

**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 clefs :** 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).

**Key words:** Bacteriophage, *Escherichia coli*, Phage-therapy, Resistance, Pneumonia