3a). We spotted different profiles of phage: from phages which have a broad host range of more than hundreds susceptible hosts, to the phages with a very narrow host range (less than 50 susceptible hosts). In mirror, we can distinguish hosts which are susceptible to more than 30 phages, from hosts which can be infected by less than 10 phages. We conclude that most of the time, the phages of *E. coli* are not able to infect *Escherichia* strains, and that their host range varies considerably, with generalist phages being able to infect many strains, and specialist phages being able to infect only the most susceptible strains. Host range depends on the number of strains on which the phage is tested (32, 33). Understanding what determines the size of the host range is therefore a key question.



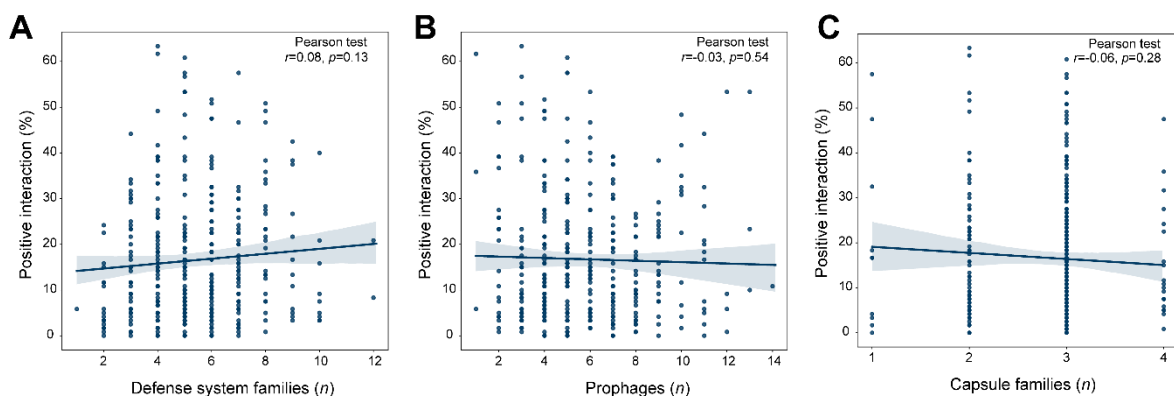
**Figure 3. Phage host range varies from narrow to extremely broad spectra, with an overall nested organization.**

(A) Bacteria-phage interactions between the 369 strains (in rows) and the 120 phages (in columns). All 7373 positive interactions are represented by an orange square, representing the summary of three independent replicates of plaque assays (see Methods). Bacterial strains are ranked according to the number of phages by which they can be infected; phages are ranked by their number of susceptible hosts. (B) Histograms of number of phages each bacterial strain is susceptible to, and (C) of the number of bacterial hosts a phage can infect.

## Factors influencing overall the phage host range

### *Antiviral systems, capsules and prophages*

We wanted to know to what extent traits linked to phage resistance, such as antiviral defense systems, capsules or prophages, could explain that certain strains are more susceptible to infection than others. As bacteria are believed to have a large antiviral arsenal to enhance their diversity (9), and since its maintenance has a fitness cost (34, 35), we hypothesized that the number of phages infecting a strain might be reduced by the number of phage infection-opposed systems encoding in the host genome. We found no correlation between the percentage of phages infecting a strain and the number of phage resistance traits, either the number of defense system families (or the total number of defense systems, data not shown), the number of prophages or the number of capsule groups (figure 4). We conclude that by increasing the size of its antiviral arsenal, *Escherichia* does not improve its protection against phage infection.



**Figure 4. Susceptibility to phages is not associated with the number of defense systems, prophages or capsules. (A)** Percentage of phage infecting each host according to its number of defense system families, **(B)** its number of prophages, or **(C)** its number of capsule groups. Line is simple linear regression models. Pearson correlation test was performed using SciPy python module v1.9.0.

### *Bacterial phylogeny and lifestyle*

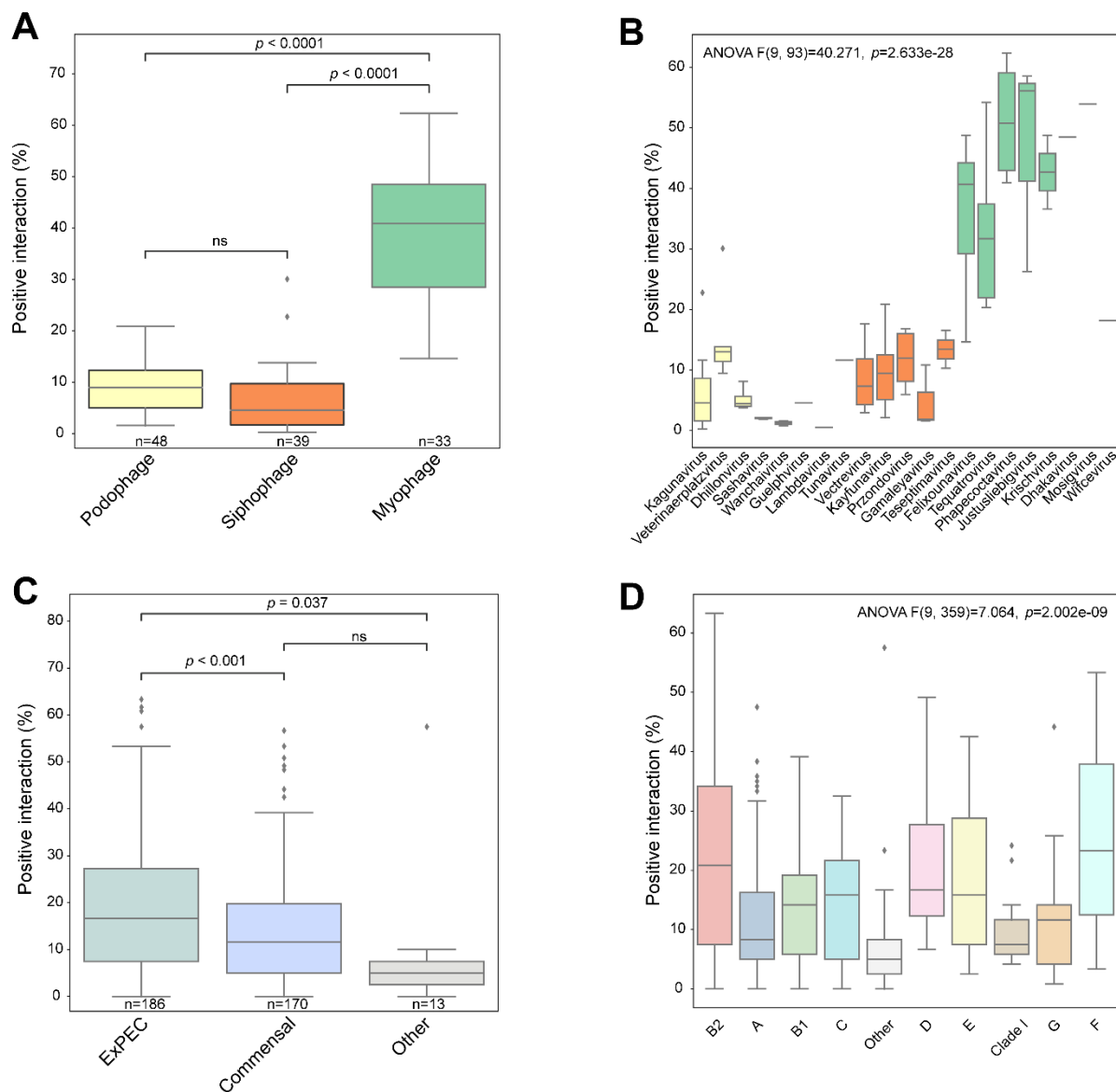
When plotting the phage-host interaction matrix by grouping bacterial strains by phylogroup (Figure S5), we observed that the weakest susceptible strains to a large range of phages belong particularly to B2 and F phylogroups. We therefore wondered whether the size of the host range could also be influenced by the phylogeny of *Escherichia* strains. We computed a one-way ANOVA and found a difference in the number of phages a strain could be infected by ( $p < 0.0001$ ) (figure 5d). We then performed a post hoc analysis by pairwise multiple comparison (Tukey's HSD). Strains of phylogroup B2 were more susceptible to phages than strains of phylogroups A ( $p = 0.001$ ), or to strains belonging to the *albertii* and *fergusonii* species or to cryptic clades ( $p = 0.001$ ). Similarly, phylogroup F strains were more phage-infected than phylogroup A strains ( $p = 0.01$ ) or cryptic clades and other non-*E. coli* species ( $p = 0.004$ ).

However, the pathogenic strains of *Escherichia* more frequently belong to phylogroups B2, D and F, whereas most strains of phylogroups A, B1 and E are commensal (36). We then asked whether the host range was wider in pathogenic strains than in commensal strains. We only focused on extraintestinal pathogenic strains (ExPEC) because our collection contained few intra-intestinal pathotypes. We found that ExPEC strains are susceptible to a greater range of phages than commensal strains ( $p < 0.001$ ) (Fig. 5c). We conclude here that certain phylogenetic traits related to the bacterial lifestyle could promote better resistance to phage infectivity.

### *Viral phylogeny*

As we assumed that phages belonging to the same viral genus share a large number of characteristics in common that could influence their ability to infect a specific host (RBP, capsule-targeting enzymes), we wondered to what extent the phylogeny of phages could influence the host range. On the phage-host interaction matrix ordered by viral genus (Figure S5), phages belonging to the same viral genus shared similar host ranges. We therefore looked at whether the magnitude of the host range varied according to viral phylogeny. We found that some viral genera could infect more hosts than others (Figure 5b). All these phages have a myovirus-like morphotype. Myophages infected four times more bacterial strains than siphophages or podophages: on average 144 (39.1%) against 34 (6.7%,  $p < 0.0001$ ) and 24 (9.4%,  $p < 0.0001$ ) hosts (Figure 5a). As myoviruses have a larger genome (Fig. S6c), we wondered if these differences could be explained by the size of the viral genome. The capsid size constrains size of the viral genome with a variation range of 5 to 10%, theoretically limiting the number of escape mechanisms that a phage can acquire (37). We found a strong positive correlation between viral genome size and host range size (Fig. S6a). But we no longer found this correlation within phages belonging to the same morphotype: a large variable size of the host ranges was observed for phages with identical genome sizes. Moreover, while genome size within the myovirus varied by a factor of two (from 70kb to over 160kb), the number of susceptible hosts was not correlated with genome size (Fig. S6b). We conclude that the viral morphotype, and not the size of the genome, is a factor associated to the size of the host range, with myovirus genera having a broader host range.

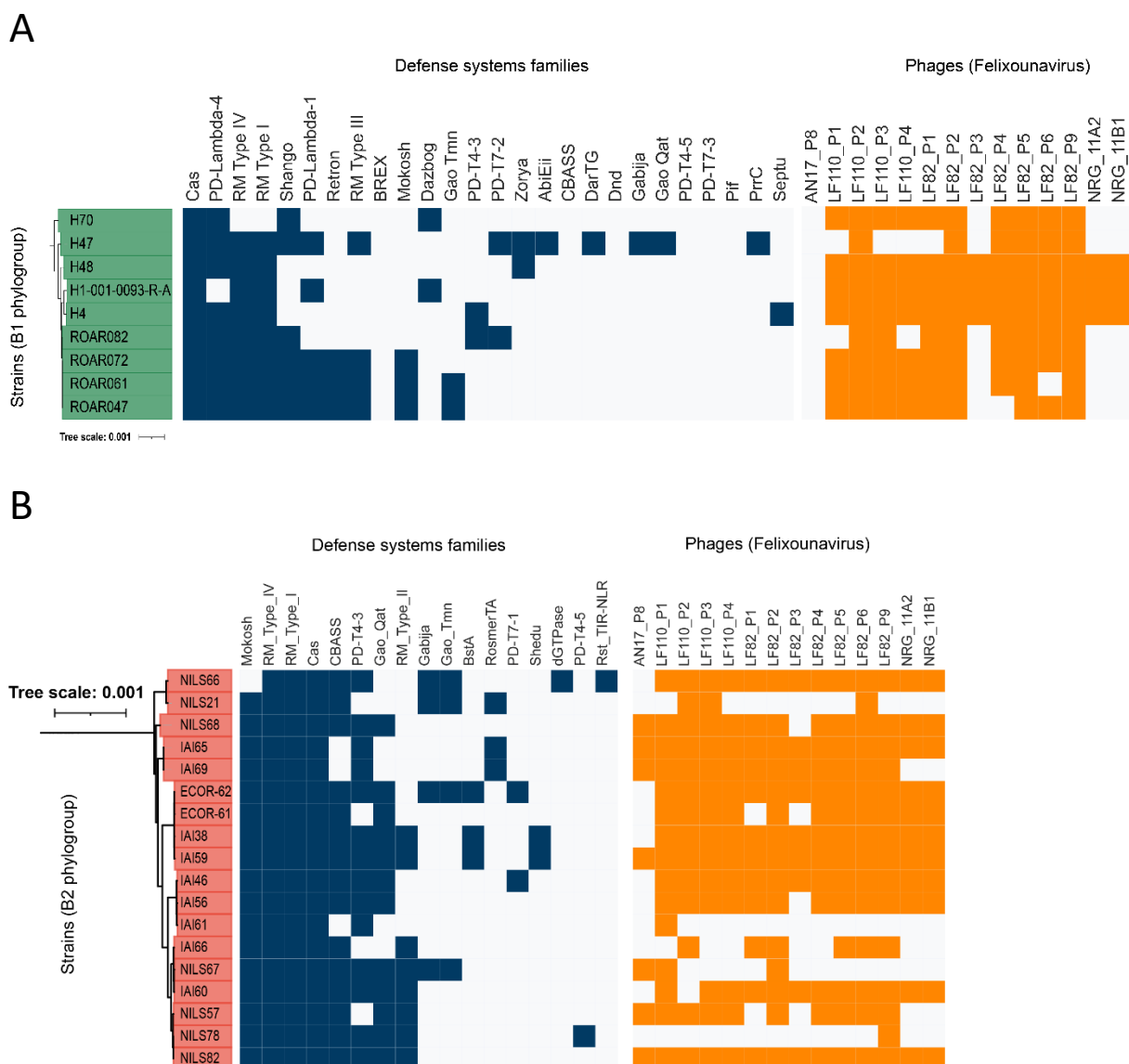




**Figure 5. Phage phylogeny and strain pathotype are determinant factors for host range.** (A) Percentage of *Escherichia* strains infected by phage according to their morphotype (comparison two by two by t-test), and (B) according to their viral genera (one-way ANOVA, post-hoc analysis by Tukey's HSD), colored by morphotype (podovirus, yellow; siphovirus, orange; myovirus, green). (C) Percentage of phages each bacterial strain can be infected by according to the bacterial lifestyle (comparison two by two by t-test), and (D) to the phylogroup (one-way ANOVA, post-hoc analysis by Tukey's HSD). ExPEC: extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*.

## Specificity of the host range at the individual level

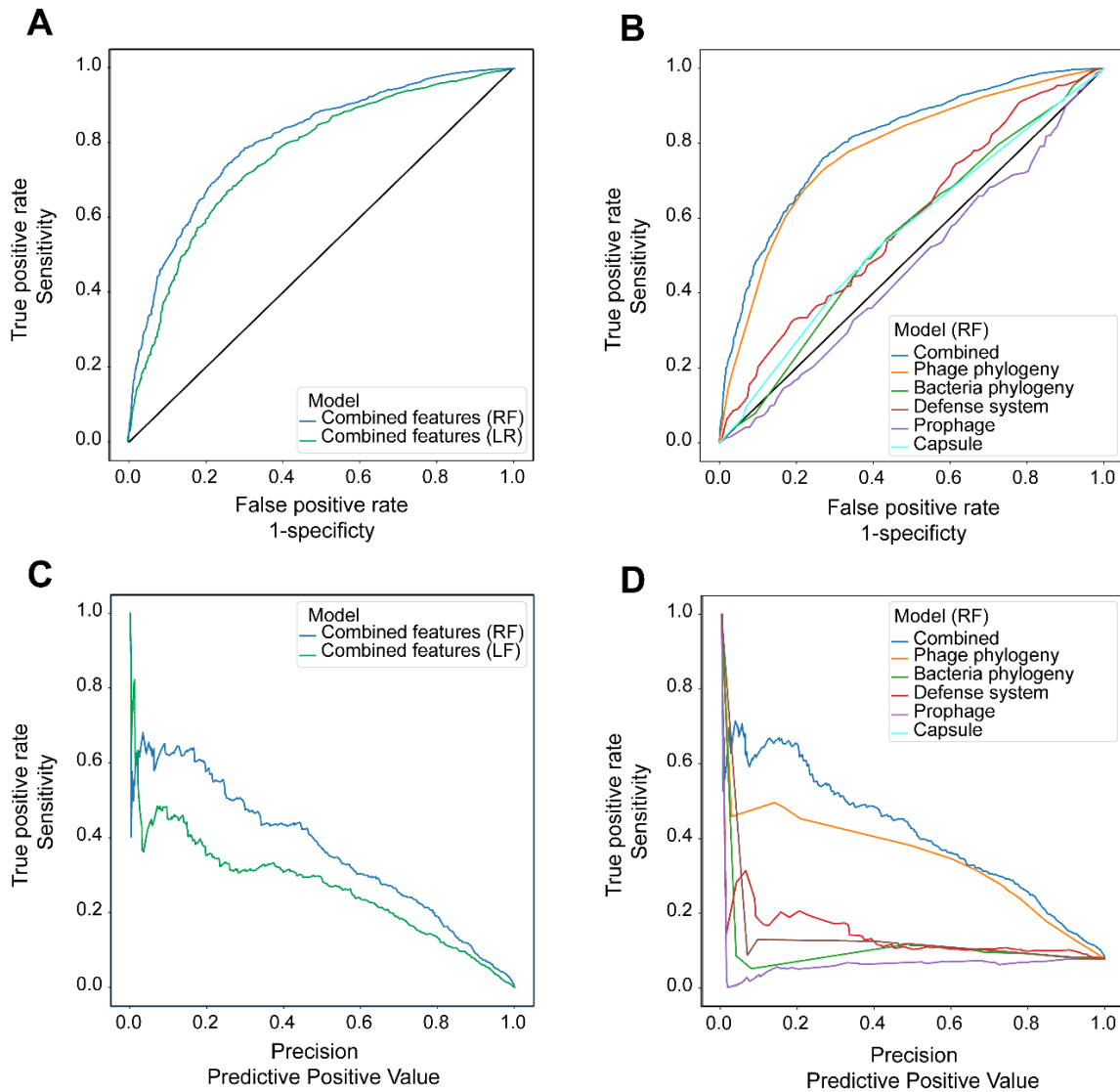
Environmental studies show that in very similar strains (38), the host range is solely determined by the defense systems. Thus, we examined closely related strains and found that, for example, within closed strains of phylogroup B1, only six strains have a Shango system: they are all resistant to three *Felixounaviruses* (LF82\_P3, NRG11A2 and NRG11B1) (figure 6a). Similarly, within phylogroup B2, the NILS78 strain encodes a PD-T4-5 system, unlike its close relatives, and have an almost pan-resistant phenotype to *Felixounavirus*, unlike close strains which are more susceptible (figure 6b). Thus, host range is shaped globally by phage phylogeny, but also appears to be determined to a finer degree by defense systems.



**Figure 6. Zoom in on the phage-bacteria interaction matrix to a finer degree.** Two examples are illustrated here: the interaction between phages of the *Felixounavirus* genus (myophage) and strains of phylogroup B1 (**A**), or strains of phylogroup B2 (**B**). Each positive phage-host interaction is represented by an orange square. The presence of a defense system in the bacterial genome is indicated by a blue square.

## Preliminary results of statistical models to predict bacteriophage-host interaction

As deduced from the above tests, characterizing the host specificity of phages remains challenging. Computational methods have been broadly implemented to investigate biological systems, including for virus-host interaction (17, 18, 21, 22, 39, 40). We wanted to determine to what degree we could predict phage-bacteria interactions in the *Escherichia* genus from previously explored phylogenetic and genomic data. Given the strong correlation we found between viral genus and host-range, we expected that the interactions would be mostly determined by viral genus. We also hypothesized that even if their number did not influence the size of the host range, a qualitative approach to the defense systems could reveal their impact on the host range. In the same way we assumed that by relating the genus of the prophages with the genus of the phage, we could determine if a phage is able to infect a bacterial host. We therefore started by developing two models: a linear logistic regression (LR) model and a random forest (RF) model, that we implemented with 21 viral genera, 15 host phylogenetic groups, as well as 89 families of defense systems, 5 capsule groups and 22 prophage genera. To do this, we separated our dataset into two balanced datasets for all features. The training dataset, corresponding to 70% of the phage-bacteria interactions, made it possible to train the models, which were then tested with the test dataset corresponding to the remaining 30% of interactions. We then assessed their performance using the F1 score (i.e. harmonic mean of precision and recall). Precision is the proportion of correctly predicted phage-bacteria interactions among all positive interactions that were predicted. Recall is the proportion of correctly predicted phage-bacteria interactions among all interactions that are actually positive. The models had poor predictive performances. The areas under the curve (AUC) of the ROC curves were 80.6% (RF) and 76.3%(LR), while those of the Precision-Recall curves were 47.2% (RF) and 38.5% (LR) (figure 7a and c). In the best-performing model, the F1 score reached a maximum of only 50.1% (RF), with an accuracy of 41.7%, a sensitivity of 62.9% and a specificity of 82, 8%. We also assessed the weight of different features in this model. Phage genera contributed most of the prediction (ROC-AUC ~77.8%, PR-AUC ~41.1%), while other categories had very little impact (figure 7b and d). We have some predictive power in this model, but our understanding of the host range determinants remains limited. Assessing the quality of these predictions gives us a way to measure our progress as the models improve. These analyzes were started only recently, and we expect that a better understanding of factors influencing host range will allow us to refine our models.



**Figure 7. Performance of host range predictive models.** 152 Genomic features were defined as potential predictors of host range (see methods) and used to build predictive models of the host range. **(A)(B)** ROC curves (the true positive rate (TPR) against the false positive rate (FPR) at various threshold settings), for a linear model (logistic regression, LR) and a nonlinear model (random forest, RF). **(C)(D)** Precision-Recall curves (the true positive rate (TPR) against the positive predictive value (PPV) at various threshold settings), for LR model and RF model.

## Discussion

In this study, we investigated what is shaping phage host-range within the genus *Escherichia*. We established that despite its huge variability, phage host range is associated to viral phylogeny on a large scale. In a second finer layer of reading, our results suggest that host range could be influenced by other traits such as defense systems.

We have used here collections which are intended to be exhaustive of the bacterial diversity of *Escherichia* and its phages. We thus hope to have resolved the representativeness biases of previous studies which analysed either the host range of very diverse phages against one or few strains, or that of a few phages against very diverse strains. Our standardized

methodology (see Methods) will facilitate its reproducibility and will make it possible to enrich it in the future with the missing viral genera.

However, our work has some limitations. First, our experimental approach was limited to the detection of lytic interactions, and therefore ignores all other alternative infectious cycles, mainly lysogeny, but also pseudo-lysogenic and chronic cycles. Then, a positive interaction here corresponded to the appearance of a lysis plaque in the bacterial overlay, which could be secondary to a productive infection (cell lysis during the release of the progeny), to an abortive infection, or to an phenomenon of lysis from without. This last phenomenon could however be easily excluded: it is estimated as rare and only appears by saturation of the surface receptors by virions leading to the destabilization of the cell envelope. Lysis can therefore be observed in a situation where the quantity of phage is much higher than that of bacteria but disappears for dilutions with a multiplicity of infection (MOI) much lower than 1 (41).

We initially thought that phage genome size could be a major constraint for broader host-range. While bacteria can dramatically expand their genome size (24, 42) and so integrate multiple defense systems (9), the limitation in the size of the phage genome that can be encapsidated (37) could limit the number of escape mechanisms a phage can encode. We rather found that polyvalency (i.e. ability to infect a broad range of hosts) was far more frequent in myophages. Our results are aligned with data obtained with environmental cyanophages amongst which myovirus-like structure displays broader host range than podovirus (43).

Variations in susceptibility to phages were also associated with bacterial lifestyle. Commensal strains were most resistant to phage infection than extra-intestinal pathogenic strains. As the non-pathogenic strains are thought to have a higher rate of genome divergence, notably via horizontal gene transfer (24), and that most of the *E. coli* anti-viral systems are carried on mobile genetic elements (44), a large turnover of mobile genetic elements could greatly enhance immune system of commensal *Escherichia* strains. Gut is extremely phage rich (45), compared to ExPEC ecological niches like urine (46), blood (47) or lung (48). Faced with intense and diverse viral selective pressures, commensal strains may need to acquire a wide range of antiviral mechanisms to escape phage predation. This trait also questions the influence of the strain used for phage isolation. We wonder whether phages isolated mainly from ExPEC strains (24 out of 35) are not preferentially adapted to infect this type of host, and in particular on a possible similar profile of defense systems and prophages of strains sharing the same lifestyle, which we will have to explore in the future.

Prophages are known to confer protection on the host against infection by another phage (49). Superinfection exclusion systems prevent the triggering of a new infection by the same or closely related phage, by preventing viral adsorption on its receptor, or by inhibiting the injection of the phage DNA (5). Superinfection immunity is more akin to a classic resistance phenomenon that can also counter more distant phages. Many prophages encode an antiviral

system (50). Some antiviral systems are even mainly detected in prophages (9), suggesting that these systems target competing phages while protecting the prophage from autoimmunity upon excision and virion production. It is therefore surprising that our results do not find an influence of the prophages of a bacterial host on the number of secondary phages able to infect it. *Escherichia* indeed encodes a high number of prophages in its genome but also an important viral phylogenetic diversity. Our analysis only focused on the number of phages, so it is not excluded that the specificity of the prophage genera repertoire can shape the interactions between a bacterial host and a secondary phage.

We also highlighted here that *Escherichia* strains had a larger arsenal of defense systems than the average of prokaryotic world (50% more defense systems) (9). Interestingly, increasing resistance mechanisms doesn't lead to a better protection against phage infection. Neither we observed major differences between ExPEC strains and commensal ones, for the number of defense systems or the number of families of defense systems (figure S7). The number of antiviral systems didn't influence here the size of the host-range, which does not exclude that, by their composition, the profiles of the defense systems do not shape the host ranges at individuals' level. Few antiviral systems are abundant, even almost ubiquitous, in *Escherichia* genomes, whereas most of them are far more specific. We previously found that the rare systems drive the defense arsenal towards a broader diversity (9). The profile of defense systems of the toto-resistant strains is similar to the average (data not shown). We will further explore how different defense systems pattern could explain that two strains have different susceptibility to a phage repertoire. We couldn't exclude that our perception of phage-host interaction through the prism of defense systems is probably limited by our poor knowledge of the immune systems of bacteria, especially as there is a difference between detections of a system without activity or of an active system. Many new systems have been discovered in the last few years. It is likely that many more will be identified, and their mechanisms characterized to give us a better understanding of the bacterial immune system.

In *Escherichia*, capsule didn't seem to shape host range, contrary to *Klebsiella* (51–53). Capsules are versatile features regarding phage-host interaction. The capsule might function as a primary receptor, to facilitate the irreversible binding to a cell wall component (54). Several phages of *E. coli* use the capsular antigen as receptor (55–57). But the capsules can also block the spatial access to the cell membrane receptor if the phage doesn't have the specific enzyme to degrade it (58, 59). Over 80 different types of *E. coli* capsules have been identified (60). This huge diversity is complexified by a frequent co-occurrence of capsule from different groups (11). Our understanding of capsule role to moderate phage-host-interaction was here limited through a quantitative approach. Interestingly, most of K1-dependant phages are siphovirus or podovirus (61), even if myovirus have been recently identified (54). Further investigation should be needed to understand how capsule diversity protect or facilitate some phage infection.

The preliminary predictive models that we have developed, explain only very imperfectly the interactions between the bacterial host and the phage in *Escherichia*. A main limitation is the

lack of consideration in our models of the first layer of selection: the interaction between viral RBPs and bacterial cell surface receptors. However, the known phage receptors of Gram-negative bacteria (61) are widespread or even ubiquitous. Their detection in the genome of bacterial strains then becomes non-informative. New tools have recently been developed to predict phage RBPs (62) as well as the prediction of domain-domain interactions between two proteins (63). We will therefore explore this direction in the future. We plan to detect all the structures that can be a receptor and to classify them (for example the type of O antigen, or the type of LPS core), as well as to predict the potential RBPs phages and the positive interaction with one of the possible bacterial receptors. We could thus test whether viral phylogeny shapes the host range mainly because two phages of the same genus share the same RBPs or whether other undetected traits such as anti-defense systems play a role.

Overall, this study provides a novel large-scale collection of *E. coli* phages, representative of their diversity, and uncovers new insights of determinants shaping phage host-range within the *Escherichia* genus. Further work will be needed to fill the gaps for developing *in silico* models that could predict the interaction between a given phage and a bacterium.

## **Materials and methods**

### **Culture media and solutions**

Strains were cultivated at 37°C on LB Lennox medium (agar or broth) (Becton Dickinson, USA). The thickness of the agar plates was standardized using an automatic pump dispensing 50 mL per 120mm x 120mm petri dish on a flat surface. Phosphate-buffered saline (PBS) was prepared by dissolving commercial tablet (Sigma-Aldrich, USA) in 200 mL of deionized water and sterilized by autoclaving. All the batch media were prepared within few days to ensure the most homogeneous condition.

### **Bacterial strains**

#### *Bacterial collection*

The bacterial collection including 370 strains was previously described. One strain could not be retrieved for this study. This collection representative of the phylogenetic diversity of the genus *Escherichia* includes strains belonging to the species *E. coli* ( $n = 325$ ), *E. albertii* ( $n = 7$ ), *E. fergusonii* ( $n = 5$ ), and to the cryptic clades of *Escherichia* ( $n = 32$ ). The 325 strains of *E. coli* belong to the eight phylogroups of the species: A ( $n = 72$ ), B1 ( $n = 41$ ), B2 ( $n = 111$ ), C ( $n = 35$ ), D ( $n = 20$ ), E ( $n = 19$ ), F ( $n = 12$ ) and G ( $n = 15$ ). Their characteristics are detailed by Galardini et al. The genomes of the 369 strains were already available.

### *Detection of genomic features*

We detected several genomic traits, known to confer phage resistance with the following tools: DefenseFinder (defense systems), CapsuleFinder (capsule operon), Virsorter2 (prophages) with a sorting of data by CheckV.

*In silico* typing of the clones was carried out using SRST2 for the sequence type (ST) according to the MultiLocus Sequence Typing (MLST) Warwick. Phylogroup were confirmed by the Clermont Typing software. Bacterial genomes were compared by PanACoTA and phylogenetic tree annotated with iTOL online tool.

### **Bacteriophage collection**

#### *Isolation*

Phages were isolated from different samples of sewage water collected over 10 years from several wastewater treatment plants of the urban region of Paris (France). Phage isolation was performed on a specific host with an enrichment step as described by Van Twest et al. Isolation host strains were all *E. coli* isolates, including clinical isolates from ventilator associated pneumonia ( $n = 22$ ), urinary tract infection ( $n = 2$ ), and intestinal strains from inflammatory bowel disease patients ( $n = 7$ ), as well as EAEC ( $n = 1$ ), commensal strain of mice ( $n = 1$ ) and lab strains (K12 and *E. coli* B,  $n = 2$ ). All phage lysates were filtered (0.2  $\mu\text{m}$ ) before use. By convention, phage titer was determined on the host of isolation.

#### *Genome sequencing*

Phages nucleic acid was extracted by a conventional molecular method. Briefly, after a pre-treatment of the lysate with DNase and RNase, capsid was disrupted by adding proteinase K and SDS, and the nucleic acid retrieved by phenol-chloroform-acid-isoamyl alcohol 25:24:1 separation followed by a sodium acetate-ethanol precipitation step. The libraries were constructed using the Nextera DNA prep Kit (Illumina, USA) according to the manufacturer's protocol. A pair-end sequencing (300 bp) was performed on a MiniSeq platform (Illumina, USA).

#### *Genome phage analysis*

Reads quality was checked using FastQC. Adapters and quality reads were trimmed by TrimGalore. Reads were *de novo* assembled with SPAdes in one single contig, and ambiguities were resolved with the Bandage visualizing tool. We used Prokka to annotate phage genomes with restriction of the database to phage genomes only. Phages were sorted by family and genus based on whole-genome blastn searches against the nonredundant nucleotide collection database. Genomic identities were assessed by two-by-two comparisons using BLASTn and calculated into a genomic proximity score ( $\% \text{ identity} \times \text{proximity length} / \text{phage genome length}$ ). This identity score was computed between genome of this study and ICTV reference genomes of phages. It allowed to identify extremely close related phages and to assign a taxonomic classification according to the latest release of the ICTV classification (June



2022). Virus assignment into genera ( $\geq 70\%$  similarities) and species ( $\geq 95\%$  similarities) ranks follows the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) genome identity thresholds.

Distance between phage were calculated by vConTACT2 v0.11.3, using both viral genomes of this study as well as the 77 public genomes of BASEL collection and the 4,482 RefSeq phage genomes. Phage phylogenic network was then visualized and annotated with Cystoscape software.

### *Composition of the collection*

In total 128 phages were sequenced and analyzed. Phages closely related to other isolates were deliberately excluded if they shared a nucleotide identity upon 98% unless they displayed obvious phenotypic difference of their host-range. Ultimately 120 unique phages were obtained, with 50 phage couples with a genomic proximity score between 98% and 100% but a different host range.

### **Plaques assays**

The infectivity of a given phage on a given host was quantified by plaques assays. First all the phage solutions titers were normalized at  $5 \times 10^8$  PFU/mL in PBS. Then the phage-bacteria interaction was assessed by adding a 2  $\mu$ L drop of phage solution on a bacterial lawn on a agar plate. Each bacterial strain was overlaid on agar plates, from a fresh liquid medium culture, that reached the exponential growth phase ( $OD_{600nm} 0.25 \approx 5 \times 10^7$  PFU/mL). Three different concentrations of each phage were tested ( $5 \times 10^8$  PFU/mL,  $5 \times 10^7$  PFU/mL and  $5 \times 10^6$  PFU/mL) against each bacterial strain, representing either a MOI 10, 1 or 0.1. The multiplexing and standardization of phage deposit was performed by automation with Viaflo 96 device (Integra Bioscience, Swiss). Agar plates were incubated overnight à 37°C. Three independent replicates were performed to assay the interactions of the 44,280 phage-bacteria couples at three different MOI.

The reading of the results was standardized. All plates have been digitized with a high-resolution scanner after 16 hours of incubation and reviewed manually. The result of each interaction was encoded according to deflection in bacterial lawn: 2 for a complete defect circle in the bacterial lawn, 1 for individual lysis plaques, 0 for no defect, -1 for uninterpretable result due to errors or artefacts. A summary of the interactions at the three MOIs was computed into a single predefined score: 0 for no interaction at the three concentrations, 1 for positive interaction (lysis for at least one of the highest concentrations), -1 for inconsistency (presence of lysis but not at the highest concentration). Discrepancies between replicates were resolved by retaining the most frequent value among the three replicates.

### **Association analysis**

To identify an association between the number of phages a strain can be infected by and the number of defense system families, capsules or prophages, we fitted linear regression models and computed a Pearson correlation test using Scipy library. We also explored the correlation

between phage genome size and the size of the host range with the same method. To compare the percentage of phage-host positive interactions according to the strain phylogroups and to a subset of phage genera (genera with more than three phages), we computed one-way ANOVA analysis with a post-hoc analysis by performing multiple pairwise comparison (Tukey's HSD) using bioinfokit library. t-test were used to compared two-by-two phage morphotypes and strain pathotype (statannot library).

### **Predictive models**

In order to have two comparable train and test datasets, we clusterized *Escherichia* strains, and then we splitted it to have a proportion of each group in both dataset, with a 70% / 30% ratio for train and test datasets. We then trained both linear (logistic regression) and nonlinear (random forest) statistical models, implemented with 152 different genomic and phylogenetic features (21 viral genera, 15 host phylogenetic groups, as well as 89 families of defense systems, 5 capsule groups and 22 prophages genera). We then evaluated their performance by computing AUC of ROC, Precision-Recall curves. Keeping best predictive model (random forest with all features implemented and maximum F1-score), we computed its sensitivity, specificity and accuracy.

### **Software libraries**

Bioinformatic code is based on the Python and Bash programming languages and the following softwares: Defense Finder v1.1.0, Capsule Finder (personal lab modified version), Virsorter2 v2.2.3, CheckV v1.0.1, Macsyfinder v2.0rc6, SRST2 software v0.2.0, Clermont Typing v21.03, PanACoTA v. 1.3.1, FastQC v0.11.8, Trim Galore v0.4.4\_dev, SPAdes v3.11.1, Prokka v1.14.5, BLAST v2.12.0+, vContact2 v0.11.3.

Analysis code is only based on the Python programming language and the following libraries: pandas v1.4.2, numpy v1.21.5, seaborn v0.11.2, matplotlib v3.5.1, plotly v5.6.0, bioinfokit v2.0.8, scipy v1.7.3, scikit-posthocs v0.7.0, statannot v0.2.3, statsmodels v0.13.2, squarify v0.4.3, python v3.9.12.

There are version of other softwares: Bandage v0.9.0, Cytoscape v3.7.1, iTOL v6.

### **Acknowledgments**

We thank Mélanie Magnan and Benoit Gacher for their help in adapting genome sequencing protocols. We acknowledge particularly all the team of the SEED lab for their contributions to picture plate acquisition and media preparation and pouring.

## References

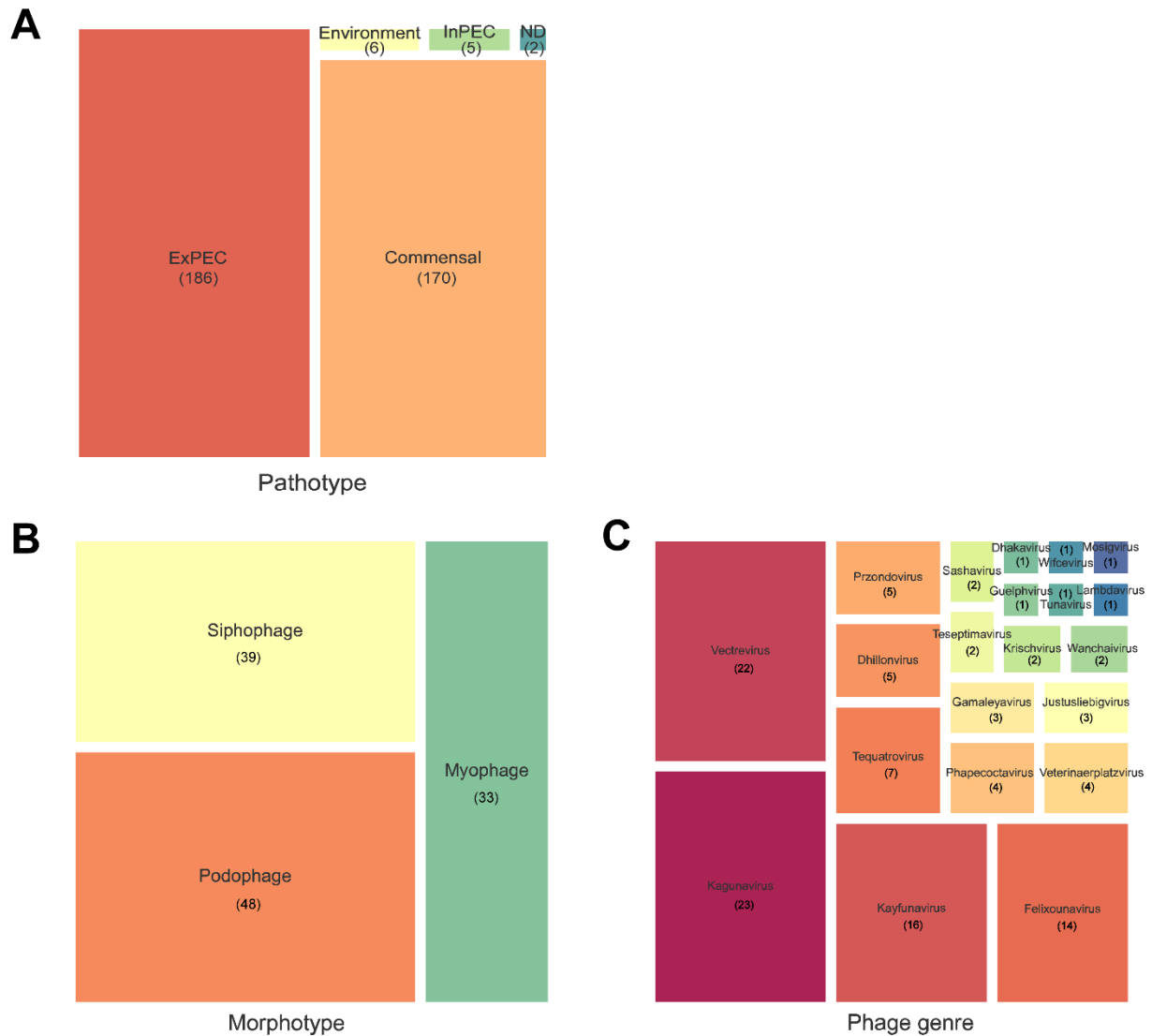
1. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E, Johnson SC, Browne AJ, Chipeta MG, Fell F, Hackett S, Haines-Woodhouse G, Hamadani BHK, Kumaran EAP, McManigal B, Agarwal R, Akech S, Albertson S, Amuasi J, Andrews J, Aravkin A, Ashley E, Bailey F, Baker S, Basnyat B, Bekker A, Bender R, Bethou A, Bielicki J, Boonkasidecha S, Bukosia J, Carvalheiro C, Castañeda-Orjuela C, Chansamouth V, Chaurasia S, Chiurchiù S, Chowdhury F, Cook AJ, Cooper B, Cressey TR, Criollo-Mora E, Cunningham M, Darboe S, Day NPJ, Luca MD, Dokova K, Dramowski A, Dunachie SJ, Eckmanns T, Eibach D, Emami A, Feasey N, Fisher-Pearson N, Forrest K, Garrett D, Gastmeier P, Giref AZ, Greer RC, Gupta V, Haller S, Haselbeck A, Hay SI, Holm M, Hopkins S, Iregbu KC, Jacobs J, Jarovsky D, Javanmardi F, Khorana M, Kissoon N, Kobeissi E, Kostyanev T, Krapp F, Krumkamp R, Kumar A, Kyu HH, Lim C, Limmathurotsakul D, Loftus MJ, Lunn M, Ma J, Mturi N, Munera-Huertas T, Musicha P, Mussi-Pinhata MM, Nakamura T, Nanavati R, Nangia S, Newton P, Ngoun C, Novotney A, Nwakanma D, Obiero CW, Olivas-Martinez A, Olliaro P, Ooko E, Ortiz-Brizuela E, Peleg AY, Perrone C, Plakkal N, Ponce-de-Leon A, Raad M, Ramdin T, Riddell A, Roberts T, Robotham JV, Roca A, Rudd KE, Russell N, Schnall J, Scott JAG, Shivamallappa M, Sifuentes-Osornio J, Steenkeste N, Stewardson AJ, Stoeva T, Tasak N, Thaiprakong A, Thwaites G, Turner C, Turner P, Doorn HR van, Velaphi S, Vongpradith A, Vu H, Walsh T, Waner S, Wangrangsimakul T, Wozniak T, Zheng P, Sartorius B, Lopez AD, Stergachis A, Moore C, Dolecek C, Naghavi M. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 399:629–655.
2. Geneva: World Health Organization. 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. disponible sur : <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241509763>. Retrieved 4 August 2022.
3. Koonin EV, Senkevich TG, Dolja VV. 2006. The ancient Virus World and evolution of cells. *Biol Direct* 1:29.
4. Bernheim A, Sorek R. 2020. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. 2. *Nat Rev Microbiol* 18:113–119.
5. Hampton HG, Watson BNJ, Fineran PC. 2020. The arms race between bacteria and their phage foes. 7790. *Nature* 577:327–336.
6. de Jonge PA, Nobrega FL, Brouns SJJ, Dutilh BE. 2019. Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range. *Trends Microbiol* 27:51–63.
7. Tadmor AD, Ottesen EA, Leadbetter JR, Phillips R. 2011. Probing Individual Environmental Bacteria for Viruses by Using Microfluidic Digital PCR. *Science* 333:58–62.
8. Barrero-Canosa J, Moraru C. 2019. PhageFISH for Monitoring Phage Infections at Single Cell Level. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1898:1–26.
9. Tesson F, Hervé A, Mordret E, Touchon M, d’Humières C, Cury J, Bernheim A. 2022. Systematic and quantitative view of the antiviral arsenal of prokaryotes. 1. *Nat Commun* 13:2561.
10. Payne LJ, Todeschini TC, Wu Y, Perry BJ, Ronson CW, Fineran PC, Nobrega FL, Jackson SA. 2021. Identification and classification of antiviral defence systems in bacteria and archaea with PADLOC reveals new system types. *Nucleic Acids Res* 49:10868–10878.
11. Rendueles O, Garcia-Garcerà M, Néron B, Touchon M, Rocha EPC. 2017. Abundance and co-occurrence of extracellular capsules increase environmental breadth: Implications for the emergence of pathogens. *PLOS Pathog* 13:e1006525.
12. Guo J, Bolduc B, Zayed AA, Varsani A, Dominguez-Huerta G, Delmont TO, Pratama AA, Gazitúa MC, Vik D, Sullivan MB, Roux S. 2021. VirSorter2: a multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. *Microbiome* 9:37.

13. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS. 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 44:W16-21.
14. Song W, Sun H-X, Zhang C, Cheng L, Peng Y, Deng Z, Wang D, Wang Y, Hu M, Liu W, Yang H, Shen Y, Li J, You L, Xiao M. 2019. Prophage Hunter: an integrative hunting tool for active prophages. *Nucleic Acids Res* 47:W74–W80.
15. Sirén K, Millard A, Petersen B, Gilbert MTP, Clokie MRJ, Sicheritz-Pontén T. 2021. Rapid discovery of novel prophages using biological feature engineering and machine learning. *NAR Genomics Bioinforma* 3:lqaa109.
16. Tynecki P, Guziński A, Kazimierczak J, Jadczyk M, Dastyk J, Onisko A. 2020. PhageAI - Bacteriophage Life Cycle Recognition with Machine Learning and Natural Language Processing. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.07.11.198606>.
17. Boeckeaerts D, Stock M, Criel B, Gerstmans H, De Baets B, Briers Y. 2021. Predicting bacteriophage hosts based on sequences of annotated receptor-binding proteins. 1. *Sci Rep* 11:1467.
18. Coutinho FH, Zaragoza-Solas A, López-Pérez M, Barylski J, Zielezinski A, Dutilh BE, Edwards R, Rodriguez-Valera F. 2021. RaFAH: Host prediction for viruses of Bacteria and Archaea based on protein content. *Patterns* 2:100274.
19. Young F, Rogers S, Robertson DL. 2020. Predicting host taxonomic information from viral genomes: A comparison of feature representations. *PLOS Comput Biol* 16:e1007894.
20. Gałan W, Bąk M, Jakubowska M. 2019. Host Taxon Predictor - A Tool for Predicting Taxon of the Host of a Newly Discovered Virus. 1. *Sci Rep* 9:3436.
21. Li M, Wang Y, Li F, Zhao Y, Liu M, Zhang S, Bin Y, Smith AI, Webb GI, Li J, Song J, Xia J. 2021. A Deep Learning-Based Method for Identification of Bacteriophage-Host Interaction. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 18:1801–1810.
22. Wang W, Ren J, Tang K, Dart E, Ignacio-Espinoza JC, Fuhrman JA, Braun J, Sun F, Ahlgren NA. 2020. A network-based integrated framework for predicting virus-prokaryote interactions. *NAR Genomics Bioinforma* 2:lqaa044.
23. Galiez C, Siebert M, Enault F, Vincent J, Söding J. 2017. WISH: who is the host? Predicting prokaryotic hosts from metagenomic phage contigs. *Bioinformatics* 33:3113–3114.
24. Galardini M, Clermont O, Baron A, Busby B, Dion S, Schubert S, Beltrao P, Denamur E. 2020. Major role of iron uptake systems in the intrinsic extra-intestinal virulence of the genus *Escherichia* revealed by a genome-wide association study. *PLOS Genet* 16:e1009065.
25. Touchon M, Perrin A, Sousa JAM de, Vangchhia B, Burn S, O'Brien CL, Denamur E, Gordon D, Rocha EP. 2020. Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. 6. *PLOS Genet* 16:e1008866.
26. Bondy-Denomy J, Qian J, Westra ER, Buckling A, Guttman DS, Davidson AR, Maxwell KL. 2016. Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. 12. *ISME J* 10:2854–2866.
27. Bobay L-M, Rocha EPC, Touchon M. 2013. The adaptation of temperate bacteriophages to their host genomes. *Mol Biol Evol* 30:737–751.
28. Iranzo J, Krupovic M, Koonin EV. 2016. The Double-Stranded DNA Virosphere as a Modular Hierarchical Network of Gene Sharing. 4. *mBio* 7:e00978-16.

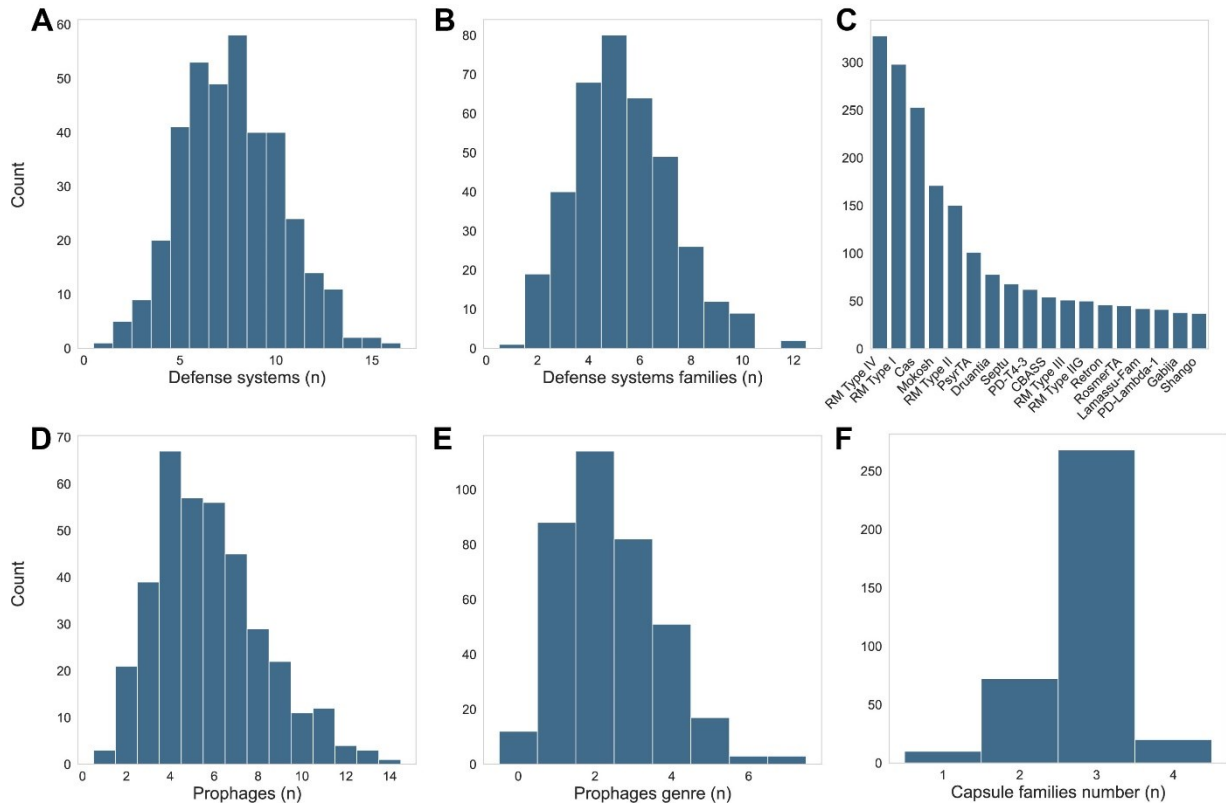
29. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. 2021. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. 3. *Viruses* 13:506.
30. Maffei E, Shaidullina A, Burkolter M, Heyer Y, Estermann F, Druelle V, Sauer P, Willi L, Michaelis S, Hilbi H, Thaler DS, Harms A. 2021. Systematic exploration of *Escherichia coli* phage–host interactions with the BASEL phage collection. *PLOS Biol* 19:e3001424.
31. Flores CO, Meyer JR, Valverde S, Farr L, Weitz JS. 2011. Statistical structure of host-phage interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:E288-297.
32. Abdelsattar AS, Dawooud A, Rezk N, Makky S, Safwat A, Richards PJ, El-Shibiny A. 2021. How to Train Your Phage: The Recent Efforts in Phage Training. 2. *Biologics* 1:70–88.
33. Molina F, Menor-Flores M, Fernández L, Vega-Rodríguez MA, García P. 2022. Systematic analysis of putative phage-phage interactions on minimum-sized phage cocktails. 1. *Sci Rep* 12:2458.
34. Pleška M, Qian L, Okura R, Bergmiller T, Wakamoto Y, Kussell E, Guet CC. 2016. Bacterial Autoimmunity Due to a Restriction-Modification System. *Curr Biol* 26:404–409.
35. Iranzo J, Lobkovsky AE, Wolf YI, Koonin EV. 2013. Evolutionary Dynamics of the Prokaryotic Adaptive Immunity System CRISPR-Cas in an Explicit Ecological Context. *J Bacteriol* 195:3834–3844.
36. Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. 2021. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. 1. *Nat Rev Microbiol* 19:37–54.
37. Nurmammedov E, Castelnovo M, Medina E, Catalano CE, Evilevitch A. 2012. Challenging Packaging Limits and Infectivity of Phage  $\lambda$ . *J Mol Biol* 415:263–273.
38. Piel D, Bruto M, Labreuche Y, Blanquart F, Goudenège D, Barcia-Cruz R, Chenivresse S, Le Panse S, James A, Dubert J, Petton B, Lieberman E, Wegner KM, Hussain FA, Kauffman KM, Polz MF, Bikard D, Gandon S, Rocha EPC, Le Roux F. 2022. Phage–host coevolution in natural populations. 7. *Nat Microbiol* 7:1075–1086.
39. Young F, Rogers S, Robertson DL. 2020. Predicting host taxonomic information from viral genomes: A comparison of feature representations. *PLOS Comput Biol* 16:e1007894.
40. Leite DMC, Brochet X, Resch G, Que Y-A, Neves A, Peña-Reyes C. 2018. Computational prediction of inter-species relationships through omics data analysis and machine learning. *BMC Bioinformatics* 19:420.
41. Abedon ST. 2011. Lysis from without. *Bacteriophage* 1:46–49.
42. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, Bingen E, Bonacorsi S, Bouchier C, Bouvet O, Calteau A, Chiapello H, Clermont O, Cruveiller S, Danchin A, Diard M, Dossat C, Karoui ME, Frapy E, Garry L, Ghigo JM, Gilles AM, Johnson J, Bouguéneq CL, Lescat M, Mangenot S, Martinez-Jéhanne V, Matic I, Nassif X, Oztas S, Petit MA, Pichon C, Rouy Z, Ruf CS, Schneider D, Tourret J, Vacherie B, Vallenet D, Médigue C, Rocha EPC, Denamur E. 2009. Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. 1. *PLOS Genet* 5:e1000344.
43. Sullivan MB, Waterbury JB, Chisholm SW. 2003. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Nature* 424:1047–1051.
44. Hochhauser D, Millman A, Sorek R. 2022. The defence island repertoire of the *Escherichia coli* pan-genome. preprint. *Microbiology*.
45. Zuppi M, Hendrickson HL, O’Sullivan JM, Vatanen T. 2022. Phages in the Gut Ecosystem. *Front Cell Infect Microbiol* 11:822562.

46. Żaczek M, Weber-Dąbrowska B, Międzybrodzki R, Górski A. 2020. Phage Prevalence in the Human Urinary Tract—Current Knowledge and Therapeutic Implications. *Microorganisms* 8:1802.
47. Haddock N, Barkal L, Ram-Mohan N, Kaber G, Chiu C, Bhatt A, Yang S, Bollyky P. 2022. The circulating phageome reflects bacterial infections 24.
48. Porto BN. 2022. Insights Into the Role of the Lung Virome During Respiratory Viral Infections. *Front Immunol* 13.
49. Abedon ST. 2015. Bacteriophage secondary infection. *Virol Sin* 30:3–10.
50. Rousset F, Depardieu F, Miele S, Dowding J, Laval A-L, Lieberman E, Garry D, Rocha EPC, Bernheim A, Bikard D. 2022. Phages and their satellites encode hotspots of antiviral systems. *Cell Host Microbe* 30:740-753.e5.
51. Blundell-Hunter G, Enright MC, Negus D, Dorman MJ, Beecham GE, Pickard DJ, Wintachai P, Voravuthikunchai SP, Thomson NR, Taylor PW. 2021. Characterisation of Bacteriophage-Encoded Depolymerases Selective for Key *Klebsiella pneumoniae* Capsular Exopolysaccharides. *Front Cell Infect Microbiol* 11:686090.
52. de Sousa JAM, Buffet A, Haudiquet M, Rocha EPC, Rendueles O. 2020. Modular prophage interactions driven by capsule serotype select for capsule loss under phage predation. 12. *ISME J* 14:2980–2996.
53. Townsend EM, Kelly L, Gannon L, Muscatt G, Dunstan R, Michniewski S, Sapkota H, Kiljunen SJ, Kolsi A, Skurnik M, Lithgow T, Millard AD, Jameson E. 2021. Isolation and Characterization of *Klebsiella* Phages for Phage Therapy. *Phage New Rochelle N* 2:26–42.
54. Gong Q, Wang X, Huang H, Sun Y, Qian X, Xue F, Ren J, Dai J, Tang F. 2021. Novel Host Recognition Mechanism of the K1 Capsule-Specific Phage of *Escherichia coli*: Capsular Polysaccharide as the First Receptor and Lipopolysaccharide as the Secondary Receptor. *J Virol* 95:e0092021.
55. Stirm S, Freund-Mölbert E. 1971. *Escherichia coli* capsule bacteriophages. II. Morphology. *J Virol* 8:330–342.
56. Fehmel F, Feige U, Niemann H, Stirm S. 1975. *Escherichia coli* capsule bacteriophages. VII. Bacteriophage 29-host capsular polysaccharide interactions. *J Virol* 16:591–601.
57. Scholl D, Rogers S, Adhya S, Merrill CR. 2001. Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it to infect and replicate on both K1 and K5 strains of *Escherichia coli*. *J Virol* 75:2509–2515.
58. Scholl D, Adhya S, Merrill C. 2005. *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7. *Appl Environ Microbiol* 71:4872–4874.
59. Soundararajan M, von Büнау R, Oelschlaeger TA. 2019. K5 Capsule and Lipopolysaccharide Are Important in Resistance to T4 Phage Attack in Probiotic *E. coli* Strain Nissle 1917. *Front Microbiol* 10:2783.
60. Whitfield C, Roberts IS. 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 31:1307–1319.
61. Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. 2016. Host receptors for bacteriophage adsorption. 4. *FEMS Microbiol Lett* 363:fnw002.
62. Boeckeaerts D, Stock M, De Baets B, Briers Y. 2022. Identification of Phage Receptor-Binding Protein Sequences with Hidden Markov Models and an Extreme Gradient Boosting Classifier. 6. *Viruses* 14:1329.
63. Gao M, Nakajima An D, Parks JM, Skolnick J. 2022. AF2Complex predicts direct physical interactions in multimeric proteins with deep learning. *Nat Commun* 13:1744.

## Supplementary data

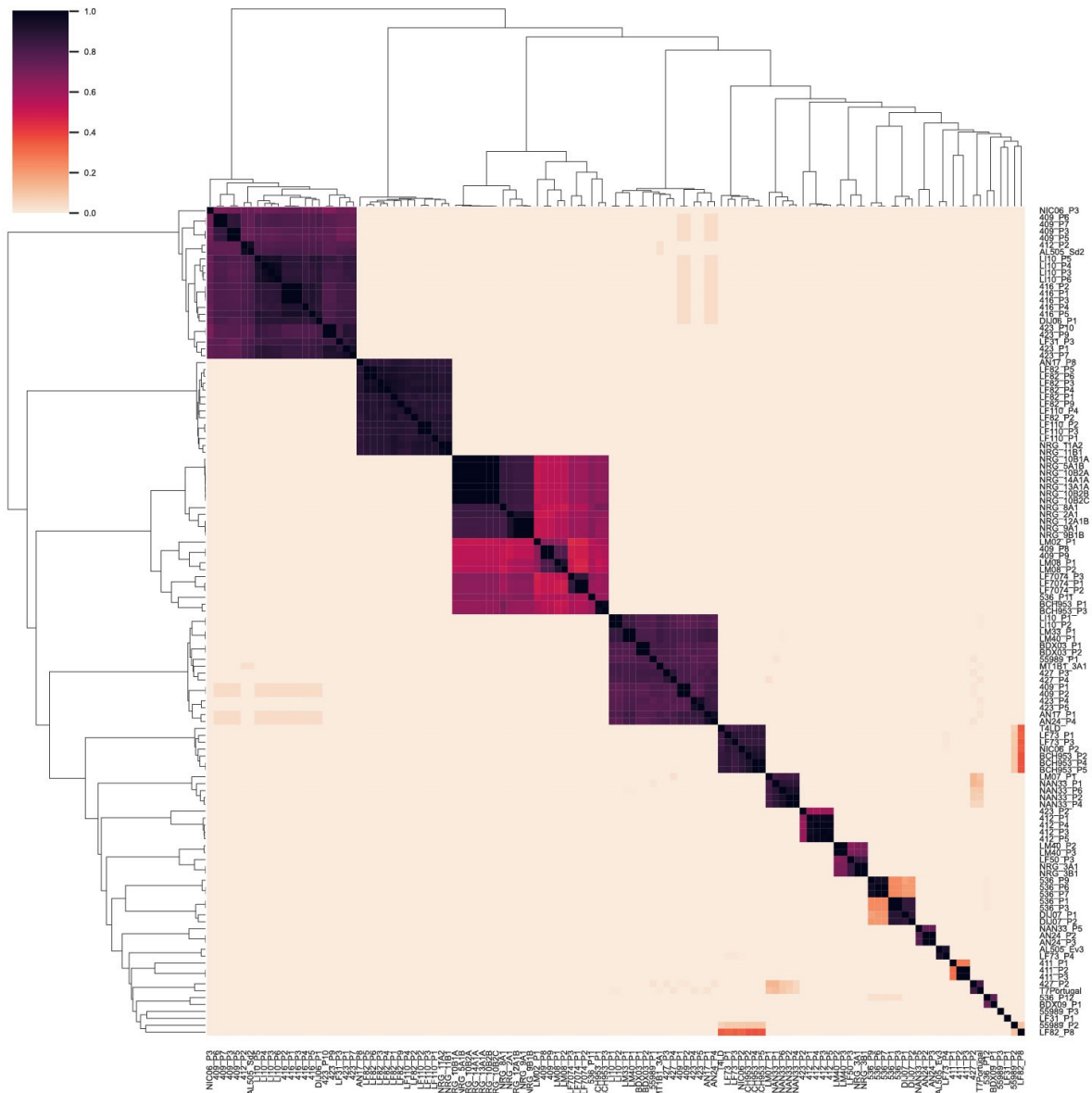


**Supplementary S1. Diversity of *Escherichia* bacterial strains and phages used in this study. (A)** Pathotypes of bacterial strains used in this study. ExPEC: extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*; ND: non-determined. **(B)** Morphotype of the phage of this study collection and **(C)** their viral genera.



**Supplementary S2. Anti-viral arsenal and prophages of the *Escherichia* strains genomes.** Histograms of genomic features encoded in bacterial genomes. **(A)** Number of each type of defense systems (some systems are present in multiple copy in the genome). **(B)** Number of defense systems families (example CRISPR-Cas, Restriction Modification, as compared to type like CRISPR-Cas Type I, RM Type I). **(C)** Most frequent families of defense systems (present in more than 10% of strains). **(D)** Number of prophages. **(E)** Number of different genera of prophages. **(F)** Number of capsule families (similar to the number of capsule systems).





**Supplementary S3. Genomes of the phages of this study collection cluster into more than 15 different groups, related to 21 ICTV genera.** Hierarchically clustered heat map of the identity score of the 120 phages genomes of this study collection. Genomic identities were assessed by two-by-two comparisons using *Blastn* and calculated into a genomic proximity score (% identity x proximity length / phage genome length). Heatmap was generated by hierarchical clustering using the complete linkage method in the Seaborn v 0.11.2 visualization module for Python v3.9.12. Clusters are indicated by the dendrogram.

<b>Common</b>	<b>This study</b>	<b>BASEL col.</b>	<b>RefSeq database</b>
<b><i>Caudoviricetes</i></b>	<b><i>Caudoviricetes</i></b>	<b><i>Caudoviricetes</i></b>	<b><i>Caudoviricetes</i></b>
<i>Dhillonvirus</i>	<i>Dhakavirus</i>	<i>Berlinvirus</i>	<i>Asterivirus*</i>
<i>Felixounavirus</i>	<i>Gamaleyavirus</i>	<i>Changchunvirus</i>	<i>Avunovirus*</i>
<i>Guelphvirus</i>	<i>Justusliebigvirus</i>	<i>Enquatrovirus</i>	<i>Bonnellvirus*</i>
<i>Lambdavirus</i>	<i>Kagunavirus</i>	<i>Eseptimavirus‡</i>	<i>Carltongylesvirus/Sabourvirus</i>
<i>Mosigvirus</i>	<i>Kayfunavirus</i>	<i>Hanrivervirus</i>	<i>Drulis virus*</i>
<i>Tequatrovirus</i>	<i>Krischvirus</i>	<i>Nonagvirus‡</i>	<i>Ermolevavirus*</i>
<i>Teseptimavirus</i>	<i>Phapecoctavirus</i>	<i>Peduovirus‡</i>	<i>Goslarvirus*</i>
<i>Tunavirus</i>	<i>Przondovirus</i>	<i>Punavirus‡</i>	<i>Jilinvirus*</i>
	<i>Sashavirus</i>	<i>Rtpvirus</i>	<i>Kuravirus</i>
	<i>Vectrevirus</i>	<i>Sertoctavirus</i>	<i>Kuttervirus</i>
	<i>Veterinaerplatzvirus</i>	<i>Seuratvirus‡</i>	<i>Lavrentievavirus*</i>
	<i>Wanchavirus</i>	<i>Teetrevirus</i>	<i>Muvirus*</i>
	<i>Wifcevirus</i>	<i>Tequintavirus‡</i>	<i>Uetakevirus*</i>
		<i>Tlsvirus</i>	<b><i>Microviridae</i></b>
		<i>Vequintavirus</i>	<i>Enterogokushovirus</i>
		<i>Warwickvirus</i>	<i>Emesvirus</i>
			<i>Gequatrovirus*</i>
			<i>Alphatrevirus</i>
			<b><i>Inoviridae</i></b>
			<i>Inovirus*</i>
			<i>Infulavirus*</i>
			<i>Lineavirus*</i>
			<b><i>Fiersviridae</i></b>
			<i>Qubevirus*</i>

**Supplementary S4. Phage genera of the known *E. coli* host-related phages.** Each genus is indicated in a different column depending on whether it is present in all collections, only in this study collection, or only in the BASEL collection, or in the RefSeq database. The viral genera are grouped in their class (*Caudoviricetes*) for the tailed phages and by family for the others.

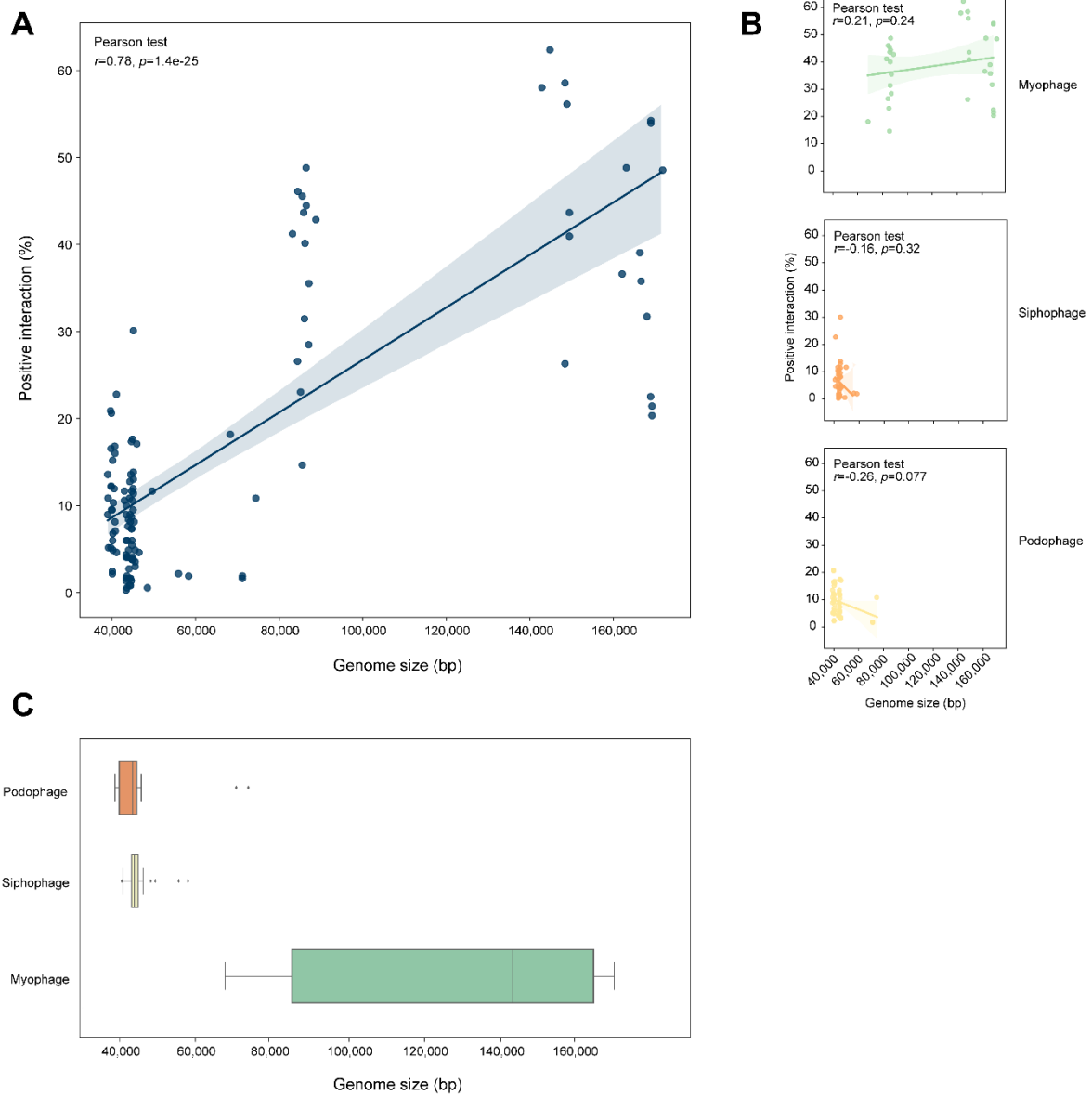
\* three or less representant *Escherichia* phages in RefSeq.

‡ genus whose don't belong to same cluster with phage of our collection.

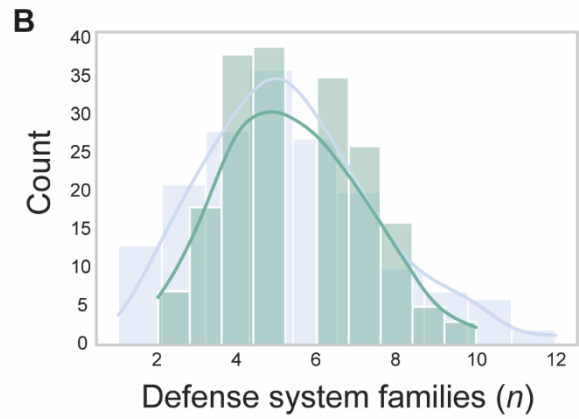
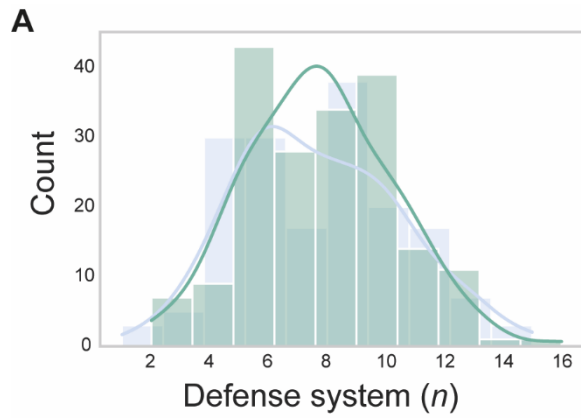
Phages ( $n=120$ )



**Supplementary S5. Phage host range patterns follow the viral phylogeny.** Matrix of the bacteria-phage interactions between the 369 strains (in rows) and the 120 phages (in columns). All 7373 positive interactions are represented by an orange square, representing the summary of three independent replicates of plaque assays. Bacterial strains are ordered according to the phylogenetic tree; phages are ranked by viral genus.



**Supplementary S6. Host range is broader in phages with larger genome.** Percentage of susceptible hosts according to the size of phage genomes, and fit linear regression model. A Pearson correlation test were performed using SciPy python module v1.9.0. **(A)** There is a strong correlation between genome size of a phage and the number of hosts it can infect. **(B)** Sub-analysis by morphotype show no correlation inside groups, suggesting than genome size could be a cofounder, as genome size of a phage depends on its morphotype **(C)**.



**Supplementary S7. Defense systems according to the bacterial lifestyle:** ExPEC (green) and commensal (blue). **(A)** Number of each type of defense systems (some systems are presents in multiple copy in the genome). **(B)** Number of defense systems families (example CRISPR-Cas, Restriction Modification, as compared to type like CRISPR-Cas Type I, RM Type I). ExPEC: extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*.

# **CHAPITRE 5**

-

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE**



La phagothérapie est en cours de développement en France et dans l'Union Européenne, accompagnée par des évolutions réglementaires (1–3). Après deux décennies de recherche préclinique croissante, la translation des connaissances au lit du patient est plus proche que jamais. En août 2022, près de 30 essais cliniques interventionnels, recensés sur ClinicalTrials.gov, vont bientôt débiter, sont en cours de recrutement de patients ou d'analyse de leurs résultats.

L'un des aspects essentiels de la relation entre un bactériophage et une bactérie est la capacité de ces deux entités à coévoluer pour contrecarrer les phénomènes de résistance et de contre-résistance. Ma thèse a porté sur l'étude des déterminants génétiques de la résistance bactérienne aux bactériophages à travers un modèle de phagothérapie pulmonaire chez *E. coli*. J'ai présenté ici trois approches pour explorer les interactions bactériophages-bactéries dans une perspective thérapeutique. Deux d'entre elles ont permis de mieux comprendre les dynamiques de coévolution entre un bactériophage et la bactérie ciblée (approches pharmacométrique *in silico* et génomique *in vivo*). La troisième propose une photographie de la diversité écologique des interactions bactériophage-hôte au sein du genre *Escherichia* (approche génomique *in vitro*). Ces connaissances pourront servir à trois étapes de la constitution d'un traitement personnalisé par bactériophages : 1) le choix des bactériophages, 2) leur assemblage, après identification des mécanismes de résistance, 3) la détermination des posologies et voies d'administration.

## **1. Résistance bactérienne au bactériophage : leçons pour la phagothérapie.**

### **a. La résistance comme facteur d'échec thérapeutique**

L'échec de la phagothérapie peut être défini comme une situation clinique dans laquelle le traitement par bactériophage ne parvient pas à guérir le patient en éliminant l'infection. Le contrôle de la densité bactérienne est l'élément central dans le succès d'un traitement antibactérien. Ceci répond à un double objectif : d'une part la diminution des lésions tissulaires, et d'autre part la réduction du risque de dissémination à distance du site infectieux initial.

#### La croissance de la population bactérienne favorise la résistance par mutation

La mutation *de novo* d'un composant de surface est l'unique mécanisme de résistance retrouvé au cours de la phagothérapie. En ce sens, nos résultats obtenus avec la souche *E. coli* 536 et le bactériophage 536\_P1 confirment le reste de la littérature sur le sujet (4)(revue en annexe). Comme la survenue de mutations dans un gène est proportionnel au nombre de générations bactériennes (taux d'erreur par réplication du génome) et à la taille de la population (nombre de réplifications), un contrôle de la croissance de la population bactérienne diminue l'émergence de la résistance aux bactériophages.



Ce contrôle doit être le plus précoce possible. Les premiers clones bactériens résistants sont détectés dès les premières heures de l'infection dans le couple bactériophage/hôte 536\_P1/536. Gordillo Altamirano et al. rapportent aussi plus de 80% de clones d'*A. baumannii* résistants par mutation dès la 11<sup>ème</sup> heure d'infection (5). Ces résultats sont similaires à d'autres données qui confirment l'émergence rapide de la résistance dès les premières heures de phagothérapie au cours de modèles pré-cliniques (6) ou bien encore dans les premiers jours du traitement de patients (7, 8).

### Un déséquilibre dans la synergie immunophage favorise la croissance incontrôlée des bactéries

Le contrôle de la densité bactérienne repose sur une synergie entre les bactériophages et le système immunitaire. Dans un précédent travail, nous avons démontré au laboratoire la nécessité d'une coopération entre les polynucléaires neutrophiles et les bactériophages pour la résolution d'une infection pulmonaire à *P. aeruginosa*. Le modèle éco-évolutif proposé, appelé synergie immunophage, posait le postulat que l'émergence d'une population bactérienne résistante au bactériophage ne serait un facteur d'échec thérapeutique que si les défenses immunitaires de l'hôte ne parvenaient plus à éliminer la bactérie pathogène (9). Nous avons confirmé par un nouveau modèle, cette fois-ci de pharmacométrie et chez *E. coli*, l'existence d'un seuil de densité bactérienne au-delà duquel le contrôle de l'infection nécessite une coopération entre le bactériophage et le système immunitaire murin. Ainsi, une diminution de l'efficacité du bactériophage ou du système immunitaire conduit à la saturation du système immunitaire, et donc à la réplication incontrôlée de la population bactérienne, favorisant l'émergence par mutation de clones résistants au bactériophage.

### Les facteurs de déséquilibre de la synergie immunophage

#### *Facteurs pharmacocinétiques*

L'un des facteurs réduisant la capacité du bactériophage à éliminer la population bactérienne sensible est son inaccessibilité spatiale. Pour les virus, qui ne sont pas mobiles, cette situation correspond à des problèmes de distribution jusqu'à l'organe cible et de concentration au site infectieux. Nous avons montré dans notre modèle pharmacométrique que le succès de la phagothérapie reposait en particulier sur des paramètres qui influencent la pharmacocinétique du bactériophage. Ainsi, la voie d'administration et la posologie impactent la capacité des bactériophages à contre-carrer la croissance bactérienne. Mais, l'intérêt des bactériophages passe aussi par leur capacité à s'amplifier au site infectieux, et donc à limiter, *a priori*, les conséquences d'une faible concentration. Or dans notre exemple, malgré des propriétés intrinsèques excellentes (*burst size* élevée et temps de latence faible), celles-ci ont eu un impact limité. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de De Sousa et al. qui ont montré par modélisation qu'un environnement compartimenté, dans lequel les bactéries ne sont pas facilement accessibles aux bactériophages, facilite l'émergence de populations bactériennes résistantes (10).

## *Biofilms*

Les bactéries ont également tendance sur certaines surfaces à s'organiser au sein de biofilms, constitués de colonies de cellules bactériennes reliées en un ensemble cohésif par une matrice extra-cellulaire. L'organisation structurale des biofilms peut fortement réduire la capacité d'un bactériophage à contrôler le foyer infectieux bactérien. D'une part, la matrice diminue la pénétration et la diffusion des bactériophages au sein du biofilm : elle forme une barrière protectrice épaisse et contient des enzymes capables d'inhiber les particules virales (11, 12). D'autre part, le contingent interne de la population bactérienne est métaboliquement peu actif, du fait d'un gradient de raréfaction des ressources en nutriments. Or, les bactériophages ont besoin d'une machinerie active de l'hôte pour se répliquer (13, 14). Enfin, les biofilms se structurent sous la dépendance du *Quorum Sensing*. La détection d'une densité virale élevée dans l'environnement immédiat, favorise l'expression de facteurs de résistance aux bactériophages : diminution du nombre de récepteurs en surface (15), répression de l'activation métabolique (16), activation de systèmes CRISPR-Cas (17, 18). Simmons et al. ont d'ailleurs montré que l'organisation de *E. coli* en biofilm favorise l'émergence de populations résistantes aux bactériophages. Des clones résistants s'organisent en grappes de cellules séquestrant les bactériophages pour empêcher leur accès à d'autres cellules (19).

### Immunodépression, pharmacocinétique et biofilm en pratique clinique

Les biofilms sont retrouvés dans 65 % de toutes les infections, notamment : 1) les infections associées aux dispositifs médicaux (cathéters, sonde urinaire), fréquentes en réanimation ; 2) les infections de prothèses orthopédiques ; 3) les infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose (20).

Les patients immunodéprimés englobent une partie importante de la population, représentant environ 3% des adultes (14,5 millions de personnes dans l'Union Européenne, et 10 millions d'individus aux Etats-Unis (21)). Un état d'immunodépression peut également s'installer, y compris chez les patients avec un système immunitaire sain, au cours d'une infection sévère. Cause majeure d'admission en réanimation, le sepsis est une réponse inflammatoire systémique induite par une infection, entraînant une altération de la réponse immunitaire innée et adaptative (22).

Enfin, des variations substantielles de la pharmacocinétique des médicaments sont fréquentes chez les patients en réanimation (23), diminuant considérablement l'efficacité attendue des traitements.

Toutes ces situations cliniques sont encore peu explorées dans les études pré-cliniques au laboratoire, notamment par manque de modèles animaux pertinents.

### Contrecarrer la résistance par des cocktails de bactériophages

L'assemblage de plusieurs bactériophages en un cocktail contraint la course à l'armement entre l'accumulation par l'hôte bactérien de mutations des récepteurs, et les modifications adaptatives des RBP par les bactériophages en retour. Le développement de la résistance

nécessite en effet des mutations dans de multiples *loci*, avec un coût sur le fitness bactérien augmenté. L'association de deux bactériophages diminue sensiblement la proportion de clones résistants de 10 - 20% à presque nulle dans des modèles murins de bactériémies (24, 25). Yuan et al. ont montré que dans ce dernier cas le cocktail de deux bactériophages réduisait jusqu'à 3 log le taux de mutations des souches d'*A. baumannii* par rapport à un bactériophage isolé (25). Cependant, la constitution du cocktail doit être soigneusement réfléchie. Si les bactériophages partagent le même récepteur, sa mutation confère une pan-résistance à moindre coût. L'association de plusieurs bactériophages non apparentés ciblant collectivement une gamme de récepteurs diverse, répartit ainsi la pression de sélection sur plusieurs récepteurs de bactériophages. Ceci requiert un intense travail de caractérisation des bactériophages au préalable. D'autres approches proposent de s'affranchir de cette limitation par la constitution de banques de bactériophages modifiés par bio-ingénierie couvrant l'essentiel de la diversité possible de leurs RBPs (26–28).

Nous avons débuté un travail préclinique visant à évaluer le succès d'une phagothérapie pulmonaire par des cocktails de plusieurs bactériophages dans un modèle murin à *E. coli* et *P. aeruginosa*. Ce travail, en collaboration avec d'autres équipes en France et en Allemagne, vise à comprendre notamment, comment la résistance bactérienne aux bactériophages peut émerger dans ce contexte en présence ou non d'autres facteurs (immunodépression, biofilms), et expliquer l'échec du traitement par bactériophage.

### **b. La résistance comme stratégie thérapeutique**

Devant l'émergence quasi-certaine d'une résistance bactérienne aux bactériophages, des auteurs recommandent de s'appuyer sur celle-ci au bénéfice du patient.

#### Coût physiologique de la résistance au cours de la phagothérapie

##### *Mutations des récepteurs et virulence*

L'acquisition de la résistance bactérienne aux bactériophages a souvent un coût sur d'autres traits bactériens (29, 30), notamment sa capacité à croître ou sa virulence. Comme exposé en introduction, les modifications des composants de la paroi cellulaire imposent un coût physiologique élevé pour la pathogénicité bactérienne. Dans notre modèle murin 85% des clones d'*E. coli* résistants au bactériophage 536\_P1 présentent une modification du LPS, associée à une diminution de leur croissance, de leur résistance à la phagocytose et de leur virulence. La résistance au traitement par bactériophage survient quasi-exclusivement par mutation dans un gène codant pour la synthèse d'un composant à la surface de la cellule hôte (5, 6, 31–33). Ces travaux, à la fois des modèles pré-cliniques et des cas cliniques, retrouvent systématiquement un compromis à l'acquisition de la résistance, qui s'accompagne en effet d'une diminution de la virulence bactérienne.

### *Contre-sélection des mécanismes de défense inductibles*

L'acquisition d'un nouveau système de défense est principalement médiée par transfert horizontal de gènes (34). Or, ces flux de gènes sont fortement réduits dans le contexte d'infections mono-bactériennes extra-intestinales, où les communautés microbiennes sont pauvres. Par ailleurs, si les mécanismes constitutifs de défense sont associés à un coût fixe, les mécanismes de défense inductibles sont typiquement associés à un coût de résistance induit (35–37). Le coût d'une stratégie de résistance inductible dépend en particulier de la densité virale (38), ce qui favorisait, dans une étude récente chez *P. aeruginosa*, l'immunité médiée par un système CRISPR par rapport à une résistance par modification de composants de la paroi bactérienne dont le coût est constant (39).

L'absence d'observation de tels mécanismes au cours de la phagothérapie suggère qu'une stratégie d'adaptation par mutation du récepteur est à la fois plus aisée, rapide et probablement moins coûteuse, notamment parce qu'il permet d'offrir une résistance à un plus large spectre de bactériophages que les systèmes inductibles. Notre analyse des systèmes de défense inductibles dans le genre *Escherichia* montre que la diversité ou le nombre de systèmes de défense inductibles ne sont pas associés à une résistance à une plus large gamme de bactériophages. La spécificité de ces systèmes inductibles (37, 40–43) impose leur multiplication ou celles des composants jouant le rôle de *senseur* dans ces systèmes (par ex. le nombre de *spacers* dans un système CRISPR), ce qui est coûteux, pour en faire des systèmes généralistes.

Deux stratégies possibles pour exploiter la résistance aux bactériophages sont proposées.

#### Stratégie n°1 : moduler la pathogénicité bactérienne par la résistance aux bactériophages

Certains auteurs ont proposé de contraindre la bactérie ciblée dans une impasse évolutive : sous la pression de plusieurs bactériophages, la bactérie ne pourrait résister qu'en accumulant plusieurs mutations, dont le coût cumulé réduirait voir anihilerait la virulence de la souche (44). Si cette approche est alléchante, nous avons montré que l'acquisition d'une résistance par mutation à un bactériophage n'était pas systématiquement associée à une perte de virulence.

#### Stratégie n°2 : re-sensibilisation de la bactérie à un autre agent antibactérien

Par ailleurs, la résistance aux bactériophages peut favoriser la sensibilisation à d'autres antibactériens, lorsque la résistance à un bactériophage induit des modifications structurelles à la surface bactérienne, comme des pompes d'efflux de médicaments (5, 45–48). Cependant, l'effet inverse a également été décrit : certaines mutations pour résister aux bactériophages confèrent une résistance accrue aux antibiotiques (49). De façon similaire, nous avons observé que l'acquisition d'une résistance au bactériophage 536\_P1 conduisait à la sensibilisation à d'autres bactériophages antérieurement non infectants. Ces résultats sont corroborés par Gordillo Altamirano et al. qui retrouvent une sensibilisation au bactériophage LK01 d'une

souche d'*A. baumannii* après traitement par le bactériophage FG02. Ces observations suggèrent que les cocktails de bactériophages ne doivent pas nécessairement inclure uniquement des bactériophages infectant la souche ciblée du patient, mais également ceux pouvant être à un moment donné sensibles aux clones mutés.

Le recours à ces stratégies thérapeutiques demande cependant de parfaitement caractériser les mécanismes de résistance en jeu et de les anticiper.

## **2. Prédire les dynamiques évolutives : enjeux et limites**

Pour répondre à cette question, le recours à des modèles prédictifs *in silico* peut permettre de simuler les dynamiques évolutives bactériophage-bactérie. Leur performance est fortement dépendante de la qualité des jeux de données qui servent à leur développement, leur amélioration et leur maintien. Elle est donc intimement liée aux biais des études expérimentales. Nous discutons ici ceux que nous avons identifiés dans nos travaux, et ne reprendront pas ceux concernant la détermination du spectre d'hôte que nous avons précédemment exposés dans le chapitre 4.

### Biais du modèle de pneumonie murine

Les biais de notre modèle préclinique limitent en partie la translation des résultats obtenus vers la pratique médicale. Ce modèle correspond à une infection suraigüe : l'inoculum bactérien est très important et l'efficacité du traitement dépend du contrôle de la densité bactérienne durant les premières heures. Cet état est imposé par la difficulté à obtenir des modèles létaux ou avec une morbidité objective chez la souris à partir d'inoculum plus faibles, comme l'illustre parfaitement les données acquises lors du premier travail : les individus infectés avec des inoculum sous le seuil de saturation du système immunitaire guérissaient rapidement même en l'absence de traitement. Malgré cette limitation, nos résultats nous permettent de conclure que les premières heures sont déterminantes pour l'efficacité du traitement par bactériophage, en miroir de ce qui a été décrit dans le traitement des infections sévères par des antibiotiques (50, 51). Le temps d'observation ne permet pas, en revanche, de prendre en compte le développement d'anticorps neutralisant les bactériophages puisque ceux-ci ne se développent au plus tôt qu'entre deux et dix jours après leur administration (52–55). Il ne permet pas non plus de comprendre la coévolution bactériophage-bactérie sur un temps plus long que les 48 premières heures.

### Limites des proxy *in vitro* à refléter les dynamiques *in vivo*

L'extrapolation de conclusions obtenues à partir de proxy *in vitro* pour comprendre les dynamiques au cours de la phagothérapie est également limitée. Cette extrapolation est rendue nécessaire pour répondre aux enjeux éthiques liés au bien-être animal au cours de l'expérimentation animale : la réduction du nombre d'animaux utilisés, la diminution de la

sévérité des procédures, et le remplacement par des méthodes alternatives si elles sont appropriées. Le développement de méthodes alternatives se heurte parfois à leur représentativité des résultats obtenus *in vivo*, mais aussi à leur adaptation à de nouveaux modèles infectieux. Ainsi, le modèle *D. discoideum* ne reflète que très imparfaitement la virulence de la souche dans le modèle de pneumonie, alors qu'il est bien corrélé à la pathogénicité des souches d'*E. coli* dans un modèle de septicémie (56). En effet, l'étude de la *fitness* des clones résistants de la souche *E. coli* 536 au bactériophage 536\_P1 retrouve une sensibilisation de tous ces clones au pâturage par le protozoaire, quel que soit la cible (LPS ou capsule), contrairement au modèle murin dans lequel les mutants de la capsule demeurent aussi virulents que la souche sauvage.

### Biais dans l'identification des mécanismes de résistance

L'identification des mécanismes de résistance peut s'accompagner d'un biais de mesure. Comme ces mécanismes s'accompagnent parfois d'un défaut extrême de la vitesse de croissance, le temps d'apparition de colonies visibles sur une gélose peut être considérablement allongé. Cela réduit la probabilité que ces clones soient étudiés, si la méthodologie n'est pas adaptée. Or, une capacité de croissance altérée dans un milieu de culture standard ne se reflète pas forcément dans un autre environnement (par exemple un organe).

### **3. Des connaissances au service d'une médecine personnalisée**

La médecine mute petit à petit vers l'utilisation de traitements spécifiques, sélectionnés de façon personnalisée en regard des caractéristiques uniques d'un individu, pour plus d'efficacité et moins d'effets secondaires. La phagothérapie a la capacité de pleinement s'inscrire, et même de promouvoir, cette marche vers la médecine personnalisée (57) (figure 31). L'utilisation d'aides automatisées à la décision pourra faciliter la définition d'une stratégie thérapeutique utilisant des bactériophages.

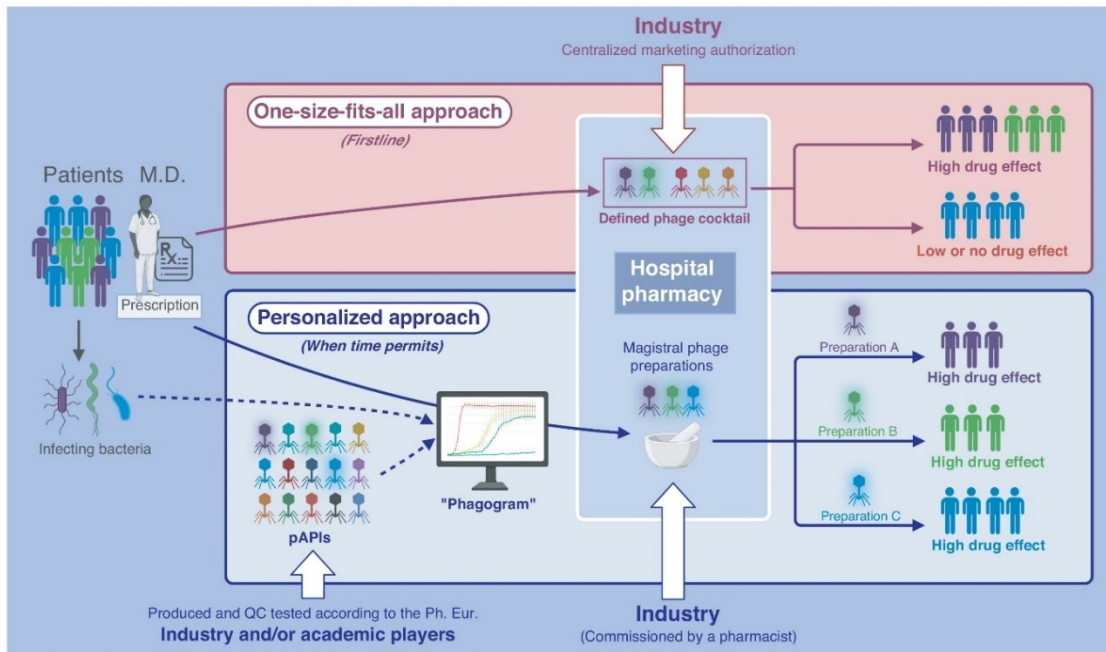


Figure 31. Deux paradigmes complémentaires de phagothérapie : la phagothérapie personnalisée et l'approche universelle.

Source: Verbeken et al. European regulatory aspects of phage therapy: magistral phage preparations. 2022 (57)

### Isoler et identifier les bactériophages efficaces

L'identification rapide du ou des meilleurs bactériophages pour cibler une bactérie pathogène est un enjeu crucial. Ceci doit inclure une meilleure compréhension des dynamiques de coévolution des mécanismes bactériens de résistance et d'adaptation réciproque du bactériophage. Notre analyse globale à l'échelle du genre *Escherichia* a souligné la complexité des déterminants du spectre d'hôte, dont un des composants majeurs est liée à la phylogénie virale. A ce stade, il nous est impossible de conclure si cette notion de phylogénie virale recoupe la diversité des RBPs, d'autres structures de la queue, des mécanismes anti-système de défense viraux, ou d'autres caractéristiques. Une analyse comparative du génome des bactériophages permettrait de combler ce manque de connaissances. Un nouvel outil permettant de prédire les RBPs des bactériophages a récemment été publié (58), ce qui nous permettrait de confirmer que les interactions récepteurs-RBPs façonnent le spectre d'hôtes à large échelle. De plus, nous nous attacherons prochainement à comprendre le rôle des systèmes de défense dans la spécificité interindividuelle du spectre d'hôtes.

Par ailleurs, l'isolement de bactériophages sur un profil de souches majoritairement pathogènes extra-intestinales a pu biaiser leur profil d'infektivité en faveur des EXPEC : nous allons essayer de comprendre en quoi le répertoire de prophages, de systèmes de défense et la phylogénie bactérienne des souches d'isolement pourrait influencer le spectre d'hôte d'une collection de bactériophages.

A moyen terme nous espérons mettre à disposition de la communauté scientifique et médicale un outil d'identification du « meilleur » bactériophage candidat, et d'orientation

vers l'hôte idéal pour isoler de nouveaux bactériophages afin d'enrichir une banque préexistante.

#### Déterminer la stratégie thérapeutique selon les mécanismes de résistance identifiés

Une approche mécanistique de la résistance est indispensable à l'adaptation des stratégies thérapeutiques comme nous l'avons précédemment discuté. Nos résultats suggèrent que les mécanismes de résistance mis en jeu dans les premières heures d'un traitement par bactériophage convergent avec ceux observés *in vitro*. Cela vient confirmer des observations préliminaires chez *P. aeruginosa*. Une évolution génomique similaire était retrouvée soit par mutation soit par augmentation de la fréquence de variants génétiques préexistants : 62 % des modifications génétiques *in vitro* ont été trouvées *in vivo*, dont 77 % étaient des mutations *de novo* (59). Des données cliniques viennent appuyer la possibilité de prédire les dynamiques évolutives par une expérience de coévolution en milieu liquide *in vitro*. En composant un cocktail de bactériophages avec un premier bactériophage efficace contre la bactérie initiale mais aussi avec des bactériophages pouvant infecter les clones d'*A. baumannii* résistants à ce premier bactériophage, cette stratégie a été couronnée de succès (8). Des études supplémentaires spécifiquement pensées en ce sens sont nécessaires pour confirmer la prédictibilité des mécanismes de résistance au cours d'un traitement, et leur généralisation à d'autres couples bactéries-bactériophages.

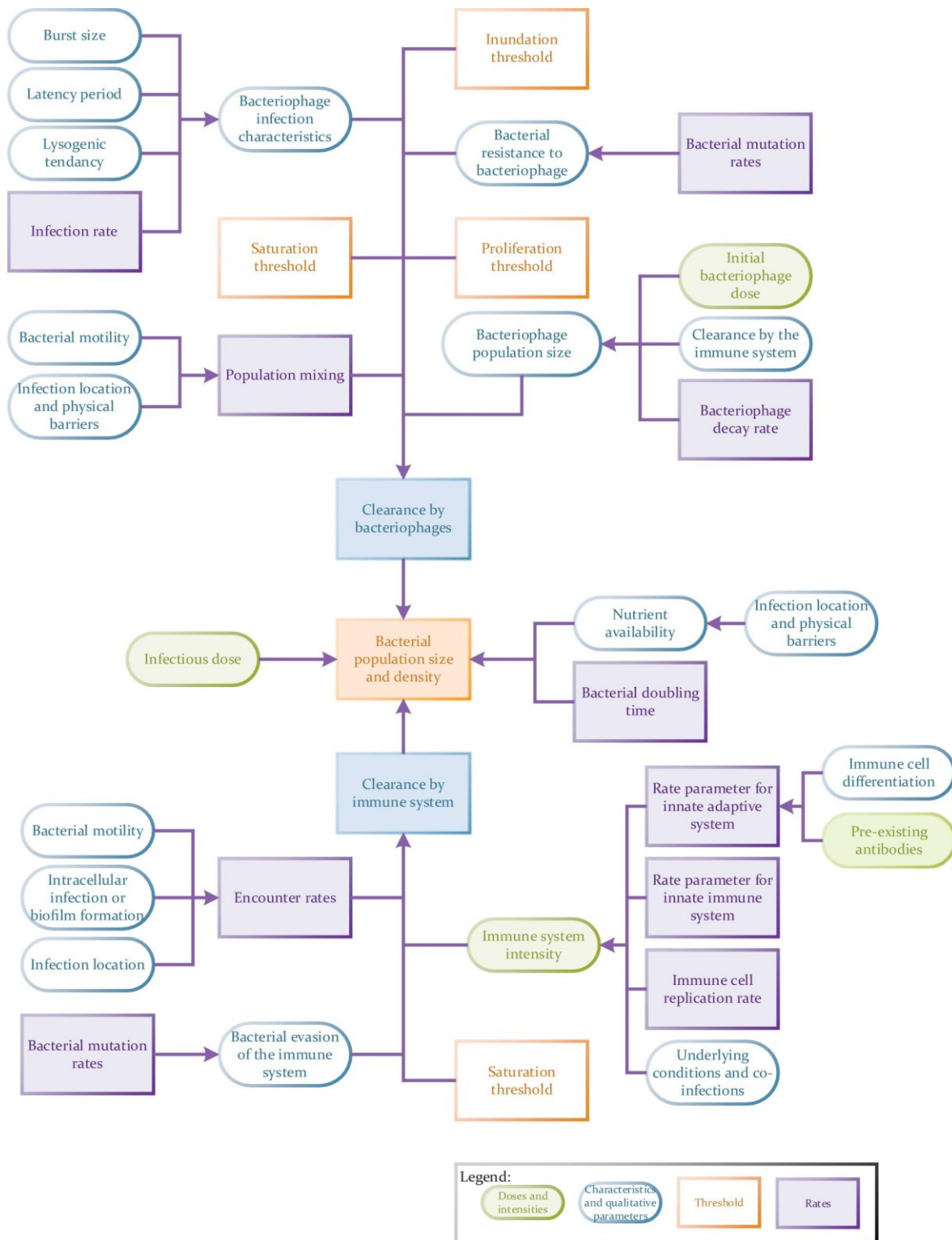
#### Définir les paramètres pharmacologiques du traitement

Notre modèle pharmacométrique permet de prédire l'efficacité sur la densité bactérienne du traitement par bactériophage en fonction de critères pharmacocinétiques (biodistribution) et pharmacodynamiques (neutralisation et élimination en fonction de la concentration au cours du temps) et des paramètres infectieux du bactériophage (burst size, temps de latence). A terme, des recommandations de posologie et de voie d'administration pourraient être proposés à l'aide de ce modèle, sous réserve de son extrapolation à d'autres sites infectieux et d'autres couples bactérie-bactériophage.

#### Collection de bactériophages de *E. coli*

Finalement, une phagothérapie comme traitement personnalisé nécessite la constitution et le maintien de banques de bactériophages pré-établies dans lesquelles piocher les meilleurs candidats sélectionnés à l'aide d'outils d'aide à la décision, comme ceux évoqués précédemment. Nous avons assemblé ici une large collection de bactériophages d'*E. coli*, présentant une grande diversité génomique et phylogénique, complémentaire de la collection BASEL (60). Elle sera mise à disposition de la communauté pour la recherche et la thérapie. La poursuite de sa caractérisation (annotations génomiques, identification de leurs récepteurs bactériens) est cependant indispensable pour répondre aux ambitions de ressource utile pour la phagothérapie.





**Figure 32. Complexité potentielle d'un modèle de phagothérapie prenant pleinement en compte les interactions hôte-pathogène-bactériophage.**

Source: Styles et al. A Review of Using Mathematical Modeling to Improve Our Understanding of Bacteriophage, Bacteria, and Eukaryotic. 2021 (61)

#### 4. Perspectives : vers des modèles complexes permettant leur généralisation

Nous souhaitons obtenir à terme un modèle pharmacométrique permettant d'anticiper l'évolution des densités bactériennes au cours d'une phagothérapie pulmonaire à partir des caractéristiques intrinsèques du bactériophage obtenu par *One Step Growth*, de la virulence attendue de la bactérie pathogène, et des paramètres pharmacocinétiques du bactériophage thérapeutique. Au laboratoire, j'ai encadré dernièrement un étudiant en Master 2 dont le sujet était de caractériser deux autres couples bactéries-bactériophages de façon identique au couple 536/536\_P1. Ces deux couples sont constitués d'une seule bactérie, *P. aeruginosa* souche PAK, et de deux bactériophages PAK\_P1 et CHA\_P1. Alors que PAK\_P1 a été isolé avec la souche PAK, CHAP\_P1 a été isolé avec la souche CHA et n'infecte la souche PAK qu'avec une EOP de 0,4. A l'aide d'un modèle de pneumonie aigüe initiée par la souche PAK, nous avons collecté un ensemble de données de biodistribution et d'efficacité qui est aujourd'hui utilisé pour implémenter le modèle initial. Enfin, les données recueillies au cours du projet franco-allemand portant sur l'efficacité d'un cocktail de bactériophages dans le traitement de pneumonies murines à *E. coli* et *P. aeruginosa* seront aussi utilisées pour raffiner ce modèle.

Nous cherchons également à développer des modèles prédictifs des interactions lytiques bactériophages-bactéries, à un degré de précision plus élevé que l'espèce, et basés sur un ensemble informatif de déterminants du spectre d'hôtes sous formes de données génomiques. Ces modèles visent à intégrer les différentes couches de sélection d'un bactériophage se basant sur la biologie d'un cycle infectieux (récepteurs, systèmes de défense et antisystèmes, modes de vie du bactériophage). Ils seront à terme confrontés à d'autres jeux de données (génomiques et matrices d'interactions) portant sur d'autres genres bactériens (*Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*) pour identifier leurs limites et les améliorer.

#### 5. Conclusion

Notre travail s'intéresse uniquement à la phagothérapie pensée comme une utilisation isolée de bactériophages pour traiter des infections bactériennes. Je n'y aborde donc pas sa version 2.0 qui consiste à combiner des bactériophages et d'autres agents antibactériens (antibiotiques, lysines, dépolymérase de biofilm, probiotiques...).

Les progrès réalisés ces dernières années dans la compréhension des interactions bactériophages-bactéries, notamment au cours de la phagothérapie, laissent espérer une translation accélérée en pratique clinique. Projetons-nous dans le futur et imaginons un patient hospitalisé en réanimation qui développe une pneumonie acquise sous ventilation mécanique. L'identification microbiologique de la bactérie causale révèle un *E. coli* multirésistant. Son génome complet est obtenu en quelques heures grâce aux nouvelles techniques de séquençage à la paillasse de type Nanopore. Les données génomiques sont

entrées dans un logiciel : un premier modèle identifie en quelques minutes les bactériophages candidats disponibles au sein d'une banque; puis un second modèle simule les mécanismes de résistance attendus aidant à adopter la stratégie thérapeutique (synergie avec un antibiotique, association de bactériophages, évolution dirigée vers l'avirulence); enfin un troisième modèle détermine la voie d'administration, la posologie, le nombre de doses et la durée du traitement idéal. Les bactériophages purifiés selon les conditions GMP sont alors assemblés dans un traitement personnalisé, qui sera administré au patient idéalement quelques heures après l'identification de la bactérie causale.

## Bibliographie de la discussion

1. ANSM. 2022. Phagothérapie : l'ANSM autorise un accès compassionnel pour des bactériophages dans les infections ostéo-articulaires. <https://ansm.sante.fr/actualites/phagotherapie-lansm-autorise-un-acces-compassionnel-pour-des-bacteriophages-dans-les-infections-osteo-articulaires>. Retrieved 23 August 2022.
2. Pelfrene E, Willebrand E, Cavaleiro Sanches A, Sebris Z, Cavaleri M. 2016. Bacteriophage therapy: a regulatory perspective. 8. *J Antimicrob Chemother* 71:2071–2074.
3. Verbeken G, Pirnay J-P. 2022. European regulatory aspects of phage therapy: magistral phage preparations. *Curr Opin Virol* 52:24–29.
4. Oechslin F. 2018. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. 7. *Viruses* 10:E351.
5. Gordillo Altamirano FL, Kostoulias X, Subedi D, Korneev D, Peleg AY, Barr JJ. 2022. Phage-antibiotic combination is a superior treatment against *Acinetobacter baumannii* in a preclinical study. *eBioMedicine* 80:104045.
6. Salazar KC, Ma L, Green SI, Zulk JJ, Trautner BW, Ramig RF, Clark JR, Terwilliger AL, Maresso AW. 2021. Antiviral Resistance and Phage Counter Adaptation to Antibiotic-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *mBio* 12:e00211-21.
7. Tan X, Chen H, Zhang M, Zhao Y, Jiang Y, Liu X, Huang W, Ma Y. 2021. Clinical Experience of Personalized Phage Therapy Against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Lung Infection in a Patient With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front Cell Infect Microbiol* 11:631585.
8. Wu N, Dai J, Guo M, Li J, Zhou X, Li F, Gao Y, Qu H, Lu H, Jin J, Li T, Shi L, Wu Q, Tan R, Zhu M, Yang L, Ling Y, Xing S, Zhang J, Yao B, Le S, Gu J, Qin J, Li J, Cheng M, Tan D, Li L, Zhang Y, Zhu Z, Cai J, Song Z, Guo X, Chen L-K, Zhu T. 2021. Pre-optimized phage therapy on secondary *Acinetobacter baumannii* infection in four critical COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* 10:612–618.
9. Roach DR, Leung CY, Henry M, Morello E, Singh D, Di Santo JP, Weitz JS, Debarbieux L. 2017. Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. *Cell Host Microbe* 22:38-47.e4.
10. de Sousa JAM, Buffet A, Haudiquet M, Rocha EPC, Rendueles O. 2020. Modular prophage interactions driven by capsule serotype select for capsule loss under phage predation. 12. *ISME J* 14:2980–2996.
11. Vidakovic L, Singh PK, Hartmann R, Nadell CD, Drescher K. 2018. Dynamic biofilm architecture confers individual and collective mechanisms of viral protection. *Nat Microbiol* 3:26–31.
12. González-Gómez JP, González-Torres B, Guerrero-Medina PJ, López-Cuevas O, Chaidez C, Avila-Novoa MG, Gutiérrez-Lomelí M. 2021. Efficacy of Novel Bacteriophages against *Escherichia coli* Biofilms on Stainless Steel. *Antibiotics* 10:1150.
13. Łoś M, Golec P, Łoś JM, Weglewska-Jurkiewicz A, Czyz A, Wegrzyn A, Wegrzyn G, Neubauer P. 2007. Effective inhibition of lytic development of bacteriophages lambda, P1 and T4 by starvation of their host, *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol* 7:13.

14. Bryan D, El-Shibiny A, Hobbs Z, Porter J, Kutter EM. 2016. Bacteriophage T4 Infection of Stationary Phase *E. coli*: Life after Log from a Phage Perspective. *Front Microbiol* 7:1391.
15. Høyland-Kroghsbo NM, Maerkedahl RB, Svenningsen SL. 2013. A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. *mBio* 4:e00362-00312.
16. Qin X, Sun Q, Yang B, Pan X, He Y, Yang H. 2017. Quorum sensing influences phage infection efficiency via affecting cell population and physiological state. *J Basic Microbiol* 57:162–170.
17. Høyland-Kroghsbo NM, Paczkowski J, Mukherjee S, Broniewski J, Westra E, Bondy-Denomy J, Bassler BL. 2017. Quorum sensing controls the *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR-Cas adaptive immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:131–135.
18. Broniewski JM, Chisnall MAW, Høyland-Kroghsbo NM, Buckling A, Westra ER. 2021. The effect of Quorum sensing inhibitors on the evolution of CRISPR-based phage immunity in *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J* 15:2465–2473.
19. Simmons EL, Bond MC, Koskella B, Drescher K, Bucci V, Nadell CD. 2020. Biofilm Structure Promotes Coexistence of Phage-Resistant and Phage-Susceptible Bacteria. *mSystems* 5:e00877-19.
20. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, Hussain T, Ali M, Rafiq M, Kamil MA. 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc JCMA* 81:7–11.
21. Harpaz R, Dahl RM, Dooling KL. 2016. Prevalence of Immunosuppression Among US Adults, 2013. *JAMA* 316:2547–2548.
22. Delano MJ, Ward PA. 2016. The immune system’s role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol Rev* 274:330–353.
23. Smith BS, Yogaratnam D, Levasseur-Franklin KE, Forni A, Fong J. 2012. Introduction to drug pharmacokinetics in the critically ill patient. *Chest* 141:1327–1336.
24. Hesse S, Malachowa N, Porter AR, Freedman B, Kobayashi SD, Gardner DJ, Scott DP, Adhya S, DeLeo FR. 2021. Bacteriophage Treatment Rescues Mice Infected with Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258. *mBio* 12:e00034-21.
25. Yuan Y, Wang L, Li X, Tan D, Cong C, Xu Y. 2019. Efficacy of a phage cocktail in controlling phage resistance development in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Virus Res* 272:197734.
26. Yehl K, Lemire S, Yang AC, Ando H, Mimee M, Torres MDT, de la Fuente-Nunez C, Lu TK. 2019. Engineering Phage Host-Range and Suppressing Bacterial Resistance through Phage Tail Fiber Mutagenesis. *Cell* 179:459-469.e9.
27. Latka A, Lemire S, Grimon D, Dams D, Maciejewska B, Lu T, Drulis-Kawa Z, Briers Y. 2021. Engineering the Modular Receptor-Binding Proteins of *Klebsiella* Phages Switches Their Capsule Serotype Specificity. *mBio* 12:e00455-21.
28. Dams D, Brøndsted L, Drulis-Kawa Z, Briers Y. 2019. Engineering of receptor-binding proteins in bacteriophages and phage tail-like bacteriocins. *Biochem Soc Trans* 47:449–460.
29. Lenski RE, Levin BR. 1985. Constraints on the Coevolution of Bacteria and Virulent Phage: A Model, Some Experiments, and Predictions for Natural Communities. *Am Nat* 125:585–602.

30. Mangalea MR, Duerkop BA. 2020. Fitness Trade-Offs Resulting from Bacteriophage Resistance Potentiate Synergistic Antibacterial Strategies. *Infect Immun* 88:e00926-19.
31. Oechslin F. 2018. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses* 10:E351.
32. Egado JE, Costa AR, Aparicio-Maldonado C, Haas P-J, Brouns SJJ. 2021. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiol Rev* 46:fuab048.
33. Engeman E, Freyberger HR, Corey BW, Ward AM, He Y, Nikolich MP, Filippov AA, Tyner SD, Jacobs AC. 2021. Synergistic Killing and Re-Sensitization of *Pseudomonas aeruginosa* to Antibiotics by Phage-Antibiotic Combination Treatment. *3. Pharmaceuticals* 14:184.
34. Rocha EPC, Bikard D. 2022. Microbial defenses against mobile genetic elements and viruses: Who defends whom from what? *PLOS Biol* 20:e3001514.
35. van Houte S, Ekroth AKE, Broniewski JM, Chabas H, Ashby B, Bondy-Denomy J, Gandon S, Boots M, Paterson S, Buckling A, Westra ER. 2016. The diversity-generating benefits of a prokaryotic adaptive immune system. *Nature* 532:385–388.
36. Vale PF, Lafforgue G, Gatchitch F, Gardan R, Moineau S, Gandon S. 2015. Costs of CRISPR-Cas-mediated resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Proc R Soc B Biol Sci* 282:20151270.
37. Pleška M, Guet CC. 2017. Effects of mutations in phage restriction sites during escape from restriction–modification. *Biol Lett* 13:20170646.
38. Tollrian R, Harvell CD. 1999. *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. Princeton University Press.
39. Westra ER, van Houte S, Oyesiku-Blakemore S, Makin B, Broniewski JM, Best A, Bondy-Denomy J, Davidson A, Boots M, Buckling A. 2015. Parasite Exposure Drives Selective Evolution of Constitutive versus Inducible Defense. *Curr Biol* 25:1043–1049.
40. Pleška M, Qian L, Okura R, Bergmiller T, Wakamoto Y, Kussell E, Guet CC. 2016. Bacterial Autoimmunity Due to a Restriction-Modification System. *Curr Biol* 26:404–409.
41. Tyson GW, Banfield JF. 2008. Rapidly evolving CRISPRs implicated in acquired resistance of microorganisms to viruses. *Environ Microbiol* 10:200–207.
42. Díez-Villaseñor C, Almendros C, García-Martínez J, Mojica FJM. 2010. Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*. *Microbiol Read Engl* 156:1351–1361.
43. Weinberger AD, Sun CL, Pluciński MM, Deneff VJ, Thomas BC, Horvath P, Barrangou R, Gilmore MS, Getz WM, Banfield JF. 2012. Persisting viral sequences shape microbial CRISPR-based immunity. *PLoS Comput Biol* 8:e1002475.
44. Torres-Barceló C, Turner PE, Buckling A. 2022. Mitigation of evolved bacterial resistance to phage therapy. *Curr Opin Virol* 53:101201.
45. Segall AM, Roach DR, Strathdee SA. 2019. Stronger together? Perspectives on phage-antibiotic synergy in clinical applications of phage therapy. *Curr Opin Microbiol* 51:46–50.

46. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. 2016. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. 1. *Sci Rep* 6:26717.
47. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, Barr JJ, Reed SL, Rohwer F, Benler S, Segall AM, Taplitz R, Smith DM, Kerr K, Kumaraswamy M, Nizet V, Lin L, McCauley MD, Strathdee SA, Benson CA, Pope RK, Leroux BM, Picel AC, Mateczun AJ, Cilwa KE, Regeimbal JM, Estrella LA, Wolfe DM, Henry MS, Quinones J, Salka S, Bishop-Lilly KA, Young R, Hamilton T. 2017. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00954-17.
48. Chang RYK, Chow MYT, Wang Y, Liu C, Hong Q, Morales S, McLachlan AJ, Kutter E, Li J, Chan H-K. 2022. The effects of different doses of inhaled bacteriophage therapy for *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections in mice. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 28:983–989.
49. Burmeister AR, Fortier A, Roush C, Lessing AJ, Bender RG, Barahman R, Grant R, Chan BK, Turner PE. 2020. Pleiotropy complicates a trade-off between phage resistance and antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:11207–11216.
50. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. 2018. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Med* 44:925–928.
51. Naucler P, Huttner A, van Werkhoven CH, Singer M, Tattévin P, Einav S, Tängdén T. 2021. Impact of time to antibiotic therapy on clinical outcome in patients with bacterial infections in the emergency department: implications for antimicrobial stewardship. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 27:175–181.
52. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, Carlton R, Merrill CR. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 70:204–210.
53. Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, Sun Z, Reed E, Ding L, Gong J, Li QQ, Hu J. 2006. Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Med* 17:309–317.
54. Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, Sun Z, Tao D, Ding L, Reed E, Gong J, Li QQ, Hu J. 2006. Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of mice with extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia. *Int J Mol Med* 17:347–355.
55. Hodyra-Stefaniak K, Miernikiewicz P, Drapała J, Drab M, Jończyk-Matysiak E, Lecion D, Kaźmierczak Z, Beta W, Majewska J, Harhala M, Bubak B, Kłopot A, Górski A, Dąbrowska K. 2015. Mammalian Host-Versus-Phage immune response determines phage fate in vivo. *Sci Rep* 5:14802.
56. Adiba S, Nizak C, van Baalen M, Denamur E, Depaulis F. 2010. From grazing resistance to pathogenesis: the coincidental evolution of virulence factors. *PLoS One* 5:e11882.
57. Verbeken G, Pirnay J-P. 2022. European regulatory aspects of phage therapy: magistral phage preparations. *Curr Opin Virol* 52:24–29.
58. Boeckaerts D, Stock M, Criel B, Gerstmans H, De Baets B, Briers Y. 2021. Predicting bacteriophage hosts based on sequences of annotated receptor-binding proteins. 1. *Sci Rep* 11:1467.

59. Castledine M, Padfield D, Sierocinski P, Soria Pascual J, Hughes A, Mäkinen L, Friman V-P, Pirnay J-P, Merabishvili M, de Vos D, Buckling A. 2022. Parallel evolution of *Pseudomonas aeruginosa* phage resistance and virulence loss in response to phage treatment in vivo and in vitro. *eLife* 11:e73679.
60. Maffei E, Shaidullina A, Burkolter M, Heyer Y, Estermann F, Druelle V, Sauer P, Willi L, Michaelis S, Hilbi H, Thaler DS, Harms A. 2021. Systematic exploration of *Escherichia coli* phage–host interactions with the BASEL phage collection. *PLOS Biol* 19:e3001424.
61. Styles KM, Brown AT, Sagona AP. 2021. A Review of Using Mathematical Modeling to Improve Our Understanding of Bacteriophage, Bacteria, and Eukaryotic Interactions. *Front Microbiol* 12.





# **ANNEXE**



## Title

Considering the role of the animal host in the management of bacteriophage resistance during phage therapy

## Authors

Baptiste Gaborieau and Laurent Debarbieux

## Abstract

Multi-drug resistant (MDR) bacteria are associated with a significant increase in morbidity and mortality. While the discovery of new antibiotics remains weak, phage therapy, the use of bacteriophages infecting bacteria to cure infections, is investigated as alternative or complementary treatment to antibiotics. However, one of the major limitations of this approach lies in the antagonistic coevolution between bacteria and bacteriophages that lead to success or failure of phage therapy. Here, we review how the animal host could influence phage resistance and its consequence on the efficacy of phage therapy. We also discuss the value of *in vitro* assays to anticipate phage resistance dynamics taking place during *in vivo* treatments with the aim to provide personalized treatment.

## Introduction

Antibiotic resistance is a major threat for public health worldwide, exposing human populations to an increased risk of therapeutic failures (1). Yearly deaths are expected to rise to ten million globally by 2050 if no major novel treatment becomes available (2). In the current context of low discovery rate of new antibiotics, phage therapy is gaining weight as a solution against MDR bacteria (3). However, beside case-series and few randomized controlled trials (RCT), little data are currently available regarding the clinical efficacy of bacteriophages (phages) (4).

Bacteria and phages coexist and coevolve in the environment including within animals. The antagonistic nature of their relationships has been the subject of many studies that have uncovered a large portfolio of molecular mechanisms of bacterial defences and phage counter defences systems (5). Owing the appropriate set of genes, bacteria have the ability to interrupt every step of phage infection cycle, from the adsorption of the viral particle to the release of progenies (6). While a first wave of discovery of bacterial defences mechanisms, such as restriction-modification systems, encompasses the golden age of phage research from the 50's to the 80's, we are currently experiencing a second wave that started with Crispr/Cas systems and that is amplifying with the intense *in silico* search of novel defence systems, some being experimentally validated (7–14).

Despite these diverse and numerous defence systems, many treatments of experimental infections support the efficacy of phage therapy. Interestingly, these proofs of concept studies

have often ignored the eventual issue of the selection of phage-resistant bacteria. A possible explanation lies in the role of the animal host immune system that is synergistically acting against bacteria whether they are susceptible or resistant to phages (15). Alternatively or complementarily, reports have shown that phage-resistant bacteria carry such a fitness cost (ie. loss of virulence) that they are unable to jeopardize the overall efficacy of the treatment (16–18). In a retrospective analysis of human treatments provided over several years in Poland authors have reported that phage resistance varied from 17% to 85% when phages targeting *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, respectively, were used (19). Lebeaux et al. reported in a case report that mechanisms of phage resistance were mutation (20). Moreover, in a review of experimental models, Oeschlin showed also that phage resistance is not a rare event (21). Confronted to the issue, the monitoring, analysis and exploitation of phage resistance for improving the success of treatments has been previously discussed and reviewed (22–24).

Here, we review recent clinical case reports of phage therapy (n=14) that included the study of phage resistance. In addition, we collected 11 recent preclinical studies of phage therapy targeting acute extra-intestinal infections and that monitored emergence of phage resistance (Figure 1). We highlight the potential role of the animal host in the selection of phage resistant clones and examine the consequence of phage resistance on the outcome of treatments. Based on identified phage resistance mechanisms, we then discuss the value of *in vitro* tests to predict which of those are taking place *in vivo* and how this information could be useful for phage therapy.

### **The immunophage synergy underlies the success of phage therapy despite phage resistance**

The success of a phage treatment relies on the intrinsic lytic properties of therapeutic phages, the probability of encountering the targeted bacteria and the synergistic antibacterial action with the immune system. The preponderance of this immunophage synergy was observed when the phage treatment of an acute pneumonia by *Pseudomonas aeruginosa* failed in immunocompromised mice (15). This failure was caused by the uncontrolled growth of phage resistant bacteria that otherwise are eliminated by the immune system as predicted (25). These experiments took advantage of an *in vivo* imaging tool to measure and quantify the real time kinetics of phage therapy treatments (26). More recently, a pharmacometric study assessing the dose and the route of administration to cure a lethal murine pneumonia induced by a pathogenic strain of *Escherichia coli* relies on the same imaging tool to develop a mathematical model that emphasizes the critical role of a refractory bacterial population, including bacteria inaccessible and/or bacteria resistant to phages, in the therapeutic outcome in immunocompetent animals (27). These studies demonstrate that during phage therapy tripartite interactions between phages, bacteria and the host take place. It remains to be determined the rate at which each of the two antibacterial components is synergistically managing bacterial growth.

### **The type of phage resistance affects the bacterial clearance by the host**

During the course of an inhaled phage therapy for treating a *P. aeruginosa* pneumonia in mice, Chang et al. reported that the phage resistance rate increased with the phage dose (30% for MOI 4, 74% for MOI 250, and 90% for MOI 25000), while bacterial loads in the lungs at 24 h post-treatment remained similar (1.3-1.9 log<sub>10</sub>) suggesting that phage resistant clones grew in the lungs as well as the wild type strain (28). Phenotypes associated to the phage resistant clones include increased susceptibility to ciprofloxacin, impaired twitching motility, and reduced blue-green pigment production, suggesting that several resistance mechanisms could be involved. Moreover, the level of cytokines in lungs 24 h post-treatment gradually decreased with increase phage dose, which suggest that phage-resistant bacteria are less pro-inflammatory than the parental strain, which in turn suggest that they could eventually persist longer by not being as rapidly eliminated by the immune response than the wild type strain. These data contrast to several reports showing that phage resistant bacteria display reduced virulence and are then outfitted to persist at the site of infection (21, 29–32). Indeed, many receptors used by phages (LPS, pili, flagella, capsules...) are also major virulence factors, sometimes-even essentials for the pathogenic trait of bacteria (33). However, the diversity of phage resistance traits has also been reported to be linked to the conditions of selection (34, 35). Moreover, a recent study by Gaborieau et al. (36) supports the above interpretation of the study by Chang et al., yet by adding another layer of complexity. Indeed, these authors found during an experimental phage therapy study that an *E. coli* strain become resistant to a single phage by mutations affecting either the LPS of the K15 capsule. While the LPS mutants have lost their virulence, the K15 capsule mutants kept an intact virulence trait (assessed in mice), showing that during the course of a treatment phage resistant clones with opposite fitness costs can be selected. Therefore, to which extent the selection of phage resistant clones temporally coincide with the immunophage synergy process will be key in the overall success or failure of the treatment.

### **The host responses to phages during treatment**

In contrast to a single phage dose often used in experimental infections, several administrations are provided during human treatments. Such repeated doses culminated with the intravenous administration of phages twice a day over several months to manage a *Mycobacterium abscessus* infection in a lung-transplanted cystic fibrosis patient (37). Interestingly, no phage resistance emerged during this treatment as well others still targeting *M. abscessus*, showing that phage resistance is not always observed over long periods of treatment. Interestingly, the same phage treatment was applied to another patient, not immunosuppressed during which authors noted the production of neutralizing antibodies leading to stop phage administration (38). Additional phage treatments of mycobacterial infections on 20 patients led to observed that neutralizing antibodies are not systematically detected and are not significantly associated with treatment failures (39). The observation that neutralizing antibodies to phages can be detected without jeopardizing the outcome of

the treatment is an encouraging data as treatments often last long enough to build such response. However, it raises the broader question on how the host immune response deals with phages in general and in particular during treatment. The difference between these two conditions lies in one hand on the relatively large amount of one or a few phages compared on the other hand to the low amount of broad diversity of phages present in human associated microbiota. The direct interaction between phages and immune cells, in absence of bacteria, has been studied *in vitro* and *in vivo* and reviewed, but to date no conclusive general observation could be drawn, which probably reflects the broad diversity of structural proteins entering in the composition of viral particles (40). A recent case report provided a large overview of the immune response during a phage treatment targeting *P. aeruginosa* (chronic osteoarticular infection) using transcriptomics from whole blood samples over time (41). These data revealed that most of the affected genes relate to the immune response to the bacteria including those involved in autophagy, while few belong to intracellular viral trafficking. Based on these data, authors advocate that phages drive globally a positive immunomodulatory effect while they kill bacteria over time. Altogether, these case reports support deeper investigations on the mechanistic role of the immune response during phage treatment. Within the phage resistance focus of this review, it must be mentioned that any significant impact of the immune response on the density of either bacteria or/and phages would potentially affect the emergence rate of phage resistance.

### **Phage resistance mutations from *in vitro* and *in vivo* conditions converge towards the same pathways**

Since environmental conditions shape the dynamics of phage bacteria interactions, it is anticipated that during phage therapy the conditions for the selection of phage resistant clones would be different to well-controlled *in vitro* conditions in the laboratory. Salazar et al. explored the arm-race evolution of an *E. coli* phage/bacterium couple in a murine model of bacteremia and in solid medium *in vitro*. Phage resistant clones emerged in both conditions and their genome sequence revealed that the 21 resistant clones presented a mutation located in the LPS biosynthesis pathway and additionally 10% of them had mutations in the porin OmpA (30). Similarly, phage resistant clones of the *A baumannii* strain AB900 challenged by phage  $\phi$ FG02 during a bacteremia model or a co-culture *in vitro* displayed mutations only in the K genes coding for the capsule. Interestingly, a strong convergence towards one gene was also observed as five out of eight resistant clones isolated from eight mice targeted *gtr29*, which was previously identified from *in vitro* condition (31). An original study followed the parallel evolution of *P. aeruginosa* subjected to phage treatments in a single patient (intranasal decolonization during 5 days) and in rich medium *in vitro* during 12 days (42). Phage treatments were similar in both conditions with a daily phage application. Phage resistance followed comparable dynamics, with similar rates associated with trade-offs on bacterial virulence (assessed in a wax moth larvae model) or growth rate. The analysis of the genomes of phage resistant clones revealed that 62% of mutations *in vitro* were also found *in vivo*, of which 77% were *de novo* mutations. These mutations occurred at high frequency in the same

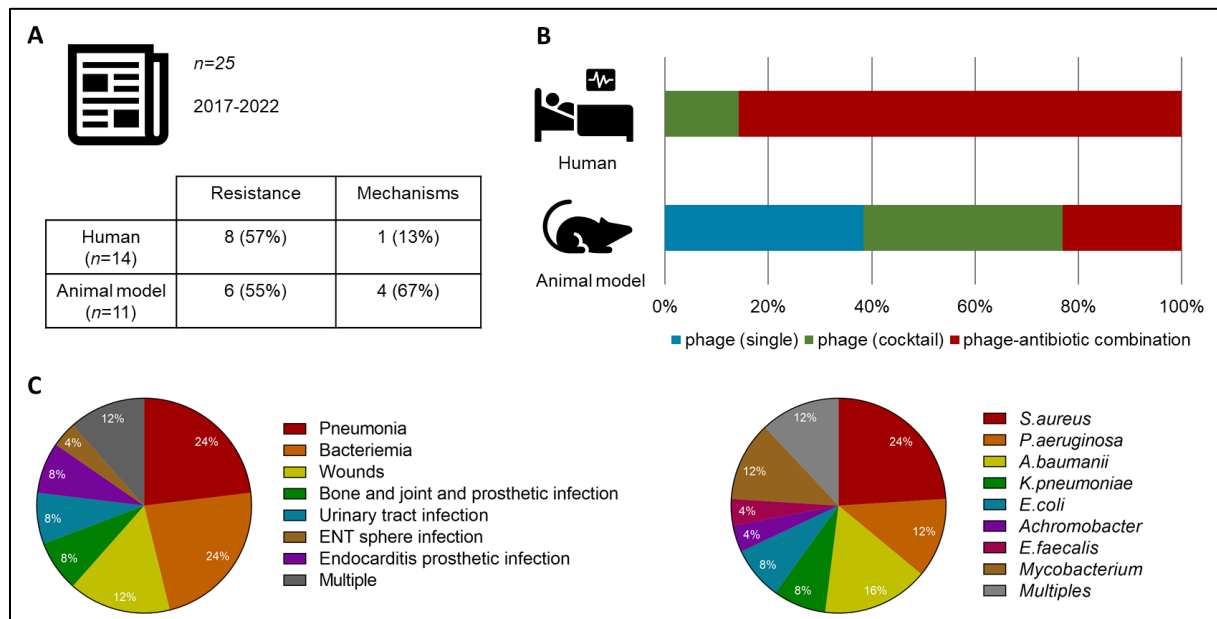
genes *in vitro* and *in vivo* (30% for *flgL*, 45% for *mutS*, 50% for *mreC*, 30% for *mreD*=30% and 40% for *pilB*) (42). Finally, a study of more than 50 phage resistant clones isolated from animals (murine pneumonia) 24 h post-phage treatment and from *in vitro* liquid medium confirmed the convergence reported above as mutations affected only the LPS and the K15 capsule biosynthetic pathways, independently of their origin of isolation (36). The rate of emergence of these resistant was faster *in vitro* than *in vivo* and their fitness costs evaluated by their growth rate and their resistance to phagocytosis (amoeba model) could not distinguish neither their origin (*in vitro* vs. *in vivo*) nor the mutated pathway (LPS vs. K15 capsule). Interestingly, these authors found that some but not all phage-resistant clones affected in the same pathway were susceptible to other phages that are unable to infect the ancestral bacteria. This observation, also reported by Gordillo Altamirano et al. (31), offers an opportunity to build phage cocktails based on the information collected from phage resistant clones.

### **Perspectives**

The recent clinical reports of compassionate phage treatments are increasingly including the monitoring of phage resistance. This is necessary and should be systematically considered during future trials as it informs on the coevolutionary dynamics taking place *in vivo*. Based on a vast literature reporting the characterization of phage resistance in laboratory conditions, this naturally occurring phenomenon is undoubtedly taking place during phage therapy treatment. However, the emergence of phage resistance does not systematically preclude the positive outcome of treatments. Here, the nature of mutations will have a major impact on the behaviour of phage resistant clones that could either take over the susceptible population and worsen the clinical outcome, or could be rapidly eliminated to the benefit of the patient. These opposite outcomes depend in part also on the immune response available to support the management of pathogenic bacteria through immunophage synergy. The recent reports reviewed here have shown that *in vitro* selected phage resistant clones displayed a mutational convergence with *in vivo* selected clones. We then anticipate that the characterization of each putative therapeutic phage will shortly include the sequencing of phage resistant clones selected *in vitro*. Moreover, these resistant clones should also be further exploited to determine their susceptibility to other phages. Altogether these data incorporated in public databases will help guiding the choice of phages to be assembled into therapeutic cocktails (43). Therefore, the mutational convergence between *in vitro* and *in vivo* conditions argues against a direct role of the immune system on the nature of the selection of phage resistant clones. However, the impact of the immune system on the density of bacterial or/and phage populations certainly affects the rate of selection of phage resistant clones. Finally, most of the current clinical treatments are provided in combination of antibiotics. When bacterial targets of antibiotics are involved in phage infection it has been observed that phage resistant clones display either higher or lower susceptibility to antibiotics (44, 45). The exploitation of the re-sensitization of bacteria to antibiotics by the use of phages has been recently discussed (24). The expected benefit of the combination of phages with other antibacterials should



provide a more rapid decrease of the bacterial load that will ultimately accelerate the control of the infection by the immune response (46).



**Figure 1.** Phage resistance topic during phage therapy in 25 studies published since 2017. **A.** Number of studies interested in phage resistance and proportion of resistance occurrence and mechanisms characterization; **B.** Antibacterial treatments; **B.** Infection models; **C.** Bacterial species.

## References

1. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E, Johnson SC, Browne AJ, Chipeta MG, Fell F, Hackett S, Haines-Woodhouse G, Hamadani BHK, Kumaran EAP, McManigal B, Agarwal R, Akech S, Albertson S, Amuasi J, Andrews J, Aravkin A, Ashley E, Bailey F, Baker S, Basnyat B, Bekker A, Bender R, Bethou A, Bielicki J, Boonkasidecha S, Bukosia J, Carvalho C, Castañeda-Orjuela C, Chansamouth V, Chaurasia S, Chiurchiù S, Chowdhury F, Cook AJ, Cooper B, Cressey TR, Criollo-Mora E, Cunningham M, Darboe S, Day NPJ, Luca MD, Dokova K, Dramowski A, Dunachie SJ, Eckmanns T, Eibach D, Emami A, Feasey N, Fisher-Pearson N, Forrest K, Garrett D, Gastmeier P, Giref AZ, Greer RC, Gupta V, Haller S, Haselbeck A, Hay SI, Holm M, Hopkins S, Iregbu KC, Jacobs J, Jarovsky D, Javanmardi F, Khorana M, Kissoon N, Kobeissi E, Kostyanev T, Krapp F, Krumkamp R, Kumar A, Kyu HH, Lim C, Limmathurotsakul D, Loftus MJ, Lunn M, Ma J, Mturi N, Munera-Huertas T, Musicha P, Mussi-Pinhata MM, Nakamura T, Nanavati R, Nangia S, Newton P, Ngoun C, Novotney A, Nwakanma D, Obiero CW, Olivas-Martinez A, Olliaro P, Ooko E, Ortiz-Brizuela E, Peleg AY, Perrone C, Plakkal N, Ponce-de-Leon A, Raad M, Ramdin T, Riddell A, Roberts T, Robotham JV, Roca A, Rudd KE, Russell N, Schnall J, Scott JAG, Shivamallappa M, Sifuentes-Osornio J, Steenkeste N, Stewardson AJ, Stoeva T, Tasak N, Thaiprakong A, Thwaites G, Turner C, Turner P, Doorn HR van, Velaphi S, Vongpradith A, Vu H, Walsh T, Waner S, Wangrangsimakul T, Wozniak T, Zheng P, Sartorius B, Lopez AD, Stergachis A, Moore C, Dolecek C, Naghavi M. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 399:629–655.
2. ACG Interagency Coordination Group on Microbial Resistance. No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections. Report to the secretary general of The United Nations. 2019. Available at : [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections-en.pdf?sfvrsn=5b424d7\\_6&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections-en.pdf?sfvrsn=5b424d7_6&download=true).
3. Theuretzbacher U, Outterson K, Engel A, Karlén A. 2020. The global preclinical antibacterial pipeline. *Nat Rev Microbiol* 18:275–285.

4. Kwiatek M, Parasion S, Nakonieczna A. 2020. Therapeutic bacteriophages as a rescue treatment for drug-resistant infections – an in vivo studies overview. 4. *J Appl Microbiol* 128:985–1002.
5. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. 5. *Nat Rev Microbiol* 8:317–327.
6. Tal N, Sorek R. 2022. SnapShot: Bacterial immunity. *Cell* 185:578-578.e1.
7. Bernheim A, Sorek R. 2020. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. 2. *Nat Rev Microbiol* 18:113–119.
8. Bernheim A, Millman A, Ofir G, Meitav G, Avraham C, Shomar H, Rosenberg MM, Tal N, Melamed S, Amitai G, Sorek R. 2021. Prokaryotic viperins produce diverse antiviral molecules. 7840. *Nature* 589:120–124.
9. Doron S, Melamed S, Ofir G, Leavitt A, Lopatina A, Keren M, Amitai G, Sorek R. 2018. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. 6379. *Science* 359:eaar4120.
10. 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. 2. *EMBO J* 34:169–183.
11. 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. 7780. *Nature* 574:691–695.
12. Millman A, Bernheim A, Stokar-Avihail A, Fedorenko T, Voichek M, Leavitt A, Oppenheimer-Shaanan Y, Sorek R. 2020. Bacterial Retrons Function In Anti-Phage Defense. 6. *Cell* 183:1551-1561.e12.
13. Ofir G, Herbst E, Baroz M, Cohen D, Millman A, Doron S, Tal N, Malheiro DBA, Malitsky S, Amitai G, Sorek R. 2021. Antiviral activity of bacterial TIR domains via immune signalling molecules. 7887. *Nature* 600:116–120.
14. Tal N, Millman A, Stokar-Avihail A, Fedorenko T, Leavitt A, Melamed S, Yirmiya E, Avraham C, Brandis A, Mehlman T, Amitai G, Sorek R. 2022. Bacteria deplete deoxynucleotides to defend against bacteriophage infection. *Nat Microbiol* 7:1200–1209.
15. Roach DR, Leung CY, Henry M, Morello E, Singh D, Di Santo JP, Weitz JS, Debarbieux L. 2017. Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. *Cell Host Microbe* 22:38-47.e4.
16. Smith HW, Huggins MB. 1983. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J Gen Microbiol* 129:2659–2675.
17. Smith HW, Huggins MB. 1982. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J Gen Microbiol* 128:307–318.
18. Pouillot F, Chomton M, Blois H, Courroux C, Noelig J, Bidet P, Bingen E, Bonacorsi S. 2012. Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by a clone O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* strain producing CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother* 56:3568–3575.
19. Międzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Szufnarowski K, Pawełczyk Z, Rogóż P, Kłak M, Wojtasik E, Górski A. 2012. Clinical Aspects of Phage Therapy, p. 73–121. *In Advances in Virus Research*. Elsevier.
20. Lebeaux D, Merabishvili M, Caudron E, Lannoy D, Van Simaey L, Duyvejonck H, Guillemain R, Thumerelle C, Podglajen I, Compain F, Kassis N, Mainardi J-L, Wittmann J, Rohde C, Pirnay J-P, Dufour N, Vermeulen S, Gansemans Y, Van Nieuwerburgh F, Vanechoutte M. 2021. A Case of Phage Therapy against Pandrug-

- Resistant *Achromobacter xylosoxidans* in a 12-Year-Old Lung-Transplanted Cystic Fibrosis Patient. *Viruses* 13:60.
21. Oechslin F. 2018. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses* 10:E351.
  22. Cohan FM, Zandi M, Turner PE. 2020. Broadscale phage therapy is unlikely to select for widespread evolution of bacterial resistance to virus infection. *Virus Evol* 6:veaa060.
  23. Rohde C, Resch G, Pirnay J-P, Blasdel BG, Debarbieux L, Gelman D, Górski A, Hazan R, Huys I, Kakabadze E, Łobocka M, Maestri A, Almeida GM de F, Makalatia K, Malik DJ, Mašlačňová I, Merabishvili M, Pantucek R, Rose T, Štveráková D, Van Raemdonck H, Verbeken G, Chanishvili N. 2018. Expert Opinion on Three Phage Therapy Related Topics: Bacterial Phage Resistance, Phage Training and Prophages in Bacterial Production Strains. *Viruses* 10:178.
  24. Torres-Barceló C, Turner PE, Buckling A. 2022. Mitigation of evolved bacterial resistance to phage therapy. *Curr Opin Virol* 53:101201.
  25. Leung CYJ, Weitz JS. 2017. Modeling the synergistic elimination of bacteria by phage and the innate immune system. *J Theor Biol* 429:241–252.
  26. Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, Grossi O, Balloy V, Touqui L. 2010. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Infect Dis* 201:1096–1104.
  27. Delattre R, Seurat J, Haddad F, Nguyen T-T, Gaborieau B, Kane R, Dufour N, Ricard J-D, Guedj J, Debarbieux L. 2022. Combination of in vivo phage therapy data with in silico model highlights key parameters for pneumonia treatment efficacy. *Cell Rep* 39.
  28. Chang RYK, Chow MYT, Wang Y, Liu C, Hong Q, Morales S, McLachlan AJ, Kutter E, Li J, Chan H-K. 2022. The effects of different doses of inhaled bacteriophage therapy for *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections in mice. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 28:983–989.
  29. Egado JE, Costa AR, Aparicio-Maldonado C, Haas P-J, Brouns SJJ. 2021. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiol Rev* 46:fuab048.
  30. Salazar KC, Ma L, Green SI, Zulk JJ, Trautner BW, Ramig RF, Clark JR, Terwilliger AL, Maresso AW. 2021. Antiviral Resistance and Phage Counter Adaptation to Antibiotic-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *mBio* 12:e00211-21.
  31. Gordillo Altamirano FL, Kostoulas X, Subedi D, Korneev D, Peleg AY, Barr JJ. 2022. Phage-antibiotic combination is a superior treatment against *Acinetobacter baumannii* in a preclinical study. *EBioMedicine* 80:104045.
  32. Engeman E, Freyberger HR, Corey BW, Ward AM, He Y, Nikolich MP, Filippov AA, Tyner SD, Jacobs AC. 2021. Synergistic Killing and Re-Sensitization of *Pseudomonas aeruginosa* to Antibiotics by Phage-Antibiotic Combination Treatment. *3. Pharmaceuticals* 14:184.
  33. Hantke K. 2020. Compilation of *Escherichia coli* K-12 outer membrane phage receptors - their function and some historical remarks. *FEMS Microbiol Lett* 367:fnaa013.
  34. Markwitz P, Olszak T, Gula G, Kowalska M, Arabski M, Drulis-Kawa Z. 2021. Emerging Phage Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Is Accompanied by an Enhanced Heterogeneity and Reduced Virulence. *Viruses* 13:1332.

35. van Houte S, Ekroth AKE, Broniewski JM, Chabas H, Ashby B, Bondy-Denomy J, Gandon S, Boots M, Paterson S, Buckling A, Westra ER. 2016. The diversity-generating benefits of a prokaryotic adaptive immune system. *Nature* 532:385–388.
36. Gaborieau B, Delattre R, Adiba S, Clermont O, Denamur E, Ricard J-D, Debarbieux L. 2022. Variable effects on virulence of bacteriophage resistance mechanisms in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *bioRxiv* 2022.09.01.506217; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.09.01.506217>
37. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, Gilmour KC, Soothill J, Jacobs-Sera D, Schooley RT, Hatfull GF, Spencer H. 2019. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med* 25:730–733.
38. Dedrick RM, Freeman KG, Nguyen JA, Bahadirli-Talbott A, Smith BE, Wu AE, Ong AS, Lin CT, Ruppel LC, Parrish NM, Hatfull GF, Cohen KA. 2021. Potent antibody-mediated neutralization limits bacteriophage treatment of a pulmonary *Mycobacterium abscessus* infection. *Nat Med* 27:1357–1361.
39. Dedrick RM, Smith BE, Cristinziano M, Freeman KG, Jacobs-Sera D, Belessis Y, Whitney Brown A, Cohen KA, Davidson RM, van Duin D, Gainey A, Garcia CB, Robert George CR, Haidar G, Ip W, Iredell J, Khatami A, Little JS, Malmivaara K, McMullan BJ, Michalik DE, Moscatelli A, Nick JA, Tupayachi Ortiz MG, Polenakovik HM, Robinson PD, Skurnik M, Solomon DA, Soothill J, Spencer H, Wark P, Worth A, Schooley RT, Benson CA, Hatfull GF. 2022. Phage Therapy of *Mycobacterium* Infections: Compassionate-use of Phages in Twenty Patients with Drug-Resistant *Mycobacterial* Disease. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* ciac453.
40. Van Bellegem JD, Dąbrowska K, Vaneechoutte M, Barr JJ, Bollyky PL. 2018. Interactions between Bacteriophage, Bacteria, and the Mammalian Immune System. *Viruses* 11:E10.
41. Khatami A, Lin RCY, Petrovic-Fabijan A, Alkalay-Oren S, Almuzam S, Britton PN, Brownstein MJ, Dao Q, Fackler J, Hazan R, Horne B, Nir-Paz R, Iredell JR. 2021. Bacterial lysis, autophagy and innate immune responses during adjunctive phage therapy in a child. *EMBO Mol Med* 13:e13936.
42. Castledine M, Padfield D, Sierocinski P, Soria Pascual J, Hughes A, Mäkinen L, Friman V-P, Pirnay J-P, Merabishvili M, de Vos D, Buckling A. 2022. Parallel evolution of *Pseudomonas aeruginosa* phage resistance and virulence loss in response to phage treatment in vivo and in vitro. *eLife* 11:e73679.
43. Lamy-Besnier Q, Brancotte B, Ménager H, Debarbieux L. 2021. Viral Host Range database, an online tool for recording, analyzing and disseminating virus-host interactions. *Bioinforma Oxf Engl* btab070.
44. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. 2016. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. 1. *Sci Rep* 6:26717.
45. Burmeister AR, Fortier A, Roush C, Lessing AJ, Bender RG, Barahman R, Grant R, Chan BK, Turner PE. 2020. Pleiotropy complicates a trade-off between phage resistance and antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:11207–11216.
46. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, Barr JJ, Reed SL, Rohwer F, Benler S, Segall AM, Taplitz R, Smith DM, Kerr K, Kumaraswamy M, Nizet V, Lin L, McCauley MD, Strathdee SA, Benson CA, Pope RK, Leroux BM, Picel AC, Mateczun AJ, Cilwa KE, Regeimbal JM, Estrella LA, Wolfe DM, Henry MS, Quinones J, Salka S, Bishop-Lilly KA, Young R, Hamilton T. 2017. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00954-17.